



LA SHARKA TIPO *MARCUS* (M), UNA GRAVE ENFERMEDAD DEL MELOCOTONERO

M. Cambra, N. Capote, M.C. Martínez y M.T. Gorris

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Apartado Oficial. 46113 Moncada (Valencia)

RESUMEN

Plum pox virus (PPV) causa la enfermedad de la sharka en frutales de hueso. Se trata de la enfermedad viral más grave del albaricoquero y ciruelo y también del melocotonero, cuando están presentes ciertos aislados del virus denominados *Marcus* (M) o tipos recombinantes con M (Rec). En España sólo se han dispersado aislados comunes o D del virus, pero existe riesgo real de introducción de aislados M agresivos en melocotonero, que podrían incidir gravemente en la producción temprana española. De hecho, un foco de PPV-M fue detectado y erradicado en Aragón en 2002. Los aislados *Marcus* se están dispersando por la cuenca del Mediterráneo y tienen una incidencia importante en Italia y Francia, países con los que se mantiene un frecuente tráfico de material vegetal. La precaución y la vigilancia de fruticultores, viveristas y técnicos, debiera poder evitar la introducción y dispersión de aislados agresivos PPV-M en España. Se dispone técnicamente de sistemas de diagnóstico específicos que permiten la detección específica de cepas *Marcus* de forma fiable. Estos métodos, disponibles comercialmente, han sido transferidos a los Servicios de Sanidad Vegetal de las distintas Comunidades Autónomas.

INTRODUCCIÓN

La sharka (viruela en lengua eslava) es la enfermedad más grave del albaricoquero y ciruelo y también del melocotonero, cuando están presentes ciertos aislados del virus conocido internacionalmente como *Plum pox virus* (PPV). La enfermedad es grave, no sólo por la importancia de las pérdidas económicas que produce, sino también por tratarse del único virus de frutales de hueso que se dispersa de forma natural por pulgones. Este hecho obliga a tomar medidas drásticas en los viveros de países que posean la enfermedad y a precauciones especiales para evitar su introducción en otras zonas. El PPV está considerado como virus de cuarentena en la Unión Europea (UE), por lo que el movimiento de material vegetal de zonas con árboles infectados, está sujeto a controles.

La enfermedad fue descrita por vez primera en Bulgaria en 1917 en ciruelo europeo y en 1933 en albaricoquero. Desde entonces se ha dispersado por toda Europa y por la mayoría de países del Mediterráneo. Fuera de este ámbito, ha sido detectada en algunos países de América como Chile, Estados Unidos, Canadá y muy recientemente en Argentina.

TIPOS DEL VIRUS Y SINTOMATOLOGÍA

Los aislados del virus se pueden agrupar en cuatro tipos, que difieren en sus características biológicas, epidemiológicas, serológicas y/o moleculares: tipo Dideron (D) o común, tipo Marcus (M) agresivo en melocotonero, tipo El Amar (EA) de origen egipcio y tipo Cerezo (C). Recientemente se han descrito dos nuevos tipos de PPV: tipo recombinante entre D y M (Rec), y tipo W, descrito en Canadá. Los tipos D, M y Rec son mayoritarios, siendo la incidencia del resto escasa y muy local.

La severidad de la enfermedad varía entre países y zonas según los tipos de PPV presentes, las condiciones climáticas y epidemiológicas, la sensibilidad de las variedades utilizadas y las medidas de control adoptadas.

Los síntomas de la enfermedad en frutales de hueso, dependen del aislado del virus. Los aislados comunes o tipo D pueden afectar a albaricoquero, ciruelo y melocotonero, pero no obstante los daños más graves son causados en las variedades más precoces de albaricoquero y en algunas de ciruelo europeo. Los primeros síntomas aparecen en algunas hojas en forma de anillos y manchas cloróticas en primavera. Los albaricocos y ciruelas presentan anillos hundidos y deformaciones externas que se corresponden con acumulaciones gomosas en el mesocarpio. Los frutos suelen caer precozmente y además presentan mal sabor, que los hace inservibles incluso para la industria alcoholera. Los síntomas en la piel del fruto de albaricoquero se corresponden con manchas tipo ojo de perdiz y anillos en la semilla o hueso, que son característicos de la enfermedad. Los aislados de PPV tipo D causan una sintomatología foliar muy aparente en muchas variedades de ciruelo japonés, pero sin embargo apenas inducen síntomas de anillos y deformaciones en frutos o cuando lo hacen, éstos sólo afectan al 10-15% de los mismos.

En melocotonero los síntomas foliares son fugaces y aparecen en primavera, desapareciendo con los primeros calores. Consisten en manchas, anillos y clorosis nervial (Foto 1). En frutos suelen presentarse anillos, arabescos o manchas pálidas, fácilmente visibles antes del envero y que pueden ser casi imperceptibles en madurez, en variedades de piel amarilla (Foto 2), aunque en algunas ocasiones son patentes (Foto 3); en las de piel roja suelen ser más visibles (Fotos 4, 5 y 6). Los frutos no poseen mal sabor ni caen.

Los aislados tipo M inducen los mismos daños que los D en albaricoquero, pero sin embargo, afectan con más gravedad al melocotonero y ciruelo. Los síntomas foliares son más evidentes, persistentes y frecuentes, y además en algunos cultivares de melocotonero los pétalos de las flores muestran decoloraciones (Foto 7). Los frutos de melocotonero y ciruelo se deforman, presentan anillos muy marcados y suelen caer antes de la madurez. Así pues, los aislados PPV-M son graves en el cultivo del melocotonero, albaricoquero y ciruelo, constituyendo su introducción un serio riesgo para fruticulturas que basan su potencial en la exportación de fruta temprana, ya que estas variedades presentan síntomas más acusados al desarrollarse el fruto con tem-

peraturas más moderadas. En las variedades más tardías, en las que el desarrollo del fruto se produce con temperaturas más elevadas del verano, la carga viral disminuye y los síntomas del virus se atenúan.

Los aislados de PPV tipo Rec muestran un comportamiento similar al de los M. Los tipos EA poseen una sintomatología intermedia entre los D y M pudiendo afectar al albaricoquero, ciruelo y melocotonero. Los aislados PPV-C, pueden infectar al cerezo dulce y al ácido o guindo pero aunque se ha citado que pueden deformar los frutos, es frecuente que no presenten síntomas ni siquiera foliares. El tipo W se encontró en un jardín residencial en Ontario (Canadá) infectando un ciruelo europeo que fue erradicado y se desconoce su comportamiento en otros huéspedes. Así pues, la sharka tipo D es grave en albaricoquero, la sharka tipo M, Rec y EA son graves en todos los huéspedes, y la tipo C es potencialmente grave en cerezo. No se han observado síntomas de infección natural de PPV en almendro, aunque puede ser infectado artificialmente.

DISPERSIÓN DEL VIRUS Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE AISLADOS MARCUS

El virus de la sharka se disemina a larga distancia por el tráfico de material vegetal infectado y se transmite fácilmente por injerto y multiplicación vegetativa. El virus no se transmite mecánicamente por poda o durante la recolección, ni por polen o semilla. A menor distancia, el virus es transmitido de forma no persistente por diversas especies de pulgones. En las condiciones españolas mediterráneas *Aphis spiraecola* y *A. gossypii* son los principales vectores responsables de la dispersión natural de la enfermedad.

El modo de transmisión natural no persistente, se caracteriza por un ciclo corto en el que el pulgón adquiere el virus tras breves picaduras de prueba (segundos o minutos) e inmediatamente puede transmitirlo a una nueva planta sin necesidad de un período de latencia dentro del insecto. De ahí, la ineficacia de los tratamientos anti pulgón para la reducción de la tasa de infección. Además, se ha determinado experimentalmente en Valencia que unos 10.000 pulgones visitan un árbol adulto en primavera. Estas oleadas de pulgones son imposibles de detener y, si se tiene en cuenta que un único individuo es capaz de transmitir el virus, se deduce que el control de la enfermedad es imposible mediante tratamientos fitosanitarios.

Los aislados PPV-D se transmiten naturalmente con facilidad de albaricoquero a ciruelo (europeo o japonés) y viceversa y entre dichas especies, mientras que prosperan muy lentamente, cuando lo hacen, entre cultivares de melocotonero.

Los datos de otros países, muestran que los aislados de PPV-M siguen una pauta epidemiológica muy diferente, ya que se dispersan fácilmente entre cualquier tipo de melocotonero (nectarino, chato o paraguayo, de carne amarilla o blanca, etc), además de entre albaricoqueros y ciruelos. La epidemiología de PPV-EA es bastante desconocida aunque parece ser similar a la de los de tipo M. Los aislados PPV-C pudieran dispersarse únicamente entre cerezos, aunque no se ha constatado este hecho. Se desconoce la epidemiología de los aislados tipo W. Así pues, la importancia de los tipos M radica no únicamente en la gravedad de los síntomas que provocan, sino también en la facilidad de su dispersión natural.

Los aislados agresivos del tipo M únicamente han sido detectados en Centroeuropa, Europa del Este y países mediterráneos. Así se han encontrado árboles infectados, sin que se haya logrado erradicación en:

Albania, Alemania, Bulgaria, Croacia, Eslovaquia, Francia, Grecia, Hungría, Italia, Macedonia, Montenegro, República Checa, Rumania y Serbia.

Históricamente se han detectado aislados M que han sido erradicados en Bélgica y España, donde la enfermedad fue detectada tempranamente en los focos iniciales. Así, en prospecciones visuales de rutina se detectó, en junio 2002 en Caspe (Zaragoza), la presencia de síntomas en frutos y hojas de árboles del cultivar Royal Gem, de origen desconocido. En el Centro de Protección Vegetal de Zaragoza, se detectó por métodos serológicos la presencia de PPV-M que fue confirmada por métodos serológicos y moleculares en el Laboratorio de Referencia de la Subdirección General de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación para virus de plantas leñosas en el IVIA (Valencia). Entre junio y julio de 2002, se realizó una amplia prospección individual de árboles, implicando el análisis de aproximadamente 9.200 y se comprobó la dispersión del virus a otros cultivares de melocotonero plantados en la proximidad de los focos de infección (cvs. Gladys y Calante). En aplicación del Real Decreto 1190/98 de 13 de junio de 1998, los Servicios de Sanidad Vegetal del Gobierno de Aragón procedieron a la erradicación de 6,5 ha de 'Royal Gem' y 13 ha de otros cultivares. Se continúan realizando prospecciones para asegurar la efectiva erradicación de PPV-M de la zona y vigilar la aparición de nuevos focos en otras áreas.

El éxito de esta ejemplar erradicación se debe a la actividad de los Servicios de Sanidad Vegetal de Aragón, a su celeridad en la aplicación de la normativa vigente y a la disponibilidad de métodos y reactivos específicos para la detección de PPV-M.

DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE PPV TIPO MARCUS

La observación de síntomas en pétalos de flores de algunas variedades de melocotonero así como la de síntomas foliares en primavera, constituye una seria sospecha de la presencia de aislados M. Así también, la observación de que año tras año la enfermedad avance significativamente en plantaciones de melocotonero, en las cuales se presenten síntomas en los frutos, especialmente antes del envero. No obstante, son necesarias pruebas de laboratorio para confirmar la presencia de aislados tipo M o Rec y efectuar una correcta caracterización o identificación de los mismos.

En el IVIA se han desarrollado métodos serológicos (ELISA-DASI con anticuerpos monoclonales) y moleculares (variantes de PCR con iniciadores específicos), que permiten el diagnóstico sensible e inequívoco de cualquier tipo del virus de la sharka. Estos métodos y reactivos están disponibles comercialmente y son distribuidos internacionalmente por la empresa española Durviz. Estos métodos y reactivos son los recomendados oficialmente por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (OEPP/EPPO).

Existen varios problemas para el análisis rutinario de PPV en plantas, como son la irregular distribución del virus en especies leñosas, el bajo título o carga viral del mismo en los meses de altas temperaturas, y la presencia de numerosos inhibidores, fundamentalmente compuestos fenólicos, en los frutales de hueso. Por ello, la toma de muestras debe realizarse desde la brotación en primavera recolectando hojas, flores o frutos con síntomas. En el caso de ausencia de síntomas, analizar conjuntamente como mínimo 6 hojas adul-

tas, tomadas en primavera o en otoño hasta la caída de la hoja, de distintas partes de las ramas que constituyen la estructura interna del árbol. Los análisis realizados fuera de dichos periodos son mucho menos fiables, sea cual fuere el método de análisis.

CONCLUSIONES

La presencia únicamente de aislados tipo D en España coloca a la fruticultura española en un puesto preferente para el cultivo de variedades tempranas de cualquier tipo de melocotonero. Esta situación puede cambiar si se introducen accidentalmente con material vegetal, aislados tipo M o Rec agresivos. El control rutinario de viveros debería intensificarse cuando el material vegetal proceda de países en los que están presentes dichos aislados, aunque venga acompañado del correspondiente certificado o pasaporte fitosanitario. Nunca se debería introducir material vegetal de países en los que está detectado el aislado PPV-M sin realizar un análisis previo.

La vigilancia de la presencia de síntomas en pétalos de flores y en frutos de melocotonero debería ser muy intensa. Ante cualquier síntoma en dicha especie, se deben remitir urgentemente muestras a los Servicios de Sanidad Vegetal correspondientes. La disponibilidad de reactivos de fiable detección y clasificación de aislados del virus de la sharka, aseguran en España un rápido y certero diagnóstico y la posibilidad de erradicar los primeros focos de aislados agresivos.

La colaboración entre fruticultores, viveristas y Servicios de la Administración parece esencial para luchar contra la sharka y evitar la introducción de aislados M, que fácilmente se podrían instaurar y dispersar en las condiciones españolas. El futuro del cultivo del melocotonero depende de ello, en tanto en cuanto no existan cultivares tolerantes o resistentes, empresa difícil ya que no se han localizado genes de resistencia en dicha especie.

AGRADECIMIENTOS

La actividad de investigación desarrollada para lograr la información contenida en esta exposición y los reactivos de diagnóstico selectivos ha sido financiada por proyectos nacionales INIA (SC94-035, SC98-060 y RTA03-099) y locales (IMPIVA, 89-93/1008) de la Generalidad Valenciana. La colaboración con los Drs. J.A. García (CNB-Madrid), T. Candresse (INRA-Bordeaux) y D. Boscia (Universidad de Bari, Italia) ha sido esencial. La fiabilidad de los sistemas de diagnóstico y caracterización ha sido evaluada en Acciones COST 88 y 823 y otros programas europeos (SMT4-CT98-2252) y de la OEPP.

BIBLIOGRAFÍA

- AVINENT, L., HERMOSO DE MENDOZA, A., LLACER, G. 1994. Dispersión natural de Plum Pox virus en plantaciones de frutales de hueso en Valencia. *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetales* 8, 258-263.
- BOSCIA, D., ZERAMDINI, H., CAMBRA, M., POTERE, O., GORRIS, M.T., MYRTA, A., DI TERLIZZI, B., SAVINO, V. 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *European Journal of Plant Pathology* 103, 477-480.

- CAMBRA, M., ASENSIO, M., GORRIS, M.T., PÉREZ, E., CAMARASA, E., GARCÍA, J.A., LÓPEZ-MOYA, J.J., LÓPEZ-ABELLA, D., VELA, C., SANZ, A. 1994. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non structural proteins. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 24, 569-577.
- CAMBRA, M.A., CRESPO, J., GORRIS, M.T., MARTÍNEZ, M.C., OLMOS, A., CAPOTE, N., CAMBRA, M. 2004. Detection and eradication of *Plum pox virus* Marcus type in Aragón (Spain). Acta Horticulturae 657:231-235.
- CANDRESSE, T., CAMBRA, M., DALLOT, S., LANNEAU, N., ASENSIO, M., GORRIS, M.T., REVERS, I., MACQUAIRE, G., OLMOS, A., BOSCIA, D., QUIOT, J.B., DUNEZ, J. 1998. Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. Phytopathology 88, 198-204.
- CAPOTE, N., GORRIS, M.T., MARTÍNEZ, M.C., ASENSIO, M., OLMOS, A., CAMBRA, M. 2005. Interference between D and M types of *gin* Japanese plums assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time RT-PCR. Phytopathology (in press).
- GOTTWALD, T.R., AVINENT, L., LLÁCER, G., HERMOSO DE MENDOZA, A., CAMBRA, M. 1995. Analysis of the spatial spread of sharka (*Plum Pox Virus*) in apricot and peach orchards in Eastern Spain. Plant Disease 79, 266-278.
- LÓPEZ-MOYA, J.J., FERNÁNDEZ-FERNANDEZ, M.R., CAMBRA, M., GARCÍA, J.A. 2000. Biotechnical aspects of plum pox virus. Journal of Biotechnology 76, 121-136.
- OEPP/EPPO, 2004. Diagnostic protocol for regulated pests. *Plum pox potyvirus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34, 247-256.
- OLMOS, A., CAMBRA, M., DASÍ, M.A., CANDRESSE, T., ESTEBAN, O., GORRIS, M.T., ASENSIO, M. 1997. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. Journal of Virological Methods 78, 127-137.
- OLMOS, A., CAMBRA, M., ESTEBAN, O., GORRIS, M.T., TERRADA, E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. Nucleic Acids Research 27, 1564-1565.
- OLMOS, A., BERTOLINI, E., GIL, M. CAMBRA, M. 2005. Real-time for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. Journal of Virological Methods 128, 151-155.



Foto 1. Síntomas evidentes de PPV-M en hojas de melocotonero cv. Royal Gem. Se observan manchas, anillos y clorosis nervial característicos



Foto 2. Síntomas de aislados PPV-D sobre frutos de melocotonero cv. Catherine



Foto 3. Manchas y anillos cloróticos causados por el virus de la sharka tipo D en frutos de melocotonero cv. Catherine (Foto cedida por el Dr. M.A. Cambra, Centro de Protección Vegetal de Zaragoza).



Foto 4. Manchas y anillos cloróticos causados por el virus de la sharka tipo D en frutos de melocotonero cv. Springcrest



Foto 5. Manchas y anillos cloróticos causados por el virus de la sharka tipo D en frutos de nectarino cv. Arm King



Foto 6. Síntomas causados por el virus de la sharka tipo M en frutos de melocotonero cv. Royal Gem (Foto cedida por el Dr. M. A. Cambra, Centro de Protección Vegetal de Zaragoza)



Foto 7. Síntomas de PPV-M (tipo Marcus) en pétalos de flores de melocotonero cv. Gladys. (Foto cedida por el Dr. M.A. Cambra del Centro de Protección Vegetal de Zaragoza)