

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A
Plum Pox Virus EN ALBARICOQUERO
(*Prunus armeniaca* L.),
MEDIANTE SINTOMATOLOGÍA Y RT-PCR EN
TIEMPO REAL



TESIS FIN DE MÁSTER

Antonio Pascual Font Tomás

Director Académico
Dr. Gerardo Llàcer III

Directores Experimentales
Dr. Carlos Romero Salvador
Elsa María Vera Ruiz

VALENCIA, DICIEMBRE 2009

MÁSTER OFICIAL INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL



Universidad Politécnica de Valencia

Instituto de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana



Universidad Politécnica de Madrid

Universidad Politécnica de Cataluña



EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A *Plum Pox Virus* EN ALBARICOQUERO (*Prunus armeniaca* L.), MEDIANTE SINTOMATOLOGÍA Y RT-PACR EN TIEMPO REAL

TESIS FIN DE MÁSTER

Antonio Pascual Font Tomás

Director Académico

Dr. Gerardo Llàcer Ill

Directores Experimentales

Dr. Carlos Romero Salvador

Elsa María Vera Ruiz

Instituto Valenciano de Investigaciones agrarias

Moncada (Valencia), Diciembre 2009

AGRAÏMENTS.

De nou em trobe davant d'una de les parts més boniques dels treballs fi de carrera, de les tesines de màster i de les tesis doctorals, només fa dos anys em trobava a la mateixa situació en finalitzar els meus estudis de enologia i més de 4 anys quan ho vaig fer per primera vegada, en finalitzar la ingenieria tècnica agrícola; tal vegada esta siga l'última volta, si no em donen alguna oportunitat per fer una tesi doctoral, per aquest motiu he volgut fer-ho un poc diferent d'allo que he fet anteriorment.

De moment ja vos haureu adonat que els agraiements els he escrit en la meua llengua materna, per a mi és més fàcil pensar i al mateix temps escriure el que pense, només em sap malament per la gent que no domina aquesta llengua, els demane disculpes per anticipat.

Unes fulles més avant es troba el treball de culminació de dos anys de molt d'esforç, en els quals he tingut el gust de conèixer a molta gent nova i acabar de conèixer a d'altres que han continuat presents en la meua vida, també hi ha que no estan ja entre nosaltres, però que ocuparen un lloc privilegiat a la meu vida.

Ja fa uns quants anys que em vaig apropar al món de l'agricultura, i gràcies a Antonio Font i a Rafa Ros aquesta activitat em va encisar, ells m'han ensenyat tot el que saben d'aquest món i d'altres, he après molt de les seues llisons, gràcies als dos.

Ara farà 10 anys l'equip de fruiters de l'Institut Valencià d'Investigacions Agràries, em va acollir al seu equip de treball, he d'agrair a Gerardo Llàcer, el que avui continua sent el cap del departament i director acadèmic d'aquest treball, que contara amb mi en aquell moment i que dia a dia ha ficat tot el necessari per a portar a la fi aquest treball, també tinc agraiements cap a Marisa Badenes que en tot moment ha estat tant propera per ajudar-me, no puc oblidar-me de Carlos Romero, el que és avui el meu director experimental i a qui estic molt agraït pel gran esforç d'última hora que hem hagut de fer per finalitzar aquest treball, amb ell i compartint la direcció experimental ha estat Elsa Vera, a la qual estic molt agraït per compartir amb mi els inicis experimentals d'aquest treball, molt de ànim per acabar la teua tesi.

En general estic agraït a tot l'equip de fruiters, als que encara estan, Ana, Mar, Mati, Elena, Carmen, José Miguel, Gabino. als que no estan ja com Lola, Ana Delia, Santi i alguns més, i als que han pasat per allí per un motiu o un altre. Però en especial he d'agrair als meus companys del dia a dia amb els que passe moltes hores, com son José Martínez, company de màster

també i amb el que he passat tant de temps estos dos últims anys, moltes gràcies ja que he compartit feines amb tu, en les que he après moltes coses, gràcies també a Enzo per eixos moments de rialles durant els matins tan calorosos o tan freds i com no donar les gràcies al meu gran company i amic Pepe Palanca, has segut com un germà major, un recolzament en els moments difícils, sempre has estat al meu costat.

Dos anys fa que els conec a la majoria d'ells, em referisc als meus companys i mestres del màster, ha segut una experiència molt bonica i gratificant, en la que he après molt i he fet grans amics. Estic molt agraït als mestres perquè en general han sabut transmetre'm els seus coneixements amb unes lliçons moltes vegades magistrals, també han comprés les meues limitacions i han ficat de la seua part per no deixar-me enrere. També tinc paraules d'agraïment per als meus companys de curs, sense el recolzament de tots vosaltres no ho hagués aconseguit, heu estat al meu costat i m'heu oferit sempre la vostra ajuda, moltes gràcies a tots. Però en especial he d'agrair a dos companys que han estat per damunt de tot al meu costat, en primer lloc Carles, per la seua ajuda prestada per poder finalitzar eixos exàmens d'última hora i en segon lloc moltes gràcies a Pablo que ha estat pendent de mi especialment durant aquestos dos anys.

També vull donar les gràcies al meus companys de enologia en els que encara compartixc bons moments i que han estat donant-me suport per finalitzar estos estudis, a Isabel i Alberto, a Sergi, Elvira i molt especialment a Ana que hui per hui és una gran amiga.

Però realment els més importants als que vull agrair aquest treball son la meua família. Els meus avis que sempre han estat presents, amb tota la seua saviesa. Al meu germà i a la meua tia Montse, que d'ací res estarà feta tota una advocada, ànim que queda menys. Als meus pares ja que ells han segut recolzament de tots els meus projectes de vida, sense ells res d'açò seria possible.

Però si algú es mereix tot el meu agraïment eixa es Mercé, ella ha estat fins on jo no aplegava, ha segut mare i pare dels nostres fills mentre jo acudia a classe, ha segut comprensiva amb els meus mals humors degut al cansament i ha estat de forma incondicional al meu costat.

Als meus pares i família. El meu passat.

A Mercé. El meu present.

A Toni i Carolina. El meu Futur.



ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
1.1. EI ALBARICOQUERO.	3
1.1.1. Origen.	3
1.1.2. Descripción taxonómica.	4
1.1.3. Importancia agronómica.	5
1.2. EL VIRUS DE LA SHARKA.	9
1.2.1. Aparición y distribución geográfica.	9
1.2.2. Agente causante.	9
1.2.3. Sintomatología.	9
1.2.4. Epidemiología.	9
1.2.5. Métodos de control.	12
1.2.6. Métodos de diagnóstico y detección.	12
1.3. LA SHARKA EN ESPAÑA.	13
1.3.1. Distribución e importancia.	13
1.3.2. Medidas de control adoptadas.	14
1.3.3. Mejora genética para resistencia a PPV.	14
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	19
3.1. MATERIAL VEGETAL.	20

3.2. BIOENSAYO.	21
3.3. TEST SEROLÓGICO.	27
3.4. RT-PCR EN TIEMPO REAL.	29
4. RESULTADOS.	31
5. DISCUSIÓN.	45
6 BIBLIOGRAFÍA.	50



INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN.

1.1. EL ALBARICOQUERO.

1.1.1. Origen.

En el año 2205 a. C., el Emperador Yú fundaba la dinastía china de los Hsia, bajo cuyo mandato la agricultura conoció un periodo muy floreciente. A este emperador se le atribuye la paternidad del libro sagrado Shan-hai-King, en el que se dice que algunos 'Sing' (albaricoqueros) crecen en las colinas chinas, siendo ésta la cita más antigua que se conoce sobre la especie. De hecho, los hallazgos más consistentes de ejemplares espontáneos fueron hechos en China, en las montañas cercanas a Pekín. Los frutos eran más pequeños, de un tamaño aproximado de unos 25 mm, con piel amarilla y roja, pulpa amarilla-rojiza y de sabor ácido, pero comestibles (Forte 1988).

El albaricoquero espontáneo también se puede encontrar en Turkestan en el Himalaya, en Manchuria meridional, en Mongolia sur-oriental, en China del Norte y en varias zonas del extremo oriente (Forte 1988).

Más concretamente, Vavilov (1951) describió tres centros de origen para el albaricoquero: El centro chino, que comprende las regiones montañosas del noroeste, centro y oeste de china llegando hasta la provincia de Kansu y el noroeste del Tíbet, el centro de Asia Central, que comprende el área montañosa que se extiende desde el sur de Tien-Shan hasta Kashmir, y el centro del Próximo Oriente, considerado por Vavilov como secundario, que comprende la zona montañosa que se extiende desde el noroeste de Irán hasta el Cáucaso y el centro de Turquía (figura 1).

Los albaricoqueros se extendieron desde Asia Central a la región Transcaucásica a través de Irán (Goor y Nurock 1968). Esta difusión debió ocurrir como parte de los intercambios militares, económicos y culturales que siguieron a las penetraciones de Alejandro de Macedonia dentro del Turquestán, llegando hasta el Valle de Fergana durante el siglo IV a. C. Muy probablemente la palabra 'armeniaca' con la que los griegos y romanos designaron al albaricoque significase solamente que desde aquella región, donde también se cultivaba, llegase a Grecia y después a Roma. La especie

empleó más de dos mil años para llegar a Occidente, ya que hasta comienzos de la era cristiana e incluso algún tiempo después no se tienen noticias ciertas.

Todo parece indicar que el albaricoquero llegó a España por dos caminos distintos: por el norte del Mediterráneo, a través de los romanos, en los primeros siglos después de Cristo, y por el sur del Mediterráneo, a través de los árabes, hacia el siglo VII. Sólo así se explica, según Crossa-Raynaud (1961), la diversidad de caracteres morfológicos (porte, ramificación y tamaño del fruto) y fisiológicos (necesidades de frío, época de maduración y autocompatibilidad) que se encuentra en las poblaciones autóctonas, especialmente en las de Murcia.

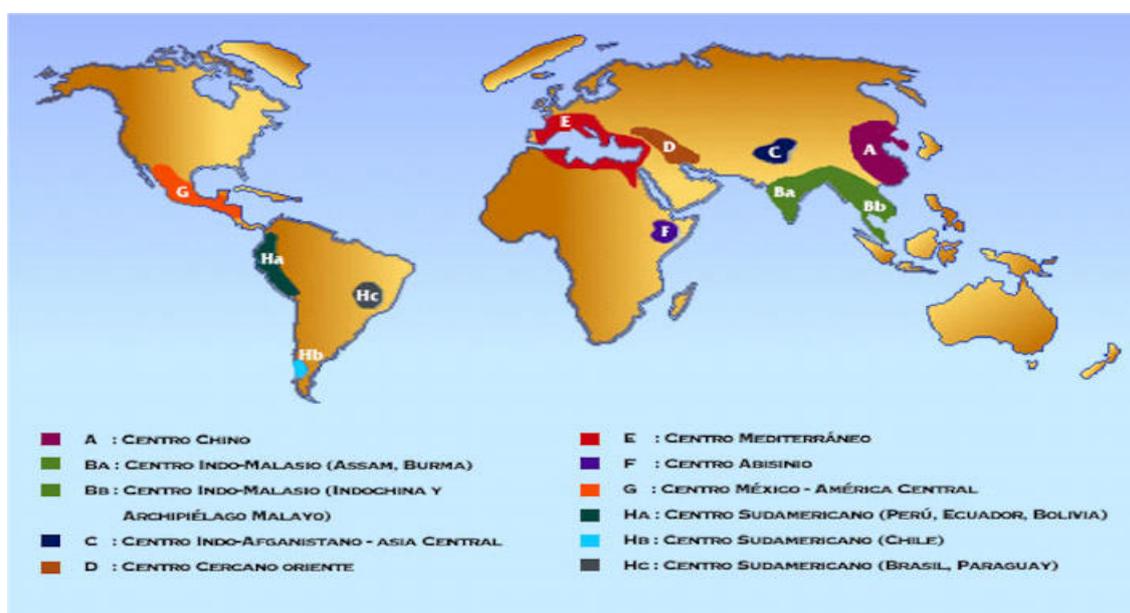


Figura 1: Centros de origen de los cultivos (Vavilov 1951).

1.1.2. Descripción taxonómica.

Según la clasificación de Rehder (1967), el albaricoquero pertenece a la familia de las Rosáceas, subfamilia *Prunoidea*, género *Prunus*, y subgénero *Prunophora*. Este género incluye alrededor de 150 especies de árboles y arbustos de hoja caduca o perenne de acuerdo con sus adaptaciones climáticas. La mayoría se encuentran en las zonas templadas de América del Norte, Este de Asia y Europa. Unas pocas de ellas se localizan en las zonas montañosas tropicales situadas al norte de Ecuador.

La mayor parte de las variedades cultivadas de albaricoquero pertenecen a la especie *Prunus armeniaca* L., esta especie es diploide ($2n = 16$), de flores solitarias, blancas o rosadas. El árbol de porte globoso, raíz pivotante, tronco erguido, corteza parda y hojas brillantes alternas, puede alcanzar entre 3 y 7 m de altura. El fruto es redondo, de 3 cm o más de diámetro, de color amarillento, y casi glabro. El hueso es liso, presentando una costilla gruesa asurcada.

1.1.3. Importancia agronómica.

En el mundo hay un total de 477.211 Ha cultivadas de albaricoquero de las cuales el 54% corresponden a países mediterráneos. La producción mundial de albaricoques ha oscilado en los últimos años alrededor de los 3 millones de toneladas, de las cuales un poco más de la mitad procede de los principales países productores, Turquía, Irán, Uzbekistán, Italia, Pakistán, Francia, Japón, Argelia, Siria, Marruecos y España (figura 2) (FAO 2007).

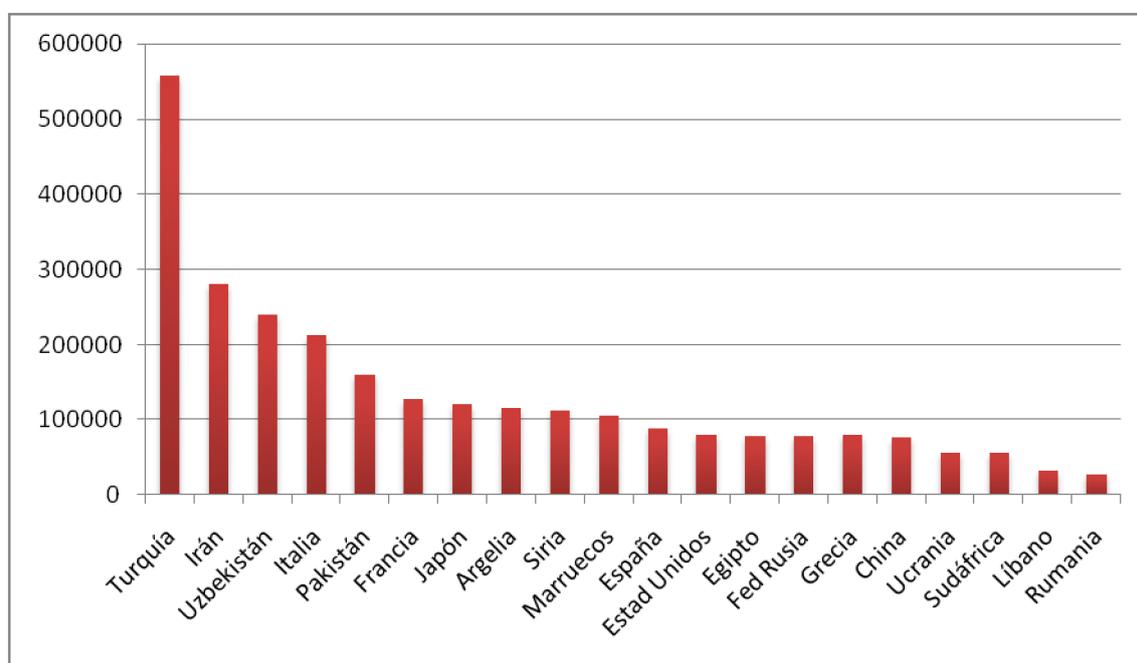


Figura 2: Producción de albaricoques de los principales países en miles de toneladas (FAO 2007).

En España, la superficie cultivada en plantación regular fue ascendiendo lentamente desde 1965 hasta 1990 de 18.000 Ha a 25.000 Ha, manteniéndose a este nivel durante toda la década siguiente. En la actualidad se encuentra alrededor de 18.300 Ha (figura 3). La producción es alternante de unos años a otros, pero según los últimos datos se sitúa en unas 88.000 toneladas anuales (figura 4), de las cuales se exporta de un 25% hasta un 40 %, dependiendo de la temporada (MARM 2008).



Figura 3: Evolución de la superficie total de albaricoquero (miles de hectáreas) en España.

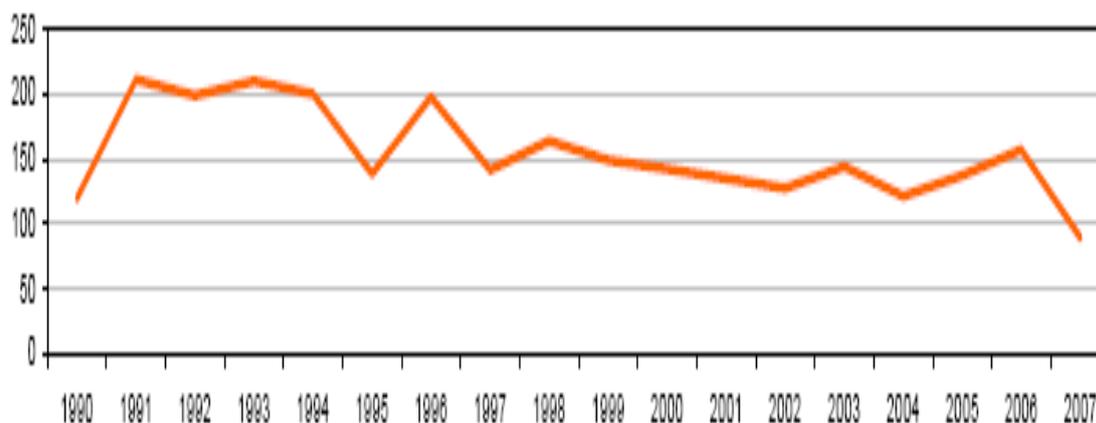


Figura 4: Evolución de la producción de albaricoque (miles de toneladas) en España.

Por comunidades autónomas, el primer lugar está ocupado por Murcia con el 54% de la superficie y casi el 65% de la producción, le sigue la Comunidad Valenciana con un 21% de la superficie y el 8% de la producción, en tercer lugar se encuentra Castilla – La Mancha, que posee un 10 % de la

superficie y un 6% de la producción (casi toda ubicada en la provincia de Albacete), mientras que Aragón se encuentra en cuarto lugar con un 5% de la superficie y un 11% de la producción. El conjunto de estas cuatro comunidades poseen el 95 % de la superficie de cultivo (figura 5) y el 90% de la producción (figura 6) total del estado español (MARM 2008).

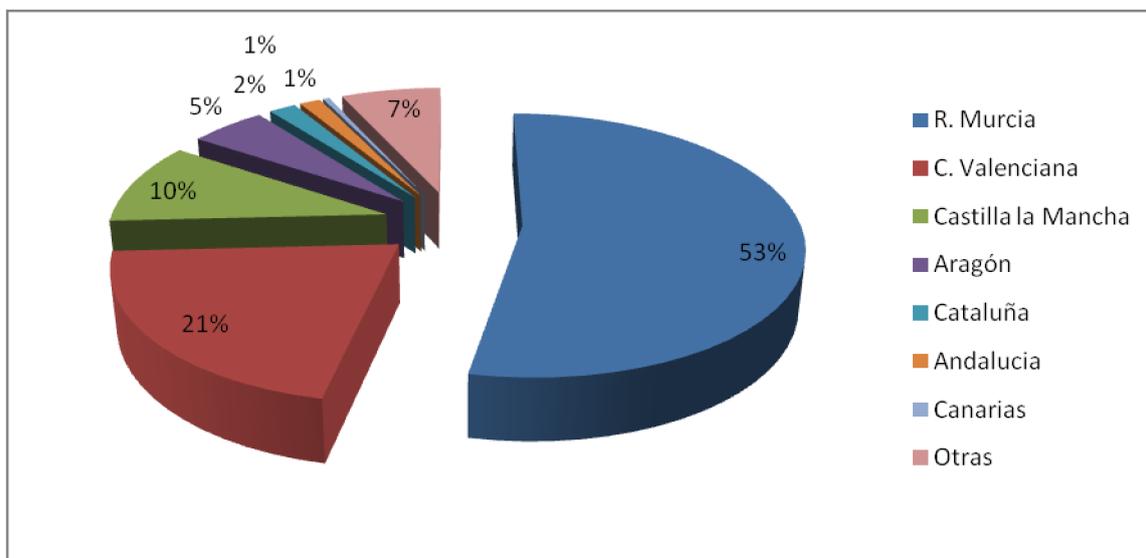


Figura 5: Distribución por Comunidades Autónomas de la superficie cultivada (%) de albaricoquero en España.

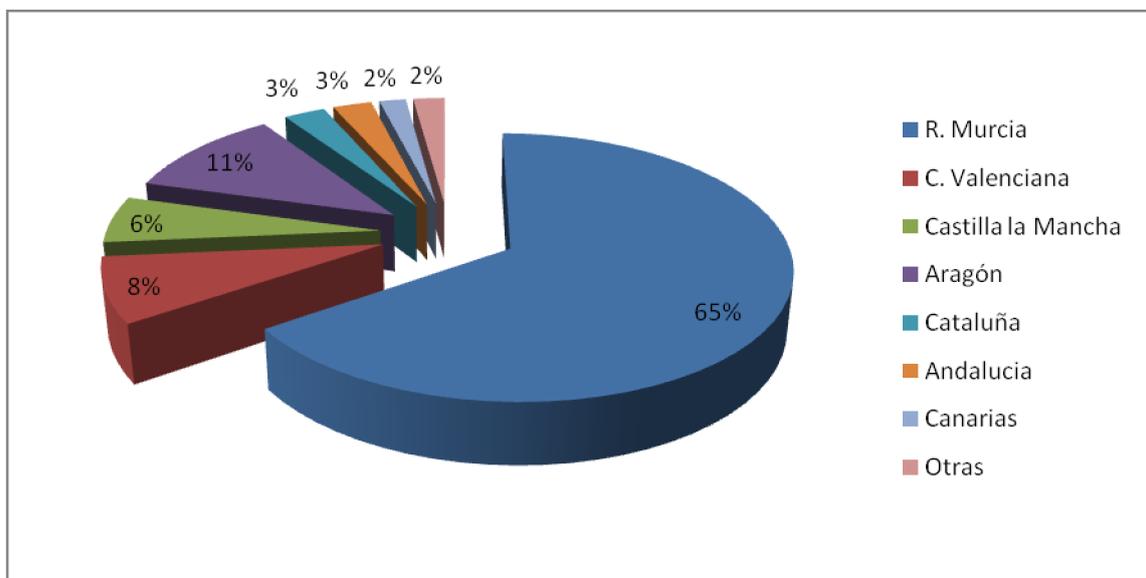


Figura 6: Distribución por Comunidades Autónomas de la producción (%) de albaricoquero en España.

Existe una clara diferencia entre comunidades en lo que respecta a la productividad por hectárea. Esto es debido a las técnicas de cultivo y sobre todo a la implantación de riego localizado en un cultivo tradicionalmente de secano, que han hecho al albaricoquero mucho más productivo en determinadas regiones (figuras 5 y 6).

Precisamente la Comunidad Valenciana produce en la actualidad 7.175 toneladas de albaricoque en unas 3.978 hectáreas de cultivo, de las cuales 2.238 Ha se encuentran en regadío y las 1.740 Ha restantes en secano. Esta circunstancia hace que sea la segunda Comunidad Autónoma en cuanto a superficie pero la tercera en cuanto a producción.

Las principales comarcas productoras son La Costera, La Ribera Alta, La Vall d'Albaida y Los Serranos en la provincia de Valencia y La Plana Alta en la provincia de Castellón de la Plana.

La producción en cada una de estas comarcas se basa en unas pocas variedades. En La Ribera Alta, el 70% de las variedades cultivadas son precoces tipo 'Ginesta', 'Palau' y 'Palabras', y el 30% restante corresponde a las variedades 'Corbató' y 'Canino' principalmente. La Vall d'Albaida es la comarca que cuenta con mayor diversidad varietal. Como variedades tempranas se cultivan 'Ginesta', 'Palau' y 'Palabras', representando un 25%, de media estación las variedades 'Mitger', 'Roig de Carlet' y 'Canino' que llegan al 60% del total y el 15% restante pertenece a la variedad tardía 'Tadeo'. Por el contrario, en la comarca de Los Serranos, el 90% de la producción se basa en una única variedad, 'Canino' (CAPA 2008).

La producción valenciana de albaricoque se destina en un 50% al consumo en fresco, de lo cual se exporta entre un 10 y un 20% a países de la Unión Europea y el 50% restante se destina a la industria (Badenes et al. 1997).

Destacar que en todas las zonas de la Comunidad Valenciana donde el cultivo del albaricoquero coincide con el cultivo de ciruelo japonés, especialmente en las comarcas de La Ribera Alta y parte de La Vall d'Albaida,

la superficie de cultivo se encuentra en una evidente regresión o prácticamente en desaparición como efecto de la gran difusión del virus de la sharka.

1.2. EL VIRUS DE LA SHARKA.

1.2.1. Aparición y distribución geográfica.

La sharka (vocablo que significa viruela en búlgaro) se describió por primera vez hacia el año 1915 en Bulgaria en ciruelos europeos, y no fue hasta 1933 cuando se detectó en albaricoqueros. Desde ese momento, la enfermedad se extendió progresivamente desde los Balcanes hasta Centroeuropa y desde allí en todas direcciones, hasta cubrir la mayor parte del continente Europeo, llegando también a algunos países de la ribera sur del Mediterráneo como Turquía, Egipto y Siria. En 1992 tuvo lugar la primera detección del virus de la sharka en el continente americano, concretamente en Chile (Roy y Smith 1994; Németh 1994). En Estados Unidos sólo hace unos años que se publicó la primera referencia sobre la sharka (Levy et al. 2000), al igual que en Canadá (Thompson et al. 2001).

1.2.2. Agente causante.

El agente patógeno causante de la sharka es un potyvirus, conocido en inglés como 'Plum Pox Virus' (PPV). Se trata de un virus de partículas filamentosas, que tienen una longitud de 680 a 900 nm y una anchura de unos 15 nm. Su genoma consiste en una única molécula de ARN de cadena simple, que se compone de 9800 nucleótidos, con un peso molecular de 3.5×10^6 daltons, posee simetría helicoidal y polaridad positiva (Laín et al. 1989; Maiss et al. 1989; Teycheney et al. 1989; Riechman et al. 1992; García et al. 1994; Rosales et al. 1998).

1.2.3. Sintomatología.

Los síntomas que PPV produce sobre los frutales de hueso aparecen especialmente sobre hojas y frutos, y su importancia depende de diferentes efectos como son: la especie frutal, la variedad, el aislado del virus y las condiciones climatológicas.

Todos los aislados estudiados en Europa hasta la aparición del PPV-Ch o Cherry podían agruparse mayoritariamente en dos tipos, un primer aislado tipo D, de Dideron, procedente de albaricoquero en el sur-oeste de Francia, y un segundo aislado, denominado tipo M, de Marcus, procedente de melocotonero del norte de Grecia. También existe una raza descrita en Egipto denominada El-Amar (Candresse y Cambra 2006).

Los aislados del tipo D, que son los que se pueden observar en albaricoquero también producen fuertes síntomas en la mayor parte de las variedades y cultivares de ciruelo europeo (*P. domestica*). Los frutos que están cercanos a la maduración presentan manchas y anillos cloróticos, que pasan a ser necróticos, y presentan una apariencia deforme. La pulpa muestra un pardeamiento y el hueso muestra manchas y anillos de color claro, especialmente en albaricoquero (figura 7). Las hojas en primavera muestran también unas manchas o bandas y anillos cloróticos, que pueden llegar a necróticos (figura 8) (Desvignes 1999).



Figura 7: Frutos de albaricoquero con síntomas de sharka.



Figura 8: Hojas de albaricoquero con síntomas de sharka.

1.2.4. Epidemiología.

Plum Pox Virus se transmite de unos árboles a otros básicamente de dos formas, una es el injerto, utilizando yemas infectadas del virus, y la otra es mediante las picaduras de pulgones (áfidos). La no utilización de material vegetal certificado (libre de virus) es la razón principal de la difusión de la enfermedad entre países. Una vez que la sharka se establece en una zona, son los pulgones los que contribuyen de una manera muy importante a su difusión en distancias cortas. El modo de transmisión es no persistente y además poco específico, lo que hace que el número de especies de áfidos capaces de actuar como vectores de PPV sea elevado. Németh (1994) cita las siguientes especies: *Aphis craccivora*, *Aphis fabae*, *Aphis spiraeicola*, *Brachycaudus cardui*, *Brachycaudus helichysi*, *Hyalopterus pruni*, *Myzus persicae*, *Myzus varians* y *Phorodn humuli*. Labonne et al. (1994) añaden las siguientes: *Aphis gossypii*, *Aphis hederiae* y *Rhopalosiphum padi*. El número de vectores crecerá conforme se ensayen más especies, aunque la eficiencia de transmisión puede variar y varía de hecho entre especies y según la cepa del virus.

1.2.5. Métodos de control.

Como sucede con todos los virus, no hay ningún tratamiento disponible para curar en el campo los árboles infectados por PPV. La protección cruzada, que se ha conseguido con otros virus por medio de la inoculación de razas débiles, tampoco se ha mostrado eficaz en el caso de la sharka. En cuanto a tratamientos aficidas para luchar contra la difusión natural del virus, son muy poco eficaces, dado el modo de transmisión no persistente. A corto plazo, el único medio de lucha disponible es el arranque sistemático de todos los árboles enfermos y la utilización de materiales sanos en todas las nuevas plantaciones. A largo plazo, la mejor solución es la obtención de variedades resistentes, adaptadas a condiciones agroclimáticas, bien sea mediante programas de mejora genética clásica, por cruzamientos (Audergon et al. 1994; Karayiannis y Mainou 1994; Polák 1994), o por medio de la producción de plantas transgénicas (Cámara Machado et al. 1994; Escalettes et al. 1994; Ravelonandro et al. 1994 y 1998; Scorza et al. 1994 y 1998).

1.2.6. Métodos de diagnóstico y detección.

El diagnóstico y la detección rutinaria del virus se ha llevado a cabo de forma tradicional mediante transmisión por injerto sobre indicadores leñosos, siendo uno de los más utilizados el melocotonero de semilla *Prunus persica* cv GF-305 cultivado en invernadero, pero también se han utilizado otros como *Prunus persica* cv Siberian C y *Prunus tomentosa* (Damsteegt et al. 1997).

Las técnicas serológicas basadas en diversas variantes del método ELISA (“Enzyme-Linked Inmuno Sorbent Assay”), son actualmente las más empleadas por sus diversas ventajas. Han sido descritos anticuerpos monoclonales que reconocen a todas las cepas del virus (D, M o C) con gran especificidad y sensibilidad, siendo aconsejables para el diagnóstico rutinario y muy útiles con fines de erradicación (Cambra y Llacer 1994; Boscia et al. 1997; Navrátil et al. 1998; Crescenzi et al. 1998). En los últimos años se han desarrollado técnicas basadas en la RT-PCR, que permiten detectar cantidades ínfimas de ARN viral (Crescenzi et al. 1994; Candresse et al. 1994; Levy y

Hadidi 1994; Krczal y Avenarius 1994; Adams et al. 1998). En la actualidad se está intentando que estos métodos basados en la RT-PCR en tiempo real se validen como métodos de análisis o cribado a gran escala (Capote et al. 2009).

1.3. LA SHARKA EN ESPAÑA.

Al final de la década de los 70, España y Portugal eran los únicos países europeos con cultivo importante de frutales de hueso donde la sharka todavía no había sido detectada. La primera detección del virus de la sharka en España tuvo lugar en junio de 1984 en plantas de ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl), cultivar 'Red Beaut', cultivadas en Sevilla que mostraron síntomas típicos de la enfermedad. A continuación, PPV fue detectado en otros ciruelos japoneses del mismo cultivar en Murcia y Valencia. Era la primera vez que el ciruelo japonés era citado como hospedante natural del virus de la sharka. Además, también se encontró en albaricoques del cultivar 'Canino' en Castellón y en melocotones del cultivar 'Rojo de Rito' en Lérida (Llácer et al. 1985; Llácer y Cambra 1986). Al investigar el origen de los árboles infectados, se descubrió que los árboles madre de 'Red Beaut' y de 'Canino' procedían del mismo vivero y estaban infectados. Probablemente PPV llegó a este vivero a través de materiales introducidos desde Francia. El albaricoquero 'Canino' procedente del mismo vivero español fue el primer origen conocido de sharka en Portugal (Louro y Corvo 1986).

1.3.1. Distribución e importancia.

El virus de la sharka ha sido detectado en todas las regiones españolas donde existe cultivo con cierta relevancia de frutales de hueso, aunque la incidencia de la enfermedad es muy variable de unas regiones a otras. Las regiones donde la sharka tiene una mayor importancia económica son aquellas donde coexiste el cultivo del albaricoquero junto con el del ciruelo japonés, como son el caso de la Comunidad de Murcia y sobre todo la Comunidad Valenciana. Entre estas dos regiones se agrupa el 75% de la superficie dedicada al cultivo del albaricoquero. En ambas comunidades se ha comprobado una difusión a gran escala de PPV desde las plantaciones de ciruelo japonés a las de albaricoquero (Avinent et al. 1993) con la siguiente particularidad, mientras que en ciruelo japonés el número de frutos deformados

que no se pueden comercializar es muy bajo, la mayoría de los frutos de albaricoquero están muy afectados para su comercialización. En consecuencia, los propietarios de ciruelos japoneses no tienen interés en arrancar sus árboles aunque estén infectados, y constituyen un foco permanente de infección para los albaricoqueros. Tanto es así que dentro de estas dos regiones las zonas donde se cultivan albaricoqueros pero no ciruelos japoneses, que suelen ser zonas del interior, donde la climatología ya no es apropiada para estos últimos, la incidencia de la enfermedad es mucho más baja.

1.3.2. Medidas de control adoptadas.

El control de PPV se basa en la erradicación de los focos de infección y en el uso de material de propagación sano. Después de la primera detección de la sharka en España, en julio de 1984, un decreto del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en enero de 1985, estableció medidas internas de cuarentena para tratar de evitar la difusión de la enfermedad de unas regiones a otras y erradicar los focos infecciosos que pudieran ser detectados en las prospecciones que se realizaron en todas las Comunidades Autónomas implicadas. A tales efectos, los servicios de Sanidad Vegetal de las nombradas Comunidades Autónomas, fueron dotados de los medios necesarios para el diagnóstico de PPV por ELISA. En las regiones más afectadas se establecieron además medidas para el arranque subvencionado de árboles infectados (decretos de las Administraciones Autonómicas de Murcia y Valencia en julio de 1988 y marzo de 1991, respectivamente). En total entre 1991 y 2008 se han arrancado casi 2.400.000 árboles, lo que ha supuesto un coste de más de 32 millones de euros en indemnizaciones. Sin embargo, pese a todo el esfuerzo realizado, la enfermedad sigue progresando.

1.3.3. Mejora genética para resistencia a PPV.

Teniendo en cuenta las gravísimas pérdidas de cosecha que este virus origina en albaricoquero, la inexistencia de métodos de lucha eficaces, la ausencia de variedades europeas resistentes y la falta de adaptación a las condiciones españolas de cultivo de las pocas variedades norte-americanas resistentes, la única forma efectiva a largo plazo de lucha contra la sharka en albaricoquero es la creación de nuevas variedades que reúnan los caracteres

de resistencia al virus y una buena adaptación agronómica y comercial. Con este fin se iniciaron en España sendos programas coordinados de mejora genética de albaricoquero en 1991 y 1993, en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), en Murcia y en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), en Moncada (Valencia) respectivamente, basados en el cruzamiento entre variedades norte-americanas resistentes a PPV y variedades autóctonas susceptibles (Egea et al. 1994; Badenes et al. 1996).

Aún siendo uno de los objetivos prioritarios de los programas de mejora genética del albaricoquero a escala mundial, el control genético del carácter de resistencia a PPV dista de estar completamente dilucidado habiendo generado una gran controversia en los últimos años. Dosba et al. (1991 y 1992) sugirieron que dos genes controlan este carácter y que la resistencia era dominante. Más tarde, Dicenta y Audergon (1998), realizaron un estudio de una familia de polinización abierta de la variedad resistente 'Stella', en la que encontraron que todas las plántulas eran resistentes. Se sugirió entonces que la resistencia a sharka podría ser dominante y homocigota para este rasgo en el cv 'Stella'. Posteriormente, Dicenta et al. (2000) estudiaron 291 descendientes de 20 combinaciones entre progenitores susceptibles y resistentes, y observaron que sus datos se adaptaban bastante bien a la hipótesis de un gen dominante. Por el contrario, Moustafa et al. (2001) y Krska et al. (2002), en el estudio de diferentes cruces de sus programas de mejora, establecieron la hipótesis de dos genes dominantes. Asimismo Guillet-Bellanger y Audergon (2001) confirmaron el predominio de un alelo de resistencia, postulando que al menos tres genes podrían estar involucrados. Por último, Hurtado et al. (2002) y Vilanova et al. (2003), en un estudio de progenies de albaricoque, sugirieron de nuevo que la resistencia a PPV podría estar controlada por dos genes. Más recientemente, Dondini et al. (2004), después de un estudio de RGAs (análogos a genes de resistencia), también señalaron la naturaleza oligogénica de la resistencia a PPV en albaricoquero. Según lo expuesto, por Rubio et al. (2007) existen 4 posibles hipótesis acerca de la resistencia a PPV: Hipótesis A. resistencia dominante y controlada por uno, dos o tres genes. Hipótesis B. resistencia recesiva y controlada por uno,

dos o tres genes. Hipótesis C. resistencia controlada por dos genes independientes, en uno la resistencia es recesiva, y en el otro dominante. Hipótesis D. resistencia dominante y controlada por un gen. Según sugieren Rubio et al. (2007), la hipótesis que más se adapta a sus estudios es la hipótesis D. El hecho de que se señale además que en los procedimientos actuales de evaluación se tiene un 25% de escapes (plantas susceptibles clasificadas erróneamente como resistentes o viceversa) justificaría los resultados contradictorios de otros autores (Audergon et al. 1995; Martínez-Gómez y Dicenta 1999; Martínez-Gómez et al. 2000; Moustafa et al. 2001; Hurtado et al. 2002) como consecuencia de varios factores, como la autenticidad de los genotipos analizados (cultivares y descendientes) o el método aplicado. En este sentido, cabe destacar que el aislado, el método de inoculación, las condiciones ambientales y culturales y la definición de los rasgos no han sido los mismos en todos los estudios.

RESUMEN

La resistencia a la enfermedad de la Sharka causada por *Plum Pox Virus* (PPV) es uno de los objetivos prioritarios en la mejora del albaricoquero a escala mundial. Los bioensayos para evaluar este carácter resultan muy costosos lo que ha despertado el interés por el desarrollo de la selección asistida. Sin embargo, este objetivo requiere cartografiar la resistencia a PPV con cierta precisión y, en este sentido, se hace necesaria una clasificación fenotípica más detallada que la clasificación binaria entre individuos resistentes y susceptibles. En este trabajo, se han evaluado dos familias obtenidas a partir de fuentes de resistencia a PPV distintas, una F_1 ('Goldrich' x 'Currot') y una F_2 ('Lito' x 'Lito') en base a una anotación de síntomas más pormenorizada y RT-PCR en tiempo real para incrementar la sensibilidad de la detección de PPV tanto en hojas sintomáticas como asintomáticas. Frente a la clasificación binaria determinada por el protocolo tradicional, los resultados obtenidos según la nueva evaluación sugieren que, una vez recopilados los datos del segundo ciclo de observaciones, podría establecerse un número discreto de clases fenotípicas de susceptibilidad con cierta consistencia. En conjunto, se ha mejorado la descripción fenotípica de la resistencia a PPV lo que podría ser de gran ayuda en el estudio de su control genético y facilitar la selección asistida en el futuro.

SUMMARY

The resistance to *Plum Pox Virus* (PPV), the causal agent of the Sharka disease, is one of the main objectives in the apricot breeding programs worldwide. Bioassays to evaluate the PPV resistance trait are very costly and this has prompted the interest on the assisted selection development. However, this objective requires the fine mapping of PPV resistance and for this purpose it would be necessary a more detailed phenotypic classification than the binary system with resistant/susceptible individuals. In this work, two mapping populations obtained from different resistance sources, an F_1 ('Goldrich' x 'Currot') and an F_2 ('Lito' x 'Lito'), have been evaluated on the basis of symptoms and real-time RT-PCR to increase the sensitivity of the PPV detection in symptomatic and asymptomatic leaves. When compared with the usual classification into resistant or susceptible hybrids through the breeding program protocol, the results obtained using this new evaluation suggest that, once data corresponding to the second cycle are available, a discrete number of phenotypic classes might be established consistently. As a whole, the phenotypic description of the PPV resistance has been improved and this might be helpful to study its genetic control and to facilitate assisted selection in the future.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Muchos programas de mejora genética de albaricoquero tienen como principal objetivo la introgresión de resistencia a la enfermedad de la Sharka causada por *Plum Pox Virus* (PPV). Sin embargo, la evaluación de la resistencia a PPV es un cuello de botella que consume mucho tiempo y requiere mucho espacio en el invernadero. Hasta ahora, en nuestro equipo la evaluación se realizaba mediante un bioensayo y se confirmaba la presencia del virus realizando un análisis ELISA-DASI. No obstante, este procedimiento sólo permite distinguir entre plantas resistentes y susceptibles, aunque la experiencia acumulada en la evaluación de la resistencia indica que los niveles de susceptibilidad / resistencia se distribuyen de forma más compleja dentro de las poblaciones segregantes. Una clasificación más específica en clases fenotípicas de susceptibilidad / resistencia puede contribuir a los estudios de cartografiado del carácter destinado a desarrollar selección asistida por marcadores moleculares mediante el correcto fenotipado de los recombinantes analizados.

En este contexto, el objetivo que se plantea este trabajo consiste en **realizar un estudio más detallado de la resistencia a PPV en dos poblaciones segregantes de albaricoquero, mediante el mismo tipo de bioensayo, pero mejorando la anotación de síntomas y utilizando RT-PCR en tiempo real, para incrementar la sensibilidad de detección de PPV en hojas con y sin síntomas.** Las ventajas y desventajas de este nuevo método se discuten en base a la comparación de los resultados obtenidos con aquellos procedentes de la evaluación tradicional en las mismas poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIAL VEGETAL.

El material utilizado consistió en dos familias de híbridos intraespecíficos de albaricoquero. En primer lugar una F1 procedente del cruce de 'Goldrich' x 'Currot', compuesta por 82 individuos, donde el donante de la resistencia, la variedad norteamericana 'Goldrich', actúa como madre y la variedad española 'Currot' como parental masculino susceptible. En segundo lugar, una F2 procedente del cruce de 'Lito' x 'Lito', con 81 individuos. La variedad 'Lito' procede del cruce entre 'Stark Early Orange' (SEO) variedad norte-americana donante de la resistencia a sharka y 'Thyrintos', variedad griega susceptible.

Estos híbridos intraespecíficos obtenidos en años anteriores pertenecen al proyecto de mejora genética del albaricoquero, que se desarrolla en el IVIA, y se encuentran situados en las parcelas de ensayo ubicadas en la denominada Masía Marfil, en el término municipal de Museros (figura 9).



Figura 9: Parcela de híbridos intraespecíficos de albaricoquero en Masía Marfil.

Como plantas indicadoras se han utilizado melocotoneros GF-305, los cuáles han sido obtenidos a partir de semillas que proceden de una plantación de árboles madre de GF-305, ubicados en una parcela de ensayos del IVIA.

Como fuente de inóculo se ha utilizado un aislado de PPV, cuya procedencia originaria fueron los árboles de ciruelo japonés de la variedad Red Beaut, infectados por dispersión natural del virus y cultivados en una parcela de

la finca La Isla en L'Alcudia (Valencia) (aislado 3.3 RB Dideron) (Asensio 1996). Este aislado se mantiene inoculado en unos albaricoqueros procedentes de semilla en un abrigo de cuarentena, en condiciones de cultivo normales y sometidos a un control periódico de la infección.

3.2. BIOENSAYO.

La metodología utilizada es una modificación de la descrita por Audergon y Morvan (1990) y está basada en el uso del melocotonero GF-305, muy susceptible a PPV, como indicador de la enfermedad (Moustafa 2000).

El proceso de obtención de los melocotoneros GF-305 es el siguiente: las semillas una vez desprendidas de la cutícula que les recubre se desinfectan por inmersión en una solución de Benomilo al 0,1% (figura 10). Después se procede a estratificarlas, colocándolas en bandejas de plástico en medio de dos capas de papel húmedo e introduciéndolas en una cámara frigorífica durante 25 días a una temperatura de 5 °C.



Figura 10: Proceso de pelado de las semillas de GF-305.

Pasado este período de tiempo se procede a la siembra de las semillas; esta operación se efectúa en unas bandejas de alvéolos (6 x 4 unidades) (figura 11), utilizando un sustrato comercial de mezcla de turba rubia y negra con arena de caolí, en un porcentaje de 75% de sustrato y 25% de arena.



Figura 11: Bandejas de alvéolos para sembrar las semillas de GF-305

Después se llenan los alvéolos con esta mezcla y se siembran las semillas recubriéndolas con arena de caolí para evitar la desecación. Al cabo de un período de unos doce días en invernadero y en condiciones de humedad y temperatura controladas las plántulas comienzan a emerger (figura 12) y se mantienen en los alvéolos hasta que las plantas alcancen una altura de unos 25 ó 30 cm, repicándose después a macetas de 3 litros de capacidad.



Figura 12: Vista general del semillero de GF-305

Con el sustrato anteriormente mencionado y mezclado con el mismo porcentaje de arena (figura 13), se mantienen en condiciones óptimas de cultivo dentro del invernadero durante unos 3 meses. Periódicamente se retiran las brotaciones laterales para favorecer el engrosamiento del tronco principal, hasta conseguir un diámetro de tronco alrededor de 4 ó 5 mm que se considera el tamaño óptimo para injertar.



Figura 13: GF-305 trasplantados a la maceta definitiva.

Con unos pocos días de antelación, se recogen de las parcelas de ensayo donde se encuentran las plantas de las dos familias a evaluar (F1 'Goldrich' x 'Currot' y F2 'Lito' x 'Lito'), las varetas de donde se obtendrán yemas para injertar. Una vez recogidas las varetas, se eliminan todas las hojas para evitar su transpiración y automáticamente se etiquetan con el número del individuo y el cruce al que pertenecen. Así, debidamente etiquetadas, se envuelven con papel húmedo y se introducen en una bolsa de plástico, almacenándose en nevera a una temperatura de unos 6 °C.

Una vez los melocotoneros GF-305 han llegado a un diámetro de tronco adecuado, (figura 14), se inoculan mediante injerto de material procedente de albaricoqueros infectados con PPV (aislado 3.3 RB Dideron) (figura 15). Simultáneamente se injertan las yemas que previamente se habían recogido y guardado en nevera, dos yemas por pie en un total de 6 plantas por cada individuo de cada familia (figura 16).



Figura 14: GF-305 con 3 meses de edad.

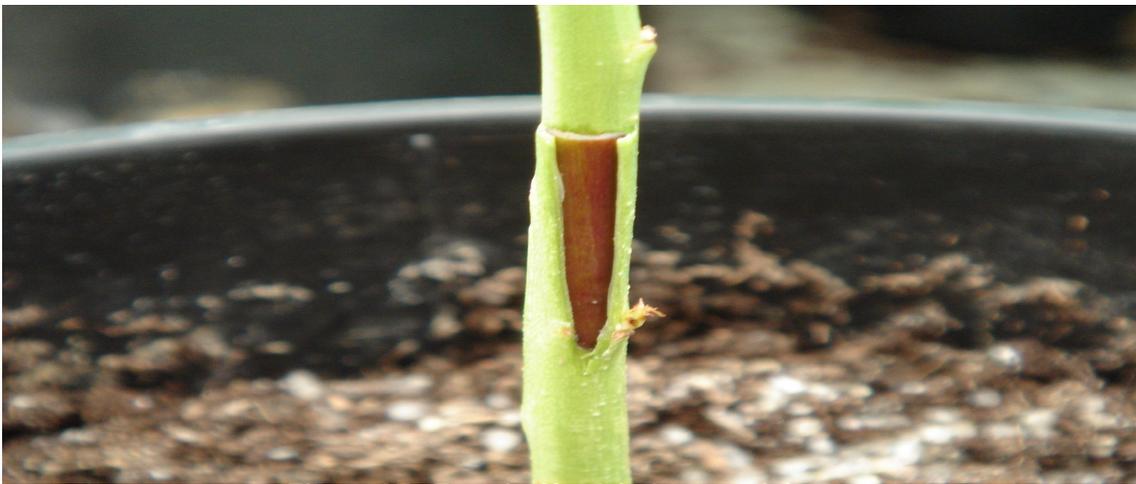


Figura 15: Inoculación del virus por injerto.



Figura 16: Injerto de 2 yemas del híbrido por pie de GF-305.

Una vez que estos han prendido, y pasados unos 25 días desde el injerto, se rebajan las plantas a una distancia de 10 cm del último injerto (figura 17), se retira el plástico de sujeción de los inóculos y de los injertos, y en el lugar donde hemos efectuado el corte aplicamos una pintura plástica especial para heridas de poda (mastic) que evitará la desecación de la planta y la entrada de hongos saprófitos por la herida.



Figura 17: Rebajado de las plantas trascurridos 25 días del injerto.

Después de realizar las operaciones anteriormente descritas, las plantas se introducen en cámaras frigoríficas que se encuentran a una temperatura de 5 °C, durante un período de 2 meses a oscuras (figura 18). Este tratamiento de frío simula un invierno artificial, que supone una parada vegetativa y que una vez finalizado favorece la nueva brotación.



Figura 18: Cámara frigorífica para tratamiento de frío durante 2 meses a 5 °C.

Tras el tratamiento de frío las plantas se devuelven al invernadero, donde las condiciones ambientales son las idóneas para el cultivo, y en un período de dos a tres semanas brotan las yemas injertadas (figura 19).



Figura 19: Vista general del invernadero con las nuevas brotaciones.

Cuando las brotaciones alcanzan un cierto tamaño, alrededor de los 5 cm, se empiezan a apreciar los primeros síntomas de sharka. Es entonces cuando una vez por semana y durante un mes se realiza una revisión de cada una de las plantas para observar síntomas. Dentro del programa de mejora de albaricoquero del IVIA estas observaciones han seguido habitualmente un protocolo determinado. En primer lugar se valora si la planta ha sido o no infectada, para ello se inspeccionan los brotes del GF-305 que rápidamente muestra síntomas, y una vez se ha comprobado que la inoculación se ha producido correctamente se buscan síntomas en las hojas de los dos injertos realizados, de las seis repeticiones por híbrido. Si las seis plantas correspondientes a un híbrido están correctamente inoculadas y ninguna muestra síntomas, éstas pasarán a un segundo ciclo en el cual se repite el mismo procedimiento. Si no es así y hay una o varias repeticiones que presentan algún síntoma en hojas (figura 20) el híbrido se eliminará y se anotará como susceptible. Las plantas que pasan a un segundo ciclo son de nuevo evaluadas en busca de posibles síntomas, y es en este 2º ciclo cuando aquellos híbridos que en sus 6 repeticiones no muestran síntomas se anotan como resistentes.



Figura 20: Síntomas de sharka en hojas de un brote de albaricoquero.

Con el objetivo de ser más exhaustivos en la observación de síntomas e intentar clasificar mejor los híbridos, en la realización de este trabajo se optó por una forma más detallada de anotación. En este segundo caso los datos de sintomatología se tomaron de la siguiente forma: para cada maceta se anotó el nombre del híbrido injertado, los síntomas del GF-305 (con o sin síntomas) y para cada injerto el número de hojas infectadas frente al total de hojas que tenía el brote.

3.3. TEST SEROLÓGICO.

El método serológico utilizado para detectar PPV fue ELISA-DASI (Double antibody sandwich Indirect) utilizando el anticuerpo policlonal R 0990B (Real) y el monoclonal 5B-IVIA (Real).

La toma de muestras se realizó de la siguiente forma: se tomaron 12 hojas representativas de las 6 repeticiones de cada híbrido y se introdujeron en bolsas de plástico. Como control positivo se utilizaron 12 hojas de la fuente de inóculo y como control negativo 12 hojas de una planta no infectada

El test ELISA-DASI se realizó en los siguientes pasos:

1.- Tapizado o sensibilización de la placa.

Las placas para ELISA con 96 pocillos (Polysorp/Nunc) se tapizaron con 200 μ l por pocillo del anticuerpo policlonal de conejo anti-PPV R0990B (REAL), diluido 1:100 en tampón carbonato de recubrimiento o tapizado (1.59 g/l Na_2CO_3 , 2.93

g/l NaHCO₃ y 0.20 g/l NaN₃; pH 9.6) y se incubaron 4 h a 37 °C. Se destinaron dos pocillos por placa para el testigo positivo y otros dos para el testigo negativo. Cada muestra se analizó por duplicado.

2.- Preparación y trituración de la muestra.

Las hojas se cortaron con tijeras de podar lo más finamente posible, se introdujeron en tubos de ensayo de cristal de 25 ml, añadiendo un tampón de extracción [2 g/l Na-DIECA-3H₂O y 20 g/l de PVP-10 y en Agua Fisiológica Tamponada (AFT) (8 g/l NaCl, 0.20 g/l KH₂PO₄, 1.44 g/l Na₂HPO₄·2H₂O, 0.20 g/l KCl y 0.20 g/l NaN₃, pH 7.2-7.4)] en una proporción de 10-20 volúmenes por peso de muestra. A continuación se trituraron utilizando un politrón (Kinemática) hasta conseguir una mezcla homogénea, limpiando el eje del mismo con agua destilada después de cada trituración.

3.- Lavado.

Tras las cuatro horas del tapizado se eliminó el anticuerpo policlonal y a continuación se lavó tres veces con tampón de lavado [AFT-Tween (0.50 ml/l Tween 20, 500 ml/l de AFT, 500 ml/l de agua destilada y 0.20 g/l de NaN₃)] secando bien las placas.

4.- Adición del antígeno.

Se añadieron 190 µl de la muestra vegetal homogeneizada (antígeno) en cada uno de los pocillos. Las puntas de la micro pipeta (1 ml) se cortaron para evitar obstrucciones de material vegetal. Una vez añadida la muestra, la placa se tapó con un plástico adherente para impedir la evaporación y se incubó 16 h a 4 °C.

5.-Lavado.

Se eliminó el antígeno y se lavó tres veces con tampón de lavado, secando bien las placas.

6.-Adición del anticuerpo monoclonal específico de PPV (5B-IVIA).

Se añadieron 190 µl por pocillo del anticuerpo monoclonal 5B-IVIA diluido 1:1000 en tampón AFT + 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin); se tapó con plástico adherente y se incubó durante 2 h a 37 °C.

7.-Lavado.

Se eliminó el anticuerpo monoclonal y se lavó tres veces con tampón de lavado, secando bien las placas.

8.-Adición del anti-anticuerpo conjugado (immunoglobinas de cabra anti-ratón, marcadas con fosfatasa alcalina).

Se añadieron 190 μ l por pocillo del anti-anticuerpo diluido 1:1000 en agua fisiológica tamponada (AFT) pH 7.2-7.4, se tapó con plástico adherente y se incubó durante 2 h a 37 °C.

9.-Lavado.

Se eliminó el anti-anticuerpo conjugado y se lavó tres veces con tampón de lavado, secando bien las placas.

10.- Adición del sustrato de la fosfatasa alcalina p-Nitrofenilfosfato

Finalmente se añadieron 200 μ l de una solución tampón de p-Nitrofenilfosfato (1mg/ml) (97 ml/l dietanolamina y 0.20 g/l NaN_3 ; pH 9.8) en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente.

11.-Lectura de los resultados.

A continuación se realizaron lecturas en un lector de placas ELISA (TiterkTec multiskan) a 405 nm al menos a los 15, 30 y 60 minutos. Se consideraron positivos aquellos valores que superaban el doble de las lecturas de los testigos negativos.

3.4. RT-PCR EN TIEMPO REAL.

Para la toma de muestras se utilizaron tubos eppendorf de 2 ml. con cinco bolitas de vidrio, previamente pesados. Cada muestra recogida estaba formada por tres discos de hoja y cada disco pertenecía a una hoja diferente.

Dependiendo de la parte de la planta y de los síntomas que mostraba el muestreo se realizó de la siguiente forma:

1 Patrón GF-305. Se tomó una muestra (con síntomas si los había)

2 Injerto sin síntomas: se tomaron discos de al menos un 30% de las hojas. Menos de seis hojas: una muestra. Entre seis y 23 hojas: dos muestras. Entre 23 y 30 hojas: tres muestras. Más de cuarenta: cuatro muestras. En los injertos con síntomas se dividieron las muestras en dos bloques, hojas con y sin síntomas siguiendo la pauta anterior. Por ejemplo, en un brote de seis hojas con síntomas y de 24 hojas sin síntomas se tomarían dos muestras de hojas con síntomas y tres muestras de hojas sin síntomas.

Un vez recogidas las muestras se pesaron de nuevo los tubos para conocer el peso de las muestras y se congelaron con N₂ líquido, guardándose a -80°C hasta el momento de realizar la RT-PCR en tiempo real.

La extracción del ARN viral se realizó triturando las muestras con el equipo Tyssuelyser (Qiagen) durante 30 segundos dos veces consecutivas a una frecuencia de 30 oscilaciones por segundo. Una vez triturada, la muestra se diluyó a razón de 10 volúmenes por peso de hoja de tampón de extracción (2 g/l Na-DIECA·3H₂O y 20 g/l PVP-10 en AFT pH 7.2-7.4). Estas muestras se diluyeron de nuevo 1:20 en tampón de extracción en placa de 96 pocillos dejando 3 pocillos para positivos, que contenían 2.4 µl de 10², 10⁴ y 10⁶ partículas de PPV (puntos de la curva con concentración conocida), 3 para negativos (con extracto de una muestra negativa que siguió el mismo proceso) y 3 para blancos que contenían agua.

Siguiendo básicamente el protocolo descrito por Olmos et al. (2005) la reacción de RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando el kit TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix reagents Kit (Applied Biosystems) y sus componentes fueron: H₂O 2.70 µl, cebador P316D (100 µM) (5'-GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3') 0.12 µl, cebador P241 (100 µM) (5'-CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3') 0.12 µl, sonda TaqMan con marcaje FAM-TAMRA (6 µM) (5'-CGT CGG AAC ACA AGA AGA GGA CAC AGA-3') 0.36 µl, 40 x RT /RNase inhibitor mix 0.30 µl, 2 x PCR Master Mix 6.00 µl y muestra (extracto) (1:200) 2.40 µl, hasta alcanzar un volumen final de 12 µl.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador tipo Step One Plus Real Time RT-PCR (Applied Biosystems) con el siguiente programa: una primera fase de 15 minutos a 45 °C, una segunda de 10 minutos a 95 °C y finalmente 45 ciclos con dos segmentos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C cada uno.

RESULTADOS



4. RESULTADOS.

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados de la evaluación de la resistencia a sharka en dos poblaciones, una F_2 ('Lito' x 'Lito') y una F_1 ('Goldrich' x 'Currot'), mediante dos evaluaciones realizadas de forma independiente y diferidas en el tiempo.

En la primera evaluación se siguió el procedimiento habitual en el programa de mejora genética de albaricoquero combinando la clasificación mediante síntomas visuales, en resistentes (-) y susceptibles (+), con el análisis ELISA-DASI tras cada uno de los dos ciclos de frío del bioensayo. En la segunda evaluación se realizó una clasificación en base a síntomas visuales, contando el número de hojas infectadas sobre el total de hojas inspeccionadas, y a su vez se determinó la presencia del virus mediante RT-PCR en tiempo real tras el primer ciclo del bioensayo.

En la clasificación realizada según la primera evaluación, sí tras el primer ciclo de frío un individuo presenta síntomas visuales positivos y el resultado del ELISA-DASI es positivo, o bien presenta síntomas visuales negativos pero el test ELISA-DASI resulta positivo, el individuo se considera susceptible (+) y no se evalúa después del segundo ciclo de frío (n.e.). Por el contrario, si presenta síntomas positivos pero ELISA-DASI negativo, se repite la evaluación tras el segundo ciclo de frío para confirmar el resultado. Sólo en el caso de que presente resultados negativos en ambos análisis, tras el segundo ciclo de frío, es considerado finalmente resistente (-) (Tabla 1).

De forma similar, y a falta de obtener los resultados correspondientes al segundo ciclo de frío, en la segunda evaluación sólo los individuos que no presentaron ningún síntoma visual ni amplificaron ARN viral en ninguna de todas sus muestras analizadas por RT-PCR se clasificaron como resistentes. En cualquiera de los otros casos, sí tenían síntomas en hojas y/o resultaban positivos por RT-PCR en alguna de sus muestras, se consideraban, en principio, susceptibles (en términos de una clasificación binaria).

Cabe destacar que, tanto para la primera como para la segunda evaluación, solo se consideraron aquellos híbridos injertados sobre patrones

GF-305 con síntomas de PPV donde, por tanto, la inoculación había funcionado. Desafortunadamente, en la segunda evaluación una parte significativa de los híbridos de 'Lito' x 'Lito' (16 n.e.) y 'Goldrich' x 'Currot' (15 n.e.) no pudo ser inspeccionada porque o no brotó ninguno de sus injertos o se secaron posteriormente (Tablas 1 y 2). Aquellos híbridos en los que sí se tomaron datos disponían de al menos 2 brotes en más del 90% de los casos. Los resultados de RT-PCR en tiempo real de la segunda evaluación corresponden al número de reacciones de amplificación positivas sobre muestras asintomáticas e indican el grado de extensión de la infección más allá de los síntomas apreciados (Tablas 1 y 2). En este sentido, hay que señalar que se consideraban negativas aquellas amplificaciones que el termociclador Step One Plus (Applied Biosystems) marcaba como "undetermined" y aquellas que se producían por encima de ciclo 35 (generalmente con menos de 10 partículas virales) y que podrían deberse a contaminaciones.

El grado de coincidencia entre los resultados de la primera y la segunda evaluación varía según la población analizada siendo en general más consistente en 'Goldrich' x 'Currot' (71% de coincidencia) que en 'Lito' x 'Lito' (52% de coincidencia). En 'Lito' x 'Lito' 25 híbridos resultaron resistentes (color verde) y 9 susceptibles (color rojo) según ambas evaluaciones, 16 no pudieron ser evaluados (n.e.) y 31 variaron su clasificación (color amarillo). En 'Goldrich' x 'Currot', 3 fueron resistentes y 45 susceptibles en ambas evaluaciones, 15 no pudieron ser evaluados (n.e.) y 19 variaron su clasificación. En ambas poblaciones las reclasificaciones corresponden tanto a híbridos considerados resistentes en la primera evaluación y susceptibles en la segunda (14 'LxL' y 16 'GxCu') como al suceso contrario (17 'LxL' y 3 'GxCu'). Es destacable que muchos de los híbridos encuadrados en el primer caso presentaron síntomas escasos en la segunda evaluación (menos del 10% de las hojas) y que algunos del segundo caso disponían de muy pocas hojas en la segunda evaluación. De cualquier forma la clasificación definitiva deberá esperar a los resultados de la evaluación tras el segundo ciclo de frío.

Tabla 1: Fenotipos de resistencia a sharka observados en la familia F₂ 'Lito' x 'Lito' tras dos bioensayos distintos mediante la combinación de síntomas visuales (+/-) y ELISA-DASI (primera evaluación) ó síntomas visuales (%) y RT-PCR en tiempo real (segunda evaluación).

Nº Híbrido	PRIMERA EVALUACIÓN				SEGUNDA EVALUACIÓN			
	1º Ciclo de Frío		2º Ciclo de Frío		1º Ciclo de Frío			
	Sínt Visual	ELISA	Sínt Visual	ELISA	Sínt Visual	% S.V.	PCR+	% PCR+
1	-	-	-	-	1/56 ^b	2 ^c	1/6 ^d	17 ^e
2	-	-	-	-	0/12	0	0/2	0
3	-	-	-	-	0/72	0	0/9	0
4	+	+	n.e. ^a		33/112	29	7/9	78
5	-	+	n.e.		0/107	0	0/12	0
6	+	+	n.e.		10/100	10	2/13	15
7	-	+	n.e.		0/85	0	0/10	0
8	+	-	-	-	32/120	4	0/11	0
9	-	-	-	-	0/29	0	0/3	0
10	+	-	-	-	0/83	0	1/10	10
11	+	+	n.e.		9/45	20	1/6	17
12	-	-	-	-	n.e.			
13	-	+	n.e.		0/64	0	0/7	0
14	-	+	n.e.		0/7	0	0/2	0
15	+	+	n.e.		0/59	0	0/6	0
16	-	+	n.e.		1/85	2	0/8	0
17	+	+	n.e.		n.e.			
18	+	-	-	-	0/66	0	0/11	0
19	+	+	n.e.		26/43	60	3/3	100
20	-	-	-	-	0/6	0	0/2	0
21	-	+	n.e.		0/10	0	0/2	0
22	+	-	-	-	53/153	35	0/15	0
23	+	+	n.e.		0/131	0	0/16	0
24	-	-	-	-	n.e.			
25	+	-	-	-	3/24	12	0/2	0
26	-	+	n.e.		7/72	10	0/7	0
27	-	-	-	-	5/67	8	0/9	0
28	-	-	-	-	3/35	9	0/3	0
29	-	-	-	-	4/59	7	0/6	0
30	-	-	-	-	0/105	0	0/12	0
31	-	-	-	-	0/6	0	0/2	0
32	-	+	n.e.		0/77	0	0/6	0
33	-	-	-	-	0/26	0	0/3	0
34	-	-	-	-	15/32	45	0/3	0
35	-	-	-	-	1/71	1	0/3	0
36	-	-	-	-	2/32	6	0/3	0
37	+	+	n.e.		0/50	0	0/5	0
38	-	-	-	-	30/72	42	0/6	0
39	-	-	-	-	0/61	0	0/12	0
40	-	-	-	-	0/14	0	0/2	0

Nº Híbrido	PRIMERA EVALUACION				SEGUNDA EVALUACION			
	1º Ciclo de Frío		2º Ciclo de Frío		1º Ciclo de Frío			
	Sínt Visual	ELISA	Sínt Visual	ELISA	Sínt Visual	% S.V.	PCR+	% PCR+
41	-	-	-	-	0/163	0	0/20	0
42	-	-	-	-	0/8	0	0/2	0
43	-	-	-	-	3/22	14	0/2	0
44	-	-	-	-	n.e.			
45	+	+	n.e.		0/57	0	0/8	0
46	+	+	n.e.		n.e.			
47	+	+	n.e.		n.e.			
48	-	-	-	-	0/29	0	0/3	0
49	-	-	-	-	0/16	0	0/2	0
50	-	-	+	+	n.e.			
51	-	-	-	-	n.e.			
52	-	-	-	-	n.e.			
53	-	-	+	+	n.e.			
54	-	-	-	-	0/38	0	0/4	0
55	-	-	-	-	0/6	0	0/2	0
56	-	-	-	-	0/6	0	0/2	0
57	+	+	n.e.		0/29	0	0/2	0
58	-	+	n.e.		0/19	0	0/2	0
59	-	-	-	-	n.e.			
60	-	-	-	-	n.e.			
61	-	-	-	-	0/25	0	0/6	0
62	-	-	+	+	0/41	0	0/8	0
63	-	-	-	-	n.e.			
64	-	-	-	-	0/89	0	0/12	0
65	-	-	-	-	0/49	0	0/10	0
66	+	+	n.e.		21/24	87	0/1	0
67	+	+	n.e.		n.e.			
68	-	-	-	-	0/11	0	0/2	0
69	+	-	-	-	5/107	5	0/9	0
70	-	-	-	-	n.e.			
71	-	-	-	-	n.e.			
72	-	-	+	+	0/54	0	0/4	0
73	-	-	-	-	0/87	0	1/11	9
74	-	-	-	-	0/59	0	0/7	0
75	-	-	-	-	0/18	0	0/4	0
76	-	+	n.e.		0/50	0	0/9	0
77	+	+	n.e.		0/55	0	0/8	0
78	+	+	n.e.		58/71	82	2/2	100
79	-	+	n.e.		25/105	24	0/10	0
80	-	-	-	-	0/86	0	0/12	0
81	-	-	-	-	0/111	0	0/14	0

a n.e. no evaluado

b nº hojas infectadas / total hojas evaluadas

c columna anterior (b) expresada en porcentaje

d nº PCRs positivas / nº PCRs realizadas sobre muestras asintomáticas

e columna anterior (d) expresada en porcentaje

Tabla 2: Fenotipos de resistencia a sharka observados en la familia F₁ 'Goldrich' x 'Currot' tras dos bioensayos distintos mediante la combinación de síntomas visuales (+/-) y ELISA-DASI (primera evaluación) ó síntomas visuales (%) y RT-PCR en tiempo real (segunda evaluación).

Nº Híbrido	PRIMERA EVALUACIÓN				SEGUNDA EVALUACIÓN			
	1º Ciclo de Frío		2º Ciclo de Frío		1º Ciclo de Frío			
	Sínt Visual	ELISA	Sínt Visual	ELISA	Sínt Visual	% S.V.	PCR+	% PCR+
1	+	+	n.e. ^a		26/119 ^b	22 ^c	7/12 ^d	58 ^e
2	-	-	+	+	n.e.			
3	-	-	+	+	0/57	0	2/7	29
4	-	-	-	-	16/43	37	1/4	25
5	+	+	n.e.		3/194	1	3/21	14
6	+	+	n.e.		n.e.			
7	-	-	+	+	50/129	39	5/10	50
8	-	-	+	+	75/196	38	11/15	73
9	-	+	+	+	10/69	14	2/7	29
10	-	-	+	+	23/101	23	5/10	50
11	-	-	-	-	1/48	2	2/2	100
12	+	+	n.e.		150/184	81	5/7	71
13	-	-	-	-	n.e.			
14	-	+	+	+	26/197	13	3/18	17
15	+	+	n.e.		13/94	14	2/9	22
16	-	-	-	-	7/93	7	7/13	54
17	+	+	n.e.		47/62	76	2/3	67
18	-	+	+	+	63/116	54	2/7	29
19	-	-	+	+	49/162	30	12/14	86
20	n.e.		n.e.		n.e.			
21	-	-	-	-	24/262	9	3/7	43
22	+	+	n.e.		n.e.			
23	+	+	n.e.		101/122	83	3/6	50
24	-	-	-	-	0/117	0	0/15	0
25	+	+	n.e.		39/120	32	5/9	56
26	+	+	n.e.		35/94	37	3/6	50
27	-	-	-	-	20/130	15	2/13	15
28	+	+	n.e.		11/133	8	0/10	0
29	-	+	-	+	n.e.			
30	-	-	-	-	6/93	6	1/9	11
31	+	+	n.e.		6/145	4	1/14	7
32	-	-	-	-	2/83	2	0/4	0
33	-	-	+	+	2/47	4	0/2	0
34	-	-	+	+	23/44	52	2/4	50
35	-	-	-	-	n.e.			
36	-	-	-	-	0/46	0	0/6	0
37	+	+	n.e.		n.e.			
38	-	-	-	-	n.e.			
39	-	-	-	-	1/68	1	1/9	11
40	-	-	-	-	12/136	9	7/17	41
41	-	-	+	+	1/210	0,5	2/23	9

Nº Híbrido	PRIMERA EVALUACION				SEGUNDA EVALUACION			
	1º Ciclo de Frío		2º Ciclo de Frío		1º Ciclo de Frío			
	Sínt Visual	ELISA	Sínt Visual	ELISA	Sínt Visual	% S.V.	PCR+	% PCR+
42	-	-	-	-	3/154	2	0/18	0
43	-	+	-	+	44/145	30	5/6	83
44	+	+	n,e,		89/137	65	7/9	78
45	-	-	+	+	n.e.			
46	-	+	+	+	28/115	24	0/11	0
47	+	+	n,e,		43/118	36	5/8	63
48	+	+	n,e,		34/75	45	1/5	20
49	+	+	n,e,		45/71	63	5/6	83
50	-	-	+	+	76/196	39	3/9	33
51	-	-	-	-	10/109	9	2/9	22
52	+	+	n,e,		15/58	26	3/5	60
53	+	+	n,e,		13/196	7	3/3	100
54	-	+	+	+	29/77	38	5/7	71
55	n.e.		n,e,		n.e.			
56	-	-	-	-	6/141	4	1/6	17
57	-	-	-	-	12/106	11	4/11	36
58	-	-	+	+	42/79	53	7/7	100
59	-	+	+	+	n.e.			
60	+	+	n,e,		29/178	16	4/12	33
61	-	-	+	+	26/60	43	2/4	50
62	+	+			33/149	22	8/16	50
63	-	+	+	+	3/65	5	0/2	0
64	+	+	n,e,		0/99	0	0/14	0
65	+	+			11/90	12	4/4	100
66	-	-	+	+	3/57	5	3/7	43
67	-	-	+	+	0/76	0	0/4	0
68	-	-	+	+	14/95	15	3/10	30
69	-	+	+	+	66/106	62	5/7	71
70	-	-	-	-	0/42	0	0/3	0
71	-	-	+	+	0/34	0	1/5	20
72	-	+	+	+	n.e.			
73	-	-	-	-	n.e.			
74	-	-	+	+	35/125	28	7/10	70
75	+	+	n,e,		66/100	66	3/6	50
76	+	+	n,e,		107/225	47	7/16	44
77	+	+	n,e,		n.e.			
78	-	-	-	-	8/62	13	1/6	17
79	-	-	+	+	76/105	72	5/5	100
80	+	+	n,e,		1/105	1	0/9	0
81	-	-	+	+	4/43	9	2/3	67
82	+	+	n,e,		0/42	0	0/5	0

a n.e. no evaluado

b nº hojas infectadas / total hojas evaluadas

c columna anterior (b) expresada en porcentaje

d nº PCRs positivas / nº PCRs realizadas sobre muestras asintomáticas

e columna anterior (d) expresada en porcentaje

En la figura 21 se aprecia el conjunto de los resultados de la primera evaluación tras los dos ciclos de frío en la población 'Lito' x 'Lito'. En el primer ciclo se observan ligeras diferencias entre las clasificaciones obtenidas mediante síntomas visuales y ELISA-DASI, debido a que algunas plantas asintomáticas (11) resultaron positivas para el test ELISA-DASI y otras sintomáticas dieron un ELISA-DASI negativo (6). En el segundo ciclo de frío sólo se reevaluaron 53 de los 81 híbridos iniciales y todos ellos resultaron coincidentes según ambos métodos. En 5 casos se habían observado síntomas positivos en el primer ciclo que se confirmaron por ELISA-DASI y todos ellos resultaron negativos en el segundo ciclo, y en 4 casos los síntomas sólo aparecieron en el segundo ciclo siendo todos positivos por ELISA-DASI, los 44 restantes fueron negativos en ambos casos.

En la figura 22 se observan los resultados para la familia 'Goldrich' x 'Currot'. De nuevo en el primer ciclo de frío se observaron claras discrepancias en las clasificaciones obtenidas mediante síntomas visuales y ELISA-DASI, debido a que 11 híbridos que no mostraron síntomas fueron positivos en el test ELISA-DASI. Estos 11 individuos fueron reevaluados y confirmados en el segundo ciclo de frío (2 sólo por ELISA-DASI). Además, 28 híbridos positivos por ambos métodos en el primer ciclo no fueron reevaluados en el segundo y otros 20 negativos para los dos análisis tras el primer ciclo resultaron positivos en ambos tras el segundo ciclo. De los 23 restantes, 2 no fueron evaluados y 21 fueron negativos por ambos métodos tras los dos ciclos de frío.

En conjunto, tras el segundo ciclo de frío de esta primera evaluación y combinando ambos métodos de análisis en la familia 'Lito' x 'Lito' 31 híbridos se clasificaron como susceptibles (38%) y 50 como resistentes (62%). En 'Goldrich' x 'Currot' 59 se clasificaron como susceptibles (74%), 21 como resistentes (26%) y 2 no se evaluaron (n.e.) (figuras 21 y 22).

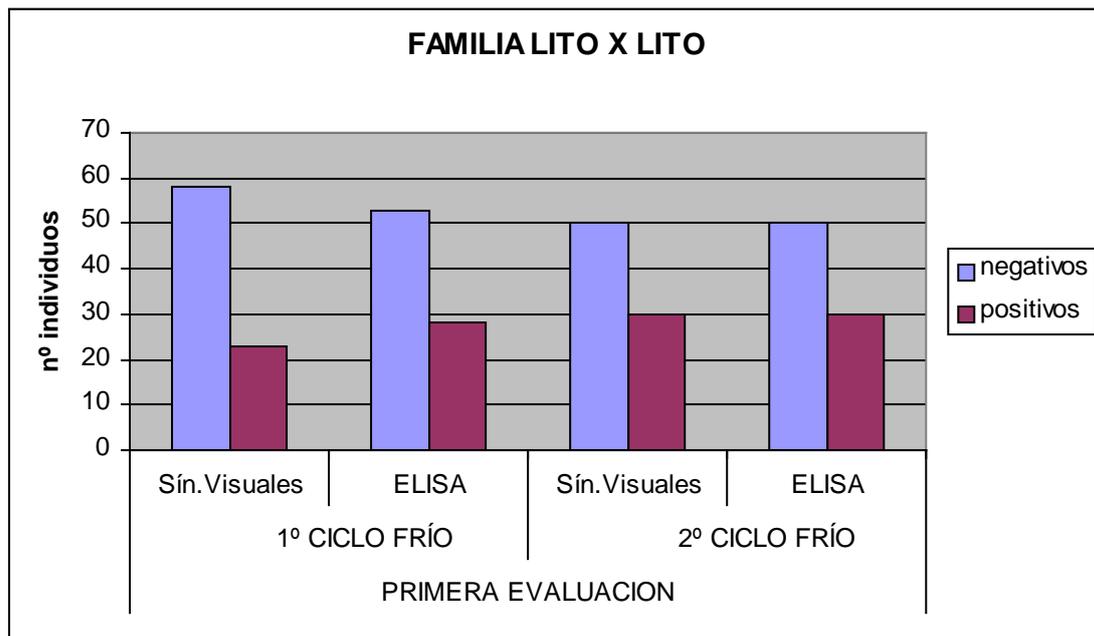


Figura 21: Clasificación de los individuos de la población 'Lito' x 'Lito' en base a la presencia/ausencia de síntomas visuales de PPV y al resultado del análisis ELISA-DASI tras cada uno de los dos ciclos de frío en la primera evaluación.

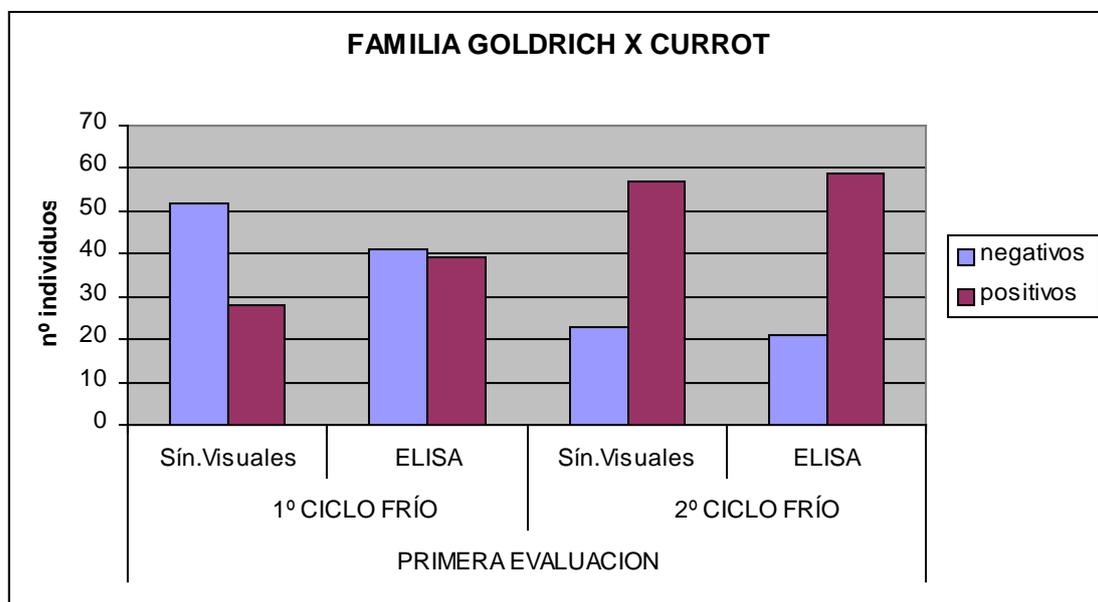


Figura 22: Clasificación de los individuos de la población 'Goldrich' x 'Currot' en base a la presencia/ausencia de síntomas visuales de PPV y al resultado del análisis ELISA-DASI tras cada uno de los dos ciclos de frío en la primera evaluación.

En la figuras 23 y 24 se observa la clasificación de los individuos en función de los síntomas observados y anotados tras el primer ciclo de frío de la segunda evaluación. Tal como ocurrió en la primera evaluación la población 'Lito' x 'Lito' mostró un mayor número de individuos resistentes. El 66% de los híbridos inspeccionados (43) en esta familia no mostró ningún síntoma en hojas, sin embargo, esto sólo ocurrió en el 12% de los híbridos (7) de la población de 'Goldrich' x 'Currot'. En líneas generales, aunque no completamente coincidentes, los resultados derivados de la observación de síntomas en la segunda evaluación se asemejan a los obtenidos en la primera.

En relación con la segunda evaluación cabe destacar fundamentalmente la enorme variabilidad observada en el porcentaje de hojas sintomáticas entre los híbridos susceptibles de cada familia. En 'Lito' x 'Lito' desde el 1 al 87 % de hojas afectadas y en 'Goldrich' x 'Currot' desde 1 al 83%. En términos absolutos, y a modo de ejemplo, en 'Lito' x 'Lito' se puede señalar el híbrido nº 16 donde se observaron síntomas en una sola hoja de 85 inspeccionadas o en el extremo opuesto el nº 78 que presentó síntomas en 58 de 71 hojas evaluadas (Tabla 1).

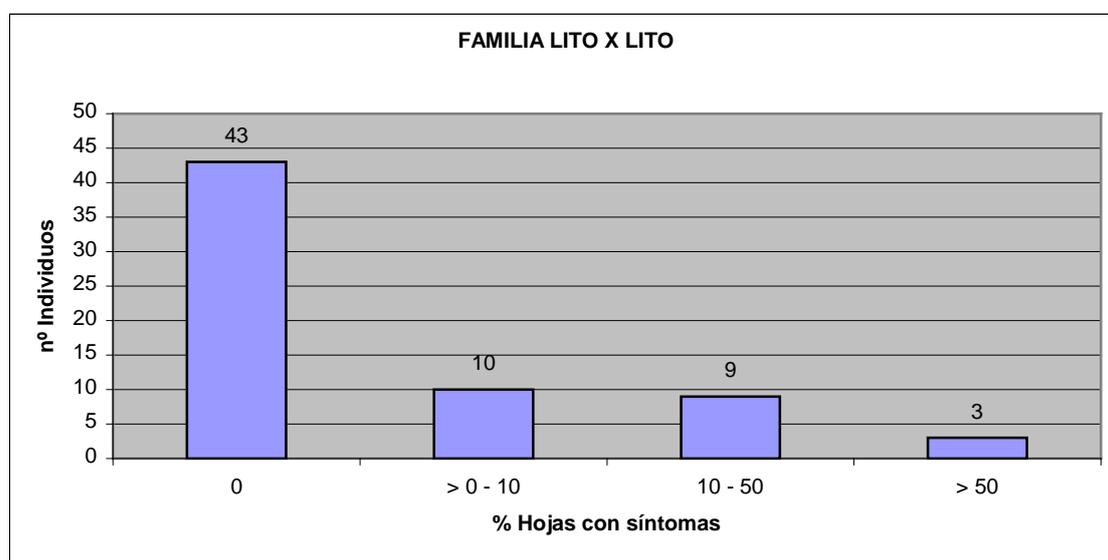


Figura 23: Clasificación de los individuos de la población 'Lito' x 'Lito' en base al % de hojas con síntomas sobre el total inspeccionado en cada híbrido tras el primer ciclo de frío de la segunda evaluación.

De forma similar, en 'Goldrich' x 'Currot' el híbrido nº 68 mostró síntomas en 1 de 68 hojas analizadas y el nº 23 en 101 de 122 (Tabla 2).

Este conjunto de datos se agruparon de forma arbitraria en 3 clases discretas relativamente homogéneas que comprendían híbridos con porcentajes de hojas sintomáticas de 0 a 10, de 10 a 50 y mayores de 50 con el fin de poder comparar su distribución más fácilmente (figuras 23 y 24). De ello se concluye que no sólo el porcentaje de resistentes es menor en 'Goldrich' x 'Currot' sino que además los susceptibles presentan en promedio un mayor porcentaje de hojas sintomáticas (55% >10% en 'Lito' x 'Lito' frente al 66% en 'Goldrich' x 'Currot').

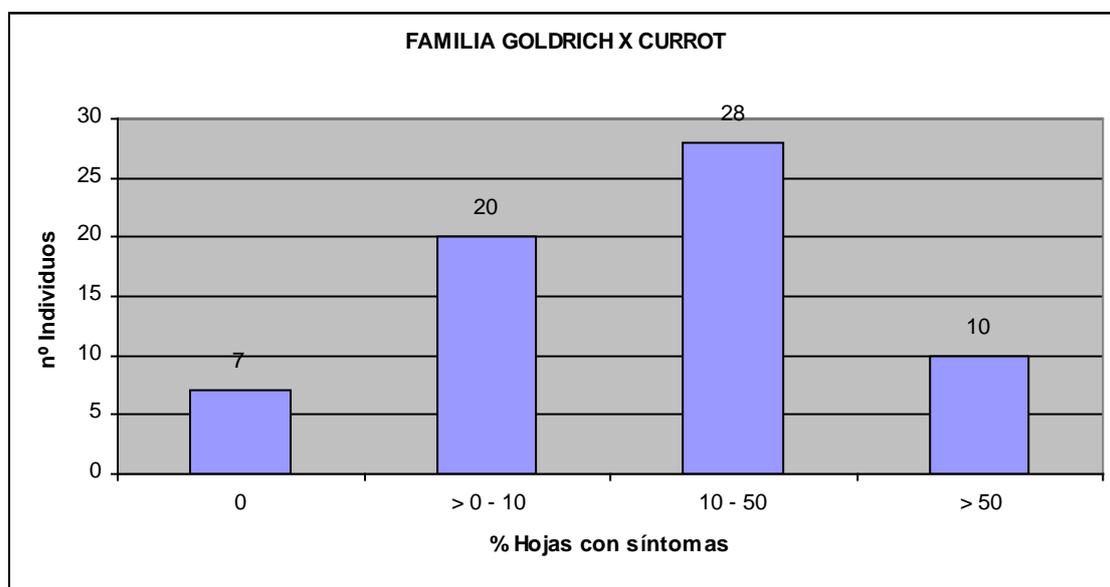


Figura 24: Clasificación de los individuos de la población 'Goldrich' x 'Currot' en base al % de hojas con síntomas sobre el total inspeccionado en cada híbrido tras el primer ciclo de frío de la segunda evaluación.

Por último, se evaluó el porcentaje de RT-PCRs positivas sobre el total de muestras asintomáticas analizadas en las clases discretas previamente establecidas en base al porcentaje de hojas sintomáticas. En 'Lito' x 'Lito' menos del 1% de estas RT-PCRs realizadas en híbridos asintomáticos resultaron positivas, en aquellos que presentaban hasta un 10% de hojas con

síntomas se observó un 2.5% de RT-PCRs positivas, en la clase que comprendía entre el 10 y el 50% de hojas sintomáticas el porcentaje de RT-PCRs positivas ascendió al 15.1%, y de ahí pasó a un 83.3% cuando se trataba de híbridos con más de un 50% de hojas sintomáticas (figura 25).

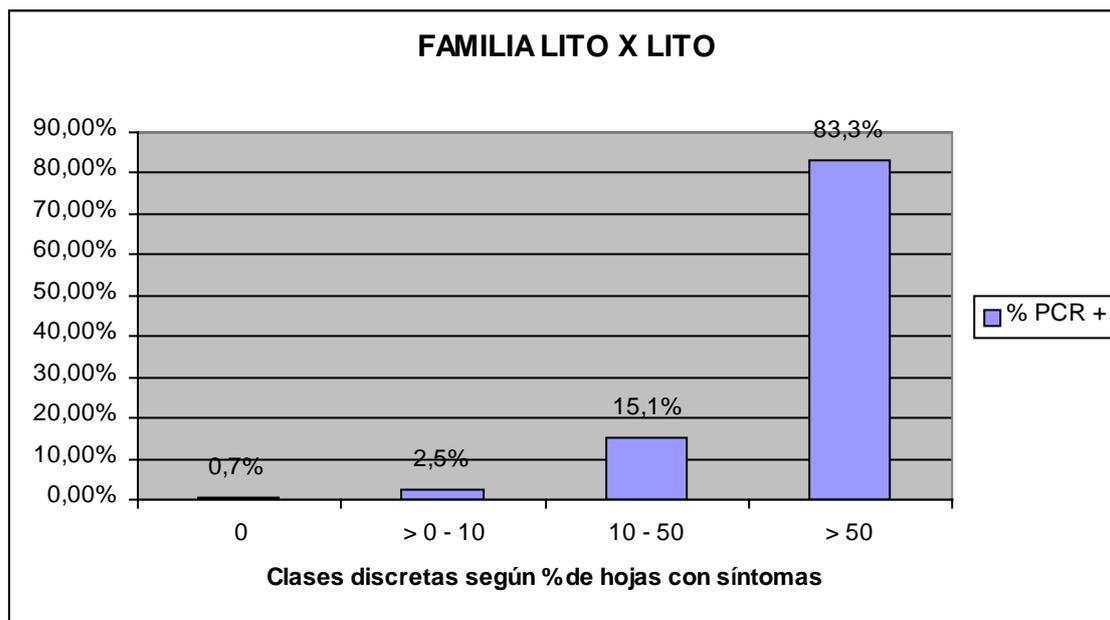


Figura 25: Porcentaje de RT-PCRs positivas sobre el total de muestras asintomáticas analizadas en el conjunto de híbridos agrupados en cada clase discreta establecida según el % de hojas sintomáticas en 'Lito' x 'Lito'.

Análogamente, en la familia 'Goldrich' x 'Currot' para estas mismas clases discretas se obtuvieron porcentajes de RT-PCRs positivas del 3.6%, el 19.1%, el 43.3% y el 68.6% respectivamente (figura 26).

En ambas poblaciones se aprecia que el porcentaje de RT-PCRs positivas sobre muestras asintomáticas crece conforme aumenta el porcentaje de síntomas de los híbridos (figuras 25 y 26). Además, en la misma línea de lo afirmado anteriormente en referencia a los síntomas visuales, aunque los datos porcentuales enmascaren hasta cierto punto este resultado, se han detectado en conjunto un mayor número de RT-PCRs positivas sobre muestras

asintomáticas en 'Goldrich' x 'Currot' (204 de 526, un 39%) que en 'Lito' x 'Lito' (sólo 16 de 139, un 12%) en los híbridos con síntomas y también en los asintomáticos (3 de 57, un 5% en 'Goldrich' x 'Currot' frente a 2 de 286, menos del 1% en 'Lito' x 'Lito') (Tablas 1 y 2).

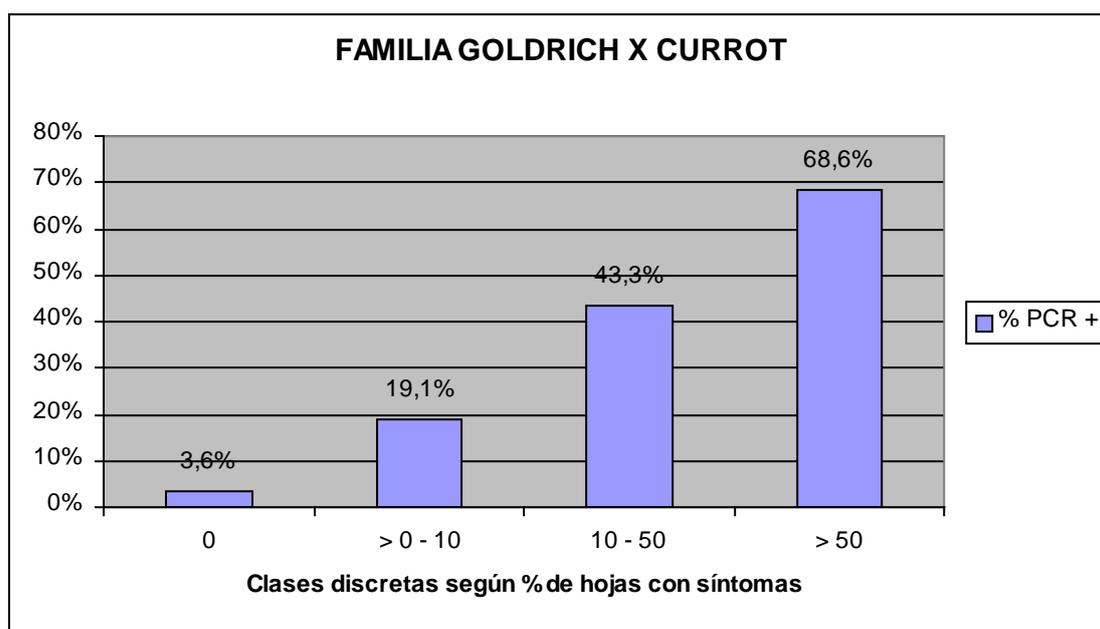


Figura 26: Porcentaje de RT-PCRs positivas sobre el total de muestras asintomáticas analizadas en el conjunto de híbridos agrupados en cada clase discreta establecida según el % de hojas sintomáticas en 'Goldrich' x 'Currot'.

Salvo excepciones, que probablemente puedan atribuirse a fallos en la reacción, la gran mayoría de las RT-PCRs en muestras sintomáticas resultaron positivas (> 95%). También de forma general, puede indicarse que el número de partículas virales detectadas en muestras sintomáticas frente a las asintomáticas era entre 1 y 2 órdenes de magnitud mayor. En este sentido hay que señalar que por diversos motivos una parte significativa de las muestras tuvo que ser procesada a partir de improntas en papel hechas como reserva en lugar de utilizar los extractos inicialmente previstos. Esto ha supuesto que el número de partículas virales detectadas no pueda ser comparado entre todos

los casos ya que las amplificaciones a partir de improntas son 1 ó 2 órdenes de magnitud menores. Tan sólo a modo de ejemplo, y para ilustrar el caso anterior, podemos indicar que en el híbrido nº 4 de 'Lito' x 'Lito' se realizaron 9 RT-PCRs sobre muestras asintomáticas que detectaron un promedio de 32.627 partículas virales y 10 sobre muestras sintomáticas que detectaron un promedio de 541.655 partículas virales (todas ellas realizadas a partir de extractos).

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN.

La enfermedad de la sharka, causada por el *Plum Pox Virus* (PPV), es uno de los factores más limitantes para el cultivo de frutales de hueso, particularmente para el albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.). En casi todos los programas de mejora genética del albaricoquero de Europa y América del Norte, se incluye la resistencia a PPV como uno de sus principales objetivos (Bassi y Audergon 2006). Sin embargo, los bioensayos usados habitualmente para evaluar la resistencia a PPV en poblaciones segregantes requieren una gran inversión en tiempo y espacio. Por otro lado, sus resultados no siempre son concluyentes al estar muy influenciados por las condiciones medioambientales (Decroocq et al. 2005), lo que explica en gran medida las discrepancias que en los últimos años han surgido en torno al control genético de la resistencia a PPV (Rubio et al. 2007).

Estas razones han impulsado el interés de los diferentes programas de mejora en el desarrollo de la selección asistida por marcadores con el fin de evitar el costoso proceso de evaluación del carácter. No obstante, para lograr este objetivo es esencial fenotipar adecuadamente la resistencia como requisito previo indispensable en la realización de un cartografiado de cierta precisión (Soriano et al. 2008). Esta caracterización será, además, de gran ayuda en el establecimiento de un modelo de control genético consistente. En este sentido es importante resaltar que hasta el momento la mayor parte de los trabajos realizados en albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) solo han permitido clasificar los híbridos y variedades estudiados en resistentes y susceptibles, si bien con ciertas matizaciones en algunos casos (Martínez-Gómez et al. 2000). Un intento más sistemático de fenotipado fue llevado a cabo por Decroocq et al. (2005), pero en un cruce interespecífico *Prunus persica* x *Prunus davidiana*, mediante el uso de una escala basada en la intensidad de los síntomas en las hojas y la extensión de los mismos por toda la planta para clasificar los híbridos en 5 clases. En albaricoquero, pese a que habitualmente se recurre a la clasificación binaria (susceptible/resistentes), existen numerosas evidencias que señalan una gran variabilidad en la respuesta frente al virus dependiente de genotipo. Estas evidencias tienen orígenes distintos. Por un lado la experiencia acumulada en la observación de diferencias en el comportamiento

de las variedades cultivadas en áreas de difusión natural del patógeno. Por otro, los resultados de la evaluación de poblaciones segregantes en los programas de mejora mediante la realización de bioensayos, o los análisis genéticos más dirigidos como el llevado a cabo por Dicenta y Audergon (1998) donde se sugiere, por ejemplo, que el cultivar 'Stella' es inmune a PPV. Finalmente, los estudios de interacción planta-patógeno también parecen señalar comportamientos diferenciados. Por ejemplo, Ion-Nagy et al. (2006) detectaron PPV después de inoculaciones, usando fluorescencia estereomicroscópica, hibridación *in situ* y detección inmunológica en cultivares de albaricoquero clasificados como susceptibles y resistentes. Sin embargo, las infecciones en hojas diferían en la localización y la extensión entre y dentro de las dos clases fenotípicas. Los autores sugieren que diferencias en la eficiencia de replicación o el movimiento del virus podrían explicar dichos fenotipos.

En este trabajo se ha tratado de mejorar los resultados obtenidos en las evaluaciones rutinarias del programa de mejora de albaricoquero del IVIA, realizando una anotación de síntomas más detallada (hoja por hoja) y utilizando RT-PCR en tiempo real para incrementar la sensibilidad de la detección de PPV en hojas sintomáticas y asintomáticas. Este intento en modo alguno invalida la selección realizada hasta ahora dentro del programa, la cual se ha mostrado realmente eficaz, tan sólo pretende ser de ayuda para establecer las bases de una futura selección asistida. Para validar este sistema se han comparado los resultados obtenidos en la determinación de la resistencia a sharka en dos poblaciones, una F_2 ('Lito' x 'Lito') y una F_1 ('Goldrich' x 'Currot'), mediante dos evaluaciones, una con el nuevo método y otra con el procedimiento habitual en el programa de mejora de albaricoquero combinando la clasificación mediante síntomas visuales, en resistentes y susceptibles, con el análisis ELISA-DASI tras cada uno de los dos ciclos de frío del bioensayo.

El grado de coincidencia entre los resultados de la primera y la segunda evaluación varía según la población analizada (71% en 'Goldrich' x 'Currot' y 52% en 'Lito' x 'Lito') pero en general es bastante alto. Las incongruencias entre ambas evaluaciones pueden tener distintas explicaciones. Por ejemplo, existen numerosos casos en que los híbridos fueron considerados resistentes en la primera evaluación y los síntomas observados en la segunda son muy pocos. Esto podría indicar que las condiciones medioambientales en la

segunda evaluación podrían haber favorecido la infección, haciendo que ciertos híbridos poco susceptibles acabaran mostrando algunos síntomas. En otros casos simplemente se dispone de poca información (pocas hojas o datos del segundo ciclo) como para confirmar una reclasificación. Por tanto, en este sentido, es factible sugerir que el bioensayo como fuente de datos para la clasificación fenotípica, aún con limitaciones como ya se ha dicho, es bastante robusto. De hecho, las segregaciones que finalmente se obtiene en ambas poblaciones estudiadas según los dos métodos son ciertamente similares. En 'Lito' x 'Lito' según la primera evaluación 62% resistentes vs. 38% susceptibles y en la segunda 66% vs. 34%, mientras que en 'Goldrich' x 'Currot' 74% vs. 26% en la primera y 88% vs. 12% en la segunda. Estos datos, así como los procedentes de RT-PCR en tiempo real, vienen a corroborar el diferente comportamiento de las dos fuentes de resistencia utilizadas frente a PPV según todas las observaciones previas (Martínez-Gómez et al. 2000; Ion-Nagy et al. 2006), siendo 'Lito' más resistente que 'Goldrich'.

La enorme variabilidad observada, en el porcentaje de hojas sintomáticas entre los híbridos susceptibles de ambas familias, apoya las evidencias que ya se tenían en este sentido. Según esta primera impresión, es evidente que el análisis pormenorizado del número de hojas sintomáticas proporciona una información que quedaba oculta en las evaluaciones rutinarias del programa y que puede resultar muy útil para los fines ya descritos anteriormente. De manera preliminar se han agrupado estos híbridos en 3 clases fenotípicas con cierta homogeneidad pero sería necesario disponer de un conjunto de datos mayor para establecer una clasificación más consistente. Habría, por tanto, que determinar que parte de esta variabilidad obedece a causas genéticas y que parte a causas medioambientales. En cualquier caso, este resultado sugiere que aunque el control genético del carácter pueda deberse a uno o dos genes, en su expresión fenotípica podrían intervenir otros más.

La evaluación mediante RT-PCR en tiempo real se ha mostrado muy eficaz en la detección del virus en muestras asintomáticas (hasta un 39% en 'Goldrich' x 'Currot' y un 12% en 'Lito' x 'Lito'). Aunque en principio parece haber sido ligeramente más sensible en este ensayo, resulta difícil establecer comparaciones significativas con los resultados cualitativos de ELISA-DASI sin

haber analizado exactamente las mismas muestras. El verdadero potencial de esta técnica reside en el análisis cuantitativo (relativo o absoluto) de la presencia del virus, algo que desafortunadamente no se ha podido llevar a cabo por completo en este trabajo por los motivos ya reseñados. Cabe esperar que la evaluación tras el segundo ciclo de frío nos proporcione datos suficientes para elaborar un análisis estadístico significativo en base al número de partículas virales detectadas.

En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que la combinación de evaluación sintomatológica y RT-PCR en tiempo real puede permitir clasificar los híbridos con una mayor precisión que la disponible hasta ahora. Este es un primer paso en el camino hacia el desarrollo de la selección asistida para la resistencia a PPV que, además, resultará de gran ayuda en el estudio de recombinantes resistentes y susceptibles en el proceso de cartografiado del carácter.

BIBLIOGRAFÍA



6. BIBLIOGRAFÍA.

Adams AN, Guise CM, Crossley SJ (1998). Detection of plum pox virus in root and bark samples from dormant plum trees. *Acta Hort* 472: 469-474.

Asensio M (1996). El virus de la sharka (plum pox virus): caracterización, diagnóstico y detección mediante anticuerpos monoclonales específicos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 193 pp.

Audergon JM, Morvan G (1990). A rapid method for assessing the sensitivity of apricot to Plum Pox Virus. *Proceedings XXIII International Horticultural Congress*: 35-42

Audergon JM, Dosba F, Karayiannis I, Dicenta F (1994). Amélioration de l'abricotier pour la résistance à la sharka. *EPPO Bull* 24: 3741-3748.

Audergon JM (1995). Variety and breeding. *Acta Hort* 384: 35-45.

Audergon JM, Dosba F, Karayiannis I, Dicenta F (1995) A method to determine the susceptibility of apricot to plum pox virus. *Acta Hort* 384: 575-579.

Avinent L, Hermoso de Mendoza A, Liàcer G 1993. Dispersión natural del virus de la sharka en plantaciones frutales de Valencia. *Investig Agrar Ser Prod Prot Veg* 8 (2): 251-263.

Badenes ML, Hurtado MA, Martínez Calvo J, Liàcer G (1996). Mejora varietal de albaricoquero. *Fruticultura Profesional* 82: 2-5.

Badenes ML, Martínez-Calvo J, García-Carbonell S, Villarubia D, Liàcer G (1997). Descripción de variedades autóctonas valencianas de albaricoquero. Publicaciones de la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. *Serie Divulgación Técnica* 41: 60 pp.

Bassi D, Audergon JM (2006). Apricot breeding, update and perspectives. *Acta Hort* 701: 279-294.

Boscia D, Zeramdini H, Cambra M, Potree O, Gorris MT, Myrta A, Di Terlizzi B, Savino V (1997). Production and characterization of monoclonal

antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *Eur J Plant* 103: 273-286.

Cámara Machado A Da, Knapp E, Pühringer H, Seifert G, Hanzer V, Weiss H, Katinger H, Laimer da Cámara Machado M (1994). Approaches to pathogen-mediated resistance breeding against plum pox potyvirus in stone-fruit trees. *EPPO Bull* 24: 697-704.

Cambra M, Llácer G (1994). El virus de la sharka en frutales. *Actas del VII Congreso Latinoamericano de Fitopatología*: 179-183.

Candresse T, Macquaire G, Lanneau M, Bousalem M, Wetzel T, Quiot-Douine L, Quiot JB, Dunez J (1994). Detection of plum pox potyvirus and analysis of its molecular variability using immunocapture-PCR. *EPPO Bull* 24: 585-594.

Candresse T., Cambra M. (2006). Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *EPPO Bull* 36: 239-246.

CAPA (2008) Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. *Anuario de estadísticas*. www.agricultura.gva.es/estadisticos.

Capote N, Bertolini E, Olmos A, Vidal E, Martínez M C, Cambra M (2009). Direct simple preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *Int Microbiol* 12: 1-6.

Crescenzi A, Nuzzaci M, Piazzolla P (1994). Sensitivity of the detection of plum pox potyvirus by molecular assays. *EPPO Bull* 24: 579-584.

Crescenzi A, d'Aquino L, Nuzzaci M, Comes S, Piazzolla P, Ostuni A, Bavoso A, De Stradis A (1998). Synthetic peptides in diagnosis of plum pox potyvirus. *Acta Hort* 472: 491-494.

Crossa-Raynaud P (1961). L'abricot et le climat. *Journées Nationales de l'abricotier* : 55-57.

Damsteegt VD, Scorza R, Stone AL, Shneider WL, Webb K, Demuth M, Gildow FE (1997). *Prunus* Host Range of Plum pox virus (PPV) in de United States by Aphid and Graft inoculation. *Plant Dis* 91(1): 18-23.

-
- Decroocq V, Foulongne M, Lambert P, Le Gall O, Mantin C, Pascal T, Schurdi-Levraud V, Kervella M** (2005). Analoges of virus resistance genes map to QTLs for resistance to Sharka disease in *Prunus davidiana*. *Mol Gen Genomics* 272: 680-689.
- Desvignes JC** (1999). Les maladies communes aux prunus en Maladies à virus des arbres fruitiers. Editions *Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes*. Paris. 59-67 pp.
- Dicenta F, Audergon J M** (1998). Inheritance of resistance to Plum pox potyvirus (PPV) in "Stella" apricot seedlings. *Plant Breed* 117: 579-581.
- Dicenta F, Martínez-Gómez P, Burgos L, Egea P** (2000). Inheritance of resistance to plum pox potyvirus (PPV) in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breed* 119: 161-164.
- Dondini L, Costa F, Tataranni G, Tartarini S, Sansavini S** (2004). Cloning of apricot RGAs (Resistance Gene Analogs) and development of molecular markers associated with Sharka (PPV) resistance. *J Hort Sci Biotech* 79: 729-734.
- Dosba F, Denise F, Maison P, Massonié G, Audergon JM** (1991). Plum Pox Virus resistance of apricot. *Acta Hort* 293: 569-579.
- Dosba F, Orliac S, Dutranoy F, Maison P, Massonié G, Audergon JM** (1992). Evaluation of resistance to Plum pox virus in apricot trees. *Acta Hort* 309: 211-219.
- Egea J, García JE, Berenguer T** (1994). El albaricoquero, situación y perspectivas del cultivo. *Hortofruticultura* 6: 53-62.
- Escalettes V, Dahouron F, Ravelonandro M, Dosba F** 1994. Utilisation de la transgénese pour l'obtention de pruniers et d'abricotiers exprimant le gène de la protéine capsidale du plum pox potyvirus. *EPPO Bull* 24: 705-712.
- FAO** (2007). FAOSTAT database 2004. Disponible en: <http://apps.fao.org>.
- Forte V** (1988). El albaricoque. *Ediciones Mundi Prensa*. Madrid. 11-14 pp.

-
- García JA, Riechmann JL, Laín S, Martín MT, Guo H, Simon L, Fernández A, Domínguez E, Cervera MT** (1994). Molecular characterization of plum pox potyvirus. *EPPO Bull* 24: 543-554.
- Goor A, Nurock M** (1968). The peach, the apricot, the plum and the pear. In *Fruits of the Holy Land. Israel Universities Press. Jerusalem.* 202-227 pp.
- Guillet-Bellanger I, Audergon JM** (2001). Inheritance of the Stark Early Orange apricot cultivar resistance to *Plum pox virus*. *Acta Hort* 550: 111-115.
- Hurtado MA, Romero C, Vilanova S, Abbott AG, Llácer G, Badenes ML** (2002). Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) and mapping of PPV (sharka) resistance. *Theor Appl Genet* 105: 182-191.
- Ion-Nagy L, Lansac M, Eyquard JP, Salvador B, García JA, Le Gall O, Hernould M, Schurdi-Levraud V, Decroocq V** (2006). PPV long-distance movement is occasionally permitted in resistant apricot hosts. *Virus Res* 120: 70-78.
- Karayiannis I, Mainou A** (1994). Resistance to plum pox potyvirus in apricots. *EPPO Bull* 24: 761-766.
- Krczal G, Avenarius U** (1994). Detection and characterization of plum pox potyvirus isolates from southern Germany by polymerase chain reaction (PCR). *EPPO Bull* 24: 625-632.
- Krska B, Salava J, Polák J, Komínek P** (2002). Genetics of resistance to *Plum pox virus* in apricot. *Plant Prot Sci* 38: 180-182.
- Labonne G, Lauriaut F, Yvon M, Quiot JB** (1994). Dissémination du plum pox potyvirus par les pucerons: analyse des vecteurs potentiels du virus dans un verger d'abricotiers. *EPPO Bull* 24: 681-690.
- Laín S, Riechman JL, García JA** (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus. *Virus Res* 13: 157-172.
- Levy L, Hadidi A** (1994). A simple and rapid method for processing tissue infected with plum pox potyvirus for use with specific 3'non-coding region RT-PCR assays. *EPPO Bull* 24: 595-604.
-

- Levy L, Damstegt V, Welliver R** (2000). First report of plum pox virus (Sharka disease) in *Prunus persica* in the United States. *Plant Dis* 84: 202.
- Llácer G, Cambra M, Laviña A** (1985). Detection of plum pox virus in Spain. *EPPO Bull* 15: 325-329.
- Llácer G, Cambra M** (1986). Occurrence of plum pox virus in Spain in a new natural host, *Prunus salicina* Lindl (Japanese plum). *Plant Dis* 70: 173.
- Llácer G** (1987). La sharka: una grave amenaza para la producción de albaricoques en España. *Fruticultura Profesional* 12: 41-47.
- Louro D, Corvo LM** (1986). Ocurrence of sharka in Portugal. *Acta Hort* 193: 183-186.
- Maiss E, Timpe U, Briske A, Jelkmann W, Casper R, Himmler G, Mattanovich D, Katinger HWD** (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *J Gen Virol* 70: 513-524.
- Martínez-Gómez P, Dicenta F** (1999). Evaluation of resistance to sharka in the breeding apricot program in CEBAS-CESIC in Murcia. *Acta Hort* 488: 731-737.
- Martínez-Gómez P, Dicenta F, Audergon JM** (2000). Behaviour of apricot cultivars in the presence of sharka (Plum pox potyvirus): a review. *Agonomie* 20: 407-422.
- MARM** (2008). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. *Anuario de estadísticas*. www.mapa.es/es/estadistica/infoestad.html.
- Moustafa TA** (2000). Resistencia frente al virus de la sharka en híbridos intraespecíficos de albaricoquero. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 171pp.
- Moustafa TA, Badenes ML, Martínez-Calvo J, Llácer G** (2001). Determination of resistance to sharka (plum pox) virus in apricot. *Sci Horti* 91: 57-70.
- Navrátil M, Simonová V, Paprstein F, Karesová R** (1998). Detection and serological identification of plum pox virus isolates in the Czech Republic. *Acta Hort* 472: 373-378.

-
- Németh M** (1994). History and importance of plum pox in stone-fruit production. *EPPO Bull* 24: 525-536.
- Olmos A, Bertolini E, Gil M, Cambra M** (2005). Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *J Virol Met* 128: 151-155.
- Polák J** (1994). Breeding for resistance to plum pox potyvirus in the Czech Republic. *EPPO Bull* 24: 781-782.
- Ravelonandro M., Scorza R, Callahan A, Cordts J, Monsion M, Fuchs M, Delbos R, Bachelier J, Gonsalves D, Dunez J** 1994. Production of plants of *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica* transgenic for plum pox potyvirus coat protein, and demonstration of PPV resistance in transformed *N. benthamiana*. *EPPO Bull* 24: 713-720.
- Ravelonandro M, Dunez J, Scorza R, Labonne G** (1998). Challenging transgenic plums expressing potyvirus coat protein genes with viruliferous aphids. *Acta Hort* 472: 413-420.
- Rehder A** 1967. Manual of cultivated trees and shrubs. Macmillan. New York. 996 pp.
- Riechman JL, Laín S, García JA** 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73: 1-16.
- Rosales M, Hinrichsen P, Herrera G** 1998. Molecular characterization of plum pox virus isolated from apricots, plums and peaches in Chile. *Acta Hort* 472: 401-406.
- Roy AS, Smith IM** (1994). Plum pox situation in Europe. *EPPO Bull* 24: 515-524.
- Rubio M, Audergon JM, Martínez-Gómez P, Dicenta F** (2007). Testing genetic control hypotheses for Plum pox virus (sharka) resistance in apricot. *Scientia Hort* 112: 361-365.
- Scorza R, Ravelonandro M, Callahan AM, Cordts JM, Fuchs M, Dunez J, Gonsalves D** (1994). Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Rep* 14: 18-22.
-

-
- Scorza R, Callahan AM, Levy L, Damsteegt V, Ravelonandro M** (1998). Transferring potyvirus coat protein genes through hybridization of transgenic plants to produce plum pox virus resistant plums (*Prunus domestica* L.). *Acta Hort* 472: 421-428.
- Soriano JM, Vera-Ruiz EM, Vilanova S, Martinez-Calvo J, Liácer G, Badenes ML, Romero C** (2008). Identification and mapping of a locus conferring plum pox virus resistance in two apricot-improved linkage maps. *Tree Gen Genomes* 4: 391-402.
- Teycheney PY, Tavert G, Delbos R, Ravelonandro M, Dunez J** (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA (strain D). *Nucleic Acids Res* 17: 10115-10116.
- Thompson D, McCann M, MacLeod M, Lye D, Green M, James D** (2001). First report of plum pox virus in Ontario, Canada. *Plant Dis* 85: 97.
- Vavilov NI** (1951). Phytogeographic basis of plant breeding. En: Chester K.S. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chron Bot* 13: 13-54.
- Vilanova S, Romero C, Abbott AG, Liácer G, Badenes ML** (2003). An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F₂ progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. *Theor Appl Genet* 107: 239-247.