

Capítulo 4

Distribución espacio-temporal de *Plum pox virus*-D en un huerto de la Región de Valparaíso

Mónica Madariaga V.

Licenciada en Biología, Dra.
mmadariaga@inia.cl

Cristóbal Campos M.

Ingeniero Civil Agrícola

Nelly Nova L.

Ingeniera en Biotecnología Molecular

Jéssica Devia P.

Ingeniera Agrónoma

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, el virus de la viruela del ciruelo, *Plum pox virus* (PPV), Está presente en Chile y desde su identificación se han realizado estudios epidemiológicos en las principales regiones productoras de este tipo de frutales. El primer trabajo realizado por Herrera *et al.*, 1998, fue una prospección en la cual se analizaron 10.051 muestras provenientes de cinco regiones de Chile ubicadas entre Atacama y del Libertador General Bernardo O'Higgins, en donde se encontró que en promedio un 15,2 % de las muestras analizadas fueron positivas a PPV. Posteriormente, Fiore *et al.*, 2010 reportaron un 3,22 % de infección en un total de 1.396 muestras analizadas, colectadas en las regiones de Valparaíso, Metropolitana y del Libertador General Bernardo O'Higgins.

El conocimiento actualizado de la epidemiología de cualquier enfermedad es de vital importancia para mantener un control eficiente en el tiempo. Estudios como incidencia y distribución espacio-temporal, son índices que ayudan a tener un panorama del avance de la enfermedad en una región determinada. Es por esta razón que el Laboratorio de Virología de INIA La Platina realizó estudios de este tipo durante las temporadas 2019-2020, 2020-2021 y 2021-2022, bajo el alero del proyecto "Desarrollo de estrategias de mitigación para la enfermedad de Sharka causada por *Plum pox virus* raza D", apoyado por FIA y la industria privada, cuyos resultados presentaremos a continuación.

4.1 Prospección de PPV

Durante la primavera de los años 2019 a 2022, se visitaron 78 huertos comerciales de las regiones de Valparaíso, Metropolitana y del Libertador General Bernardo O'Higgins. Un total de 2.064 muestras fueron analizadas mediante RT-PCR (Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando los partidores universales P1/P2 (Wetzel *et al.*, 1991) y la prueba ELISA-DAS (Double Antibody Sandwich Enzyme linked Immunosorbent Assay) usando anticuerpos universales para PPV (Agdia, Inc.) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los resultados indicaron que, del total de huertos visitados, el 40 % dio positivo a *Plum pox virus*. Entre las especies analizadas estuvo duraznero, ciruelo, nectarino y cerezo. No se encontraron muestras positivas en cerezos, pero sí en las otras tres especies frutales. La mayor positividad se determinó en la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins (22,91 %), seguido por Metropolitana (21,18 %) y Valparaíso (16,14 %) (**Cuadro 4.1**).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en las publicaciones de Herrera *et al.*, 1998 y Fiore *et al.*, 2010, en las mismas tres regiones, se puede observar que en todos los estudios la menor positividad aparece en la Región de Valparaíso y la mayor en la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins (**Cuadro 4.1** y **Figura 4.1**).

Cuadro 4.1. Número de muestras analizadas, positivas y porcentaje de infección de PPV-D por región, obtenidos en tres trabajos de prospección realizados en diferentes años.

Región	Herrera <i>et al.</i> , 1998			Fiore <i>et al.</i> , 2010			Presente Trabajo		
	Analizadas	Positivas	%Infección	Analizadas	Positivas	%Infección	Analizadas	Positivas	%Infección
Valparaíso	2.810	335	11,9	180	2	1,1	477	77	16,1
Metropolitana	3.424	539	15,7	606	16	2,6	845	179	21,2
O'Higgins	2.084	341	16,4	610	27	4,4	742	170	22,9
Total	8.318	1.215	14,6	1.396	45	3,22	2.064	426	20,63

En la **Figura 4.2** se muestran los porcentajes de infección totales obtenidos en los tres estudios y la tendencia de aumento de plantas infectadas con PPV. Se puede observar que, entre los resultados de Herrera *et al.*, 1998 y aquellos obtenidos en este trabajo, hay un aumento del 9,04 % del porcentaje de infección, mostrando una tendencia al alza luego de 24 años. Cabe destacar, que el

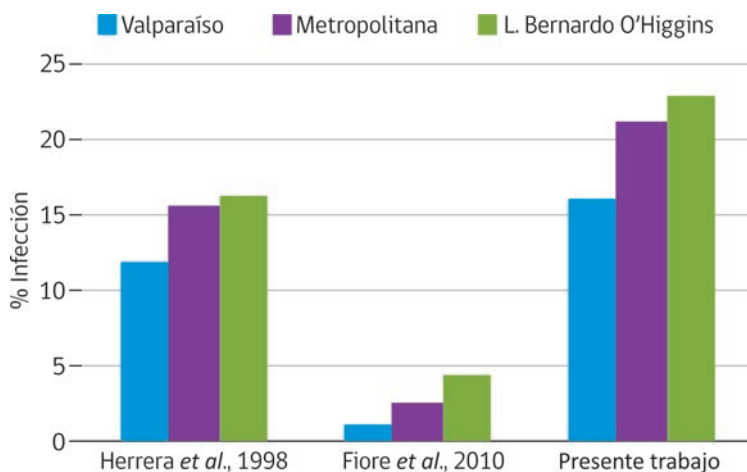


Figura 4.1. Porcentajes de infección de muestras analizadas en las regiones de Valparaíso, Metropolitana y del Libertador General Bernardo O'Higgins, en tres estudios realizados con aproximadamente 12 años de diferencia.

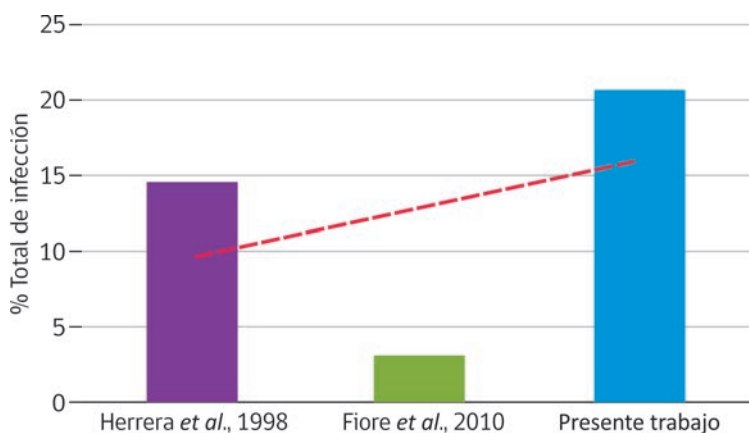


Figura 4.2. Porcentajes de infección totales de PPV obtenidos en tres prospecciones realizadas con 12 años de diferencia, en las regiones de Valparaíso, Metropolitana y del Libertador General Bernardo O'Higgins. La línea roja marca la tendencia en el aumento de la infección.

porcentaje de infección reportado por Fiore *et al.*, 2010, no sigue la tendencia que muestran los resultados de los otros dos trabajos. A pesar de no contar con toda la información para explicar este hecho, podemos inferir que influyeron otros factores como el tamaño muestral, condiciones agroclimáticas del periodo de muestreo, las variedades utilizadas para el análisis, entre otras.

Finalmente, al comparar los resultados obtenidos por Herrera *et al.*, 1998, Fiore *et al.*, 2010 y los de este trabajo, podemos afirmar que la infección por PPV-D ha aumentado en los frutales de duraznero, nectarino y ciruelo, en las regiones de Valparaíso, Libertador General Bernardo O'Higgins y Metropolitana, principales zonas productoras de estos carozos.

4.2 Distribución espacio-temporal

El estudio se realizó en la primavera de los años 2019, 2020 y 2021 en un huerto comercial de duraznero variedad Zee Lady de 18 años, ubicado en la comuna de Catemu, Región de Valparaíso ($32^{\circ}46'25''S$ $70^{\circ}58'49''W$) (**Figura 4.3**). Al inicio de este estudio se sospechó que el huerto estaba infectado con *Plum pox virus* por encontrarse aledaño a otro cuartel de duraznero variedad DU 158 sobre Nemaguard, infectado con PPV (**Figuras 4.4 y 4.5**), en el cual se había cortado la variedad dejando en terreno solo los portainjertos que desarrollaron sierpes. Estos portainjertos manifestaban los síntomas típicos de la infección por PPV (**Figura 4.6**).

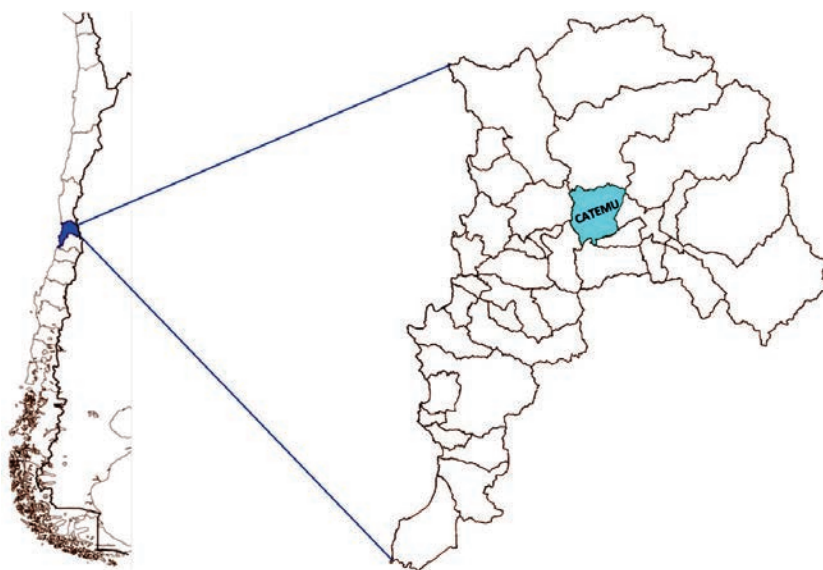


Figura 4.3. Ubicación comuna de Catemu. A la izquierda se observa un mapa de Chile donde la Región de Valparaíso se destaca en color azul. A la derecha se observa un mapa de la región, donde se destaca en color calipso la comuna de Catemu.



Figura 4.4. Ubicación georreferenciada del huerto comercial de duraznero variedad Zee Lady y del huerto de Nemaguard infectado con PPV. El cuadro rojo destaca dentro del huerto la ubicación del grupo de 200 plantas seleccionadas para el análisis (Fuente: Google Earth).



Figura 4.5. Ubicación del huerto durazneros var. Zee Lady utilizado para este estudio con respecto al predio de portainjerto Nemaguard infectado con PPV.



Figura 4.6. Nemaguard del cuartel de duraznero variedad DU 158 aledaño al huerto que se utilizó en este trabajo. A: Crecimiento de sierpes desde el portainjerto. B: Clorosis de las hojas en sierpes, síntoma característico de infección por PPV.

Dentro del huerto en estudio, se diseñó un rectángulo conformado por 20 hileras (H3-H22) y 10 plantas (P10-P19) por hilera, conformando un grupo muestral de 200 plantas (**Figura 4.4**) que fueron analizadas cada año en noviembre. Desde cada planta se colectaron cinco hojas por orientación cardinal del árbol, las cuales fueron dispuestas en bolsas plásticas debidamente rotuladas y almacenadas en una nevera para mantenerlas a una temperatura entre 5 °C y 8 °C, donde se mantuvieron durante la colecta en el predio hasta su arribo al Laboratorio de Virología de INIA La Platina. La detección del virus en cada una de las 200 plantas marcadas en el huerto dentro del rectángulo rojo (**Figura 4.4**), se realizó mediante la prueba ELISA-DAS con anticuerpos policlonales (Agdia, Inc.) considerando dos repeticiones para cada muestra y siguiendo el protocolo del fabricante, quien además provee los controles positivos y negativos (**Figura 4.7**). La colecta de muestras y pruebas ELISA se repitió cada año para las mismas plantas.

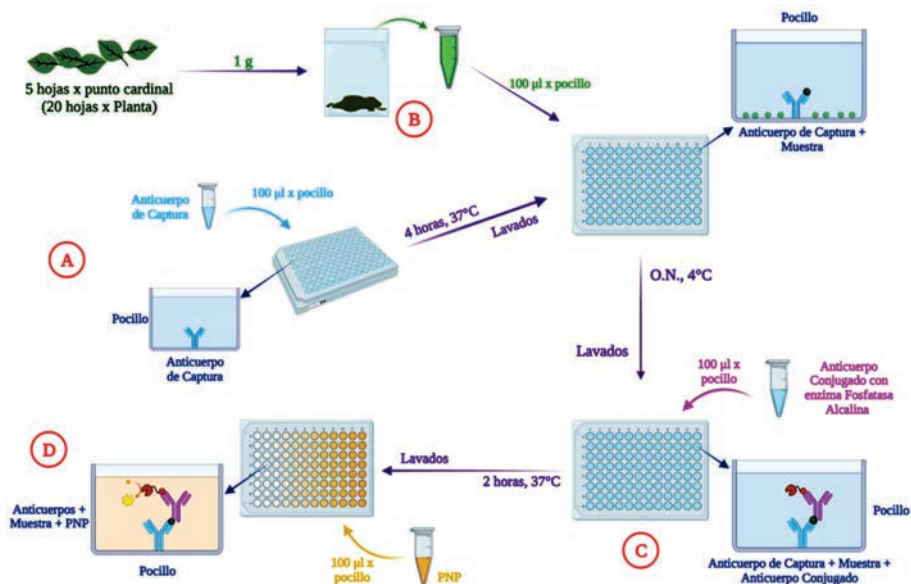


Figura 4.7. Esquema ensayo ELISA-DAS (ELISA sándwich de doble anticuerpo). A: Se agrega anticuerpo primario (captura) a cada pocillo de la placa ELISA. B: Preparación de muestra a analizar para agregarla a cada pocillo de la placa ELISA. Las muestras, controles positivos y negativos se agregan por duplicado. C: Se agrega anticuerpo secundario (conjugado) a cada pocillo de la placa ELISA. D: Se agrega PNP (p-nitrofenil fosfato) a cada pocillo de la placa ELISA y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro con un filtro de 405 nm en intervalos de tiempo.

4.2.1 Análisis espacio-temporal

Los resultados de los análisis de ELISA-DAS indicaron que la infección por PPV se diseminó entre las plantas analizadas durante los tres años estudiados. En el total de la población los casos acumulados de plantas enfermas por año fueron en aumento (Incidencia). No obstante, el número de nuevos casos infectados que aparecen cada año en la población sana remanente del año anterior va disminuyendo (**Cuadro 4.2**). Esto puede explicarse ya que, al aumentar cada año el número de plantas infectadas en la población total analizada, la población susceptible a enfermarse anualmente disminuye y, por lo tanto, puede haber un menor número de nuevos infectados.

Cuadro 4.2. Número de enfermos acumulados, porcentaje de incidencia y número de nuevos casos infectados para los tres años estudiados en un grupo muestral de 200 individuos en un huerto de durazneros variedad Zee Lady ubicado en la Región de Valparaíso.

Año	Nº Enfermos Acumulados	% Incidencia	Nº Nuevos Casos Infectados
2019	63	31.5	63
2020	91	45.5	28
2021	108	54	17

Considerando estos resultados, se determinó el patrón de variación o comportamiento de la enfermedad en el tiempo en base a la incidencia, que fue estimada con el paquete *epiphy* del software estadístico R. El programa define este concepto como:

Incidencia: Número de Plantas Enfermas en cada unidad de muestreo

Definiendo como unidad de muestreo a un **grupo** de individuos dentro de la población de 200 plantas utilizadas para este trabajo (**Figura 4.4**). Estos **grupos** pueden estar conformados por un individuo o varios de ellos.

Utilizando la incidencia como indicador se puede observar de un año a otro cómo se va diseminando la enfermedad dentro del huerto (cuadros rojos), considerando grupos de un individuo (**Figura 4.8 A**) o de cuatro plantas contiguas (grupo de 2 x 2) (**Figura 4.8 B**). Lo observado en la **Figura 4.8** también se refleja en el **Cuadro 4.2** en el aumento de número de enfermos acumulados y en el porcentaje de incidencia. Además, la **Figura 4.8** nos muestra como la enfermedad avanza en dirección izquierda-derecha, donde los nuevos enfermos cada año van apareciendo alrededor de las plantas enfermas anteriormente.

Si en el grupo de individuos conformado de cuatro plantas contiguas (grupo 2 x 2) se encuentra al menos una planta infectada, se obtiene la gráfica en el tiempo de la **Figura 4.9**, donde se observa que durante el año 2019 hay 13 grupos sin infección alguna (cuadros blancos), al año siguiente quedan seis y en el 2021 sólo tres, es decir podemos ver cómo va disminuyendo la población sana dentro del grupo muestral debido a la dispersión de la enfermedad (incidencia, representado por los cuadros rojos) que, como se dijo anteriormente, podría explicar la disminución del número de nuevos casos enfermos (**Cuadro 4.2**).

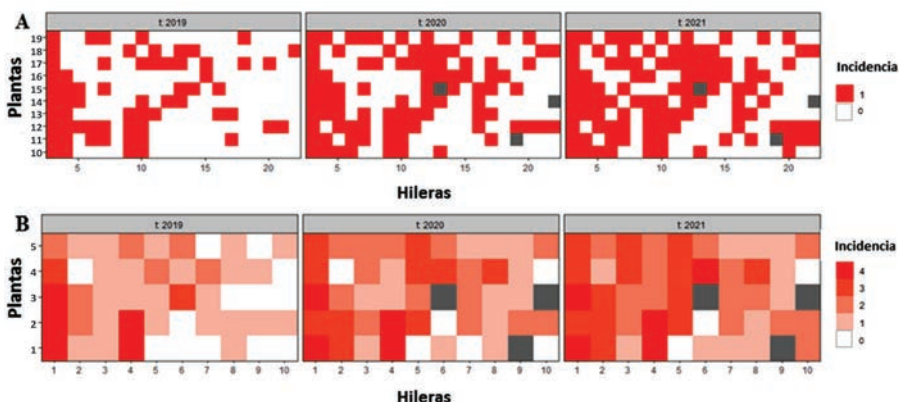


Figura 4.8. Incidencia de PPV por unidad de muestreo en tres temporadas. A: La unidad muestral es una planta, siendo la incidencia 0 = sano y 1 = enfermo. B: La unidad muestral está formada por cuatro plantas en un arreglo 2 x 2, la incidencia se muestra en una escala de colores de 0 a 4, correspondiente al número de plantas enfermas en el arreglo. Las plantas erradicadas se muestran en color gris.

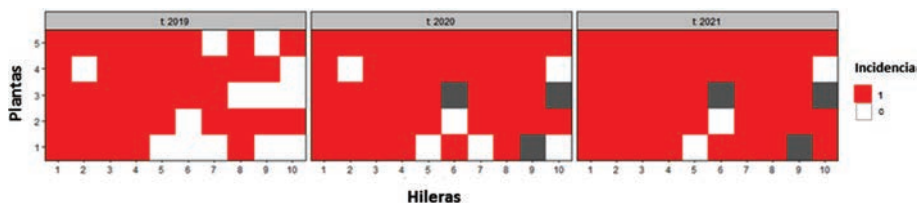


Figura 4.9. Incidencia de PPV por unidad de muestreo en tres temporadas. La unidad de muestreo está formada por cuatro plantas en una disposición 2 x 2. Los cuadros de color rojo indican unidades de muestreo en que haya a lo menos un individuo infectado. Los cuadros blancos representan la población susceptible de ser infectada. Los cuadros de color gris representan plantas que fueron erradicadas del predio.

Con los resultados obtenidos se puede determinar qué tipo de patrón de dispersión tiene la enfermedad de Sharka en el huerto estudiado, utilizando el índice de dispersión de Fisher (Fisher *et al.*, 1992), el cual vale menos de 1.0 para patrones uniformes, 1.0 para una distribución aleatoria y sobre 1.0 para patrones agregados. Para este estudio, el valor del índice de Fisher calculado fue de 1.47. Por lo tanto, este índice nos indica que la diseminación de la enfermedad ocurre alrededor de focos de plantas infectadas, observándose que al aumentar el número de plantas enfermas están se van agrupando o quedando agregadas cerca de plantas que estaban infectadas desde antes (focos) (**Figuras 4.8 y 4.9**).

A continuación, se realizó un análisis espacial por distancias (SADIE) el cual examina la distancia de los datos a la regularidad estadística entre los valores observados y un conjunto de permutaciones aleatorias, generando un índice (Índice SADIE). Los valores positivos del índice se consideran donantes de infección y los negativos receptores. En la Figura 4.10 la unidad de muestreo está formada por cuatro plantas en una disposición 2 x 2 y en ella podemos observar que las unidades de muestreo del lado izquierdo del gráfico tienden a ser más donantes (puntos rojos), mientras que los de la derecha son más receptoras (puntos azules). Esto puede explicarse porque la infección se encontraba presente en mayor medida en las plantas del lado izquierdo (donantes) que fueron infectando poco a poco al resto de la población sana (receptores), lo cual también se observa en las Figuras 4.8 y 4.9. En la Figura 4.10 también se puede observar cómo va cambiando el tamaño y la ubicación de los puntos rojos y azules ya que, al ir avanzando la diseminación de la enfermedad a través del tiempo, los grupos de individuos dadores (rojos) van ocupando más espacio (se mueven más a la derecha) y el tamaño de los círculos va variando dependiendo si dentro del grupo hay más o menos individuos con la capacidad de infectar (puntos rojos) o de ser infectado (puntos azules).

Todos estos resultados nos permiten decir que en la población de 200 plantas analizadas del huerto comercial de duraznero variedad Zee Lady, ubicado en la comuna de Catemu, Región de Valparaíso, entre los años 2019 y 2021, la infección por PPV-D aumentó anualmente, con un número de nuevos casos que fue menor cada año, debido a que la población sana fue disminuyendo (Cuadro 4.2). Además, los análisis espacio-temporales nos permiten decir que la enfermedad se esparció de izquierda a derecha. Considerando esto, podríamos decir que la sospecha inicial de que el huerto estaba siendo infectado por el cuartel aledaño de duraznero variedad DU 158 sobre Nemaguard, es posible, ya que como muestra la Figura 4.5 el cuartel de Nemaguard se encuentra a la izquierda del huerto que utilizamos para este trabajo. El patrón de distribución espacio-temporal observado corresponde a una agregación heterogénea, pues la infección se disemina en algunos casos a los árboles inmediatamente adyacentes y en otros a los árboles cercanos.

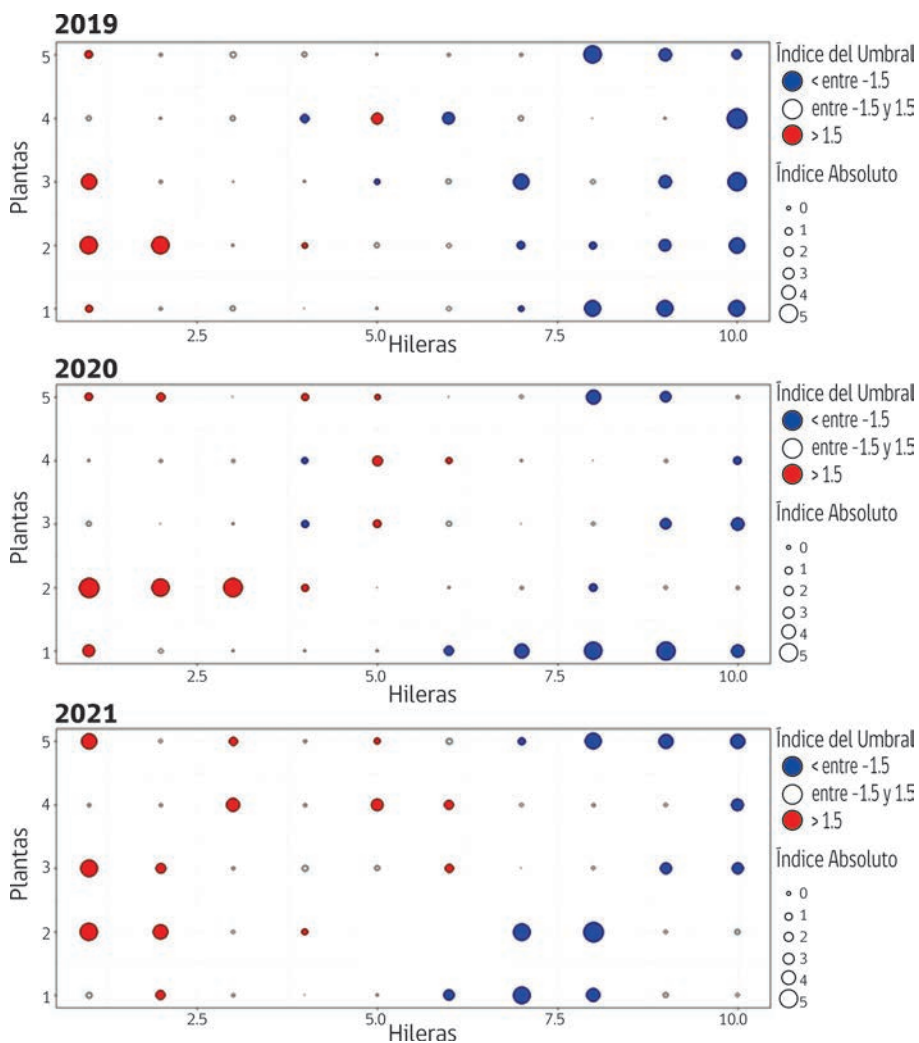


Figura 4.10. Análisis espacio-temporal de la infección de PPV durante 3 años mediante análisis espacial por distancias (SADIE). Cada rectángulo corresponde a la población de 200 plantas utilizadas para este estudio, donde la unidad de muestreo está formada por cuatro plantas en una disposición 2 x 2. El tamaño de los círculos indica mayor valor del índice SADIE, mientras que los colores indican si es dador (rojo) o receptor (azul) de la enfermedad.

4.3 Bibliografía

- Fiore, N., Araya, C., Zamorano, A., González, F., Mora, R., Sánchez-Navarro, J., Pallás, V., y Rosales, I.M. (2010). Tracking *Plum pox virus* in Chile throughout the year by three different methods and molecular characterization of Chilean isolates. *Julius-Kühn-Archiv*, 427, 156- 161.
- Fisher R.A., Thornton H.G., Mackenzie W.A., 1922. The accuracy of the plating method of estimating the density of bacterial populations. *Annals of Applied Biology*, 9, 325-359. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1922.tb05962.x.
- Herrera, G., Sepúlveda, P., y Madariaga, M. (1998). Survey of sharka disease (*Plum pox virus*) on stone fruit trees in Chile. *Acta Horticulturae*, 472, 393-400. DOI: 10.17660/actahortic.1998.472.46.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R.P., Mazyad, H., Aboul-Ata, A.E., y Dunez, J. (1991). Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of the El Amar strain of *Plum pox potyvirus*. *Journal of General Virology*, 72:1741-1746. DOI: 10.1099/0022-1317-72-7-1741.