

Capítulo 7

Comportamiento de PPV-D en fruta chilena

Mónica Madariaga V.

Licenciada en Biología, Dra.
mmadariaga@inia.cl

Isabel Ramírez A.

Ingeniera en Biotecnología
Molecular

Bruno Defilippi B.

Ingeniero Agrónomo, Ph.D

Jéssica Devia P.

Ingeniera Agrónoma

Karina Sepúlveda G.

Ingeniera Agrícola

Considerando el impacto económico que genera la enfermedad de Sharka, los países establecen severas restricciones para permitir el ingreso de material de propagación de frutales de carozo. Sin embargo, estas restricciones no aplican a los frutos, pues PPV no se transmite por semilla (Pasquini y Barba, 2006; Barba *et al.*, 2011; James, 2017). Además, la fruta al ser un elemento de consumo y no de propagación no representa un riesgo para la diseminación viral, permitiéndose su libre tránsito entre los diferentes mercados, sin importar si en su país de origen está presente la enfermedad.

Considerando lo indicado anteriormente y que en Chile la única raza de PPV presente es Dideron (PPV-D), considerada no epidémica o atenuada, la industria de frutales de carozo se había mantenido sin mayores pérdidas económicas. No obstante, este panorama cambió en el año 2017, debido a la detección del virus en fruta chilena arribada a Brasil (Rezende *et al.*, 2016), uno de los principales importadores latinoamericanos, provocando el rechazo de embarques completos y generando pérdidas evaluadas en US\$.1.227.600. La ciruela fue la más afectada con un 68,8 % del total de los embarques rechazados. Esta situación se genera debido a una modificación en la normativa fitosanitaria de Brasil, donde el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA) publica el Instructivo 17, regulando el ingreso de fruta procedente de países donde la Sharka está presente. Esta postura de Brasil se basó en la evidencia contenida en publicaciones científicas (Labonne y Quiot, 2001; Gildow *et al.*, 2004) que sugerían que, bajo condiciones de laboratorio, áfidos mantenidos en ayuno eran capaces de transmitir el virus desde una fruta infectada a una hoja sana. Sin embargo,

de acuerdo a nuestras indagaciones, a la fecha no existen otros reportes que corroboren este hallazgo y en cambio la comunidad científica concuerda en que la transmisión del virus desde fruta infectada es incierta (Cambra y Vidal, 2017).

Otras publicaciones muestran evidencias de que las bajas temperaturas generan una disminución en la tasa de replicación de ciertos potivirus (Chung *et al.*, 2015 y 2016; Singh *et al.*, 2018), situación similar a lo que ocurre en la cadena de frío en el transporte de frutas en las exportaciones. Además, otros autores sugieren que la presión del vector en el medio ambiente, la preferencia alimentaria y la disponibilidad del virus en el hospedero son variables, por lo que se deben tener en cuenta en la epidemiología de esta enfermedad (Moreno *et al.*, 2009; Cambra y Vidal, 2017).

Debido a todo esto, se hace imprescindible generar nueva evidencia científica que demuestre que la fruta no es una vía de transmisión de la enfermedad. Bajo el alero del proyecto que da origen a esta publicación, se realizaron dos estudios. El primero tuvo por objetivo dar a conocer el porcentaje de frutos sin síntomas y positivos a PPV procedentes de un árbol infectado, mientras que el segundo se comparó la acumulación de PPV en fruta recién cosechada, con fruta sometida a frío, imitando así las condiciones de transporte que se dan durante la exportación de fruta de carozo.

7.1 Estudio 1

Durante la temporada 2020-2021, se escogieron tres predios infectados con PPV en tres regiones del país. Cada uno de una especie de carozo distinta, con edades y características epidemiológicas diferentes (**Cuadro 7.1**).

Cuadro 7.1. Características huertos utilizados en el Estudio 1. Se especifica la especie y variedad del carozo, así como la ubicación, edad y nivel de sintomatología en la observación del huerto.

ID huerto	Especie	Variedad	Región	Edad huerto	Observación de síntomas
H1	Nectarino	Royal Delay	Metropolitana	10	Muy evidentes
H2	Ciruelo	Red Lyon	O'Higgins	6	Muy evidentes
H3	Duraznero	Zee Lady	Valparaíso	18	Muy atenuados

En cada huerto se escogieron seis plantas, cuya infección con PPV fue corroborada mediante RT-PCR utilizando los partidores universales P1/P2 (**Cuadro 7.2**).

Cuadro 7.2. Listado de los partidores utilizados para la detección por PCR de PPV en los Estudios 1 y 2.

ID Partidor	Secuencia 5'-3'	Producto PCR (pb)	Referencia
Nad5-F Nad5-R	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA	181	Menzel <i>et al.</i> , 2002
P1 P2	ACCGAGACCACTACACTCCC CAGACTACAGCCTCGCCAGA	243	Wetzel <i>et al.</i> , 1991
PPV-9196 PPV-9506	CAATAAAGCCATTGTTGGATC CTCTGTGCTCTTCTTGTG	313	Sánchez-Navarro <i>et al.</i> , 2005

Al momento de la cosecha, de cada planta seleccionada se colectaron diez frutos, nueve sin síntomas y uno con síntomas para utilizarlo como control positivo en los análisis por PCR (**Figura 7.1**). Los frutos fueron trasladados al Laboratorio de Virología de INIA La Platina, en donde se extrajeron muestras de 300 mg de piel de cada fruto, con las cuales se realizó una extracción de ácidos nucleicos totales (TNAs) por el método de captura con sílica (Foissac *et al.*, 2000). Con el RNA obtenido se realizó un RT-PCR con los partidores Nad5-F/Nad5-R (**Cuadro 7.2**) que amplifican para un fragmento de un gen constitutivo de la planta, que corresponde a la subunidad 5 de la Deshidrogenasa Mitocondrial NADH (nad5) (Menzel *et al.*, 2002) que permite verificar la integridad del RNA extraído. Luego, utilizando los partidores universales P1/P2 (**Cuadro 7.2**) se realizó un PCR para detectar la presencia de PPV en los frutos colectados (**Figura 7.2**).



Figura 7.1. Frutos de nectarino colectados desde el huerto H3 para el Estudio 1.

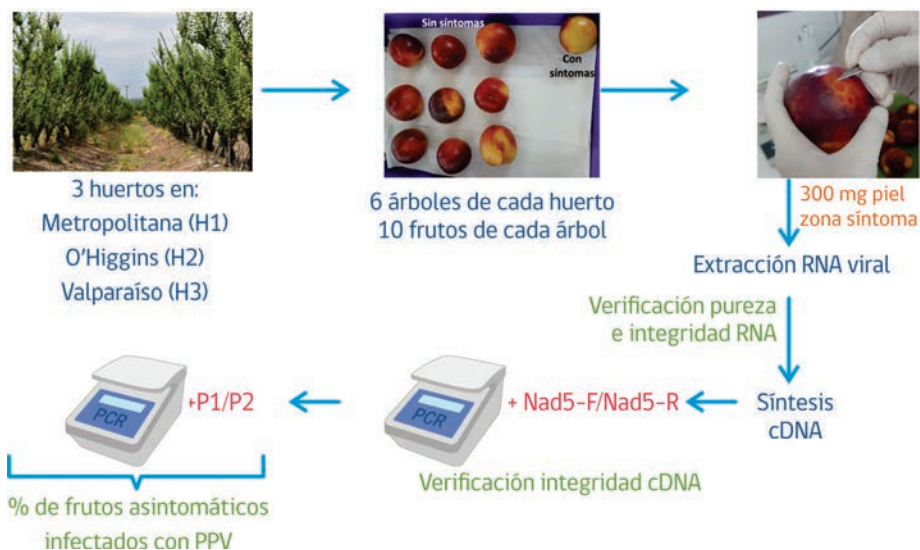


Figura 7.2. Esquema de colecta de frutos, muestreo y análisis de laboratorio del Estudio 1.

Los resultados de los PCRs para detectar PPV con partidores universales P1/P2 mostraron que de un árbol infectado a lo menos en el 50 % de sus frutos sin síntomas se encuentra infectado con el virus (**Cuadro 7.3** y **Figura 7.3**). Este resultado reafirma que la mejor estrategia para prevenir la situación de llegar con fruta infectada a destino es la erradicación de las plantas infectadas, evitando que ellas actúen como fuente de inóculo para la transmisión del virus a nuevos hospederos sanos, los cuales podrían producir frutos infectados asintomáticos que pueden dañar la

Cuadro 7.3. Número de frutos infectados y sanos determinados en los nueve frutos asintomáticos colectados de seis plantas infectadas con PPV, provenientes de tres huertos de frutales de carozo.

Planta	Huerto 1		Huerto 2		Huerto 3	
	N° Frutos		N° Frutos		N° Frutos	
	Infectados	Sanos	Infectados	Sanos	Infectados	Sanos
1	8	1	7	2	5	4
2	8	1	9	0	4	5
3	9	0	7	2	5	4
4	8	1	6	3	5	4
5	9	0	7	2	4	5
6	8	1	6	3	5	4
Total	50	4	42	12	28	26

imagen de Chile como exportador y significar pérdidas económicas graves a los productores de frutales de carozos.

El hecho de que en cada uno de los predios haya una distribución homogénea del número de frutos infectados y sanos en los árboles analizados, da mayor robustez a estos resultados. Debido a que, por cada 9 frutos asintomáticos tomados al azar de 6 árboles enfermos se puede ver la misma distribución de enfermos y sanos dentro de un mismo huerto, mostrando que la enfermedad se distribuye en los frutos de manera similar entre los árboles de un mismo predio (**Cuadro 7.3**).

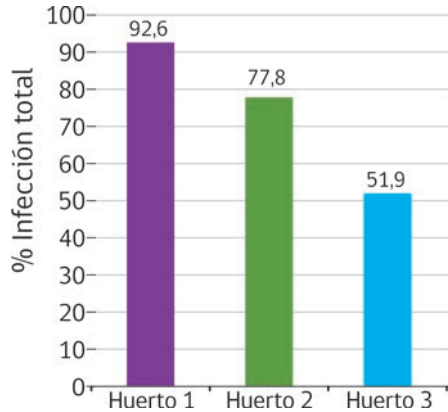


Figura 7.3. Porcentaje de infección en frutales de carozo asintomáticos colectados de árboles infectados con PPV de tres huertos (H1, H2 y H3) ubicados en las regiones Metropolitana, O'Higgins y Valparaíso, respectivamente.

Debido a que la manifestación de síntomas se ve favorecida por la especie de *Prunus*, variedad, título viral y condiciones agroclimáticas, es que los resultados de cada huerto no son comparables entre sí, ya que están ubicados en distintas regiones, poseen diferentes edades y producen distintas especies de frutales de carozo.

7.2 Estudio 2

Este estudio se llevó a cabo mediante la implementación de dos ensayos independientes el uno del otro realizados en las temporadas (2020-2021 y 2021-2022), en un huerto comercial de ciruelos variedad Red Lyon de seis años de edad, ubicado en la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, que se encontraba previamente infectado con PPV según registros del SAG (datos disponibles en <https://www.sag.cl/ambitos-de-accion/plum-pox-virus-raza-d-enfermedad-de-sharka/registros>). En cada temporada se realizó un muestreo y un número de repeticiones distintos, pero en ambas las muestras fueron distribuidas en los siguientes tratamientos (**Figura 7.4**):

- Tratamiento 1 (T1): Fruta recién cosechada. Se mantuvo a temperatura ambiente por 18 horas.
- Tratamiento 2 (T2): Fruta sometida a frío (0 °C) durante 7 días.
- Tratamiento 3 (T3): Fruta sometida a frío (0 °C) durante 15 días.

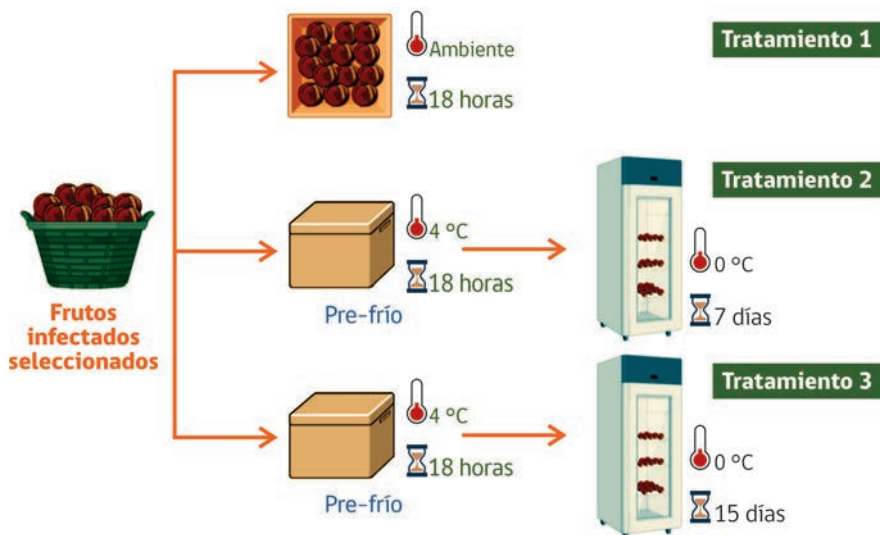


Figura 7.4. Esquema que representa los tratamientos utilizados en el Estudio 2.

Los frutos utilizados en los tratamientos T2 y T3 fueron almacenados en cajas rotuladas y llevadas a pre-frío (4 °C) durante 18 horas. Luego se colocaron en condiciones de frío (0 °C) en las cámaras frigoríficas de la Unidad de Post-Cosecha, INIA La Platina. Finalizados los tratamientos, se determinó la acumulación relativa de RNA viral de PPV-D presente en los frutos de cada tratamiento mediante Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) Semicuantitativo.

7.2.1 Temporada 1 (2020–2021)

Durante la primavera de la primera temporada, se seleccionaron al azar diez plantas dentro del huerto. Se verificó la infección de PPV en ellas mediante RT-PCR utilizando los juegos de partidores universales P1/P2 y PPV-9196/PPV-9506 (**Cuadro 7.2**). Las plantas fueron marcadas en terreno y al llegar el tiempo de la cosecha se colectaron desde ellas un total de 50 frutos con síntomas evidentes de Sharka (**Figura 7.5**), los cuales fueron trasladados inmediatamente al Laboratorio de Virología INIA-La Platina. Se distribuyeron 12 frutos por cada uno de los tratamientos (**Figura 7.6 A**) diseñados según lo mostrado en la **Figura 7.4**.



Figura 7.5. Síntomas causados por la infección por *Plum pox virus* en ciruelos variedad Red Lyon A: Se observa gran número de argollas cloróticas pequeñas que tienden a agruparse. B: Se observa una gran argolla clorótica difusa.

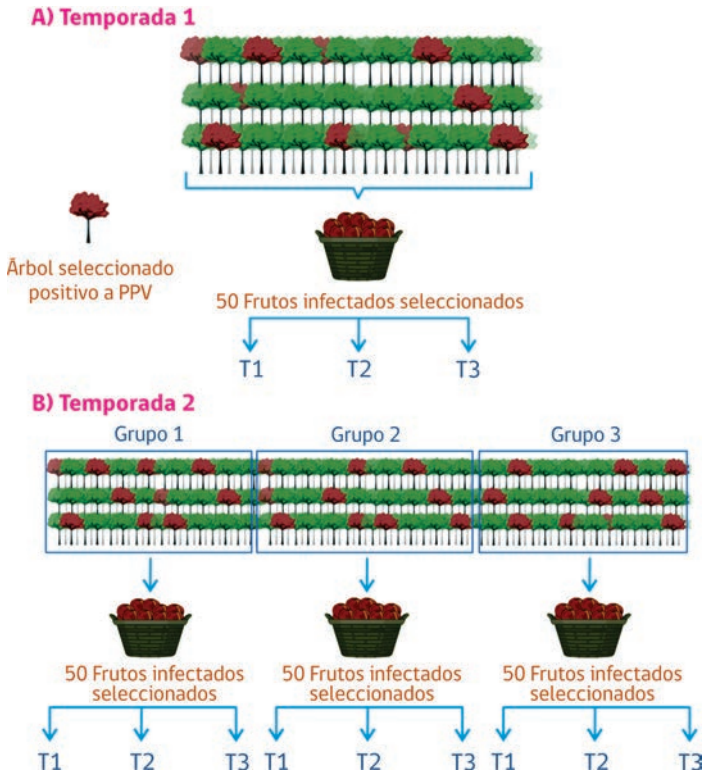


Figura 7.6. Esquema que representa el diseño experimental utilizado en las dos temporadas del Estudio 2. A: Temporada 1 (2020–2021). B: Temporada 2 (2021–2022).

Una vez finalizados los tratamientos se extrajo de cada uno de los frutos una muestra de 300 mg de piel justo en la zona con síntomas. Estas muestras fueron sometidas al procedimiento descrito en la **Figura 7.7**, que consiste en la extracción de ácidos nucleicos totales (TNAs) por el método de captura con sílica (Foissac *et al.*, 2000), síntesis de cDNA a partir del RNA obtenido y amplificación por PCR semicuantitativo. Primero se realizó un PCR para el gen constitutivo nad5 con los partidores Nad5-F/Nad5-R (**Cuadro 7.2**) para utilizarlo como control interno de los niveles de RNA viral relativos al gen nad5. Luego se llevó cabo un PCR para PPV, usando los partidores universales PPV-9196/PPV-9506 (**Cuadro 7.2**).

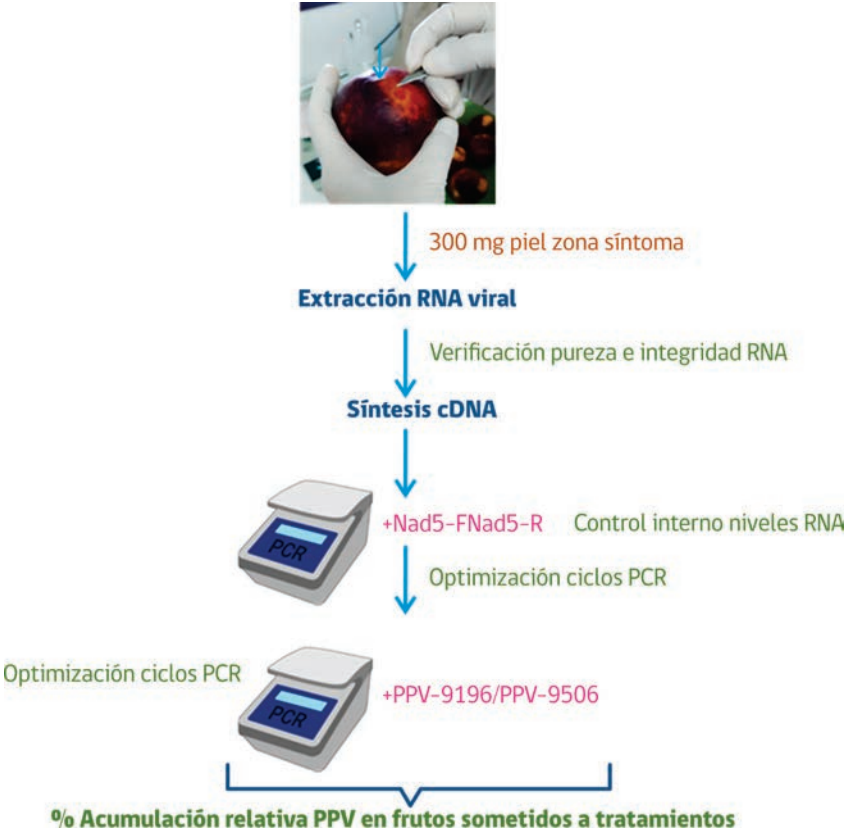


Figura 7.7. Esquema que representa el procedimiento de laboratorio realizado para el PCR semicuatitativo.

Para determinar que las diferencias en la acumulación del amplificado obtenido para PPV se debían efectivamente a diferencias en la acumulación del RNA viral en la muestra, se optimizó el número de ciclos para cada uno de los PCRs, definiendo como óptimo el número de ciclos que permitió observar una banda bien definida en el gel de agarosa y sin una concentración saturada de DNA. Para el caso del control interno nad5 se determinaron 30 ciclos y 24 ciclos para PPV.

El análisis de los resultados obtenidos del PCR semicuantitativo fue llevado a cabo utilizando el software ImageJ v1.53f51 (National Institutes of Health, USA), que permite hacer una cuantificación de la densidad de las bandas observadas en cada gel de electroforesis. Los valores obtenidos de las bandas de amplificación para PPV fueron normalizados en relación a la densidad medida de las bandas de la amplificación del gen nad5 de cada muestra, y luego graficados en relación a la acumulación de RNA en el Tratamiento T1, que sirvió como control para este propósito (**Figura 7.8 A**).

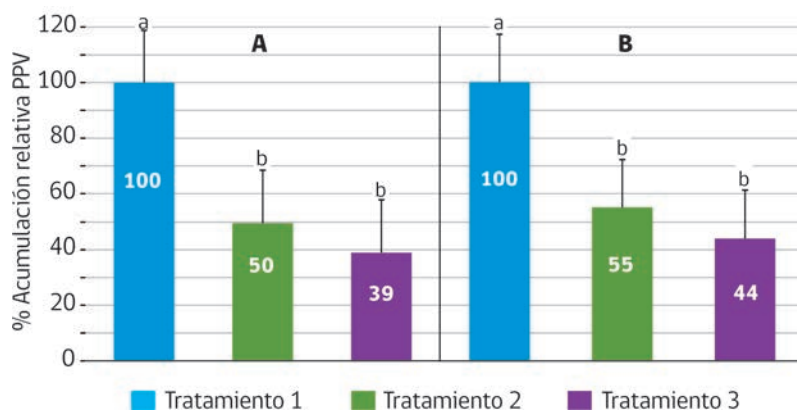


Figura 7.8. Porcentaje de acumulación relativa de PPV. A: Temporada 1. B: Temporada 2. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. En el centro de cada barra se indica el porcentaje exacto. Estadística por ANOVA y Test: LSD Fisher $\alpha=0,005$ utilizando el paquete estadístico Infostat.

El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat versión 2020 (Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), utilizando un análisis de varianza y el test LSD Fisher $\alpha=0,05$, en el cual las distintas letras indican las diferencias estadísticamente significativas.

7.2.2 Temporada 2 (2021-2022)

Un segundo ensayo se realizó en la temporada de cosecha 2021-2022, con el fin de robustecer los resultados obtenidos en la primera temporada del estudio 2. Para ello, dentro del mismo predio se identificaron tres grupos de plantas donde se escogieron diez individuos positivos a PPV (**Figura 7.6 B**), cuya infección fue comprobada al igual que en la temporada 1 mediante RT-PCR con los partidores universales PPV-9196/PPV-9506 y P1/P2 (**Cuadro 7.2**). Al momento de la cosecha se escogieron de cada uno de los grupos 75 frutos con síntomas evidentes de la virosis, de los cuales se distribuyeron 20 frutos en cada tratamiento (**Figura 7.4**). Terminado los tratamientos, se siguieron los mismos pasos que en la temporada 1 (**Figura 7.7**).

Los resultados obtenidos de los PCR semicuantitativos de la Temporada 1 mostraron diferencias significativas en el porcentaje de acumulación relativa de PPV de los frutos recién cosechados (T1) con respecto a los que fueron sometidos a frío (T2 y T3) (**Figura 7.8 A**), observándose que el número de días al que son sometidos a 0 °C no es un factor influyente. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en la Temporada 2 (**Figura 7.8 B**), demostrando que una temperatura de 0 °C puede disminuir significativamente la acumulación de RNA viral en la fruta infectada con PPV.

Nuestros resultados concuerdan con aquellos publicados por por Chung *et al.*, en los años 2015 y 2016 y también con el trabajo de Singh *et al.*, 2018, que indican que temperaturas frías pueden disminuir la acumulación de RNA viral en plantas y frutos. Sin embargo, se debe tener en consideración que la eficacia del frío en la reducción del contenido viral puede variar dependiendo de la cepa del virus, la especie del fruto y las condiciones específicas de almacenamiento, entre otros. Por esto, aunque algunos estudios sugieren que las bajas temperaturas pueden disminuir la concentración de partículas virales en plantas o frutos, se hace necesario realizar más investigaciones que nos permitan comprender en profundidad su efectividad y cómo aplicarlo de manera eficiente en distintas áreas, como la industria de exportación de frutales.

Como se mencionó más arriba, las investigaciones de Labonne y Quiot, 2001 y Gildow *et al.*, 2004, demuestran que un áfido es capaz de transmitir el virus desde una fruta infectada, bajo condiciones óptimas de laboratorio. Sin embargo, en condiciones reales en terreno existen numerosos factores que influyen y deben considerarse al analizar la epidemiología de la enfermedad como por ejemplo

características agroclimáticas de la región, interacción planta-patógeno, la especie del frutal y cepa del virus, y que solo un 20 % de la carga viral que deposita un áfido en un nuevo hospedero puede desencadenar una infección sistémica (Moreno *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2018).

El número de partículas virales presente en el hospedero y disponibles para que el vector las adquiera, es muy importante, ya que al ser la transmisión de PPV de tipo no persistente, el áfido debe adquirir las partículas desde la fruta infectada y llegar a una planta hospedera en el lapso de tiempo en que se mantiene virulífero (Ilardi y Tavazza, 2015). Por lo tanto, el hecho que la temperatura disminuya el título viral se vuelve un hallazgo muy importante, en especial en el caso de las frutas de exportación, como demuestran nuestros resultados, pues en ellas habría menos partículas virales disponibles para que un áfido las pueda adquirir y transmitir a un nuevo hospedero, reduciendo las posibilidades que una fruta de exportación se convierta en foco de la infección en una región libre de la enfermedad.

7.3 Bibliografía

- Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T., y Cambra, M. (2011). CHAPTER 36: *Plum pox virus*. Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits (pp. 185-197). The American Phytopathological Society. DOI: 10.1094/9780890545010.036.
- Cambra, M., y Vidal, E. (2017). Sharka, a vector-borne disease caused by *Plum pox virus*: vector species, transmission mechanism, epidemiology and mitigation strategies to reduce its natural spread. *Acta horticulturae*, 1163, 57-68. DOI: 10.17660/actahortic.2017.1163.10.
- Chung, B.N., Choi, K.S., Ahn, J.J., Joa, J.H., Do, K.S., y Park, K.S. (2015). Effects of Temperature on Systemic Infection and Symptom Expression of Turnip mosaic virus in Chinese cabbage (*Brassica campestris*). *Plant Pathology Journal*, 31(4), 363-370. DOI: 10.5423/PPJ.NT.06.2015.0107.
- Chung, B.N., Canto, T., Tenllado, F., Choi, K.S., Joa, J.H., Ahn, J.J., Kim, C.H., y Do, K.S. (2016). The Effects of High Temperature on Infection by Potato virus Y, Potato virus A, and Potato leafroll virus. *The Plant Pathology Journal*, 32(4), 321-328. DOI: 10.5423/PPJ.OA.12.2015.0259.

- Foissac, X., Savalle-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., y Candresse, T. (2000). Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 357, 52-59. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.550.2.
- Gildow, F., Damsteegt, V., Stone, A., Schneider, W., Luster, D., y Levy, L. (2004). *Plum pox* in north america: identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. *Phytopathology*, 94(8), 868-74. DOI: 10.1094/PHTO.2004.94.8.868.
- Ilardi, V., y Tavazza, M. (2015). Biotechnological strategies and tools for *Plum pox virus* resistance: trans-, intra-, cis-genesis, and beyond. *Frontiers in Plant Science*, 6, 379. DOI: 10.3389/fpls.2015.00379.
- James, D. (2017). Perspective on strategies for controlling the spread of *Plum pox virus*, causal agent of sharka/plum pox disease. *Acta Horticulturae*, 1163, 129-136. DOI: 10.17660/actahortic.2017.1163.19.
- Labonne, G., y Quiot, J.B. (2001). Aphids can acquire *Plum pox virus* from infected fruits. *Acta Horticulturae*, 550, 79-84. DOI: 10.17660/actahortic.2001.550.8.
- Menzel, W., Jelkmann, W., y Maiss, E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99(1-2), 81-92. DOI: 10.1016/s0166-0934(01)00381-0.
- Moreno, A., Fereres, A., y Cambra, M. (2009). Quantitative estimation of *Plum pox virus* targets acquired and transmitted by a single *Myzus persicae*. *Archives of Virology*, 154(9), 1391-1399. DOI: 10.1007/s00705-009-0450-5.
- Pasquini, G., y Barba, M. (2006). The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. *EPPO Bulletin*, 36, 287-292. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2006.00989.x.
- Rezende, J.A.M., Camelo, V.M., y Kitajima, E.W. (2016). First Report on Detection of *Plum pox virus* in Imported Peach Fruits in Brazil. *Plant Disease*, 100(4), 869-869. DOI: 10.1094/pdis-09-15-1015-pdn.

- Sánchez-Navarro, J.A., Aparicio, F., Herranz, M.C., Minafra, A., Myrta, A., y Pallás, V. (2005). Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 111(1), 77-84. DOI: 10.1007/s10658-004-1422-y.
- Singh, A., Permar, V., Basavaraj, Tomar, B. S., y Praveen, S. (2018). Effect of temperature on symptoms expression and viral RNA accumulation in Groundnut Bud Necrosis Virus infected *Vigna unguiculata*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 16(3), e1846. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31457025/>
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., y Dunez, J. (1991). A polymerase chain reaction assay adapted to *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*, 33(3), 355-365. DOI: 10.1016/0166-0934(91)90035-x.