



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



**Sharka y fitoplasmas: identificación, epidemiología y
caracterización molecular de enfermedades emergentes
cuarentenarias en frutales de carozo en Mendoza**

TESIS DOCTORAL

Damián Gustavo Piglionico

Ingeniero Agrónomo

Directora: Dra. Diana Beatriz Marini

Co-Director: Dr. Luis Rogelio Conci

Mendoza 2023

Resumen

Argentina es el segundo mayor productor de frutas en el hemisferio sur, destacándose la provincia de Mendoza como la principal productora del país, concentrando el 79% de la producción nacional. La propagación de enfermedades en los frutales representa un desafío para el sector frutícola nacional, causando pérdidas significativas en los cultivos y restringiendo su comercialización. En Mendoza se han identificado enfermedades cuarentenarias en frutales de carozo como Sharka, causada por plum pox virus y Fitoplasmas como *Argentinean Peach Yellow's Phytoplasma* (ArPY).

Sharka es una enfermedad viral de importancia global que afecta significativamente la calidad y el rendimiento de los frutos de frutales de carozo, detectada en 2004 en San Juan y 2006 en el sur de Mendoza. Luego de erradicar los focos iniciales, declarar las zonas en cuarentena y un estricto control de las plantas madre de vivero, se ha podido prevenir su dispersión. Sin embargo, aún falta información de lo que sucede en los montes comerciales cercanos a los focos iniciales de infección.

Los fitoplasmas han sido detectados en numerosas especies hortícolas, frutícolas y ornamentales a nivel mundial. Los daños producidos por estos patógenos son severos afectando la productividad. En Jujuy, en 2011, se identificó al *Argentinean Peach Yellow's Phytoplasma* (ArPY) perteneciente al grupo X-disease (subgrupo 16SrIII-B) y en 2015, en Mendoza, al '*Candidatus Phytoplasma pyri*' del grupo *Apple Proliferation* (subgrupo 16SrX-C), ambos en durazneros. No existe suficiente información sobre la incidencia de la enfermedad en la zona núcleo de durazno de industria de Mendoza.

Con la finalidad de enfrentar este desafío y brindar información que contribuya a diseñar estrategias de prevención y control, se propusieron los siguientes objetivos específicos: confirmar la presencia y evaluar la incidencia de estas enfermedades, investigar la eficiencia de transmisión del PPV por pulgones, establecer la presencia de PPV en hospedantes alternativos y desarrollar y adaptar técnicas de detección para el diagnóstico temprano. En lo que respecta a Sharka, se evaluó el área de Cuadro Benegas, San Rafael, Oasis

Sur de Mendoza, donde se dividió el área en zona cuarentenaria (ZC), 8km de diámetro desde el foco inicial, y zona no cuarentenaria (ZNC) hacia afuera. Se seleccionaron 7 fincas de ciruelo d' Agen, 3 dentro de la ZC y 4 en la ZNC para realizar un muestreo jerárquico de hojas de de dos árboles consecutivos (muestra compuesta) por 5 años (Capítulo 4). Para evaluar la eficiencia de transmisión del virus del Sharka entre duraznero y ciruelo a través de pulgones, se criaron colonias de *Myzus persicae* en cámara de cría en el laboratorio, que luego fueron utilizadas para las transmisiones del PPV (Capítulo 5). También se llevaron a cabo estudios en hospedantes alternativos (Capítulo 6).

Con respecto al estudio del 'Ca. *Phytoplasma pyri*' se realizó un muestreo dirigido a árboles con sintomatología sospechosa, del 7% de la superficie implantada con duraznero de industria, en Oasis Este y Valle de Uco de Mendoza, por 3 años consecutivos. Se seleccionaron 11 fincas con los cv. Pavía Catherina y Bowen. También se analizaron muestras de las plantas madre de duraznero de uno de los viveros más importante del Oasis Centro de Mendoza (Capítulo 7).

Entre los principales resultados obtenidos, se confirmó la presencia del Sharka en montes comerciales de ciruelo d' Agen en la ZC del Oasis Sur de Mendoza, a pesar de los esfuerzos previos de erradicación y se identificó la raza D del virus, "Diderón", única identificada en Argentina y Sudamérica hasta el momento. Se observó un incremento de la incidencia de la enfermedad dentro de la ZC del 12,6% al 25,8% en un período de 5 años, con un aumento interanual del 3%. No se detectó la enfermedad fuera de la zona cuarentenaria. Se observó una baja eficiencia de transmisión viral por pulgones en los ensayos de laboratorio, lográndose transmisiones experimentales desde duraznero a ciruelo y a duraznero. Se confirmó la presencia del virus en la planta ornamental Coronita de novia (*Spiraea sp.*), primera detección a nivel mundial, lo que indicaría que PPV puede infectar otros géneros de especies leñosas además de *Prunus*.

Se encontró un 8% de las plantas analizadas con la presencia del "Ca. *Phytoplasma pyri*" en la zona estudiada en el año 2019. No se detectaron plantas positivas en las plantas madre del vivero analizadas.

Además, se pusieron a punto, en el laboratorio de la EEA-INTA Junín, técnicas moleculares altamente sensibles para la detección temprana de ambos patógenos, como la RT-PCR en Tiempo Real, Print Capture seguido por Inmunocaptura RT-PCR, Nested PCR, entre otras. Los hallazgos de este estudio brindan una primera información del comportamiento epidemiológico de estas enfermedades y resaltan la importancia de tomar medidas de control y prevención para evitar sus dispersiones. Es necesario continuar investigando y monitoreando la situación para implementar estrategias de manejo adecuadas y salvaguardar la industria frutícola nacional.

Agradecimientos

Agradezco de manera especial a la Dra. Diana Marini y el Dr. Luis Conci, directores de esta tesis, por toda su ayuda y su incondicional disponibilidad e inestimable apoyo y amistad durante el desarrollo de mi tesis, también por brindarme todos sus conocimientos, transmitirme su pasión y visión de la investigación, los que espero tener la capacidad de incorporarlos en mi vida laboral y sobre todo por ayudarme en mi desarrollo personal y profesional.

A mis compañeros y amigos del INTA EEA Junín (Mendoza), especialmente a Vanesa Lucero, por acompañarme siempre en el trabajo de campo y laboratorio. Gracias a su ayuda, he logrado cumplir con los objetivos propuestos y enfrentar los desafíos que surgieron en el camino. Ha sido un privilegio contar con su compañía y amistad durante este proceso.

A mi familia y mi novia Lena, por acompañarme durante todo este tiempo, sin su amor incondicional, paciencia y apoyo inquebrantable no lo hubiera logrado.

Índice

Resumen.....	II
Agradecimientos.....	V
Índice	VI
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	XIV
1 Introducción.....	1
2 Objetivos	5
2.1 <i>Objetivo general.....</i>	5
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	5
3 Revisión bibliográfica	6
3.1 <i>Frutales de carozo.....</i>	6
3.1.1 Duraznero.....	7
3.1.2 Ciruelo	7
3.1.3 Situación actual del cultivo de frutales de carozo en el mundo y en Argentina	8
3.1.4 Principales enfermedades cuarentenarias causadas por patógenos sistémicos que afectan a frutales de carozo	10
3.1.4.1 Enfermedad del Sharka.....	10
3.1.4.2 Fitoplasmas.....	33
4 Estudios epidemiológicos de la enfermedad de Sharka en ciruelo europeo dentro y fuera de la zona cuarentenaria en Mendoza	46
4.1 <i>Introducción.....</i>	46
4.2 <i>Materiales y métodos</i>	47
4.2.1 Sitio, material vegetal y tipo de muestreo	47
4.2.2 Análisis serológicos de PPV	50
4.2.3 Detección molecular de PPV y tipificación de raza	50
4.2.4 Diseño experimental	51
4.2.5 Mapas de comportamiento epidemiológico de PPV por finca.....	52

4.3	<i>Resultados</i>	52
4.3.1	Análisis serológicos.....	52
4.3.2	Análisis moleculares	53
4.3.2.1	RT-PCR convencional para el diagnóstico.....	53
4.3.2.2	Tipificación molecular de los aislados de PPV	53
4.3.3	Incidencia de la enfermedad	54
4.3.4	Análisis estadístico	55
4.3.5	Mapas de comportamiento epidemiológico de PPV por finca.....	56
4.4	<i>Discusión</i>	57

5 Eficiencia de transmisión por pulgones del aislado local de plum pox virus (PPV) entre frutales hospedantes en condiciones controladas 60

5.1	<i>Introducción</i>	60
5.2	<i>Materiales y métodos</i>	63
5.2.1	Material vegetal	63
5.2.2	Cría de pulgones.....	64
5.2.3	Ensayo de transmisión por áfidos	65
5.2.4	Análisis de plantas inoculadas.....	67
5.2.5	Análisis de pulgones después del período de adquisición del virus.....	68
5.3	<i>Resultados</i>	69
5.4	<i>Discusión</i>	73

6 Hospedantes alternativos del plum pox virus en áreas cuarentenarias..... 76

6.1	<i>Introducción</i>	76
6.2	<i>Materiales y métodos</i>	78
6.2.1	Ensayos biológicos, serológicos y moleculares	78
6.3	<i>Resultados</i>	81
6.3.1	Test biológico	81
6.3.2	Pruebas serológicas.....	81
6.3.3	Pruebas moleculares	82
6.3.3.1	RT-PCR convencional para el diagnóstico.....	82
6.3.3.2	Tipificación molecular de los aislados de PPV mediante dos pares de cebadores diferentes	82

6.3.3.3	Secuenciación	84
6.4	Discusión	84
7	Estudios epidemiológicos y caracterización de fitoplasmas en la zona núcleo de producción de durazno para industria en Mendoza	86
7.1	Introducción	86
7.2	Materiales y métodos	89
7.2.1	Sitio, material vegetal y tipo de muestreo	89
7.2.2	Detección molecular e identificación de fitoplasmas.....	91
7.3	Transmisión del fitoplasma encontrado mediante injerto de yema o corteza a plantas de duraznero GF-305.	92
7.4	Resultados.....	93
7.4.1	Muestreo	93
7.4.2	Detección e identificación del fitoplasma mediante PCR y PCR-RFLP.....	94
7.4.3	Transmisión del fitoplasma mediante injerto a duraznero GF-305 y descripción de la sintomatología	97
7.5	Discusión	99
8	Conclusiones	102
	Anexos.....	106
	Bibliografía	115

Índice de figuras

Figura 3.1. Principales países productores de duraznos y nectarinos (FAO 2022).....	9
Figura 3.2. Principales países productores de ciruelas en 2020 (FAO 2022).....	10
Figura 3.3. Izq. partículas virales de PPV amplificadas con microscopio electrónico (barra negra de escala es equivalente a 0,2µm). Der. modelo de virión (Sochor, J. et al., 2012).....	11
Figura 3.4. Representación esquemática del genoma del PPV (Sochor et al., 2012).	12
Figura 3.5. Síntomas de PPV en hojas de ciruelo var. d’Agen. Foto: Diana Marini, INTA.	17
Figura 3.6. Izquierda: síntomas en flores, centro: síntomas en frutos de ciruelo Red Beaut, derecha: síntomas en durazno. Fotos: Levy et al.,2000b (izq.), Diana Marini (centro) y K.D. Hikey (der.).....	17
Figura 3.7. Izquierda: síntomas en pulpa de ciruelo var. Red Beut, derecha: síntomas en pulpa y carozo de damasco. Fotos: Diana Marini, INTA (izq.), Juan Manuel Raigón, INTA (der.).....	18
Figura 3.8. Izquierda: plantas del clon de duraznero GF-305 inoculadas en invernadero, centro y derecha: expresión de síntomas de PPV en GF-305. Fotos: Diana Marini, INTA.....	20
Figura 3.9. Test DAS-ELISA para detección de PPV, los pocillos amarillos representan resultados positivos.....	22
Figura 3.10. Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos en PCR convencional para PPV, con cebadores de P1/P2 Wetzel. Línea 1 de izq. a derecha, marcador 100 pb DNA ladder plus. Líneas 4 a 7 muestras positivas con productos amplificados de 243 pb.	25
Figura 3.11. Resultados de PCR en tiempo real. P= control positivo x 2, M= muestra vegetal x 2, T= testigo sano x 2, H= H2O x 2. Resultados de PCR	

en tiempo real. P= control positivo x 2, M= muestra vegetal x 2, T= testigo sano x 2, H= H2O x 2.....	26
Figura 3.12. Países en los que está presente la enfermedad de Sharka según EPPO 2022.....	31
Figura 4.1. Área de estudio de la enfermedad, Oasis Sur de Mendoza. Ubicación del área cuarentenaria, no cuarentenaria y las fincas seleccionadas para los muestreos.....	48
Figura 4.2. Muestreo jerárquico, muestra compuesta por hojas tomadas de dos árboles consecutivos.....	50
Figura 4.3. Amplificación por PCR en un solo paso de la banda de 243 pb obtenida con cebadores P1 y P2 (Wetzel 1990). L = GeneRuler 100 pb ADN (Invitrogen); H = control sano; P= control positivo P, PPV; H2O= control mix PCR; los carriles 01 a 04 son para muestras de ciruelo d'Agén. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red.	53
Figura 4.4. Análisis de RT-PCR en tiempo real para la identificación de cepas de PPV con SYBR Green y cebadores P1 y PD. S = control sano; P= control positivo; H= control master; MC= Muestras compuestas.....	54
Figura 4.5. Incidencia de muestras enfermas por año y por finca, ajustada por modelo lineal generalizado mixto.....	56
Figura 4.6. Aumento de incidencia interanual por finca expresado en porcentaje.....	56
Figura 4.7. Mapas bidimensionales interpolados, eje X corresponde a las hileras y el eje Y al número de muestra. Izquierda: Finca 1, derecha Finca 2. La escala representa la densidad de casos positivos de infección por el virus en cada finca, utilizando una gradación de colores que va del 1 al 0, siendo uno la mayor densidad.....	57
Figura 5.1. Plantas de duraznero utilizadas para la inoculación con pulgones.....	64
Figura 5.2. Cría de pulgones en plantas de papa libre de virus en cámara de cría.	65

Figura 5.3. Pulgones en cajas de Petri, período de inanición.	66
Figura 5.4. Pulgones adquiriendo el virus sobre hojas de ciruelo PPV+.	66
Figura 5.5. Izq. Hoja PPV+ con pulgones, colocada en planta de duraznero libre de virus para provocar la transmisión viral. Der. Pulgones moviéndose a las plantas receptoras sanas.	67
Figura 5.6. Tubos Eppendorf de 200 µl con cuadrado de papel Whatman 3MM donde se realizó la impresión de tejidos (pulgón individual).....	69
Figura 5.7. Sintomatología compatible con Sharka observada en plantas de duraznero inoculadas con pulgones alimentados sobre hojas de durazneros PPV+.	69
Figura 5.8. Amplificación por PCR en un solo paso de la banda de 243 pb obtenida con cebadores P1 y P2 (Wetzel 1990). M = GeneRuler 1-kb ADN ladder (Invitrogen); H = control sano; P= control positivo PPV; H2O= control mix PCR; las muestras 1.1 y 2.1 corresponden a las positivas del año 1 y las 1.2 y 2.2 a las positivas del año 2. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red.	71
Figura 5.9. Amplificación por PCR en un solo paso de la banda de 243 pb obtenida con cebadores P1 y P2 (Wetzel 1990). M = GeneRuler 1-kb ADN ladder (Invitrogen); H = control sano; P= control positivo PPV; H2O= control mix PCR; las muestras 1c a 9c corresponden a pulgones que se alimentaron con hojas de ciruela, las muestras 1d a 9d corresponden a pulgones que se alimentaron con hojas de duraznero GF-305. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red.	73
Figura 6.1. Planta ornamental “Corona de novia”.	78
Figura 6.2. Síntomas asociados con infección de virus del Sharka en hojas de Spiraea sp. Foto de M.E. Ojeda, INTA, Argentina.	79
Figura 6.3. Síntomas asociados al Sharka en plantas indicadores 'GF 305' inoculadas con yemas de plantas sintomáticas de Spiraea. Foto de Diana Marini, INTA, Argentina.	81

Figura 6.4. Amplificación por PCR en un solo paso de la banda de 243 pb obtenida con cebadores P1 y P2 (Wetzel 1990). L = GeneRuler 100 pb ADN Ladder 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 y 1500 pb (Invitrogen); H = control sano; P= control positivo PPV; H2O= control mix PCR; los carriles 01 a 06 son para las muestras de Spiraea y 07 a 10 son para inoculado-GF305. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red. 82

Figura 6.5. Detección del virus PPV-D mediante RT-PCR en tiempo real con SYBR Green y con cebadores P1 y PD. H = control sano (plántulas de GF-305 sanas); P= control positivo; GF= GF-305 inoculado; S= Spiraea sintomática. 83

Figura 6.6. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de PPV con cebadores P3D y P4b (Candresse et al., 1998). Producto de amplificación por PCR: banda de 467pb. L = GeneRuler 1-kb DNA Ladder (Invitrogen); S= Spiraea sintomática; H = control sano; P= control positivo; H2O= control mix PCR..... 84

Figura 6.7. Secuencia de consenso obtenida (238 pb) y depositada en GenBank. 84

Figura 7.1. Síntomas en duraznero. Hojas de duraznero cv Bowen. Hoja de la izquierda corresponde a planta sana, demás hojas a planta infectada con el fitoplasma Ca. Phytoplasma pyri. 88

Figura 7.2. Area de estudio definida para fitoplasmas en Mendoza. 90

Figura 7.3. Selección de árboles sintomáticos y toma de muestra. 91

Figura 7.4. Síntomas encontrados en las plantas muestreadas compatibles con “Ca. Phytoplasmas pyri”. 94

Figura 7.5. Amplificación por PCR directo con los cebadores universales P1 y P7 (~1.8 kb) (Deng y Hiruki 1991); L= Marcador de peso molecular 1 kb de ADN de Promega; H = control sano; P= control positivo; los carriles 01 a 09 son para las muestras correspondiente a la finca 11. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red..... 95

Figura 7.6. Amplificación por PCR anidado con los cebadores R16F2n/R16R2 (~1.2 kb) (Gundersen y Lee 1996). L= Marcador de peso molecular 1 kb de ADN de Promega; H = control sano; P= control positivo; los carriles 01 a 09 son para las muestras correspondiente a la finca 11. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red. 96

Figura 7.7. Izquierda patrones reales de RFLP de productos de PCR de 1.2 kb del gen 16Sr DNA (cebadores R16F2n/R16R2) digeridos con las enzimas de restricción Tru1I (MseI) (Thermo Scientific, USA), RsaI y α TaqI (NEB, USA), 1,2,3,5,6,7,8: muestras positivas por PCR anidado, L = GeneRuler 100 pb ADN Ladder 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 y 1500 pb (Invitrogen). Derecha patrón in silico de la cepa de referencia del subgrupo 16SrX-C (AJ542543), MW Digestión de ϕ X174 con HaeIII (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 pb). 97

Figura 7.8. Sintomatología temprana expresada en GF-305 infectados con *Candidatus Phytoplasma pyri*: Sobrebrotación de yemas axilares y clorosis. ... 98

Figura 7.9. Sintomatología luego de un mes de injertar. muerte de los brotes axilares, clorosis y enrollamiento de hojas. 99

Índice de tablas

Tabla 4.1. Coordenadas de las fincas seleccionadas para los muestreos.	49
Tabla 4.2. Número de muestras compuestas por dos plantas extraídas en cada finca en la zona cuarentenaria y no cuarentenaria y resultados positivos por finca por año.....	53
Tabla 4.3. Incidencia por finca en cada año de muestreo.....	54
Tabla 4.4. Incidencia entre fincas en cada año de muestreo.....	55
Tabla 4.5. Resultados obtenidos del análisis estadístico mediante el programa INFOSTAT.	55
Tabla 5.1. Plantas de duraznero y ciruelo infectadas con el aislado local de PPV-D de San Rafael, Mendoza a través de pulgones (50/planta) que previamente se alimentaron por 20 min de hojas PPV+.....	70
Tabla 5.2. Análisis de la Varianza de la eficiencia de transmisión por pulgones entre especies donantes y receptoras.	72
Tabla 5.3. Test de Tukey, las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).....	72
Tabla 6.1. Hospedantes alternativos del PPV pertenecientes al género Prunus (James y Thompson, 2006).	76
Tabla 7.1. Superficie implantada con durazneros de industria por oasis en la provincia de Mendoza, 2021.....	87
Tabla 7.2. Resumen de las fincas muestreadas durante las temporadas 2017, 2018 y 2019, junto con la información relevante sobre su ubicación geográfica, la zona en la que se encuentran, la superficie en hectáreas y la cantidad de muestras tomadas en cada finca.	93
Tabla 7.3. Muestras analizadas y muestras positivas por finca mediante PCR directo (P1/P7).....	94
Tabla 7.4. Muestras analizadas y muestras positivas por finca mediante PCR anidado (R16F2n/R16R2).....	96

1 Introducción

Argentina ocupa el segundo lugar como país productor de frutas en el hemisferio sur, con más de 556.000 hectáreas cultivadas. En particular, la provincia de Mendoza se destaca como la de mayor superficie plantada en el país, con un total de 214.519 hectáreas destinadas a frutales (vid, olivo, carozo, frutos secos, pepita, etc), lo que representa el 38,5% del área total. De esta superficie, 27.635 hectáreas corresponden a frutales de carozo, lo cual equivale al 13% del área total de frutales en la provincia. A pesar de una significativa disminución en la superficie dedicada a frutales de carozo en los últimos 10 años, Mendoza sigue siendo la principal provincia productora en Argentina, abasteciendo tanto el mercado de fruta fresca como de industria y concentrando con el 79% de la producción nacional (Programa Nacional Frutales 2020, INTA).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2022), se estima que anualmente se pierde hasta un 40% de los cultivos a nivel mundial debido a plagas y enfermedades de las plantas. Estas pérdidas tienen consecuencias significativas en el comercio agrícola y contribuyen a la persistencia de la pobreza y el hambre en millones de personas. En los últimos años factores como la globalización, el comercio y el cambio climático han acelerado la propagación de plagas y enfermedades de plantas entre países.

La globalización ha promovido la eliminación de barreras arancelarias, por lo que ha aumentado la importancia de establecer barreras sanitarias y de inocuidad como medida de protección contra la introducción de plagas. En este contexto, la sanidad e inocuidad se consideran bienes públicos internacionales que requieren un control riguroso para prevenir la entrada de plagas y salvaguardar los sistemas productivos (FAO, 2022).

En el caso de los frutales, se identifica que las enfermedades son mayormente causadas por patógenos sistémicos y aquellas con mayores restricciones son las denominadas enfermedades cuarentenarias, las cuales requieren un estricto control oficial (FAO, 2022). El término "enfermedad

cuarentenaria" se refiere a aquellas enfermedades de importancia económica potencial para el área en peligro, aun cuando no esté presente o si está presente, no está extendida y se encuentra bajo control oficial (FAO, 1990; revisado FAO, 1995; CIPF, 1997). Por lo tanto, es crucial implementar medidas de control y erradicación para preservar la salud de los sistemas productivos (Levy et al., 2000b).

En Mendoza se ha identificado la enfermedad del Sharka causada por el plum pox virus (PPV) en ciruelo (Rossini et al., 2009) y del fitoplasma *Candidatus* *Phytoplasma pyri* en frutales de carozo (Fernández et al., 2017a). El Sharka es considerado la enfermedad viral más significativa que afecta a estos cultivos a nivel mundial, provocando importantes pérdidas de rendimiento llegando incluso al 100% de la producción (Németh, 1994; Levy et al., 2000 b; Cambra et al., 2006 a). Esta enfermedad causa la caída prematura de los frutos (Herrera, 1994) y reduce la calidad de los remanentes debido a las características indeseables en el sabor de la fruta, lo que impide su comercialización. Además, puede afectar a diversas especies ornamentales del género *Prunus* y especies silvestres como el endrino (*Prunus spinosa*) (Damsteegt et al., 2007; James y Thompson, 2006). Hasta el año 2021 no han sido informadas infecciones naturales con el plum pox virus en especies ornamentales que no pertenezcan al género *Prunus* a nivel mundial.

La diseminación a largas distancias de esta enfermedad ocurre mediante el uso de material vegetal infectado proveniente de regiones con la presencia del PPV (Cambra et al., 2006 a), mientras que la transmisión a cortas distancias se produce a través de pulgones alados que transmiten el virus, también se puede dar a medias y largas distancia por el factor viento, el cual aumentaría las distancias de los vuelos de los pulgones alados. Estos pulgones se alimentan de hojas o frutas infectadas y luego vuelan a árboles vecinos para explorar y alimentarse (Barba et al., 2011). La eficiencia de transmisión del virus del Sharka por parte de los áfidos depende de diversos factores, como la raza del virus, la especie y variedad del hospedero, la edad de la planta y la época del año (Lupoli et al., 1992; Labonne et al., 1995; Levy et al., 2000a; Fereres y Racca, 2015). Se han identificado varias especies de áfidos como vectores del PPV, pero solo 10

de ellas colonizan especies de *Prunus*. En Mendoza, se ha observado que *Myzus persicae* es la especie predominante de áfido en plantaciones de *Prunus* (Mazzitelli et al., 2023).

La detección de esta enfermedad en Argentina tuvo lugar a fines de 2004 en la provincia de San Juan (Dal Zotto et al., 2006). Posteriormente en San Rafael, Oasis Sur de la provincia de Mendoza, fue detectada en ciruelo europeo (*P. domestica* cv. 'd'Agen') con una incidencia baja, entre 0,3% y 0,025% (Marini et al., 2015). Las áreas infectadas fueron declaradas zona cuarentenaria (Resolución 24/2005, disposición SENASA DNPV N° 04/13) y las plantas afectadas fueron erradicadas.

Los fitoplasmas son bacterias carentes de pared celular de naturaleza parasítica y restringidas a plantas hospedantes e insectos vectores, infectan más de 1000 especies de plantas alrededor del mundo y son responsables de importantes pérdidas en diferentes cultivos (Marcone, 2014; Bertaccini et al., 2014). Estos patógenos ya han sido detectados en diversas regiones productoras de frutales de carozo en Argentina. En los valles templados de la provincia de Jujuy, ubicada al norte del país y en la zona central de producción de durazno de industria en la provincia de Mendoza, se han registrado casos de infección con fitoplasmas. Análisis moleculares realizados en plantas de durazno sintomáticas en los valles templados de Jujuy revelaron la presencia de un fitoplasma perteneciente al grupo 16SrIII-B (grupo de la enfermedad X), el cual no se había registrado previamente en esta especie en el país y está limitando la producción en esa región. Este grupo es el más frecuente en Argentina y afecta a numerosas especies de importancia económica (Fernández et al., 2013; 2017b, 2020). En Mendoza, se identificó la presencia de un fitoplasma del grupo 16SrX-C (*Ca. Phytoplasma pyri*) asociado a plantas de duraznero, causando la Enrolladura de la Hoja Amarilla del Durazno (PYLR) (Fernández et al., 2017a). Posteriormente se detectó el mismo fitoplasma (*Ca. Phytoplasma pyri*) en establecimientos comerciales de perales (*Pyrus communis*) en el Alto Valle y Valle Medio de la provincia de Río Negro (Fernández y Conci, 2019).

La enfermedad del Sharka y la enfermedad causada por el fitoplasma *Ca. Phytoplasma pyri*, son cuarentenarias para los cultivos de frutales de carozo

(ciruelos, damasco y durazneros) y de pepita (peral) de nuestro país. Estas enfermedades no solo causan pérdidas significativas en la producción, sino que también imponen fuertes limitaciones en la comercialización de los productos afectados. Esto reviste una gran importancia dado que Mendoza es la principal provincia productora de frutales de carozo, tanto para consumo fresco como para industria. Por lo tanto, la presencia de estos patógenos cuarentenarios representa un riesgo importante para la actividad económica del sector.

Las estrategias de control para combatir las enfermedades sistémicas en frutales de carozo se basan en diferentes medidas, como es el uso de plantas con certificación de sanidad, erradicación de plantas enfermas, identificación de hospedantes alternativos y control de los vectores, responsables de la propagación de los patógenos. Para implementar con éxito estas estrategias, es crucial contar con información actualizada sobre la incidencia de cada enfermedad y los posibles hospedantes naturales, realizar una identificación y caracterización temprana de los patógenos, aprovechando las nuevas tecnologías disponibles para este propósito, así como también desarrollar monitoreos efectivos. Asimismo, es importante controlar la sanidad en los viveros y evaluar el material de vivero implantado en los lotes, para asegurar su calidad y salud.

En Mendoza no se cuenta con información actualizada de la incidencia de estas enfermedades en montes comerciales en las zonas núcleo de producción, ni tampoco de sus comportamientos epidemiológicos (hospedantes alternativos, eficiencia de transmisión por vectores, etc.). El presente trabajo pretende contribuir con esa información, tan necesaria para tomar medidas de prevención, erradicación y control.

2 Objetivos

2.1 *Objetivo general*

Contribuir a la mejora y protección del estado fitosanitario de los montes de frutales de carozo (ciruelos y durazneros) implantados en la provincia de Mendoza, mediante la generación de información precisa y actualizada sobre la presencia y avance de enfermedades emergentes, con énfasis en virosis como la enfermedad de Sharka y fitoplasmas.

2.2 *Objetivos específicos*

1. Confirmar la presencia y evaluar la incidencia de enfermedades emergentes, como la enfermedad de Sharka y la presencia de fitoplasmas, en el área núcleo de producción de frutales de carozo en Mendoza, mediante métodos de muestreo representativos y técnicas de diagnóstico precisas.

2. Investigar la eficiencia de la transmisión del plum pox virus por pulgones utilizando métodos de estudio de la transmisión y análisis estadístico.

3. Establecer la presencia del plum pox virus y su caracterización, en hospedantes alternativos como la planta ornamental “Corona de Novia” (*Spiraea sp.*)

4. Desarrollar y adaptar técnicas de detección para el diagnóstico temprano del virus del Sharka y de fitoplasmas en frutales de carozo, incluyendo la optimización de protocolos de extracción de ácidos nucleicos.

3 Revisión bibliográfica

3.1 *Frutales de carozo*

Los frutos de carozo son producidos por especies arbóreas pertenecientes al orden Rosales, familia *Rosaceae* y al género *Prunus*. Ellos incluyen durazneros [*Prunus persica* (L.) Batsch], nectarinos [*P. persica* (L.) Batsch nucipersica (Suchow) C. K. Schneidi], ciruelos japoneses (*Prunus salicina* L.), ciruelos europeos (*Prunus domestica* L.), damascos (*Prunus armeniaca* L.), cerezos (*Prunus avium* L.), guindos (*Prunus cerasus* L.) y almendros (*Prunus dulcis*, Mill.) (Ogawa et al., 1995).

La familia *Rosaceae* es de mucho interés a nivel botánico debido al gran número de especies de uso agrícola que posee. Esta familia, tradicionalmente dividida en 4 subfamilias en base al tipo de fruto que produce, estaba compuesta por *Spiraeae*, caracterizada por frutos en folículos o cápsulas, *Rosoideae* por aquenios, *Amygdaloideae* por drupas y *Maloideae* por pomos (Schulze-Menz, 1964). Posteriormente la filogenia de *Rosaceae* fue dividida solo en 3 grupos basales, caracterizados teniendo en cuenta diferentes genes nucleares y de cloroplastos, estos son *Amygdaloideae*, *Rosoideae* y *Dryadoideae*. *Amygdaloideae* incluye las subfamilias *Amygdaloideae* (ciruela, cereza, damasco, durazno, almendra, etc.), *Spiraeaoideae* (*Spiraea*, *Aruncus*, *Sorbaria*, etc.) y *Maloideae* (manzana, pera, cotoneaster, etc.). *Rosoideae* incluye *Fragaria*, *Potentilla*, *Rosa* y *Rubus*. *Dryadoideae* incluye *Cercocarpus*, *Chamaebatia*, *Dryas* y *Purshia* (Potter et al., 2007).

El género *Prunus*, perteneciente a la subfamilia *Amygdaloideae*, además de ser uno de los que mayor número de especies posee, es de los géneros más importantes desde el punto de vista agrícola. Más de 20 especies, de las aproximadamente 100 descritas pertenecientes a este género, son ampliamente cultivadas en todo el mundo (Bailey y Hough, 1975).

Prunus se define generalmente en base a una combinación de características: un carpelo solitario con un estilo terminal, cinco sépalos, cinco pétalos y madera de médula sólida (Rehder, 1940). Además, posee como fruto

una drupa de pulpa carnososa y dulce que rodea un carozo que protege a la semilla en su interior (Ogawa et al., 1995).

La clasificación de *Prunus* más ampliamente adoptada (Rehder, 1940), con un gran interés desde el punto de vista agrícola, está compuesta por 5 subgéneros. *Prunus* (damascos y ciruelos), *Amygdalus* (durazneros y almendros) y *Cerasus* (cerezos), además de los subgéneros *Laurocerasus* y *Padus* que no poseen especies de interés agrícola (Lee y Wen, 2001).

3.1.1 Duraznero

El duraznero, es el frutal de carozo más cultivado mundialmente. Es originario de China y fue cultivado en Persia (actualmente Irán) antes de ser introducido en Europa (Westwood, 1993). Es una especie diploide ($2n=16$), caducifolia, con un porte de planta mediano, de vida útil comercial entre 12 a 20 años, la producción de fruto inicia al segundo o tercer año (Bassi y Monet, 2008).

Las hojas son sencillas, alternas, oblongo-lanceoladas de consistencia herbácea, color verde-esmeralda, con el margen ligeramente aserrado, nervadura central marcada y pecíolos cortos. La lámina foliar es más oscura en la parte adaxial y el color de las venas principales se relaciona con el color de la pulpa del fruto (Bassi y Monet, 2008).

El fruto es una drupa de forma globosa u ovoide con diámetro de 4 a 10 cm, de colores entre amarillos y rojos (Baughner, 2003), muy carnososa, pubescente, con surco longitudinal marcado desde la base al ápice. Dentro de la especie existen diversos tipos de durazneros (pulpa blanca, amarilla, blanda, dura, etc.). Los nectarinos son duraznos sin pubescencia en su epidermis, característica definida por un gen recesivo (Looney y Jackson, 1999; Ogawa et al., 1995). Se destinan tanto para consumo en fresco como para procesado en mermeladas, jugos, almíbar, etc.

3.1.2 Ciruelo

El ciruelo presenta numerosas especies e híbridos, entre las que se distinguen los ciruelos europeos y japoneses. El primero se considera un híbrido complejo hexaploide procedente del cruzamiento natural entre *Prunus cerasifera*

Ehrh. y *Prunus spinosa L.* en la zona de Caucasia, donde estas especies se encuentran espontáneamente. Es un árbol caducifolio, arbustivo, aunque puede llegar hasta 7 metros de altura, con tronco y ramas grisáceas o pardo-rojizas, presentando una copa casi piramidal. Las hojas de 3 a 8 cm de largo son sencillas, alternas, lanceoladas o elípticas, pubescentes sobre todo en el envés, con estípulas lineales y persistentes. El fruto es de oblongo a esférico, con una amplia gama de coloraciones (Baugher, 2003).

Por otro lado, los ciruelos japoneses se originaron, muy probablemente, en China y fueron introducidos a Occidente desde Japón (Zeven y De Wet, 1993). Los ciruelos japoneses requieren veranos más cálidos y no son cultivados en las zonas frías de Europa (Looney y Jackson, 1999). Presentan árboles de hasta 5 metros, con hojas simples, alternas, oblongo-ovadas, con el margen finamente aserrado y piloso por el envés. El fruto es una drupa glabra, globosa que presenta normalmente cera (pruina) en la piel. La longitud del fruto oscila entre 2 y 8 cm. Los colores son muy variables pueden ser azul/morado, rojo/rosado o amarillo/verdoso con pulpa de sabor ácido hasta muy dulce (Baugher, 2003).

Los frutos de los ciruelos se aprovechan para consumo en fresco, mermeladas y también como pasas.

3.1.3 Situación actual del cultivo de frutales de carozo en el mundo y en Argentina

Las frutas de carozo son muy importantes en la economía agrícola de muchos países. En 2020, la producción mundial de frutas de carozo fue de aproximadamente 64 millones de toneladas. Los principales productores mundiales fueron: China (21 millones tn), Turquía (3 millones tn) y España (2 millones de tn) (FAO, 2022).

En América existen varios países con producciones importantes de frutas de carozo, como EE. UU. y Canadá en América del Norte, y Argentina, el sur de Brasil, Chile y Uruguay en América de Sur.

En Argentina, los frutales son una importante fuente de riqueza. De las 556.522 ha dedicadas al cultivo de frutales (2017-2019), los frutales de carozo

ocupan 35.130ha, aproximadamente un 7% de la superficie mencionada (Programa Nacional Frutales 2019, INTA). Mendoza posee una superficie total destinada a frutales de 214.519 ha, lo que representa el 38,5% del total del país, convirtiéndola en la provincia con mayor superficie plantada de Argentina. De esta superficie 27.635 ha corresponden a frutales de carozo, es decir, un 13% de la superficie total implantada con frutales de la provincia. En los últimos 10 años la superficie ocupada por frutales de carozo ha sufrido una fuerte disminución, pero, aun así, Mendoza sigue siendo la principal provincia productora con destino tanto a fruta fresca como industria y concentra el 79% del total nacional (Programa Nacional Frutales 2020, INTA).

La producción mundial de durazno y nectarina en 2020 fue de alrededor de 24,6 millones de tn (FAO, 2022). Los principales países productores son China (15 millones tn), España (1,3 millones tn), Italia (1,01 millones tn), Turquía (892 mil tn) y Grecia (890 mil tn) (Figura 3.1). En Argentina, la producción en 2019/20 fue alrededor de 221.717 tn, de las cuales 167.000 tn se produjeron en Mendoza, siendo el duraznero el frutal de carozo con más superficie implantada (IDR, 2021).

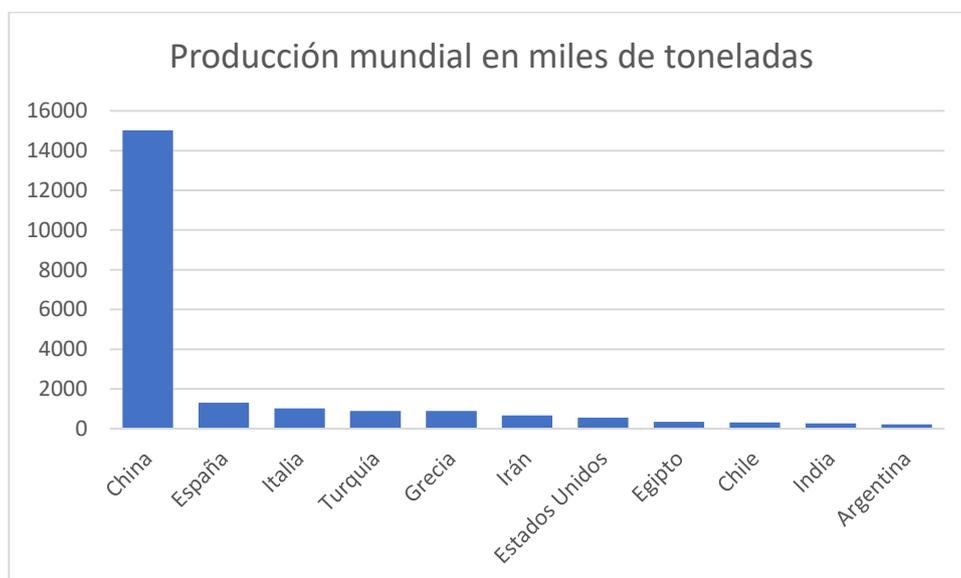


Figura 3.1. Principales países productores de duraznos y nectarinos (FAO 2022).

La producción mundial de ciruela japonesa y europea se estima en unos 12,2 millones de tn. Los principales países productores son China (6,5 millones tn), Rumania (758 mil tn), Serbia (582 mil tn), Chile (416 mil tn) e Irán (376 mil

tn) (FAO, 2022) (Figura 3.2). El ciruelo es el segundo frutal de carozo más cultivado en Argentina, después del duraznero y produce 148.757 tn. La producción de ciruelo en Mendoza es de 60.000 tn para industria, de la que el 95% es para exportación y aproximadamente 24.000 tn de ciruela para consumo en fresco (IDR, 2021).



Figura 3.2. Principales países productores de ciruelas en 2020 (FAO 2022).

3.1.4 Principales enfermedades cuarentenarias causadas por patógenos sistémicos que afectan a frutales de carozo

3.1.4.1 Enfermedad del Sharka

Sharka es una enfermedad de origen viral causada por plum pox virus (PPV). Afecta a la mayoría de las especies del género *Prunus*, especialmente damasco, duraznero, ciruelo y en menor medida a cerezo (Morvan y Audergon, 1989; Kalashyan et al., 1994; Németh, 1994; Roy y Smith, 1994; Crescenzi et al., 1997a; Cambra et al., 2006a). Experimentalmente ha sido transmitida a almendro (Dallot et al., 1996). Naturalmente se ha detectado en especies ornamentales de *Prunus* y plantas herbáceas (EPPO 2022; Polak, 2001; Milusheva y Rankova, 2002; Sebestyen, 2008).

La enfermedad fue citada por primera vez en Bulgaria en 1917, luego en Yugoslavia en 1937, bajo la denominación de mosaico del ciruelo y en el cultivo de damasco en 1938 (Atanasoff, 1932; Josifovic, 1937; Christof, 1938). Posteriormente se extendió por toda Europa y actualmente se encuentra

distribuida en gran parte del mundo (Morvan y Audergon, 1989; Németh, 1994; Roy y Smith, 1994; Smith et al., 1994; CABI, 2022).

3.1.4.1.1 Taxonomía, características y razas

El PPV es un virus del género *Potyvirus* de estructura filamentosa, con una longitud total de 680 a 900 nm y un ancho de 15 nm, perteneciente a uno de los grupos más numerosos en vegetales que incluye a virus de importancia económica como el virus Y de la papa (potato Y Virus, PVY), el cual da nombre al género, o el mosaico común del poroto (Bean Common Mosaic Virus, BCMV) (Barnett, 1990).

Su ácido nucleico está compuesto por aproximadamente 9.800 nucleótidos (nt) con un peso molecular relativo de 3.200 daltons (Lain et al., 1989). Este se encuentra envuelto por una cápside compuesta de muchas subunidades proteicas con un peso molecular relativo de 36.500 daltons, (Sochor et al., 2012) (Figura 3.3), siendo una de las cápsides proteicas más grandes dentro del género *Potyvirus* (Ravelonandro et al., 1988).



Figura 3.3. Izq. partículas virales de PPV amplificadas con microscopio electrónico (barra negra de escala es equivalente a 0,2 μm). Der. modelo de virión (Sochor, J. et al., 2012).

El genoma del plum pox virus consiste en una cadena única de ARN simple cadena con simetría helicoidal y polaridad positiva, con una proteína VPg (Proteína del genoma viral) en su extremo 5' y una cadena de poli(A) de longitud variable en el extremo 3'. (Riechmann et al., 1992; García et al., 1994; Sochor et al., 2012) (Figura 3.4).

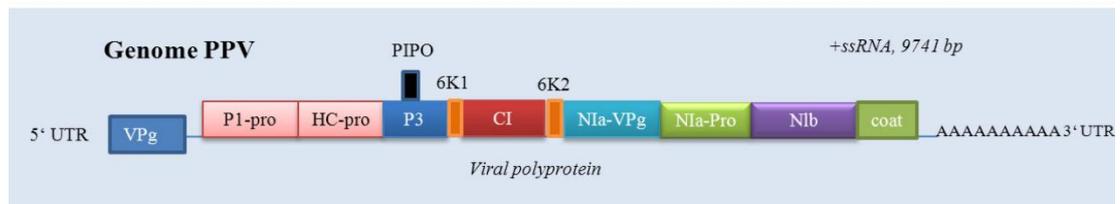


Figura 3.4. Representación esquemática del genoma del PPV (Sochor et al., 2012).

El ARN genómico de todos los potyvirus tiene un único marco abierto de lectura ORF (Open Reading Frame) y un ORF pequeño adicional que se superpone, estos son:

- Primera Proteína (P1), la actividad proteasa de P1 no es esencial para la infectividad viral, pero sí se requiere estrictamente la separación entre P1 y HCpro. Se ha demostrado que P1 funciona en trans como un factor accesorio para la amplificación del genoma viral (Verchot y Carrington, 1995).
- Proteína del factor asistente (HCpro), la primera función en la que se demostró que estaba implicada, y la que le dio su nombre de factor auxiliar o *helper component*, es la de transmisión por pulgones (Pirone, 1991). Posteriormente se ha comprobado que la proteína HCpro está también implicada en la amplificación del genoma viral (Kasschau et al., 1997), en el movimiento a corta (Rojas et al., 1997) y larga distancia (Cronin et al., 1995), en la inducción de síntomas (Atreya y Pirone, 1993) y en la intensificación de la patogenicidad de otros virus (Vanev et al., 1995). La proteína HCpro tiene actividad proteolítica, que actúa sobre su extremo carboxilo. También se sabe que la proteína HCpro tiene capacidad para interactuar con ácidos nucleicos, (Urcuqui-Inchima et al., 2000) y se ha comprobado que está implicada en la interferencia con mecanismos de defensa de la planta mediados por silenciamiento de RNA (Carbonell et al 2013; Fukuzawa, et al., 2010).
- Tercer Proteína (P3), se ha descrito que la proteína P3 del virus del moteado de las venas del tabaco interactúa con las inclusiones citoplasmáticas cilíndricas (Rodríguez Cerezo et al., 1993), pero también hay datos que muestran a P3 en las inclusiones nucleares del

virus del grabado del tabaco (Langenberg y Zhang, 1997). P3 participaría en la modulación de la expresión de genes de la planta durante la infección con plum pox virus, cumpliendo un rol importante en la fitopatogenicidad y virulencia. Además, se puede identificar un pequeño ORF, denominado 'pipo', el cual está incrustado en P3 (Wen et al., 2011).

- 6K1 podría tener un papel en la virulencia y en el movimiento de célula a célula (Hong et al., 2007; Waltermann y Maiss, 2006, Vozárová et al. 2013).
- La proteína de inclusión cilíndrica (CI) (o helicasa de inclusión cilíndrica) representa una helicasa de ARN necesaria para la replicación del genoma. Esta proteína es necesaria para facilitar el movimiento de célula a célula y la replicación (Carrington et al.; 1998). Análisis ultraestructurales revelaron interacciones entre la proteína CI, los plasmodesmos y los complejos de ribonucleoproteínas que contienen proteínas de la cápside para hacer posible el movimiento de célula a célula y a larga distancia (Rodríguez Cerezo et al., 1997). Estudios estructurales en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas por el plum pox virus revelaron interacciones entre CI y la proteína fotosintética I PSI-K como producto del gen *psaK*. Se demostró que la coexpresión de CI es responsable de una disminución de la acumulación de PSI-K como resultado de la regulación negativa de la expresión del gen *psaK*. Este efecto está estrechamente relacionado con la acumulación de PPV en plantas de *N. benthamiana* y confirma el papel de CI en la infección por PPV (Jimenez et al., 2006).
- 6K2, esta proteína transmembrana no tiene función enzimática y permite anclar el complejo de replicación viral a las membranas. Induce la formación de vesículas a partir de las membranas del retículo endoplasmático del huésped, lo que lleva a la formación de compartimentos de replicación activa que contienen todos los componentes necesarios para la replicación del virus (Restrepo-Hartwig, et al., 1994).

- La proteína N1a-VPg une covalentemente el extremo 5' del ARN viral a través del residuo de tirosina (Puurand et al., 1994). Esta proteína también desempeña funciones importantes en el ciclo de vida viral y permite la invasión sistémica (Rajamäki y Valkonen, 2003).
- La N1b actúa como una ARN polimerasa dependiente de ARN y generalmente se localiza en los núcleos de las plantas infectadas (Li et al., 1997). Las interacciones entre N1b y VPg se han demostrado en algunos artículos (Daros et al., 1999; Guo et al., 2001; Lin et al., 2009; Puustinen y Makinen, 2004). El papel de N1b en la uridilación de la proteína VPg se investigó en el virus A de la papa y parece que tiene una función importante en la regulación de la síntesis de ARN (Puustinen y Makinen, 2004).
- La proteína de la cápside (CP) cumple un papel importante en la transmisión viral por pulgones (Andrejeva et al., 1999), en conjunto con el componente auxiliar (HCpro). En particular, una actividad de HCpro independiente de sus funciones en la transmisión por áfidos y la supresión del silenciamiento del ARN estabiliza CP y mejora el rendimiento de partículas virales infecciosas (Valli et al., 2014). Además, el grado de identidad entre las secuencias de proteínas de recubrimiento se puede utilizar para la determinación de las relaciones filogenéticas dentro de la familia Potyviridae (Crescenzi et al., 1997b).

El PPV se caracteriza por su gran variabilidad, hasta la fecha se reconocen diez razas del virus (Glasa et al., 2013; James et al., 2013; Garcia et al., 2014; Chirkov et al., 2018;): Dideron (D), Marcus (M), Recombinant (Rec), Cherry (C), Cherry Russian (CR), El Amar (EA), Winona (W), Turkish (T), Ancestral (An) y Cherry Volga (CV). Cuatro son las razas con mayor presencia y por lo tanto las más estudiadas y conocidas, las que presentan las siguientes características:

-Dideron (D): está presente en casi todas las zonas donde se encuentra la enfermedad. Afecta principalmente a damasco, a ciruelo y en menor medida a duraznero. Es menos agresiva y su velocidad de difusión es menor que la de la raza M (Levy et al., 2000b, Wang et al., 2006; IPPC, 2020).

-Marcus (M): se ha detectado en países del este de Europa, Grecia, Francia, Italia y Alemania. Presenta una gran agresividad y una difusión natural muy rápida. Afecta a duraznero, ciruelo y damasco (Quiot et al., 1995; Bianco et al., 2004; EPPO 2022; Liácer y Cambra, 2006).

-El Amar (EA): Se encuentra localizada únicamente en el norte de África. Presenta una gran agresividad, afectando a duraznero, ciruelo y damasco (Maghraby et al., 2007).

-Cherry (C): se localiza en zonas del Centro de Europa. Es la única detectada en cerezo, pero además afecta al duraznero, ciruelo y damasco. Inicialmente fue descrita en cerezo ácido (Kalashyan et al., 1994), y posteriormente en Italia en cerezo dulce (Crescenzi et al., 1997a).

3.1.4.1.2 Hospedantes

-Damasco: entre los frutales afectados por el virus, el damasco es el más perjudicado. La totalidad de las variedades de damasco tradicionalmente cultivadas en Europa que han sido ensayadas, se han mostrado susceptibles a todas las razas conocidas de PPV (Liácer, 1994; Martínez-Gómez et al., 2000).

-Ciruelo: al igual que en damasco, la mayoría de las variedades cultivadas en Europa se han mostrado susceptibles a todas las razas de la enfermedad (Zawadzka et al., 1994).

-Duraznero: la mayoría de las variedades de duraznero que han sido ensayadas se han mostrado susceptibles a PPV, especialmente a aislados Tipo M, presentando síntomas en hoja y un buen número de variedades también en frutos (Mainou y Syrgiannidis 1992; Dosba et al., 1994). Sin embargo, lo mismo no ocurre para durazneros afectados con la raza D, donde cultivares inoculados con PPV-D se mantuvieron asintomáticos luego de confirmarse su positividad (Marini et al., 2019).

Algunas variedades de duraznero como el 'GF305' son especialmente sensibles al PPV, por cuya razón es utilizado tradicionalmente como planta indicadora de la enfermedad.

-Almendro: los estudios llevados a cabo en esta especie son muy escasos si los comparamos con las especies antes mencionadas. El almendro ha sido descrito tradicionalmente como una especie resistente o incluso inmune al PPV, al no encontrar plantas de almendro en condiciones naturales de campo infectadas por el virus (Giunchedi, 1986; Németh, 1986). Sin embargo, se demostró que es posible infectar plantas a partir de inoculaciones artificiales (Dallot et al., 1996).

-Cerezo: la mayoría de las variedades de cerezo son resistentes a las razas M y D, mostrándose susceptibles únicamente cuando se infectan con la Tipo C, CR, CV y CT (Fanigliulo et al., 2004; Sheveleva et al., 2021; Akbas et al., 2023).

-Plantas herbáceas: además de las especies del género *Prunus*, el PPV es capaz de infectar diversas especies herbáceas. Se han encontrados más de 23 especies de malezas infectadas naturalmente por el virus, pertenecientes a algunas familias como Fabaceae, Solanaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Ranunculaceae, Brassicaceae, Lamiaceae, etc. (Nemeth, 1986; Viršček et al., 2004). La presencia del PPV en estos hospedantes herbáceos puede jugar un rol importante en la dispersión de la enfermedad, no solo como reservorio del patógeno sino también al actuar como posible reservorio de insectos vectores.

-Ornamentales: plantas del género *Prunus* tales como *P. besseyi*, *P. insititia*, *P. tomentosa*, *P. triloba* y *P. spinosa* se han encontrado infectadas naturalmente con PPV, las cuales se han transformado en una fuente natural importante de infección (Auger y Esterio, 1995).

3.1.4.1.3 Sintomatología y daños

El virus se establece y se multiplica intracelularmente en las células de toda la planta, causando distintas alteraciones dependiendo de la especie y la variedad (Auger y Esterio, 1995). Los síntomas de PPV aparecen en hojas, frutos, flores y semillas y su intensidad varía con la especie y cultivar de *Prunus*, la raza de PPV, la localización en la planta, las estaciones del año y la edad del árbol o su estado vegetativo (Hubert et al., 1988; Levy et al., 2000b). Las altas

temperaturas del verano atenúan los síntomas e incluso pueden llegar a desaparecer (Lansac et al., 1982).

En general los árboles con un crecimiento activo afectados por Sharka presentan más síntomas en hojas y frutos, apreciándose mejor los síntomas en las hojas tiernas y jóvenes que en las adultas y lignificadas. Generalmente en hojas se puede ver manchas y/o anillos cloróticos, necrosis y clorosis internerval (Figura 3.5).



Figura 3.5. Síntomas de PPV en hojas de ciruelo var. d'Agen. Foto: Diana Marini, INTA.

En pétalos de la flor de una planta infectada se pueden ver anillos y líneas pigmentadas. En frutos pueden aparecer grietas, deformaciones, manchas y anillos cloróticos, disminuyendo su calidad comercial (Figura 3.6) (LLácer y Cambra 2006).



Figura 3.6. Izquierda: síntomas en flores, centro: síntomas en frutos de ciruelo Red Beaut, derecha: síntomas en durazno. Fotos: Levy et al., 2000b (izq.), Diana Marini (centro) y K.D. Hickey (der.).

La pulpa de los frutos puede tener una consistencia corchosa y los carozos, principalmente de damasco, pueden presentar manchas y anillos de

distintos colores (Figura 3.7). En ciruelo europeo puede llegar a provocar la caída prematura del fruto (Llácer y Cambra, 2006).



Figura 3.7. Izquierda: síntomas en pulpa de ciruelo var. Red Beut, derecha: síntomas en pulpa y carozo de damasco. Fotos: Diana Marini, INTA (izq.), Juan Manuel Raigón, INTA (der.).

El crecimiento vegetativo de los árboles infectados no es afectado y los síntomas de aquellos que recientemente adquirieron el virus son difíciles de identificar y pueden estar restringidos a una parte del árbol e incluso a una sola rama (Auger, 1993).

3.1.4.1.4 Técnicas de detección

El Sharka puede ser diagnosticado mediante inspección visual de síntomas en hojas y frutos durante el período de crecimiento. Es el método más rápido y económico pero el menos confiable debido a los falsos negativos por ausencia de síntomas. Los riesgos de no detectar visualmente la enfermedad presente, se puede deber a la distribución errática del virus en el árbol (Martínez-Gómez y Dicenta, 2001), a la baja concentración viral (Albrechtova, 1990), al extenso periodo de incubación del virus de hasta un año, durante el cual no aparecen síntomas (Németh, 1986; Breniaux et al., 1990; Candresse et al., 1993) y a las altas temperaturas (Hubert et al., 1988). La primavera sería la mejor época para observar síntomas, ya que las temperaturas no exceden los 30 grados. Debido a lo mencionado, el análisis en el laboratorio es fundamental para la correcta evaluación de la condición sanitaria de la planta, siendo la toma de muestras muy relevante para las pruebas de diagnóstico.

La microscopía electrónica (ME) es una herramienta esencial en la detección y análisis de la replicación viral. Nuevos métodos de ME y mejoras

técnicas en curso ofrecen un amplio espectro de aplicaciones, permitiendo una investigación profunda del impacto de los virus no solo en el hospedero, sino también en el medio ambiente. De hecho, utilizando los métodos más actualizados de criomicroscopía electrónica, tales investigaciones están ahora cerca de alcanzar una resolución atómica. En combinación con la bioinformática, la transición de la imagen en 2D a la reconstrucción en 3D permite análisis estructurales y funcionales que amplían y mejoran nuestro conocimiento sobre la asombrosa diversidad en la estructura y estilo de vida de los virus. En combinación con la microscopía confocal de barrido láser, la ME permite la observación en vivo de células y tejidos con un análisis de alta resolución (Richert-Pöggeler et al., 2019). Este método también presenta algunas desventajas, los virus a estudiar tienen que estar presentes en una concentración suficiente para ser detectados. Una identificación positiva con microscopía electrónica suele ser fácilmente aceptada, pero la ausencia de partículas o cuerpos de inclusión no puede ser aceptada como evidencia de que el agente en particular no está presente. Es factible tomar y examinar muestras insuficientes, el método de preparación puede no haber sido apropiado, la concentración del agente puede no ser suficiente para ser detectada, o el agente puede estar restringido en su distribución a tejidos específicos dentro de la planta distintos de los examinados. No es un método práctico cuando se tiene que analizar un gran número de muestras, es más utilizado como un método para la confirmación de la identidad de un virus desconocido, en situaciones en las que solo se necesitan unas pocas pruebas de diagnóstico (Matthews y Hull, 2002).

Los métodos más utilizados para la detección e identificación de PPV y de virus en general son biológicos, serológicos y moleculares.

3.1.4.1.4.1 Detección biológica

El PPV es transmisible mediante inoculación mecánica y por injertos por lo que puede ser inoculado por estos métodos a plantas indicadoras, libres de virus. Estas plantas manifiestan los síntomas correspondientes a la enfermedad que se les trasmite de manera más notable y en muchos casos con mayor rapidez. Pueden ser leñosas como *Prunus tomentosa*, GF-305 (*P. persica*) o

también herbáceas como *Chenopodium foetidum*, *Pisum sativum*, *Nicotiana clevelandii* y *N. benthamiana* (Dosba et al., 1988; Gentit, 2006).

El indicador biológico tradicionalmente utilizado para PPV es el clon de duraznero GF305 (Bernhard et al., 1969), capaz de detectar virus, viroides y fitoplasmas de frutales de carozo. Su alta susceptibilidad al virus y su rápida manifestación de síntomas, aproximadamente dos o tres semanas posteriores a la inoculación, hace que sea una de las mejores opciones para este método de detección. Todo el proceso se realiza en invernadero bajo condiciones controladas de aislamiento, humedad y temperatura (Desvignes, 1976; Breniaux et al., 1990; Materazzi et al., 1991; Auger, 1993) (Figura 3.8).



Figura 3.8. Izquierda: plantas del clon de duraznero GF-305 inoculadas en invernadero, centro y derecha: expresión de síntomas de PPV en GF-305. Fotos: Diana Marini, INTA.

3.1.4.1.4.2 Detección serológica

La serología fue el primer método ampliamente adoptado en la evolución de la detección e identificación rápida de patógenos de plantas. Este método se basa en el reconocimiento de antígenos por anticuerpos específicos (Rowhani et al., 2005) y depende de las propiedades superficiales de las proteínas virales, que para la mayoría de los virus vegetales significa la proteína o proteínas que componen la cubierta viral (Matthews y Hull, 2002).

La especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo permite detectar virus en presencia de material del hospedero y otras impurezas. Los resultados son rápidos, se obtienen en pocas horas en comparación con días, semanas o

incluso años para los ensayos biológicos de infectividad, se pueden analizar un número elevado de muestras de manera simultánea, en laboratorios de complejidad media a baja. Además, cuando el antisuero se almacena adecuadamente, se pueden realizar pruebas comparables durante períodos de años e incluso en diferentes laboratorios (Matthews, 1991)

El test ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es un método serológico basado en una reacción antígeno-anticuerpo, altamente sensible, rápido y confiable para la detección de virus vegetales (Clark y Adams, 1977). Este test ha sido muy utilizado y probado en la detección de PPV (Cambra et al., 2015; Auger y Esterio, 1995). Se puede aplicar a virus de diversas morfologías y es particularmente conveniente cuando se necesita analizar un gran número de pruebas (Matthews, 1993). Hay disponibles anticuerpos policlonales y monoclonales para la detección de todas las razas de PPV (Levy et al., 2000a; Cambra et al., 2015). Los anticuerpos monoclonales aumentan considerablemente la especificidad de la reacción y permiten mejorar sensiblemente el análisis, llegando a detectar hasta 2 ng/ml de virus purificado (Navrátil et al., 1992; Pasquini et al., 1995; Cambra et al., 2006b).

Los métodos ELISA se pueden dividir en procedimientos directos e indirectos. En el método indirecto (DASI)-ELISA también denominado ensayo de inmunoabsorción enzimática en fase triple de anticuerpos (TAS-ELISA), el antígeno de interés se inmoviliza en pocillos de poliestireno, mediante absorción pasiva. Se añade un tampón de bloqueo para saturar todos los sitios no unidos en el pocillo, seguido de una incubación con un anticuerpo primario no marcado específico para el antígeno. Posteriormente, se añade un anticuerpo secundario conjugado a una enzima anti-especie para unirse al anticuerpo primario. Normalmente, el anticuerpo secundario está conjugado con una peroxidasa y se detecta con un sustrato quimioluminiscente mejorado. Los métodos directos, como el doble sándwich de anticuerpos (DAS)-ELISA, implican la unión de la pfosfatasa alcalina al anticuerpo. Para este método se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo, se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo

lavado que elimina el material no retenido, se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así, pues, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (Hnasko, 2015).

El sistema de DAS-ELISA convencional para detectar el PPV cuenta con kits basados en un anticuerpo monoclonal específico o en anticuerpos policlonales con los que se haya demostrado que detectan la mayoría de las razas del PPV, en particular las razas más ampliamente distribuidas como la D y M, evitando reacciones cruzadas con otros virus o con material vegetal sano (Cambra et al., 2006b; Capote et al., 2009) (Figura 3.9).

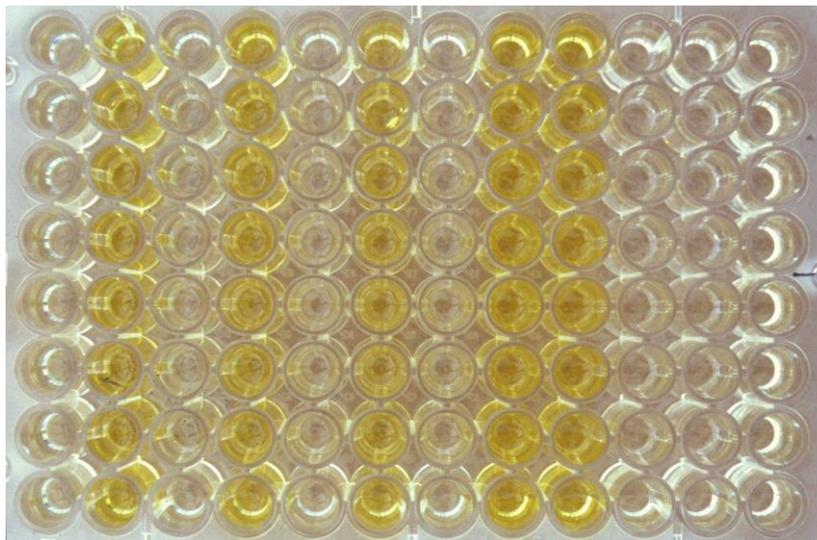


Figura 3.9. Test DAS-ELISA para detección de PPV, los pocillos amarillos representan resultados positivos.

Para esta técnica de detección se utilizan muestras preferentemente de brotes tiernos de hojas ya que, a pesar de que la distribución del virus es errática, los brotes primaverales es donde se detectan las mayores concentraciones virales (Dosba et al., 1986; Albrechtova, 1990; Martínez-Gómez y Dicenta, 2001; Teshale, 2014; Marini et al., 2015). Aunque también podrían utilizarse muestras de flores, yemas, corteza, frutos y estambres de las plantas infectadas (Dosba et al., 1986).

3.1.4.1.4.3 *Detección e identificación molecular*

Los métodos moleculares para la detección de PPV, a pesar de ser más complicados, cada vez son más utilizados por su mayor sensibilidad que el test ELISA (Henson y French, 1993).

Uno de los primeros métodos moleculares utilizados para detectar el Sharka fue la hibridación molecular, con una sensibilidad ocho veces mayor que la técnica que DAS-ELISA (Wetzel et al., 1990). Este método se basa en una característica propia de los ácidos nucleicos que es la capacidad de desnaturalización y renaturalización entre cadenas complementarias. Se produce bajo condiciones adecuadas una fuerte unión entre dos cadenas simples de ácidos nucleicos para formar una doble hélice, cuando su secuencia nucleotídica es complementaria. Una de las dos hebras es la que está marcada y llamamos sonda, de manera que permite detectar la hibridación o identificación de porciones complementarias a la misma. Inicialmente se utilizaron sondas marcadas radioactivamente. El uso de radiactividad limitó la aplicación de dicha técnica ya que para el análisis de rutina además de los riesgos que implica, requiere de instalaciones no accesibles a muchos laboratorios de diagnóstico (Nikolaeva, 1995). Otras metodologías utilizan un marcador no radioactivo, biotina o digoxigenina (Pallás et al., 1997), con una reacción colorimétrica o quimio luminiscente para el revelado de la membrana (Más et al., 1993). La variante más extendida es la llamada hibridación "Dot Blot", la que se basa en la desnaturalización del ácido nucleico del virus y su hibridación con una sonda marcada en una membrana de nylon (Varveri et al., 1986; 1988; Hull y Al-Hakim, 1988).

En el caso del sharka, los primeros ensayos de detección mediante hibridación molecular comenzaron a finales de los años ochenta con marcadores radioactivos, obteniendo una sensibilidad de hasta 500 pg/ml de virus (Varveri et al., 1987; Wetzel et al., 1990). Posteriormente se extendió la utilización de procedimientos no radioactivos con digoxigenina (Nemchinov y Hadidi, 1996; Herranz et al., 2005).

Otra de las técnicas utilizadas es la RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Es muy sensible y permite detectar la presencia de virus en concentraciones muy bajas. Consiste en amplificar exponencialmente un fragmento específico del genoma viral cuyo tamaño está determinado por el sitio de unión de los cebadores en del genoma viral (De Blas et al., 1994). En cuanto a los cebadores o “primers” utilizados en RT-PCR, los descritos por Wetzel et al. (1991) y Levy y Hadidi (1994) se consideran como referencia para la detección general de PPV. El par de primers que amplifica el gen de la proteína de la cubierta del virus es el más usado para la detección e identificación del PPV ya que, permite la identificación de múltiples aislados del virus (Wetzel et al., 1991, 1992). Por otra parte, el par de primers descrito por Hadidi (Levy y Hadidi, 1994) que amplifica la región 3' no codificante del genoma del PPV, es una secuencia no traducida que es más conservada que el gen de la proteína de la cubierta y diferencia correctamente al PPV de otros potyvirus, lo que lo convierte en un excelente marcador genético para ser usado con fines de diagnóstico (Riechmann et al., 1992). Los productos obtenidos en el RT-PCR convencional son analizados a través de electroforesis en gel de agarosa (Figura 3.10).

Mediante la implementación de una técnica serológica y molecular combinada, en un paso previo a la RT-PCR, se realiza una inmunocaptura y se puede obtener un importante aumento en la sensibilidad de detección de PPV (250 veces aprox.) (IC-RT-PCR) y también disminuir la concentración de inhibidores (Wetzel et al., 1992). Para la fase de inmunocaptura se utiliza savia vegetal de una planta extraída mediante tampón de extracción utilizado en ELISA y un anticuerpo adecuadamente validado. Se prepara una dilución de anticuerpos policlonales, o de un anticuerpo monoclonal específico de PPV, en un tampón de carbonato. Se dispensa el anticuerpo diluido en tubos de PCR y se incuban, en este momento los anticuerpos se adhieren al tubo. Luego se lavan los tubos y se añade el sobrenadante (savia) a los tubos recubiertos para PCR, aquí el antígeno del virus se une a los anticuerpos adheridos al tubo de PCR. Se añade directamente la mezcla de reacción RT-PCR a los tubos de PCR recubiertos con los anticuerpos y antígenos. La amplificación se realiza como una RT-PCR (Wetzel et al., 1992). La IC-RT-PCR con anticuerpo monoclonal ha

mostrado una precisión del 82 % en la detección del PPV (Olmos et al., 2007).



Figura 3.10. Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos en PCR convencional para PPV, con cebadores de P1/P2 Wetzel. Línea 1 de izq. a derecha, marcador 100 pb DNA ladder plus. Líneas 4 a 7 muestras positivas con productos amplificados de 243 pb.

Un avance significativo en la detección, cuantificación y diferenciación de las razas de PPV es mediante PCR en tiempo real usando SYBR Green I o sondas Taqman (Schneider et al., 2004; Olmos et al., 2005; Varga y James, 2005). Estas técnicas de fluorescencia brindan un diagnóstico aún más rápido, sensible y confiable de la enfermedad, permiten la cuantificación de la carga viral de PPV y no requieren electroforesis posterior a la PCR ni detección colorimétrica (Figura 3.11). Actualmente es una de las técnicas más sensibles para analizar la expresión génica y se ha aplicado para la cuantificación viral. Esta técnica permite por ejemplo identificar diferentes alelos del mismo gen o polimorfismos de nucleótidos individuales (SNPs) que pueden ser utilizados como marcadores genéticos para diagnósticos o pronósticos para ciertas enfermedades (Klarik y Ricchi, 2017), también permite detectar las variantes del virus y es una herramienta válida para estudiar las interacciones planta-virus.

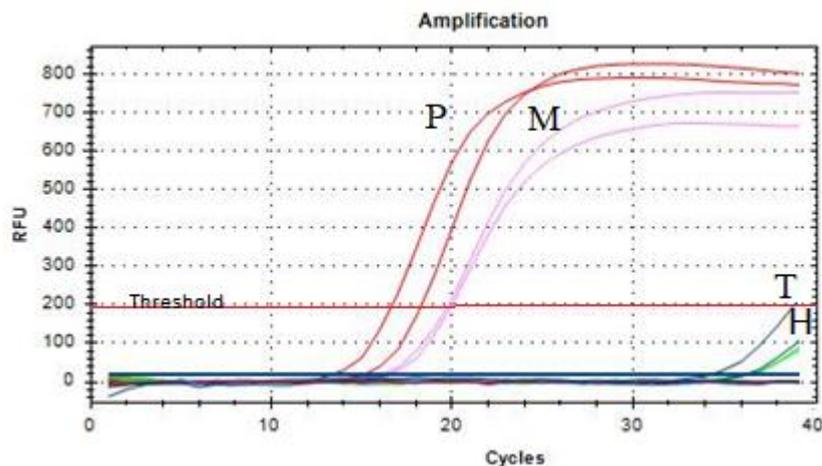


Figura 3.11. Resultados de PCR en tiempo real. P= control positivo x 2, M= muestra vegetal x 2, T= testigo sano x 2, H= H2O x 2. Resultados de PCR en tiempo real. P= control positivo x 2, M= muestra vegetal x 2, T= testigo sano x 2, H= H2O x 2.

Otras técnicas moleculares de última generación que podrían ser adaptadas y utilizadas para la detección y caracterización del virus del Sharka son: "secuenciación masiva" ó "secuenciación de nueva generación" (NGS) (Cambra et al., 2015), "amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa" (RT-LAMP) (Çelik y Ertunç, 2021) y la tecnología CRISPR (Sharma et al., 2021).

La secuenciación de alto rendimiento, también denominada NGS, permite secuenciar el genoma completo y se puede utilizar para todo tipo de organismos, siendo los que revisten especial interés virus y viroides, algunas bacterias, oomicetos y hongos. Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento pueden utilizarse para detectar plagas reglamentadas específicas y para detectar organismos desconocidos (es decir, sin conocimiento a priori). Permite conocer e identificar el genoma completo en este caso de los aislados locales de PPV (Olmos et al., 2018).

LAMP es una técnica de diagnóstico sensible y de costo relativamente bajo ya que no se requiere un equipo especial para el termociclado y con un simple bloque de calor o baño de agua capaz de mantener una temperatura de 60-65 °C es posible llevarla a cabo. Esta técnica fue desarrollada para la amplificación de ADN de alta especificidad. Es eficiente, rápida y se pueden procesar numerosas muestras simultáneamente con condiciones relativamente sencillas, la amplificación ocurre en condiciones isotérmicas. La técnica utiliza

una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebras, y un conjunto de cuatro cebadores especialmente diseñados que reconocen seis secuencias distintas en el ADN objetivo (Notomi et al., 2000). Las reacciones positivas pueden identificarse mediante electroforesis en gel de agarosa, sin embargo, el ADN o ADNc se genera en tal abundancia que los resultados pueden confirmarse mediante observación a simple vista por la intensidad de la fluorescencia generada (Pham et al., 2005; Dukes et al., 2006). La reacción LAMP se ha mejorado con la adición de cebadores de bucle, lo que permite reducir el tiempo de reacción y tiene el potencial de aumentar la sensibilidad de la técnica. Aunque LAMP se desarrolló originalmente para la amplificación a partir de ADN, LAMP ha sido adaptado para la detección de ARN viral mediante un proceso llamado transcripción inversa (RT)-LAMP (Fukuta et al., 2003; Parida et al., 2004; Pham et al., 2005; Dukes et al., 2006). La técnica ha sido también utilizada con éxito para la detección de PPV (Varga y James, 2006; Çelik y Ertunç, 2021).

Las herramientas CRISPR no solamente sirven para editar genes, sino que también pueden servir para detectarlos. El sistema CRISPR, que fue inicialmente identificado como uno de los sistemas de defensa de las bacterias por el microbiólogo español Francisco J. Martínez Mojica, y posteriormente adaptado como una herramienta para la edición genética de cualquier genoma, ahora sigue sorprendiéndonos con las nuevas aplicaciones en diagnóstico. La tecnología CRISPR apunta a reconocer en las muestras la huella digital del virus (su código genético expresado en una secuencia de ARN). Los resultados son similares a la metodología PCR, pero implica procesos más cortos y una infraestructura de menor complejidad y menor costo (Sharma et al., 2021).

3.1.4.1.5 Transmisión y Control

3.1.4.1.5.1 Transmisión

La principal vía de propagación a larga distancia de Sharka es el transporte de material infectado (yemas, estacas, portainjertos) a través de intercambios comerciales insuficientemente controlados o ilegales (Cambra et al., 2006a). La utilización de material de propagación (portainjertos y/o yemas) infectados es la razón de la introducción de PPV a campo. Actualmente, no se conoce transmisión del virus por semilla. En 8 estudios diferentes publicados

durante los últimos 30 años, no se ha logrado confirmar la presencia de PPV en el epicótilo y/o la radícula de las semillas germinadas, a pesar de su presencia en las cubiertas y cotiledones de las semillas (Pasquini y Barba, 2006; Marini et al., 2012).

Una vez establecida la enfermedad en campo, el PPV se transmite naturalmente por pulgones de manera no persistente o estiletal. Esta forma de transmisión ocurre cuando el insecto vector adquiere e inocula las partículas virales por medio de sus piezas bucales (estilete) durante periodos breves de prueba o alimentación en la planta, esto puede tomar sólo algunos segundos o minutos. No se produce la multiplicación viral dentro del insecto vector. Los áfidos permanecen infectivos por un máximo de dos horas. Existen muchas especies de áfidos capaces de transmitir el PPV, entre las cuales *Myzus persicae* y *Aphis spiraecola* parecen ser los vectores más eficientes en condiciones experimentales (Labonne et al., 1995; Gildow et al., 2004, Mazzitelli et al., en prensa). En el mundo se conocen al menos veinte especies de áfidos que han mostrado ser vectores del virus, de las cuales quince están presentes en Argentina (Ortego, 2008, Mazzitelli et al., en prensa). Los vectores que colonizan *Prunus* son: *Aphis spiraecola*, *Brachycaudus cardui*, *B. helichrysi*, *B. persicae*, *Hyalopterus pruni*, *Myzus persicae*, *M. varians* y *Phorodon humuli* (Levy et al., 2000b). Las hojas y en menor medida los frutos, constituyen fuentes de inóculo del virus para la transmisión mediada por áfidos (Labonne y Quiot., 2001; Gildow et al., 2004).

Establecer cuál es la distancia de dispersión del virus a través de pulgones infectivos es crucial para comprender y manejar la enfermedad. La información presentada sobre el patrón espacial de PPV en algunos estudios epidemiológicos de la enfermedad indican transmisión a corta distancia, sin embargo, en análisis espaciales de algunos focos de la enfermedad se demostró que la diseminación del virus puede ocurrir no solo dentro de los 200 a 600 metros de un árbol previamente identificado como enfermo (Labonne y Dallot, 2006) sino también a mayores distancias, observándose árboles enfermos a lo largo de varios kilómetros del foco inicial (Gottwald et al., 2013). La transmisión por pulgones puede deberse a vuelos activos por debajo de la canopia en

plantaciones de *Prunus*, donde la velocidad del viento es menor, y vuelos pasivos por encima de la canopia, donde las masas de aire se mueven a mayor altura sobre distancias más largas (Kennedy y Thomas, 1974; Labonne y Dallot, 2006), además del transporte que pueda ejercerse a partir de la actividad agropecuaria generada por el hombre como plantines, material para injerto o fruta con pulgones, desde un sitio a otro.

3.1.4.1.5.2 Control

A diferencia de numerosos hongos y bacterias que pueden ser controlados químicamente, no existen tratamientos antivirales para prevenir o controlar al PPV a nivel de campo. La estrategia más importante de control es la prevención. Puede ser la producción de plantas a partir de material sano, libre de PPV, mediante programas de certificación que permitan ofrecer a los agricultores plantas libres del virus (Auger y Esterio, 1995; Levy et al., 2000b). También el uso de genotipos tolerantes es un método muy efectivo, por lo que la obtención de variedades resistentes mediante mejoramiento genético tradicional o por ingeniería genética es un objetivo común en los programas de mejoramiento genético en *Prunus* (Decroocq et al., 2005; 2011; Scorza et al., 2013; Wang et al., 2013). Sin embargo, no se cuenta a la fecha con cultivares resistentes, de importancia comercial. Hay fuentes de resistencia, generalmente multigénica, que provee moderados niveles de tolerancia a algunas razas del virus (Marini et al., 2019). Si bien estos niveles de tolerancia son útiles para los productores debido a que les permite producir fruta comercializable, se necesita resistencia o inmunidad al virus para evitar la dispersión posterior por vectores (Levy et al., 2000b).

El control de vectores no se recomienda debido a la forma de transmisión de estos virus los que pueden ser adquiridos por los pulgones tras muy pocos segundos de contacto con la planta infectada (Harris, 1990). Al no existir periodo de latencia, el virus puede ser inoculado inmediatamente a una planta sana, por lo que el proceso completo de transmisión puede producirse en pocos minutos. Esto ha llevado a un fracaso reiterado de las estrategias de lucha química contra este tipo de virosis (Collar et al., 1995), ya que los insecticidas suelen tardar horas en actuar y los pulgones tan sólo minutos en dispersar el virus (Lowery et

al., 1990). Por otra parte, debido a las diversas estrategias reproductivas de los pulgones, tampoco es eficiente intentar disminuir las poblaciones de vectores de manera preventiva, ya que rápidamente reponen su población vía sexual o partenogenética.

Para gestionar las epidemias ya instaladas existen varias alternativas tales como: erradicación, supresión, contención o resiliencia. La erradicación es la aplicación de medidas fitosanitarias para eliminar una plaga de un área, la supresión tiene como objetivo reducir el tamaño de la población de plagas en un área infestada y la contención busca evitar la propagación a áreas no infestadas. La resiliencia consiste en mitigar los costos de las epidemias descontroladas mediante la adaptación de las prácticas agrícolas (FAO, 2021). La elección del objetivo debe guiarse por el equilibrio entre los costos inducidos por la estrategia de manejo y la reducción del impacto económico de la epidemia (Fraser et al., 2006).

3.1.4.1.6 Distribución geográfica del PPV e importancia económica

Los primeros síntomas de Sharka en el mundo se observaron aproximadamente en 1917 en plantaciones de ciruelos localizados en el suroeste de Bulgaria, aunque algunos reportes indican que los síntomas fueron vistos por primera vez en Macedonia en 1910 (Levy et al., 2000b). Sin embargo, el agente etiológico de la enfermedad no se detectó oficialmente hasta 1932 en damascos (Atanasoff, 1932), luego se observó en varias especies de *Prunus* en diferentes regiones de Europa, incluyendo principalmente los Balcanes y Europa Central (Sutic, 1971).

Actualmente la enfermedad está presente en Europa, América del Norte (Levy et al., 2000a), América del Sur, Asia y África del Norte (EPPO, 2022) (Figura 3.12). En Sudamérica se detectó en 1992 en Chile en damascos y durazneros, a partir de material importado originalmente desde Europa (Herrera, 1994). A fines del 2004 se detectó un brote de PPV en plantas de ciruelos y damascos en Argentina, en la provincia de San Juan (Dal Zotto et al., 2006) y en la provincia de Mendoza en el año 2006 (Rossini, et al., 2009). Considerando las pruebas biológicas, serológicas y moleculares la raza de PPV diseminada en

Chile y la detectada en Argentina corresponden al tipo Dideron (PPV-D) (Herrera y Madariaga, 2003; Dal Zotto et al., 2006; Fiore et al., 2010).

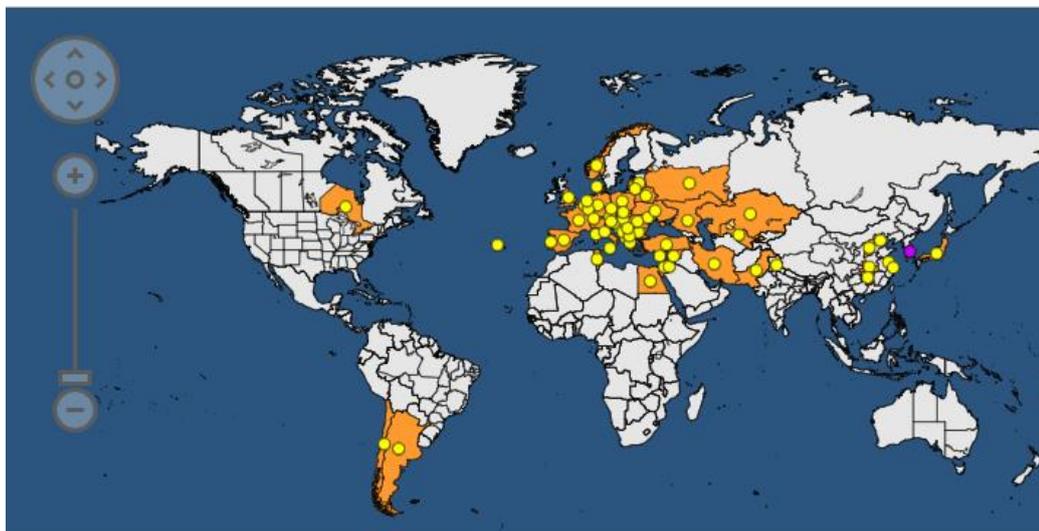


Figura 3.12. Países en los que está presente la enfermedad de Sharka según EPPO 2022.

A pesar de ser la enfermedad más devastadora de frutales de carozo en el mundo (García et al., 2014; Barba et al., 2015), en nuestra región se dispone solo de datos mínimos sobre el impacto económico y social de la enfermedad. Los costos asociados a la enfermedad están dados por las pérdidas directas en la producción de fruta, comercialización, erradicación, medidas compensatorias, pérdida de ingresos y también por costos indirectos, incluidos los de medidas preventivas como cuarentena, encuestas, inspecciones, control de viveros, diagnóstico y el impacto en el comercio exterior (medidas para arancelarias) e interior.

El costo global asociado a la gestión de Sharka en todo el mundo desde la década de los 70 hasta la actualidad, excluyendo las pérdidas comerciales indirectas, se estima que podría superar los 10.000 millones de euros, siendo también muy importante el impacto social de la enfermedad (Cambra, 2006a).

3.1.4.1.7 Problemática en el país

En Argentina fue detectada por primera vez en diciembre de 2004 en el departamento de Pocito, provincia de San Juan, en plantas de damasco y ciruelo

japonés (Dal Zotto et al. 2006). Luego, en 2006 fue detectada en la provincia de Mendoza en plantas de ciruelo d'Agen ubicadas en el distrito Rama Caída del departamento de San Rafael (Rossini et al., 2009). Los resultados obtenidos de los análisis realizados en San Juan y Mendoza indicaron una incidencia variable entre 0.1 y 1% (Rossini et al., 2009, 2011).

Sharka es una enfermedad cuarentenaria en Argentina al igual que en la mayoría de los países productores de frutas de carozo. El PPV está clasificado así por las organizaciones de protección vegetal en Europa [EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal)], África [IAPSC (Consejo Interafricano Fitosanitario)], América del Norte [NAPPO (Organización Norteamericana de Protección Vegetal)] y en Argentina por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Se define como cuarentenaria a una plaga de importancia económica potencial para el área en peligro aun cuando la plaga no esté presente o, si está presente, no está extendida y se encuentra bajo control oficial (FAO 1990; revisado FAO, 1995; CIPF, 1997; aclaración, 2005; aclaración CMF, 2012). SENASA trabaja para mantener a la enfermedad del Sharka como plaga cuarentenaria en el país y actualmente está vigente la Resolución 24/2005, disposición SENASA DNPV N° 04/13, que declara la emergencia nacional con respecto a la enfermedad y prohíbe el movimiento del material de propagación del género *Prunus* que no posea autorización del organismo.

Para mantener el estatus de cuarentenaria, las plantas enfermas fueron erradicadas en una acción conjunta de los organismos provinciales y nacionales de control de sanidad vegetal y los productores frutícolas involucrados. Además, se elaboró un programa de trabajo conjunto entre INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), INASE (Instituto Nacional de Semillas) y SENASA, el que consiste en capacitaciones, difusión y control del material de propagación. Después de muchos años de inspecciones en vivero y la eliminación de material infectado, aún se puede encontrar una incidencia muy baja del virus en plantas de ciruelo d'Agen en el sur de Mendoza (Marini et al., 2015). Y no se tiene conocimiento acabado de lo que ocurre en montes comerciales de frutales de carozo a nivel país.

3.1.4.2 *Fitoplasmas*

Los fitoplasmas son bacterias carentes de pared celular, de naturaleza parasítica y restringida a dos tipos de hospedantes: plantas e insectos. Son responsables de importantes pérdidas en diferentes cultivos y se los ha detectado en más de 1000 especies de plantas en los 5 continentes (Hogenhout et al., 2008).

En el año 1967 investigadores japoneses observaron, mediante microscopia electrónica, organismos pleomórficos que se asemejaban a micoplasmas de animales en el floema de plantas con amarillamiento (Doi et al. 1967). Por este motivo, inicialmente, la detección de fitoplasmas se basaba en la identificación de los síntomas y la confirmación de la presencia de cuerpos pleomórficos en el floema de plantas sintomáticas, mediante microscopia electrónica. La dificultad de analizar numerosas muestras y la necesidad de contar con un equipamiento costoso llevaba a determinaciones erróneas y poco consistentes debido a que los síntomas pueden ser idénticos aun tratándose de fitoplasmas diversos, y por otra parte la misma sintomatología podría ser atribuida a otros patógenos, deficiencias, desbalances hormonales o factores abióticos desconocidos (Lee et al., 2000). Esto llevó a clasificaciones confusas de este tipo de patógenos. Con el desarrollo de las técnicas moleculares se logró la amplificación por PCR de una porción del gen 16S ARNr y posterior digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP). Se logró crear un sistema de clasificación y realizar análisis filogenéticos no solo entre fitoplasmas sino también su relación con otros grupos de bacterias, además de proporcionar marcadores moleculares fiables tanto para la detección como para la identificación de una amplia gama de fitoplasmas. Se ideó un sistema de grupos y subgrupos, donde cada grupo contiene al menos una especie de fitoplasma distinta (Lee et al., 1993; Gundersen et al., 1994; Zhao et al., 2009; Nejat et al., 2013). Se determinó que los fitoplasmas constituyen un clado monofilético dentro de la clase *Mollicutes*, más relacionados con los *Acholeplasmas* y bien diferenciados de los *Mycoplasmas* y *Spiroplasmas* (Brown et al., 2010; Lim y Sears, 1989; Zhao et al., 2015) y provienen de un ancestro Gram positivo del tipo *Clostridium*, del linaje de los lactobacilos (Woese et al., 1980). Hasta la fecha se han delineado al menos 34 grupos 16Sr de fitoplasmas y más de 100 subgrupos

(Wei et al., 2007; Zhao et al., 2009; Nejat et al., 2013; Bertaccini et al., 2014; Zhao y Davis, 2016; Pérez-López et al., 2016; Kumari et al., 2019).

Algunos de los fitoplasmas más dañinos en frutales están presentes en Argentina, como el *Argentinean Peach Yellow's Phytoplasma* (ArPY) (Fernández et al, 2013), perteneciente al grupo X-disease (subgrupo 16SrIII-B) que está limitando la producción de durazneros en los Valles Templados de la provincia de Jujuy y el Decaimiento del Peral, '*Candidatus Phytoplasma pyri*', perteneciente al grupo Apple Proliferation (subgrupo 16SrX-C) (Fernández et al, 2017a) patógeno cuarentenario que afecta no solo a duraznero sino también al peral (Fernandez et al., 2019).

3.1.4.2.1 *Taxonomía y características*

Los fitoplasmas se alojan en los elementos cribosos del floema, en donde se multiplican y propagan (Doi et al., 1967; Whitcomb y Tully, 1989; Christensen et al., 2005). La forma de transporte de célula a célula es a través de los poros de los elementos cribosos y se mueven por la planta con el flujo de fotosintatos desde los tejidos fuente a los tejidos destino. Hay evidencias de que la translocación no puede explicarse únicamente por el flujo de asimilados. Es poco probable un movimiento activo teniendo en cuenta la falta de genes que codifiquen para los elementos del citoesqueleto o flagelos (Christensen et al., 2005), aunque recientemente se ha propuesto que el movimiento dentro del tejido floemático pueda estar influenciado por la unión específica de una de las proteínas inmunodominantes de membrana del patógeno con la miosina en la planta hospedadora (Boonrod et al., 2012; Buxa et al., 2015).

El genoma de los fitoplasmas ha sido sometido a una evolución reductiva, como consecuencia de un ciclo de vida que alterna entre tejidos con abundantes nutrientes en plantas e insectos, lo cual requiere adaptaciones a un rango amplio de ambientes (Hogenhout et al., 2008). A pesar del tamaño reducido del genoma, los fitoplasmas, registran genes presentes en múltiples copias, con importantes diferencias entre cada una de las cepas secuenciadas, incluso entre fitoplasmas muy emparentados (Bai et al., 2006; Tran-Nguyen et al., 2008; Kube et al., 2008; Andersen et al., 2013). La mayor parte de las copias múltiples se encuentran

organizadas en grupos de genes, involucrados en la replicación, intercambio y transposición, sugiriendo que estos constituirían elementos potencialmente móviles, denominados PMU (putative mobile units) (Bai et al., 2006), asociados a cambios de tamaño, re-arreglos genómicos y transferencia horizontal de genes. Dentro de estos “elementos móviles” se han registrado genes para proteínas con destino a membrana y la mayoría de los genes de proteínas efectoras, ambas asociadas a factores de virulencia (Hogehout et al., 2008; Toruño et al., 2010; Sugio y Hogehout, 2012). En el caso de los fitoplasmas estos efectores inducirían cambios fisiológicos y morfológicos en sus huéspedes que aumentarían su aptitud biológica durante la infección (Sugio et al., 2011a, b).

3.1.4.2.2 Clasificación

Según el criterio recomendado por el Comité Internacional de Sistemática de Bacterias (ICSB, 1997), los fitoplasmas deben ser considerados como un género y por lo menos cada grupo 16Sr representar una potencial especie. El género '*Candidatus Phytoplasma*' (IRPCM, 2004) se introdujo para clasificar bacterias no helicoidales sin pared celular que habitan el floema de las plantas y los tejidos de vectores de insectos. El taxón '*Ca. Phytoplasma*' forma parte de la clase Mollicutes y sus miembros están asociados con más de mil enfermedades de plantas en todo el mundo (Bertaccini et al., 2014; Kumari et al., 2019). Los fitoplasmas no están disponibles en colonias puras (Contaldo et al., 2016) y varios de ellos aún no se cultivan, por lo que aún no se han cumplido los postulados de Koch para confirmar su papel como patógenos. El conocimiento limitado de sus propiedades biológicas ha dificultado su clasificación; por lo tanto, la designación provisional de este género permitió estudios sobre su epidemiología y genética, revelando, en algunos casos, nuevas características moleculares de estas bacterias (Namba, 2019). Dado el aumento en el número de taxones descubiertos y, a veces, sus posibles rasgos moleculares superpuestos, la definición de una especie '*Ca. Phytoplasma*' requiere una revisión y aclaración.

Análisis de diferentes genes han demostrado que los fitoplasmas representan un grupo monofilético dentro de la clase mollicutes (Lim y Sears,

1989; Zhao et al., 2015). Diversos grupos y subgrupos son necesarios para ubicar a estos organismos, que poseen secuencias únicas en el gen 16S rRNA, unidad de membrana simple, pleomórficos, entre 60-1100nm de diámetro, habitan en floema y diversos órganos de insectos, son sensibles a las tetraciclinas, tienen 23-29% de G+C, un cromosoma de 530-1350 kpb y ADN extracromosómico, codón UGA “stop” y UGG Trp.

El umbral de identidad del gen 16S rRNA del 97.5% (estimativo 60-70% en el total de genoma) para la designación de una nueva especie de '*Ca. Phytoplasma*' definida en 2004 (IRPCM, 2004), fue revisado al agregar la longitud de secuencia requerida para tal asignación (Yarza et al., 2014). Se concluyó que el valor umbral más alto (98.65 %) aumentaría el número de especies de '*Ca. Phytoplasma*', lo que llevaría a la subdivisión de algunas de las existentes, además, reduciría el número de cepas de fitoplasmas clasificadas incorrectamente. La diferenciación debe realizarse utilizando un fragmento de aproximadamente 1.5 kb de la secuencia del gen 16S rRNA (aproximadamente el 95 % del gen completo sin las secuencias de los cebadores). Esta secuencia debe basarse en ambas hebras obtenidas con el método de secuenciación Sanger con una cobertura al menos duplicada para tres muestras biológicas independientes o de tres ubicaciones diferentes donde se determinó una sola infección por fitoplasma. Entre los pares de cebadores que amplifican todo el gen 16S rRNA se encuentran P1/P7, P1/16 S-SR o P1A/16 S-SR (Bertaccini et al., 2019). Se considera que las cepas que comparten una identidad de secuencia de >98.65 % en comparación con la cepa de referencia son miembros de la respectiva especie de '*Ca. Phytoplasma*'. Las cepas que muestran una identidad <98.65 % con la cepa de referencia, pero >98.65 % con otras cepas de la misma especie de '*Ca. Phytoplasma*', deben considerarse como relacionadas con esta especie de '*Ca. Phytoplasma*'. Cuando no se disponga de secuencias del genoma completo, se deben utilizar otros genes conservados o de mantenimiento, que tengan tasas de mutación bajas (*tufB*, *secY*, *secA*, *rplV-rpsC* y *groEL*), para la comparación genómica (Bertaccini et al., 2022).

En 1993 se propuso la utilización de los perfiles de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) para ser aplicados en el gen

ribosomal 16S de fitoplasmas, utilizando 15 diferentes enzimas de restricción (Lee et al., 1993). Más tarde se establecieron los perfiles de restricción utilizando una batería de 17 enzimas de restricción (Wei et al., 2007; 2008). La separación de los grupos principales se basa en coeficientes de similitud de patrones colectivos de RFLP de un amplicón de PCR de 1,2 kb (Lee et al., 1998). Siendo dos grupos distintos cuando los coeficientes de similitud de los patrones de RFLP son del 90% o menos. La delineación del subgrupo dentro de un grupo dado se basa en el análisis del sitio de restricción dentro de este amplicón. Se asigna un nuevo subgrupo si una cepa de fitoplasma desconocida tiene uno o más sitios de restricción diferentes de los de todos los miembros existentes del grupo dado. El sistema se ha actualizado periódicamente (Lee et al., 1998, 2000, 2006; Montano et al., 2001; Arocha et al., 2005; Al-Saady et al., 2008).

El sistema de clasificación ha sido actualizado basándose en patrones virtuales de RFLP, mediante el uso de análisis RFLP simulados por computadora de vastas colecciones de secuencias de genes de ARNr de fitoplasma 16S que se informaron y depositaron en GenBank (Wei et al., 2007, 2008; Zhao et al., 2009). Actualmente, existen 36 grupos aproximadamente (Naderali et al., 2017; Rao et al., 2018).

3.1.4.2.3 *Hospedantes*

Los fitoplasmas son los responsables de producir enfermedades en más de 1000 especies vegetales, entre las cuales se encuentran cultivos de gran importancia económica como industriales, hortalizas, frutales, cereales, plantas ornamentales, árboles maderables y de sombra, entre otros (Marcone, 2014; Bertaccini y Lee, 2018). Las enfermedades causadas por este tipo de patógenos continúan aumentando, ya sea por aparición de nuevas enfermedades o por enfermedades cuya etiología permanecía desconocida y han sido identificadas como causadas por fitoplasmas en años recientes (Bertaccini et al., 2014; Rao et al., 2018).

Estos patógenos, como parásitos estrictos, sólo viven en las plantas y en sus insectos vectores hemípteros. Se pueden transmitir por uno o varias especies de vectores de manera persistente y propagativa, dependiendo del

grado de especificidad. El rango de plantas hospederas para cada fitoplasma depende del comportamiento alimenticio del vector, vectores monófagos u oligófagos diseminaran el fitoplasma entre una o pocas especies vegetales, como es el caso de *Cacopsylla pyri* y el fitoplasma del decaimiento del peral o del enrollamiento clorótico del duraznero. En cambio, si el insecto se alimenta de diferentes especies vegetales, el fitoplasma afectará a un mayor rango de plantas, como es el caso de *Macrosteles fascifrons* que transmite el fitoplasma AY (16Srl-A, -B) a más de 191 especies de plantas diferentes (Golino et al., 1989; McCoy et al., 1989). A nivel molecular, la proteína de membrana antigénica (AMP) de los fitoplasmas puede estar involucrada en la determinación de la transmisibilidad y la especificidad del vector (Suzuki et al., 2006; Pacifico et al., 2015).

3.1.4.2.4 Sintomatología y daños

La sintomatología ocasionada por los fitoplasmas sugiere profundas alteraciones en el equilibrio hormonal de la planta; la fotosíntesis y las sustancias de reserva (Pertot et al., 1998; Lepka et al., 1999; Musetti et al., 1999; Musetti et al., 2000). Estas alteraciones se relacionan en parte con el papel que juegan las proteínas efectoras en la regulación de procesos metabólicos y fisiológicos. Existen numerosos genes de proteínas efectoras con un rol clave en los mecanismos de patogenicidad, induciendo cambios tanto en plantas hospedantes como en insectos vectores. Estos cambios aumentarían la aptitud biológica del patógeno durante la infección y la dispersión (Hogenhout et al., 2008; Sugio et al., 2011a; Renaudin et al., 2015; Rashidi et al., 2015).

La mayoría de estas proteínas de patogenicidad, al poseer un tamaño menor a 40kDa, por lo que pueden atravesar los haces cribosos del floema y dirigirse hacia otros tejidos en el huésped por fuera del floema e incluso actuar en el núcleo de las células (Rümpler et al., 2015).

Generalmente, las enfermedades de las plantas asociadas a la presencia de estos patógenos se reconocen por un conjunto de síntomas, de los cuales los más frecuentes son: amarillamiento o clorosis, enrojecimiento precoz de las hojas, esterilidad de las flores (sin producción de semillas), virescencia (pétalos

color verde sin desarrollo del color característico de la flor), enanismo generalizado, desarreglos vegetativos (desarrollo de grandes cúmulos de hojas o flores sin desarrollarse, acumulándose generalmente en lugar de las yemas axilares), enrollamiento de hojas, decaimiento general, filodias (transformación de los órganos florales en estructuras foliares) y proliferación de yemas adventicias dando lugar al desarrollo del síntoma de “escobas de bruja”. En plantas leñosas el síntoma denominado "die back", el cual sumado a los síntomas mencionados anteriormente, ocasiona que las ramas se sequen hasta terminar con la muerte completa del árbol (Lee et al., 2000; Bertaccini et al., 2014).

Algunos de estos síntomas como la virescencia, escoba de brujas, y filodias son casi exclusivos de fitoplasmas.

El patógeno '*Candidatus Phytoplasma pyri*' (grupo 16SrX-C), ha sido identificado en duraznero en Mendoza (Fernandez et al., 2017a) y peral en Rio Negro, Argentina (Fernandez et al., 2019) y Chile (Rosany et al., 2016). Este patógeno es el causante de la enfermedad del enrollamiento clorótico del duraznero (PYLR), la cual ha sido notificada primeramente en California (EE. UU.) (Blomquist y Kirkpatrick 2002) y España (Sabaté et al., 2014). Estudios de transmisión por vectores, determinaron que varias especies de psílidos, y no chicharritas, son los principales insectos vectores de los fitoplasmas que conforman el Grupo 16SrX (Blomquist y Kirkpatrick 2002).

Esta enfermedad produce los siguientes síntomas:

Hojas de tamaño normal, pero se enrollan hacia el final del verano, amarillamiento y enrojecimiento temprano de hojas, engrosamiento de nervaduras centrales y laterales de las hojas, muerte de ramas y rápido decaimiento de los árboles (el árbol infectado generalmente tarda de 2 a 3 años en morir después de la aparición de los primeros síntomas) y aparición de zonas necróticas en las hojas que se convierten en agujeros (menos frecuente).

3.1.4.2.5 Técnicas de detección

Las técnicas de detección, identificación y clasificación más empleada hoy para estos patógenos es la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) (Lee et al., 1993). Tanto para el diagnóstico como para el análisis de la filogenia, el gen 16S rDNA y la región espaciadora 16S-23S rDNA han sido las más empleadas ya que son regiones aptas para la generación de cebadores universales que permiten la hibridación en todos los grupos 16Sr de fitoplasmas (Lee et al., 2000). Numerosos genes, menos conservados, son empleados como marcadores adicionales para una clasificación y diferenciación más exacta, sobre todo entre cepas relacionadas, incluyendo los genes *rpsV* (*rpl22*), *rpsC* (*rps3*), *rplP*, *rpmC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rplE*, *rpsN*, *rpsH*, *rplF*, *rplR*, *rpsE*, *rpmD*, *rplO*, *tuf*, *secA*, *secY*, *nus*, *vmp1*, *stamp*, *groEL*, *rpoB*, *potC* y 23S rRNA, y la región espaciadora 16S–23S rRNA (Marcone et al., 2014).

El empleo de cebadores universales y específicos, han permitido una rápida y eficiente detección, identificación y clasificación de fitoplasmas en numerosas especies vegetales. Sin embargo, la concentración del patógeno en los distintos tejidos es notablemente desigual, tal como se ha demostrado en el caso de algunas especies leñosas o con presencia de látex, sumado a que muchos vegetales contienen compuestos que inhiben la actividad de la enzima polimerasa, lo que genera falsos negativos (Constable et al., 2003). Dadas estas condiciones se requieren de métodos que permitan la detección de concentraciones mínimas del ADN del patógeno y la obtención de ADN libre de inhibidores. Para ello se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real (qPCR), PCR anidada o PCR múltiple, las cuales han mejorado notablemente la detección e identificación de esta clase de patógenos aún en concentraciones mínimas o en presencia de inhibidores (Baric y Dalla-Via, 2004; Hodgetts et al., 2008; Bertaccini et al., 2014).

3.1.4.2.6 Transmisión

La propagación y transmisión de los fitoplasmas puede darse mediante la multiplicación agámica desde plantas infectadas ya sea a través de bulbos, tubérculos, rizomas y esquejes, plantas epífitas como la cuscuta (*Cuscuta sp.*), el uso de yemas y portainjertos infectados, multiplicación por estacas e insectos

vectores (Orden Hemiptera). Estos últimos se alimentan directamente del tejido floemático de plantas infectadas y transmiten los fitoplasmas de manera persistente-propagativa a plantas sanas. Luego de la adquisición durante la alimentación sigue un período variable de incubación, en el cual ocurre la multiplicación del patógeno dentro del insecto. Solo si el fitoplasma coloniza las glándulas salivales, este insecto puede transmitir el patógeno y actuar como vector, permaneciendo infectivo el resto de su vida y pudiendo infectar cada vez que se alimenta de una planta sana (Weintraub y Jones, 2010). Para que una especie de insecto pueda transmitir un fitoplasma en particular, debe existir una interacción precisa entre un grupo particular de proteínas de la membrana del fitoplasma (proteínas inmunodominantes de membrana) y proteínas del insecto (Konnerth et al., 2016). Los insectos pertenecientes al suborden Auchenorrhyncha, familia *Cicadellidae* (planthoppers), *Fulgoridae* y suborden Sternorrhyncha, familia *Psyllidae* (psílidos), son conocidos vectores de diferentes fitoplasmas (Weintraub y Beanland; 2006).

La transmisión del fitoplasma '*Candidatus phytoplasma pyri*' de un árbol a otro, se produce únicamente a través de algunas especies del género *Cacopsylla* spp. (O. Hemiptera Sbo. Sternorrhyncha) que son monófagas en frutales de pepita y de carozo, según se ha demostrado en el hemisferio norte (Purcell y Suslow, 1984; Weintraub y Beanland, 2006).

La transmisión transovarial se ha demostrado solo en algunos grupos particulares de fitoplasmas, en proporciones muy bajas y no como una característica generalizada en este tipo de patógenos (Tedeschi et al., 2006).

La transmisión por semilla biológica ha sido reportada en algunos trabajos científicos, por ejemplo, a partir de semillas de alfalfa, sésamo, maíz, tomate y recientemente de amaranto (Calari et al., 2011; Chung y Jeong, 2014; Noelting et al., 2019). Sin embargo, se desconocen en profundidad los mecanismos asociados a estos dos últimos tipos de transmisión.

3.1.4.2.7 Control

Para la eliminación del fitoplasma en materiales de propagación se ha aplicado la termoterapia mediante inmersión de esquejes o estacas en agua

caliente (50°C, 45 s) (Boudon-Padieu y Grenan, 2002). No obstante, la prevención en lugar del tratamiento es la principal estrategia de manejo.

Las enfermedades asociadas a fitoplasmas han sido manejadas mediante el establecimiento de plantas libres de la enfermedad, o con variedades que se presume que tienen tolerancia a estas enfermedades o no son elegidas por sus insectos vectores. Un mecanismo común y estratégico ha sido a través del control de los insectos vectores y mediante la aplicación de determinadas prácticas de cultivo para eliminar las fuentes de fitoplasmas en hospedantes alternativos del patógeno (Chiesa et al., 2007).

El uso de plantas resistentes es uno de los enfoques más prometedores. Las diferencias intra e interespecíficas en la respuesta de las plantas a las enfermedades causadas por fitoplasmas han sido observadas en las últimas décadas tanto en condiciones de infección experimental como natural (Sinclair 2000; Sinclair et al., 2000a, 2000b; Seemüller and Harries 2010). Los genotipos resistentes son adecuados para el manejo de enfermedades y deben ser considerados como una medida de control segura, eficaz y respetuosa con el medio ambiente. Aunque algunos genotipos así identificados no son totalmente satisfactorios para fines agronómicos, pueden ser profundizados en programas de mejoramiento genético destinados a plantas productoras con propiedades agronómicas adecuadas en las que la resistencia a los fitoplasmas sea inserta de manera estable (Marcone y Rao 2019). Por otro lado, varios experimentos que se han llevado a cabo en diferentes especies de plantas infectadas con fitoplasmas, han mostrado que la recuperación puede ser inducida artificialmente con estrés abiótico, tratamiento con inductores de resistencia o con moléculas antimicrobianas, y la aplicación de micorrizas y rizobacterias. Estos y otros hallazgos recientes han indicado la importancia de los hongos endófitos y bacterias en el fenómeno de la recuperación (Romanazzi et al., 2009).

3.1.4.2.8 Distribución geográfica e Importancia Económica

Los fitoplasmas son más diversos de lo que se pensaba y no se distribuyen de manera uniforme en todos los continentes (Seemüller et al., 1998). Es posible afirmar que geográficamente, la presencia de fitoplasmas es a nivel

mundial, ya que han sido reportados en al menos 85 países, sin embargo, la distribución varía de acuerdo con el grupo o tipo de fitoplasma, ya que muchos parecen estar restringidos a un continente o a una región geográfica específica (Costanzo, 2012).

Las enfermedades producidas por estos patógenos constituyen verdaderas limitantes de la producción afectando notablemente los rendimientos, destruyendo economías en diversas regiones del planeta. En algunos casos han sido declarados plagas cuarentenarias, afectando la comercialización de productos agropecuarios entre países y aumentando las limitaciones para el movimiento de material biológico. Este tipo de enfermedades toma mayor relevancia en especies perennes y de propagación vegetativa, provocando pérdidas en la producción y también en los procesos de comercialización (Marcone et al., 2014). Un ejemplo podría ser el “Amarillamiento letal del cocotero” que, en sólo algunas décadas, diezmó la producción de coco (*Cocos nucifera* L.) en América Central y el Caribe, con la muerte de más del 80% de las plantas en algunas regiones, generando pérdidas económicas que causaron cambios sociales en las poblaciones al depender de esta especie para la obtención de materias primas (Gurr et al, 2016). Otra enfermedad importante causada por fitoplasmas es la Flavescencia dorada y el Bois noir, enfermedades causadas por dos fitoplasmas diferentes y que están limitando la producción de vid (*Vitis sp*) en el centro de Europa (Weintraub and Jones, 2010).

En Argentina se han detectado más de 30 especies de plantas infectadas por fitoplasmas, algunas de ellas en cultivos de gran importancia económica como ajo (*Allium sativum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), frutilla (*Fragaria x anannassa* Duch), maíz, paraíso (*Melia azedarach*), entre otros, produciendo daños y pérdidas variables (Fernández et al, 2020a). También se detectaron en ornamentales nativas y malezas que podrían funcionar como reservorios del patógeno o protección para los insectos vectores (Fernández et al, 2020b). En Argentina, se ha logrado secuenciar dos genomas de fitoplasmas: "*Candidatus Phytoplasma meliae*" (subgrupo 16SrXIII-G), asociado con el China tree yellows (ChTY) (Fernández y Conci 2021), y "*Candidatus Phytoplasma pruni*" ChTDIII (grupo X-Disease, subgrupo 16SrIII-B) (Fernández et al., 2020b) que afectan al

paraíso. Actualmente, hay poca información disponible sobre los insectos implicados en la transmisión y se dispone de pocos datos que contribuyan al conocimiento de su genoma y las proteínas involucradas en los mecanismos de interacción.

También han sido detectados fitoplasmas en plantaciones de frutales de carozo como durazneros, en la provincia de Jujuy y en la zona productora núcleo de la provincia de Mendoza. En Jujuy, mediante análisis moleculares de plantas sintomáticas se pudo detectar la presencia del "*Candidatus* Phytoplasma pruni" ChTDIII perteneciente al grupo 16SrIII-B (grupo X-disease), nunca citado en esta especie en el país. Este grupo es el más frecuentemente identificado en Argentina afectando numerosas especies de importancia económica como así nativas y malezas, que podrían actuar como reservorios del patógeno en la naturaleza (Fernández et al, 2013; 2017b). El insecto vector para fitoplasma causal del "amarillamiento del duraznero" detectado en los valles templados de Jujuy aún no ha sido identificado, aunque estudios previos relacionan al cicadellido *Agalliana ensigera* como un posible vector del patógeno (Hamity et al, 2017). Recientemente, en la misma zona productora, se detectaron plantas de ciruelos (*P. domestica*) con síntomas sospechosos de infección por fitoplasmas los que dieron positivos a la presencia del patógeno, donde se logró demostrar la presencia de este patógeno que afecta al duraznero (16SrIII-B) además, de un nuevo fitoplasma del grupo 16SrXIII, subgrupo L (Bongiorno et al., 2020).

3.1.4.2.9 Problemática en Mendoza

En Mendoza en la zona del valle de Uco, se detectó la presencia de fitoplasmas en plantas de duraznero y se demostró que pertenece al grupo 16SrX-C (*Ca. Phytoplasma pyri*) (Fernández et al, 2017a). Actualmente, se desconoce la incidencia real de esta enfermedad en la región, los vectores involucrados en su transmisión, la evolución de la misma, la diversidad del patógeno y el daño producido. Este fitoplasma provoca síntomas muy diferentes al que se detectó en durazneros de los Valles Templados de Jujuy (Fernández et al, 2013), y tiene rango de cuarentenario.

Para intentar disminuir el impacto de este tipo de enfermedades y realizar un control estricto a través de normas cuarentenarias es necesario comprender la diversidad de los fitoplasmas presentes y establecer diferencias con los ya estudiados realizando estudios a nivel genómico de los fitoplasmas locales. Esto implica identificar potenciales hospedantes alternativos que podrían servir como reservorios del patógeno o como refugio para sus vectores. Además, es crucial identificar los insectos que actúan como vectores, realizar estudios de transmisión y profundizar en el conocimiento de los mecanismos biológicos subyacentes, así como comprender las interacciones entre el patógeno y su hospedante. Se deben desarrollar sistemas de diagnóstico con sensibilidad y especificidad adecuadas, robustos y útiles para estudios epidemiológicos en los cuales se maneje un gran número de muestras.

4 Estudios epidemiológicos de la enfermedad de Sharka en ciruelo europeo dentro y fuera de la zona cuarentenaria en Mendoza¹

4.1 Introducción

Sharka es considerada la enfermedad viral más importante de los frutales de carozo debido a las graves pérdidas de rendimientos que ocasiona a nivel mundial (Cambra et al. 2006a). Mendoza, con 27.635 ha implantadas de frutales de carozo, de las cuales 16.481 corresponden a ciruelo, es la primera productora de este tipo de frutas en Argentina (Programa Nacional Frutales, 2020), siendo esta actividad de gran importancia económica para la provincia. Por estos motivos, este virus capaz de generar pérdidas millonarias representa un gran peligro para lo que respecta a esta actividad económica.

Esta enfermedad que se encuentra en la mayoría de las regiones frutícolas del mundo y fue detectada a finales del 2004 en Argentina (Dal Zotto, et al., 2006), ha sido declarada por el SENASA como plaga cuarentenaria presente bajo control oficial. En la actualidad, sólo dos focos de la enfermedad del Sharka han sido detectados en Argentina. El original fue encontrado en el departamento de Pocito y en el Valle de Tulúm, ambos en la provincia de San Juan, donde se han obtenido los valores de incidencia de la enfermedad más altos, entre 0,3 y 1,82%. detectándose en ciruelo japonés (*P. salicina* cv. 'Red Beaut') y damasco (*P. armeniaca* cv. 'Bulida'). El segundo foco de infección apareció en la provincia de Mendoza, Oasis Sur (Departamentos de Gral. Alvear y San Rafael), con bajos porcentajes de incidencia, entre 0,3 y 0,025%, encontrándose en ciruelo europeo (*P. domestica* cv. 'd'Agen') (Marini et al., 2015). Estos porcentajes de incidencia fueron obtenidos a partir del monitoreo

¹ El contenido de este capítulo fue publicado en Piglionico, D., Farrando, R., Lucero, V., Ojeda, M., Dal Zotto, A., Picca, C., & Marini, D. (2022). Epidemiological behavior of Sharka disease in European plums (*Prunus domestica*) inside and outside of the quarantine area of southern Mendoza, Argentina. In PHYTOPATHOLOGY (Vol. 112, No. 3, pp. 9-9). 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121 USA: AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC.

oficial realizado por SENASA en plantas madre de ciruelo, duraznero y damasco de los viveros inscriptos del país, luego esas plantas fueron erradicadas.

Desde 2005, SENASA exige a los viveros que analicen el material de multiplicación de frutales de carozo para evitar la diseminación del virus y el cambio del estatus cuarentenario. Luego de muchos años de inspecciones en viveros y la eliminación continua de material infectado, se ha logrado disminuir la incidencia del virus (Marini et al., 2015). Sin embargo, todavía hay escasa información sobre lo que sucede en fincas comerciales cerca de las fuentes iniciales de infección y el comportamiento del virus en las condiciones de Mendoza.

El objetivo de este trabajo fue confirmar mediante herramientas de detección serológica y molecular la infección por PPV en plantas de ciruelo en el área cuarentenaria del sur de Mendoza, así como evaluar el avance o progreso de la enfermedad y el comportamiento epidemiológico del virus en la zona. A partir del objetivo de esta investigación se enunciaron las siguientes hipótesis de trabajo:

H1: Existe una correlación entre síntomas sospechosos y presencia de enfermedades emergentes en el área núcleo de producción de frutales de carozo de Mendoza.

H2: Las enfermedades emergentes detectadas se encuentran diseminadas alrededor de los focos iniciales.

4.2 *Materiales y métodos*

4.2.1 *Sitio, material vegetal y tipo de muestreo*

El ensayo se llevó a cabo durante las temporadas 2018, 2019, 2020, 2021 y 2022. El área evaluada abarca una zona comprendida por parte de los distritos de Rama Caída y Cuadro Benegas del Departamento de San Rafael, Mendoza (Figura 4.1). Dicha área de estudio se dividió en dos partes:

- Zona de cuarentena o cuarentenaria (ZC) de 8km de radio, teniendo como referencia el foco inicial en el cual la enfermedad fue detectada
- Zona no cuarentenaria (ZNC), en la que la enfermedad no ha sido detectada. Hasta 4 km de distancia del área cuarentenaria.

Para este estudio se seleccionaron 5 fincas dentro de la ZC, con plantas adultas de ciruelas d'Agén de aproximadamente 10 años de edad. En noviembre de 2017 se llevaron a cabo recuentos de plantas con manifestación de síntomas sospechosos y posteriormente se les realizó el análisis para detección de PPV. Después de confirmar la infección mediante la técnica serológica DAS-ELISA, se seleccionaron 3 fincas con resultados positivos para el virus dentro de la zona cuarentenaria. De la ZNC se seleccionaron 4 fincas (Figura 4.1, Tabla 4.1).

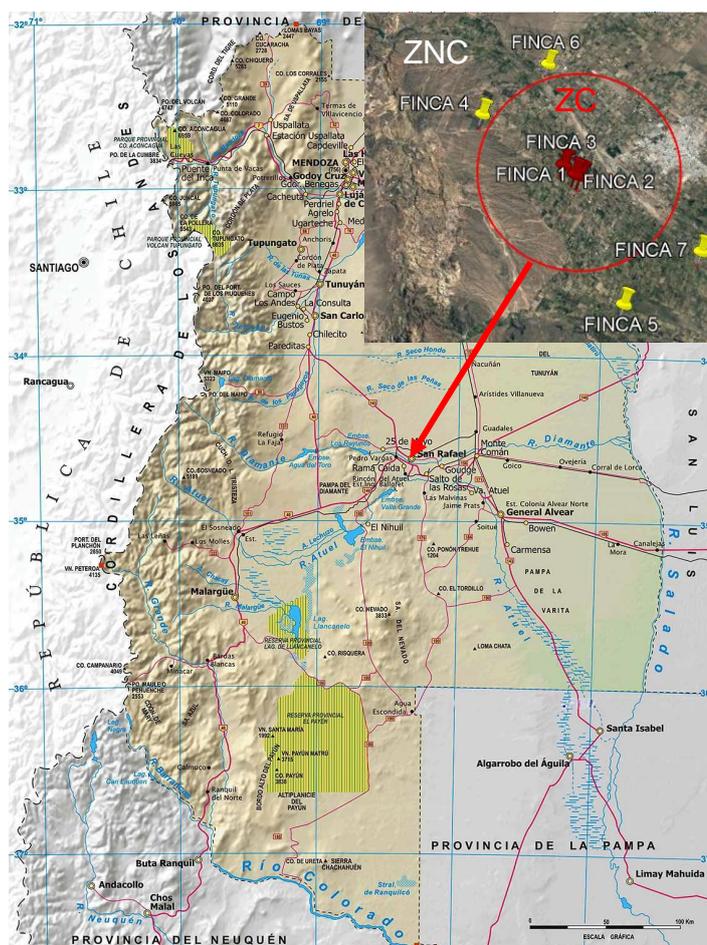


Figura 4.1. Área de estudio de la enfermedad, Oasis Sur de Mendoza. Ubicación del área cuarentenaria, no cuarentenaria y las fincas seleccionadas para los muestreos.

Tabla 4.1. Coordenadas de las fincas seleccionadas para los muestreos.

Finca	Coordenadas GPS	
	Latitud	Longitud
1	34°40'9.56"S	68°24'14.83"O
2	34°40'9.04"S	68°24'32.02"O
3	34°39'55.97"S	68°25'14.94"O
4	34°39'0.57"S	68°30'11.59"O
5	34°44'35.56"S	68°20'2.52"O
6	34°35'53.01"S	68°27'55.26"O
7	34°41'28.72"S	68°17'14.76"O

Estas fincas fueron monitoreadas y muestreadas aplicando un muestreo jerárquico, forma de evaluación grupal que utiliza las relaciones de incidencia de una enfermedad a dos o más niveles o jerarquías de espacio (Hughes, G. et al 2002), consecutivamente durante 5 años comenzando en el año 2018, entre los meses de octubre y noviembre de cada año. Para el muestreo sistemático por finca, se definió que una muestra estaría compuesta por 2 plantas consecutivas dejando una distancia de 3 plantas para tomar la siguiente muestra, siempre por la misma hilera (Figura 4.2). Cada muestra compuesta estuvo conformada por 16 hojas tiernas en total (8 hojas por árbol), tomadas de las caras norte, sur, este y oeste de las plantas. El área a muestrear por finca fue de 1ha, con el fin de tomar aproximadamente 100 muestras compuestas de cada finca seleccionada. Cada año se analizaron mediante test serológicos y moleculares las mismas muestras compuestas para estudiar el progreso, espacial y cuantitativo, de la enfermedad.

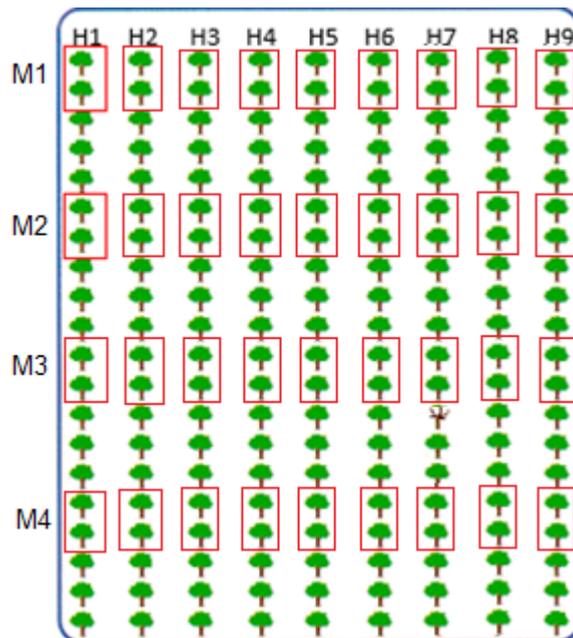


Figura 4.2. Muestreo jerárquico, muestra compuesta por hojas tomadas de dos árboles consecutivos.

4.2.2 Análisis serológicos de PPV

Todas las muestras compuestas extraídas durante cada temporada fueron analizadas mediante el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de Doble Anticuerpo (DAS-ELISA - Clark y Adams 1977) utilizando un coctel de antisueros policlonales y monoclonales anti-PPV (Bioreba, Reinach BL1, Suiza) según se detalla en Anexo 1. Las muestras se consideraron positivas cuando el valor de absorbancia (a 405 nm y 1hr de reacción) fue dos o más veces mayor que la media de las muestras de los controles sanos.

4.2.3 Detección molecular de PPV y tipificación de raza

Las muestras que resultaron positivas por DAS-ELISA, fueron analizadas molecularmente para confirmar la presencia viral. Para los análisis moleculares se extrajeron los ARN totales de las plantas a partir de 300 mg de hojas de cada muestra compuesta, utilizando un procedimiento modificado de Hughes y Galau (1988) (Sara Spiegel, The Volcani Center, Israel, comunicación personal) (Anexo 2.1). La cantidad y la calidad del ARN extraído fueron evaluadas mediante fluorimetría y electroforesis en gel de agarosa respectivamente según Anexo 3.1 y 6.1.

El RT-PCR convencional fue utilizado para confirmar los resultados positivos obtenidos por análisis serológicos y el PCR en tiempo real para tipificar la raza de PPV. Se utilizaron kits QIAGEN OneStep™ RT-PCR y SYBR Green One-Step™ RT-PCR (QIAGEN Inc., Valencia, CA), respectivamente, siguiendo los procedimientos detallados en Anexo 4.1.1 y 4.1.2.

Para el PCR convencional se utilizaron cebadores universales para PPV P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') y P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3') (Wetzel et al., 1991) y un termociclador marca Biometra (UNO II). Como control positivo se utilizó ARN total extraído de un árbol de ciruelo cv 'd'Agen' con presencia de PPV ubicado en el sur de Mendoza y como control negativo el ARN total extraído de un clon de duraznero 'GF305' libre de virus. Las amplificaciones obtenidas por RT-PCR convencional se analizaron mediante electroforesis con geles de agarosa, se tiñeron con Gel Red® y se visualizaron mediante un transiluminador UV Marca Labnet (Anexo 6.2.1).

Para la tipificación de la raza de los aislados de PPV mediante RT-PCR en tiempo real, se utilizaron cebadores específicos para la raza D P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') y PD (5'- CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3'). P1 se une a una región conservada del genoma del PPV, la cual codifica para la proteína de la capsida, mientras que el primer PD, también lo hace en esta parte del genoma, pero se une específicamente a una región única y característica del PPV-D (Olmos et al., 1997). Se utilizó un termociclador BioRad Modelo CFX96 (Anexo 4.1.2).

4.2.4 *Diseño experimental*

A partir del registro de muestras enfermas por finca durante los cuatro años, se utilizaron estos datos para calcular la incidencia de la enfermedad dentro de cada finca según la fórmula "Incidencia (%) = (Número de muestras enfermas por año por finca / Número total de muestras por finca) x 100". Asimismo, se calculó la incidencia total en cada zona, que representa la cantidad de muestras enfermas en todas las fincas evaluadas por zona en relación con el total de muestras analizadas por zona.

Para analizar estadísticamente la proporción de plantas enfermas se utilizó un modelo lineal generalizado mixto (MLGM). Para ello se ajustaron los datos con una distribución binomial y un enlace logit, con el uso del programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2020). El modelo se compuso de:

- Variable respuestas: muestras enfermas
- Variable de clasificación: fincas
- Variable regresoras: años y muestras totales.

4.2.5 Mapas de comportamiento epidemiológico de PPV por finca

Para el análisis del comportamiento epidemiológico del virus en cada finca, se utilizó el software Surfer® (Golden Software, LLC) para crear mapas bidimensionales interpolativos. Para este estudio se tuvo en cuenta la cantidad de resultados positivos nuevos por finca de cada año, asignándole un valor de 1 y para muestras negativas un valor de 0. Se calcularon los datos por el método de interpolación KRIGING.

4.3 Resultados

4.3.1 Análisis serológicos

Se recolectaron un total de 36 muestras de las 5 fincas seleccionadas y evaluadas para determinar la presencia de PPV dentro de la zona cuarentenaria. De estas muestras, 25 resultaron positivas para el virus y pertenecían a las fincas 1, 2 y 3, las cuales se utilizaron posteriormente para el estudio epidemiológico.

En la Tabla 4.2 se presentan los resultados del análisis DAS-ELISA para determinar la cantidad de muestras positivas obtenidas en cada año en las 3 fincas seleccionadas dentro de la Zona Cuarentenaria (ZC), así como en las 4 fincas ubicadas fuera de esta zona. Los resultados positivos para PPV fueron confirmados posteriormente mediante RT-PCR convencional. En las fincas estudiadas fuera de la zona cuarentenaria no se encontró ninguna planta positiva para el virus del Sharka. Es importante destacar que la finca "3" fue erradicada después de 3 años de muestreo, lo que impidió realizar un seguimiento similar al realizado en las fincas 1 y 2.

Tabla 4.2. Número de muestras compuestas por dos plantas extraídas en cada finca en la zona cuarentenaria y no cuarentenaria y resultados positivos por finca por año.

	fincas	N° de muestras compuestas	N° de resultados positivos				
			año 0	año 1	año 2	año 3	año 4
zona cuarentenaria	1	102	12	17	19	22	25
	2	96	13	19	22	25	26
	3	96	0	1	2	-	-
zona no cuarentenaria	4	108	0	0	0	0	0
	5	96	0	0	0	0	0
	6	105	0	0	0	0	0
	7	102	0	0	0	0	0

4.3.2 Análisis moleculares

4.3.2.1 RT-PCR convencional para el diagnóstico

Todos los extractos de ARN vegetal de las muestras compuestas positivas por DAS-ELISA amplificaron un fragmento de 243 pb mediante RT-PCR convencional. No se observaron bandas de ADN en controles sanos (Figura 4.3). Esto permitió confirmar la presencia del virus en las muestras compuestas año a año.

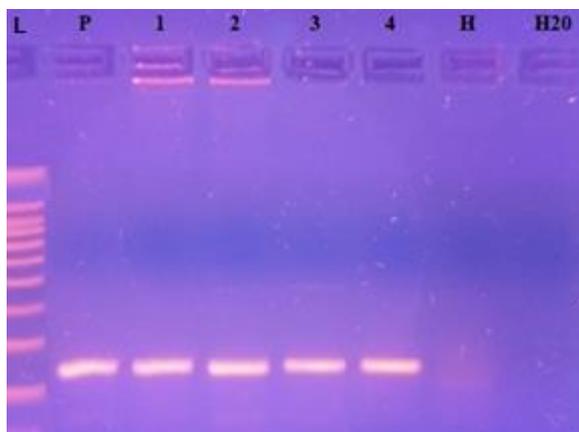


Figura 4.3. Amplificación por PCR en un solo paso de la banda de 243 pb obtenida con cebadores P1 y P2 (Wetzel 1990). L = GeneRuler 100 pb ADN (Invitrogen); H = control sano; P= control positivo P, PPV; H2O= control mix PCR; los carriles 01 a 04 son para muestras de ciruelo d'Agen. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red.

4.3.2.2 Tipificación molecular de los aislados de PPV

Según la bibliografía, se sugiere un valor de CT (cycle threshold) o umbral de ciclos de 36 como umbral para la detección de PPV mediante PCR en tiempo real, es decir, las muestras que arrojaban un CT aproximadamente igual o menor a 36 se consideraron positivas, los valores de CT entre 36 y 40 se consideraron

sospechosos, y las señales con un CT mayor o igual a 40 se consideraron negativas (Kim et al., 2008). La reacción de PCR en tiempo real utilizando cebadores P1 y PD fue positiva para los ARN provenientes de las muestras compuestas (MC) que habían resultado positivas por DAS-ELISA y RT-PCR Convencional (Ct menores a 18) y del control positivo (P); y negativa para el control sano (S) de GF-305 (Ct 40,82) y control master (H) (Figura 4.4). Esto denota que la raza presente en las plantas analizadas es Diderón, única raza detectada hasta ahora en Argentina.

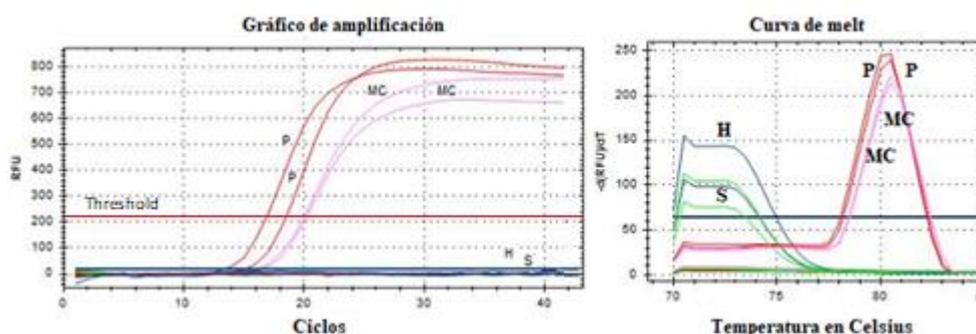


Figura 4.4. Análisis de RT-PCR en tiempo real para la identificación de cepas de PPV con SYBR Green y cebadores P1 y PD. S = control sano; P= control positivo; H= control master; MC= Muestras compuestas.

4.3.3 Incidencia de la enfermedad

Para el cálculo de la incidencia se utilizó el número de muestras enfermas por año por finca de la Tabla 4.2. Estos se dividieron por el número de muestras totales y se multiplicaron por 100 para obtener la incidencia de la enfermedad por finca por año (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Incidencia por finca en cada año de muestreo.

		Incidencia %				
fincas		año 0	año 1	año 2	año 3	año 4
zona cuarentenaria	1	11,76	16,67	18,63	21,57	24,51
	2	13,54	19,79	22,92	26,04	27,08
	3	0,00	1,04	2,08		
zona no cuarentenaria	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0

Para el cálculo de la incidencia total en la ZC, se utilizó el número de muestras enfermas totales por año para las fincas comprendidas dentro de esta zona (eliminando la finca 3, por erradicación) y se dividieron por el número de muestras totales analizadas en la ZC. Se llevó a cabo el mismo procedimiento para la ZNC (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Incidencia entre fincas en cada año de muestreo.

	Año				
	0	1	2	3	4
Incidencia % entre fincas (ZC)	12,60	18,20	20,70	23,73	25,8
Incidencia % entre fincas (ZNC)	0	0	0	0	0

4.3.4 Análisis estadístico

Los datos recopilados fueron analizados estadísticamente utilizando un enfoque de muestreo jerárquico (Hughes et al., 2002) y se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2020). Para este análisis se seleccionaron la finca 1 y 2, ya que se obtuvieron resultados PPV positivos, la finca 3 no se pudo utilizar porque fue erradicada a mitad del ensayo.

Utilizando un MLGM y ajustando los datos con una distribución binomial y un enlace logit, se encontró un efecto fijo "año" (variable independiente constante) estadísticamente significativo. Esto demuestra que el año de muestreo tiene un impacto significativo en el aumento de la proporción de plantas enfermas en las fincas correspondientes (Tabla 4.5).

Efectos fijos:

Tabla 4.5. Resultados obtenidos del análisis estadístico mediante el programa INFOSTAT.

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-1,91	0,22	-8,77	<0,0001
fincas2	0,22	0,30	0,72	0,4718
Ano	0,20	0,08	2,48	0,0133
fincas2:Ano	-0,01	0,11	-0,05	0,9597

Teniendo en cuenta las muestras positivas sobre las totales se calculó la incidencia por año con los valores ajustados obtenidos por el modelo estadístico utilizado (Figura 4.5), y el aumento de la incidencia interanual (Figura 4.6). Dando un promedio 3% para la Finca 1 y 3,25% para la Finca 2.

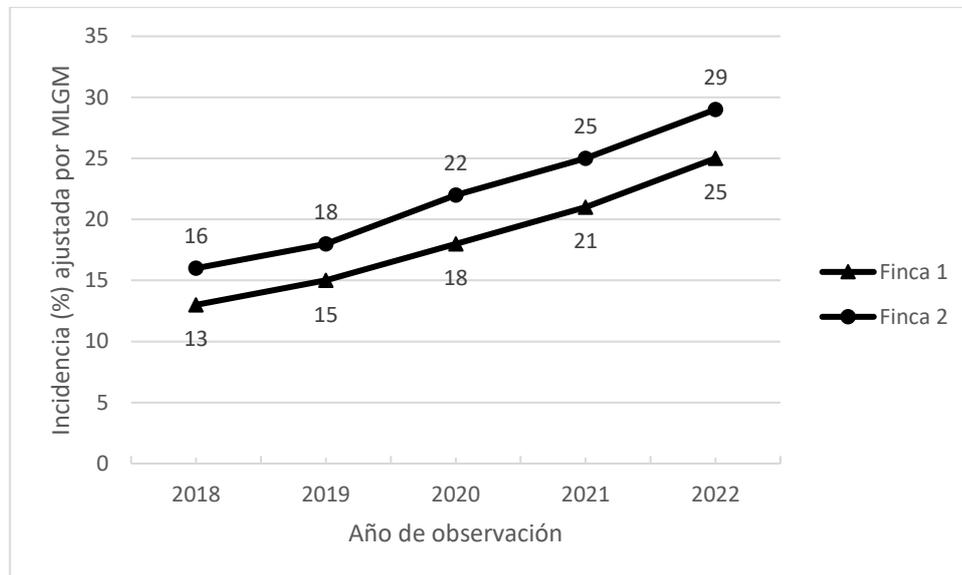


Figura 4.5. Incidencia de muestras enfermas por año y por finca, ajustada por modelo lineal generalizado mixto.

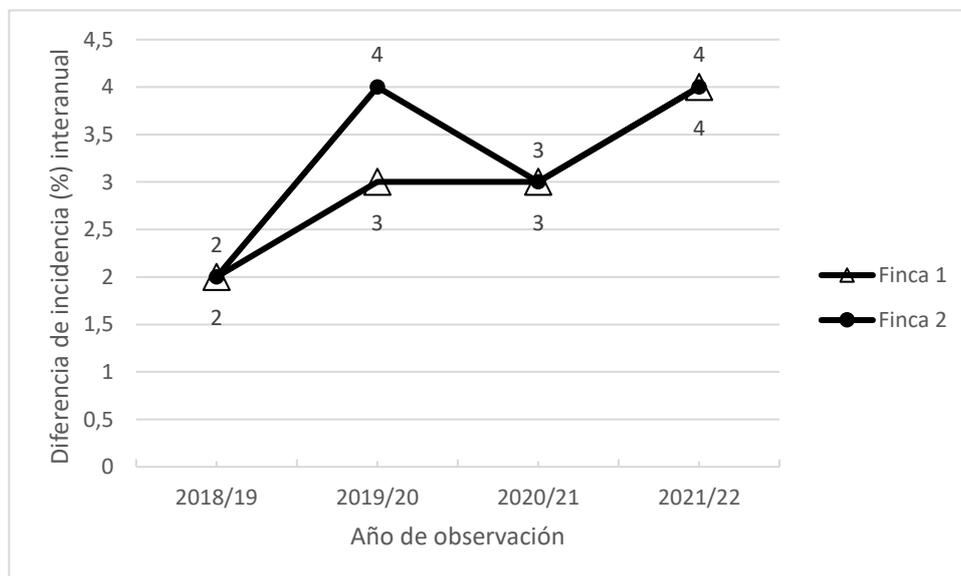


Figura 4.6. Aumento de incidencia interanual por finca expresado en porcentaje.

4.3.5 Mapas de comportamiento epidemiológico de PPV por finca

Mediante el uso del software Surfer® (Golden Software, LLC) se obtuvieron los siguientes mapas bidimensionales, en los que se puede ver

claramente la formación de focos infecciosos debido a una corta distancia de transmisión del virus (Figura 4.7).

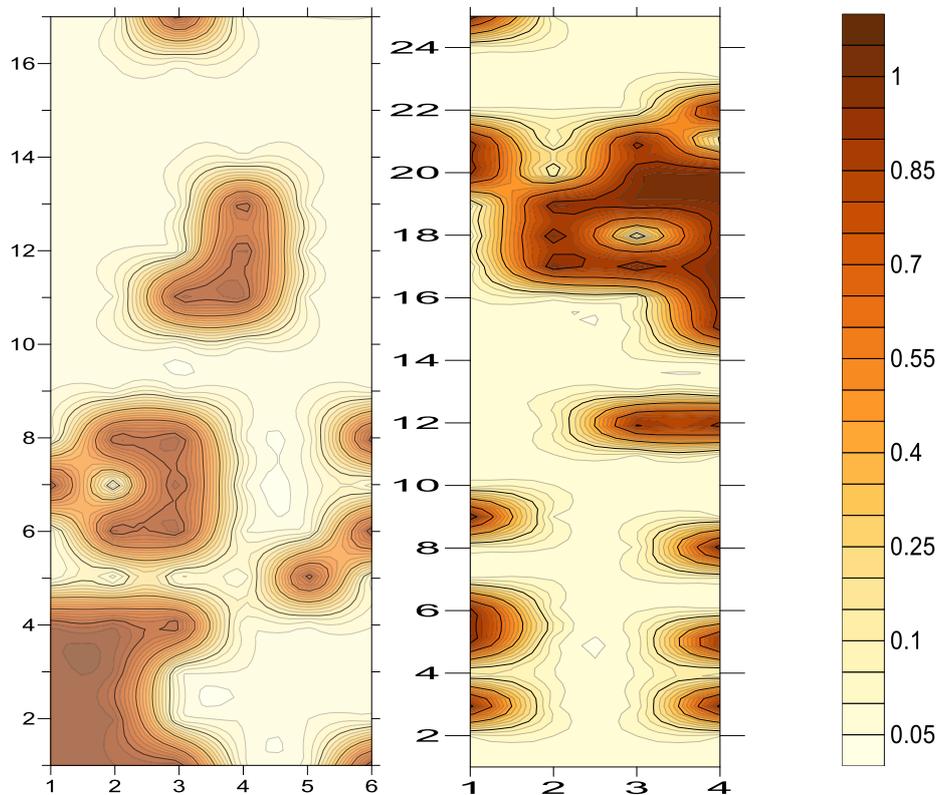


Figura 4.7. Mapas bidimensionales interpolados, eje X corresponde a las hileras y el eje Y al número de muestra. Izquierda: Finca 1, derecha Finca 2. La escala representa la densidad de casos positivos de infección por el virus en cada finca, utilizando una gradación de colores que va del 1 al 0, siendo uno la mayor densidad.

4.4 Discusión

Los resultados obtenidos mediante análisis serológicos y moleculares confirmaron la presencia de plantas de ciruelo D´Agen enfermas con Sharka en montes comerciales dentro de la zona cuarentenaria del Oasis Sur de la provincia de Mendoza, luego de la erradicación de los focos iniciales de infección por parte del SENASA. Estos resultados permitieron aceptar las hipótesis 1 y 2 planteadas en este capítulo.

Se corroboró que la raza presente del virus corresponde a la Raza D, “Diderón” (Olmos et al., 1997), coincidiendo con los reportes ya publicados sobre la única raza identificada y presente en Sudamérica (Herrera y Madariaga, 2003; Dal Zotto et al., 2006; Fiore et al., 2010; Herrera, 2013).

La incidencia del PPV en ciruelos de la ZC calculada en este estudio, varió del 12,6% al 25,8% durante los 5 años de monitoreos dentro de la zona cuarentenaria. Estos valores resultaron ser mayores que los valores previamente reportados en estudios anteriores en la misma zona (0,3% a 0,025%) (Marini et al., 2015). Esta diferencia puede atribuirse a que los cálculos anteriores se basaron únicamente en datos de plantas de vivero que posteriormente fueron erradicadas, mientras que en este estudio se utilizaron datos obtenidos de plantas de 10 años de edad de montes comerciales durante 5 años consecutivos. Además, es posible que esta mayor incidencia encontrada se deba al muestreo selectivo de plantas enfermas realizado previamente para seleccionar las fincas utilizadas en el ensayo. En otro estudio realizado durante cinco años (2007-2011) en un solo monte comercial dentro de la zona cuarentenaria de Mendoza, se reportó una incidencia inicial de 2,5% y final de 8,54% (Dal Zotto et al., 2020), este comportamiento se asemeja más al observado en este estudio.

Este estudio reveló que la incidencia de la enfermedad del Sharka dentro de cada finca en la zona cuarentenaria del Oasis Sur de Mendoza se duplicó en un lapso de 5 años. Mientras que no se observaron positivos fuera de dicha zona.

En estudios similares realizados por el Servicio de Protección de Plantas de Francia, se observó que la propagación de la enfermedad de Sharka fue más veloz en montes de durazneros infectados con el PPV-M que en montes de damascos infectados con el PPV-D. A través de observaciones detalladas y estudios de modelado, se estimó que, sin medidas de control, la incidencia podría alcanzar el 100% en un período de 5 o 6 años en huertos de durazno infectados con el PPV-M, mientras que en los damascos infectados con el PPV-D, se necesitarían 16 años para alcanzar el mismo nivel de incidencia (Labonne y Dallot, 2006). En América del Norte, donde se ha estudiado y documentado el comportamiento de la cepa PPV-D, se observó que los focos estaban localizados cercanos uno del otro y se propagaron lentamente, lo que les permitió suprimir de manera efectiva la enfermedad (Sihelská et al., 2017). Los resultados del presente trabajo coinciden con los de la bibliografía mencionada, donde si bien hemos observado que la incidencia se ha duplicado en 4 años, el incremento de

plantas enfermas anual fue de alrededor del 3%, coincidente con el avance más lento de la raza D, mencionado por otros autores.

En las diferentes regiones del mundo se ha establecido una clara prevalencia del PPV-M en duraznos y damascos y del PPV-D en ciruelas (Šubr et al., 2015), lo que podría explicar por qué en Argentina se ha detectado mayoritariamente en ciruelos.

En nuestro estudio, se pudo observar, a través de los mapas bidimensionales interpolados (Golden Software, LLC), que la propagación del virus ocurre principalmente alrededor de los focos de infección, lo cual concuerda con otros estudios que han demostrado la transmisión por áfidos a corta distancia. Estos estudios han revelado que el 80%, o más, de los nuevos árboles enfermos se encuentran dentro de los 12 metros de un árbol previamente detectado y a medida que la distancia aumenta a más de 10 metros de un árbol infectado, el riesgo de infección disminuye en un 43% (Dallot et al., 2004; Labonne y Dallot, 2006). Comparando estos resultados con los obtenidos por Dal Zotto et al., 2020, en el cual se observó que el PPV se distribuyó en el lote como un patrón de puntos caracterizado por agrupamientos heterogéneos de árboles infectados, indicando una dispersión a corta distancia, se puede apreciar una consistencia en la evidencia de la propagación cercana del virus.

A partir de todos los resultados obtenidos, aunque el virus aún no ha traspasado la zona cuarentenaria, se estima que en algunos años podría lograrlo considerando su nivel actual de dispersión anual. Por lo tanto, la situación actual del virus en el foco cuarentenario del sur de Mendoza debe ser considerada como un potencial peligro para la producción frutícola de la provincia y de Argentina en general.

5 Eficiencia de transmisión por pulgones del aislado local de plum pox virus (PPV) entre frutales hospedantes en condiciones controladas

5.1 Introducción

La enfermedad del Sharka ocasionada por PPV se dispersa principalmente de dos maneras: larga distancia causada por la acción del hombre, en la cual el virus se introduce en un área o región por material de propagación infectado traído de zonas donde el virus está presente, y a corta distancia donde el número de árboles infectados en una finca está directamente relacionado, en una temporada dada, con la cantidad y la eficiencia de los pulgones alados que transmiten el PPV. Estos pulgones se alimentan de hojas o frutas infectadas y vuelan a otros árboles, donde vuelven a explorar y alimentarse (Barba et al., 2011). Esto último conduce a un patrón típico de dispersión a través de vectores aéreos que transmiten el virus de manera no persistente, el virus es adquirido y transmitido por los áfidos durante las picaduras de prueba rápidas en cuestión de segundos adheridas en células epidérmicas. La transmisión efectiva puede ser llevada a cabo por especies transitorias de pulgones que no necesariamente colonizan la planta huésped (Labonne et al. 1995; Lowery et al. 2009, 2015).

La eficiencia de transmisión depende de diversos factores, como la raza del virus, la especie y cultivar del hospedero, la edad de la planta, la época del año y las distintas poblaciones o biotipos de especies de áfidos que difieren genéticamente en su capacidad para transmitir PPV y otros potyvirus (Lupoli et al., 1992; Labonne et al., 1995; Levy et al., 2000a; Fereres and Racca, 2015). El factor clave que permite la transmisión eficiente del PPV por parte de los áfidos es una proteína llamada HC-Pro. Esta proteína, codificada por genes del propio virus, es una cisteína proteinasa no estructural que actúa como ayudante o coadyuvante en la transmisión del virus, al mismo tiempo que suprime el silenciamiento de ARN y facilita la infección de las células vegetales (García et al., 2014).

Los virus de plantas que son transmitidos por vectores suelen requerir la presencia de factores accesorios para completar su ciclo de infección, y el HC-Pro es uno de estos factores en el caso del PPV (Pirone y Blanc, 1996). Esta proteína actúa como un puente entre los receptores específicos presentes en la parte distal del aparato bucal de los áfidos y la proteína de la cápside viral. Las razas del PPV transmitidas por áfidos, tienen un motivo de aminoácidos altamente conservado (Asp-Ala-Gly) cerca del extremo N-terminal de su proteína de la cápside, conocido como el dominio de unión al HC-Pro (Blanc et al., 1997; López-Moya et al., 1999). La eliminación de este motivo se correlaciona con la pérdida de la capacidad de transmisión por áfidos (Maiss et al., 1989), y está ausente en las variantes del virus que no son transmitidas por estos insectos. La expresión transitoria del HC-Pro en plantas de *Nicotiana benthamiana* es suficiente para permitir la transmisión por áfidos de variantes defectuosas del PPV (Goytia et al., 2006).

Veintiocho especies diferentes de áfidos han sido identificadas como vectores de PPV, pero sólo 10 colonizan especies de *Prunus*. Por lo tanto, los áfidos involucrados en la propagación de PPV son de manera mayoritaria áfidos migrantes. Las principales fuentes de inóculo para los vectores son las hojas y frutos de árboles de frutas de carozo infectados. En España, *Aphis spiraecola* es la especie de áfido predominante (43,4%), seguida de *A. gossypii* (18,0%), *Hyalopterus pruni* (6,0%), *Brachycaudus prunicola* (6,0%), *A. craccivora* (3,0%), *Myzus persicae* (1,5%) y otras especies (22,1%) (Cambra et al., 2004). En las áreas del Egeo y Mediterráneo de Turquía, las especies predominantes de áfidos son *H. pruni* y *M. persicae* (Cağlayan et al., 2013; Kaya et al., 2014). En Canadá, *M. persicae* y *A. spiraecola* (Lowery et al., 2015) y, en Estados Unidos, *A. fabae*, *A. spiraecola*, *B. persicae* y *M. persicae* (Gildow et al., 2004). En la zona cuarentenaria de Mendoza la especie predominante en *Prunus* es *Myzus persicae* (Mazzitelli et al., 2023). Las especies de vectores más eficientes, identificadas internacionalmente, son *M. persicae*, *Phorodon humuli* y *Aphis spiraecola*, sin embargo, el número de visitantes puede compensar la baja eficiencia en la transmisión de PPV (Cambra y Vidal, 2016). Una sola prueba de

un *M. persicae* virulento es suficiente para inocular 26.750 moléculas de ARN de PPV en una plántula de duraznero "GF305", con un 20% de posibilidades de que la visita resulte en una infección sistémica (Moreno et al., 2009). Sólo una parte del número total de áfidos que hacen una prueba en hojas infectadas penetra en células que contienen viriones, lo que significa que no todos los individuos que hacen una prueba en un árbol infectado son virulentos. Capote et al. (2006) demostraron que una sola prueba de *M. persicae* en un ciruelo japonés "Black Diamond" infectado con PPV-D+M puede transmitir la raza D, M o ambas simultáneamente a otros ciruelos japoneses. En general los aislados típicos de PPV-D no son propagados eficazmente a duraznero, por los áfidos (Cambra et al., 2006c), aunque algunos aislados descritos de PPV-D pudieron propagarse sin dificultad a dicho hospedero (Dallot et al., 1998). Este comportamiento no se ha observado en Francia, Canadá y Estados Unidos, donde los aislados locales de PPV-D se propagan entre cultivares de durazno, pero significativamente menos que PPV-M (Dallot et al., 2004).

La eficiencia de la transmisión natural por pulgones y el patrón espacial de propagación de PPV pueden diferir para diferentes aislados y cultivares hospedantes. En América del Norte, se observó falta de movimiento de los vectores de áfidos portadores del PPV-D hacia árboles inmediatamente adyacentes y su movimiento preferencial hacia árboles ubicados a varias distancias de un árbol a otro (Gottwald, 2006) al igual que en sur de Europa (España) (Gottwald et al., 1995). Sin embargo, en Francia se ha evidenciado la propagación de PPV-M a corta distancia por parte de los pulgones mediante el análisis de la dispersión de la enfermedad en 20 huertos sometidos a medidas de control durante hasta 10 años (inspecciones visuales sistemáticas y eliminación de árboles sintomáticos): el 80% o más de los árboles enfermos nuevos se encontraban a menos de 12 m de los árboles previamente detectados y eliminados (Dallot et al., 2004). Además, se ha registrado la diseminación del PPV a distancias más largas, entre fincas, donde aproximadamente el 90% de los árboles enfermos estaban a menos de 200 m de los árboles previamente infectados y hasta distancias superiores a 600 m (Labonne y Dallot, 2006). En España, la propagación de PPV-M mostró un proceso de contagio compuesto por un rango largo de distancia (hasta 150 m) y corto alcance a infecciones de

árboles adyacentes (Capote et al., 2010). También se ha informado de infecciones que inicialmente presentan un patrón espacial completamente aleatorio y que con el tiempo alcanzan una distribución uniforme de PPV-M en el huerto (Varveri, 2006).

No existen estudios en Argentina sobre la eficiencia de transmisión de la enfermedad por la especie del vector predominante en Mendoza en las diferentes especies hospederas, pero cabe resaltar que hasta ahora las especies principalmente afectadas son ciruelos y damascos y no se han detectado durazneros infectados naturalmente por el virus (Marini com. pers.).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de transmisión del aislado local de PPV-D entre duraznero y ciruelo a través de *Myzus persicae*. A partir del objetivo de esta investigación se enunció la siguiente hipótesis de trabajo:

H1: La raza D de Sharka no se trasmite eficientemente a duraznero por pulgones en Mendoza.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Material vegetal

Plantas de duraznero 'GF 305' (*P. persica*) y portainjertos de ciruelo 'Mariana 2624' (*Prunus cerasifera* Ehrh x *P. munsoniana* W. Wight & Hedrick) fueron cultivados en macetas (Figura 5.1) en invernadero aislado, en condiciones controladas a partir de material libre de virus de carozos (GF 305) y estacas (Mariana) provenientes del Monte Fundacional de plantas certificadas existente en la EEA Junín, Mendoza. Este material fue inoculado con los áfidos cuando alcanzó un tamaño aproximado de 50 cm a los 4 meses de edad.



Figura 5.1. Plantas de duraznero utilizadas para la inoculación con pulgones.

5.2.2 Cría de pulgones

Los pulgones fueron recolectados en primavera, de una plantación de durazneros perteneciente a la Estación Experimental Junín. Las identificaciones preliminares para determinar la especie y confirmar que pertenecían a *Myzus persicae* fueron verificadas por M. E. Mazzitelli (Laboratorio de Entomología, EEA Junín, INTA). Colonias de *M. persicae* fueron criadas sobre plantas de papas libres de virus en una cámara de cría de ambiente controlado mantenida a 20°C, 60% de humedad relativa y con luz continua para inhibir el desarrollo de formas sexuales (Figura 5.2).



Figura 5.2. Cría de pulgones en plantas de papa libre de virus en cámara de cría.

5.2.3 Ensayo de transmisión por áfidos

El aislado local de PPV utilizado en el ensayo fue el proveniente de una planta de ciruelo D'ágen infectada naturalmente en una finca de la zona cuarentenaria del sur de Mendoza. Dicho material fue inoculado por injerto de escudete en plantas de GF 305 y ciruela Mariana libre de virus y mantenido en condiciones de aislamiento en un centro de seguridad en la EEA Junín INTA. Se confirmó por PCR, utilizando primers específicos para la raza D, que este material pertenecía a esta raza.

El ensayo, que se realizó por dos años consecutivos en enero 2020 y 2021, consistió en 4 tratamientos de 30 repeticiones cada uno. Los tratamientos fueron: 1-Transmisión mediante el pulgón *M. persicae* alimentándose desde hojas sintomáticas de duraznero PPV positivos a plantas en macetas de duraznero libre de virus, 2-Desde hojas sintomáticas de duraznero PPV positivos a plantas en macetas de ciruelo libre de virus, 3-Desde hojas sintomáticas de ciruelo PPV positivo y a duraznero libre de virus y 4-Desde hojas sintomáticas de ciruelo PPV positivo a ciruelo libre de virus. En cada tratamiento se dejaron 2 plantas como controles negativos, en las que se colocaron pulgones que no habían adquirido el virus. Para comparar los resultados de transmisión se empleó un análisis de la varianza (ANOVA) con un post-test de Tukey, analizando la variable "nro de plantas enfermas". En todos los casos se utilizó el programa informático INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2020).

Se cosecharon colonias de áfidos '*M. persicae*' de 3 semanas de edad criadas en cámara de cría. Los áfidos se recolectaron de las plantas de papa

agitándolas sobre papel blanco y luego se transfirieron a cajas de Petri, donde se les dio un período de inanición de 2 horas (Figura 5.3).



Figura 5.3. Pulgones en cajas de Petri, período de inanición.

Luego se transfirieron parte de los pulgones a un recipiente que contenía las hojas de duraznero GF-305 PPV + y a otro con hojas de ciruelo d'Agen PPV +. Se permitió que los áfidos se asentaran y comenzaran a alimentarse de las hojas durante 20 minutos (Figura 5.4). Luego de este periodo se tomaron muestras de 9 pulgones que se alimentaron en hojas de duraznero y 9 que se alimentaron en hojas de ciruelo, para luego ser analizados y comprobar si adquirieron el virus.



Figura 5.4. Pulgones adquiriendo el virus sobre hojas de ciruelo PPV+.

Finalmente se seleccionaron hojas utilizadas para la adquisición del virus de ciruelo d'Agen y de duraznero GF-305, con 50 pulgones sobre ellas y se colocaron sobre las plantas libres de virus de 4 meses de edad de duraznero (GF-305) y ciruelo (Mariana) ubicadas en cámara de condiciones controladas y cada tratamiento aislado con tela antiafidos (Figura 5.5). A los áfidos se les permitió moverse libremente desde las hojas infectadas a las plantas sanas

durante un período de acceso a la inoculación de 7 días. Al finalizar este periodo las plantas se rociaron con insecticida.



Figura 5.5. Izq. Hoja PPV+ con pulgones, colocada en planta de duraznero libre de virus para provocar la transmisión viral. Der. Pulgones moviéndose a las plantas receptoras sanas.

5.2.4 Análisis de plantas inoculadas

Luego de 60 días se recogieron muestras de brotes tiernos de todas las plantas inoculadas con pulgones. Estas muestras fueron analizadas por DAS-ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas de Doble Anticuerpo, Clark y Adams 1977) utilizando un coctel de antisueros policlonales y monoclonales anti-PPV (Bioreba, Reinach BL1, Suiza), según metodología detallada en Anexo 1. Las muestras para DAS-ELISA se consideraron positivas cuando el valor de absorbancia (A405 nm) fue mayor que la media más 3 desviaciones estándar de los controles negativos.

Las muestras que resultaron positivas o dudosas por DAS-ELISA fueron corroboradas por RT-PCR. Para el diagnóstico molecular se extrajeron ARN totales de 300 mg de brotes de las plantas, utilizando un procedimiento modificado de Hughes y Galau (1988) (Sara Spiegel, The Volcani Center, Israel, comunicación personal) (Anexo 2.1). Luego las muestras fueron analizadas por PCR convencional (Anexo 4.1.1), con el kit de QIAGEN OneStep™ RT-PCR (QIAGEN Inc., Valencia, CA). Se utilizaron cebadores universales para PPV P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') y P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG

CCA GA-3') (Wetzel et al., 1991). El ARN total extraído de plantas positivas de ciruelo europeo cv 'd'Agen' ubicado en el sur de Mendoza, se utilizó como control positivo y el ARN total extraído del 'GF305' libre de virus como control negativo. Las amplificaciones de RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (según anexo 6.1.2), se tiñeron con Gel Red® y se visualizaron mediante un transiluminador UV.

5.2.5 *Análisis de pulgones después del período de adquisición del virus*

Se utilizó el método de Print Capture PCR (PC-PCR) que evita la preparación de extractos y la liberación de inhibidores, así como posibles problemas de contaminación, seguido por inmunocaptura RT-PCR (IC-RT-PCR) (Olmos et al., 1996). La preparación de las impresiones consiste en aplastar, con la base de un tubo Eppendorf, individualmente pulgones en pequeños cuadraditos (0,5cm x 0,5cm) de papel Whatman 3MM. Luego las impresiones de tejido se introdujeron individualmente en un tubo Eppendorf de 200 µl (Figura 5.6) y se añadieron 120 µl de Tritón X-100 al 0.5%, se agitaron y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se recuperaron los extractos de Tritón (100 µl) y se transfirieron a tubos de 200 µl previamente tapizados con coctel de antisueros policlonales y monoclonales anti-PPV (Bioreba, Reinach BL1, Suiza), para luego seguir los pasos de la IC-RT-PCR según metodología detallada en Anexo 4.1.3, utilizando los kits QIAGEN OneStep™ RT-PCR (QIAGEN Inc., Valencia, CA) y cebadores universales para PPV P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') y P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3') (Wetzel et al., 1991). Para este análisis se utilizaron 9 pulgones que fueron colocados en hojas de ciruelo PPV positivo, 9 pulgones que fueron colocados en hojas de duraznero PPV positivo, ARN extraído de plantas positivas de ciruelo europeo cv 'd'Agen' ubicado en el sur de Mendoza, se utilizó como control positivo, como control negativo se utilizó un cuadrado de papel que contenía un mix de los pulgones que no adquirieron el virus y se alimentaron en plantas sanas. Las amplificaciones de RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (según 6.1.2), se tiñeron con Gel Red® y se visualizaron mediante un transiluminador UV.



Figura 5.6. Tubos Eppendorf de 200 μ l con cuadrado de papel Whatman 3MM donde se realizó la impresión de tejidos (pulgón individual).

5.3 Resultados

A partir de los 30 días de realizadas las transmisiones se empezaron a observar síntomas compatibles con Sharka en brotes tiernos en algunas de las plantas del duraznero GF-305 (Figura 5.7) inoculadas con los pulgones, no se observaron sintomatologías sospechosas en las plantas de ciruelo Mariana a lo largo de todo el ensayo ni tampoco en los controles negativos.



Figura 5.7. Sintomatología compatible con Sharka observada en plantas de duraznero inoculadas con pulgones alimentados sobre hojas de durazneros PPV+.

En el año 1 del ensayo, de las 30 plantas inoculadas, sólo una planta del duraznero GF 305 y una planta del ciruelo Mariana, resultaron positivas para PPV por DAS-ELISA. Ambas plantas fueron inoculadas con 50 pulgones que previamente se habían alimentado de hojas PPV+ de duraznero (Tabla 5.1). Los

resultados positivos obtenidos por DAS-ELISA presentaron valores de absorbancia 0,825/0,836 a 405 nm, luego de 60 minutos de reacción, mientras que el valor de los controles negativos fue de 0,084 en promedio. En el año 2 del ensayo, de las 30 plantas inoculadas, sólo dos plantas del duraznero GF 305 fueron positivas por DAS-ELISA (abs. 0,624/0,732). Dichas plantas fueron inoculadas con 50 pulgones alimentados sobre hojas de PPV+ de duraznero (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Plantas de duraznero y ciruelo infectadas con el aislado local de PPV-D de San Rafael, Mendoza a través de pulgones (50/planta) que previamente se alimentaron por 20 min de hojas PPV+.

Huésped donante	Huésped receptor	N° de plantas infectadas/ N° inoculadas (Año 1)	Porcentaje (%) de infección con PPV (Año 1)	N° de plantas infectadas/ N° inoculadas (Año 2)	Porcentaje (%) de infección con PPV (Año 2)
Duraznero	Duraznero	1/30	3,3	2/30	6,6
Duraznero	Ciruelo	1/30	3,3	0/30	0
Ciruelo	Duraznero	0/30	0	0/30	0
Ciruelo	Ciruelo	0/30	0	0/30	0

Los resultados se confirmaron molecularmente por RT-PCR, donde se amplificó un fragmento de 243 pb correspondiente al PPV (Figura 5.8). No se observaron bandas de ADN en controles sanos. Todos los controles sanos, plantas inoculadas con pulgones alimentados de hojas sanas, fueron negativos por DAS-ELISA y RT-PCR.

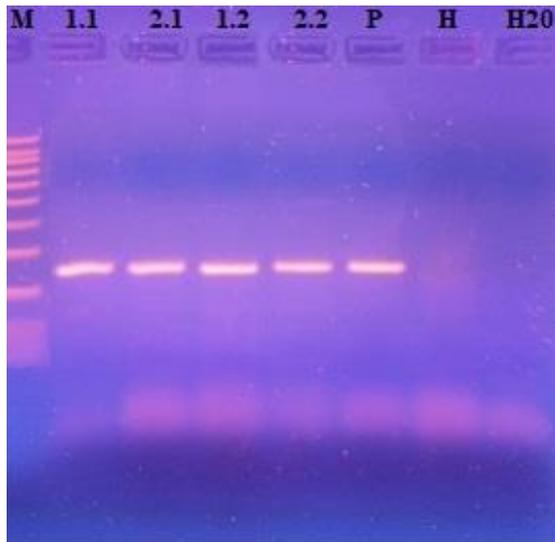


Figura 5.8. Amplificación por PCR en un solo paso de la banda de 243 pb obtenida con cebadores P1 y P2 (Wetzel 1990). M = GeneRuler 1-kb ADN ladder (Invitrogen); H = control sano; P= control positivo PPV; H2O= control mix PCR; las muestras 1.1 y 2.1 corresponden a las positivas del año 1 y las 1.2 y 2.2 a las positivas del año 2. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red.

La eficiencia de transmisión viral de *M. persicae* de duraznero a duraznero fue de 3.3 % (1 de 30 plantas) y 6,6 % para el primer y segundo año respectivamente. Y desde duraznero a ciruelo, 3.3 % y 0% (Tabla 5.1). No hubo transmisión desde ciruelo a ninguna de las dos especies utilizadas como receptoras.

Mediante un análisis ANOVA y test de Tukey de la variable “nro de plantas enfermas”, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los donantes (duraznero y ciruelo) utilizados para la transmisión (Tabla 5.2; Tabla 5.3). El análisis cumplió con los supuestos de normalidad, homocedasticidad, independencia y de normalidad.

Tabla 5.2. Análisis de la Varianza de la eficiencia de transmisión por pulgones entre especies donantes y receptoras.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,00	3	1,00	4,00	0,1069
donante	2,00	1	2,00	8,00	0,0474
receptor	0,50	1	0,50	2,00	0,2302
donante*receptor	0,50	1	0,50	2,00	0,2302
Error	1,00	4	0,25		
Total	4,00	7			

Tabla 5.3. Test de Tukey, las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,98163
 Error: 0,2500 gl: 4

donante	Medias	n	E.E.	
ciruela	0,00	4	0,25	A
durazno	1,00	4	0,25	B

Se observó la transmisión del virus PPV-D en dos de las cuatro combinaciones de transmisión, es decir, de duraznero a duraznero y de duraznero a ciruelo (Tabla 5.1), lo que significa que *M. persicae* tuvo una baja eficiencia de transmisión del aislado mendocino de PPV-D desde duraznero y no se constataron transmisiones desde ciruelo.

Las muestras de pulgones alimentados sobre hojas de plantas PPV+ analizadas mediante la técnica de Print PCR con inmunocaptura, arrojaron como resultado que aquellos pulgones que se alimentaron sobre hojas de ciruelo PPV positivos no adquirieron el virus y los que se alimentaron de hojas de duraznero GF-305 PPV positivos solo 3 de 9 adquirieron el virus (33,3 %) (Figura 5.9).

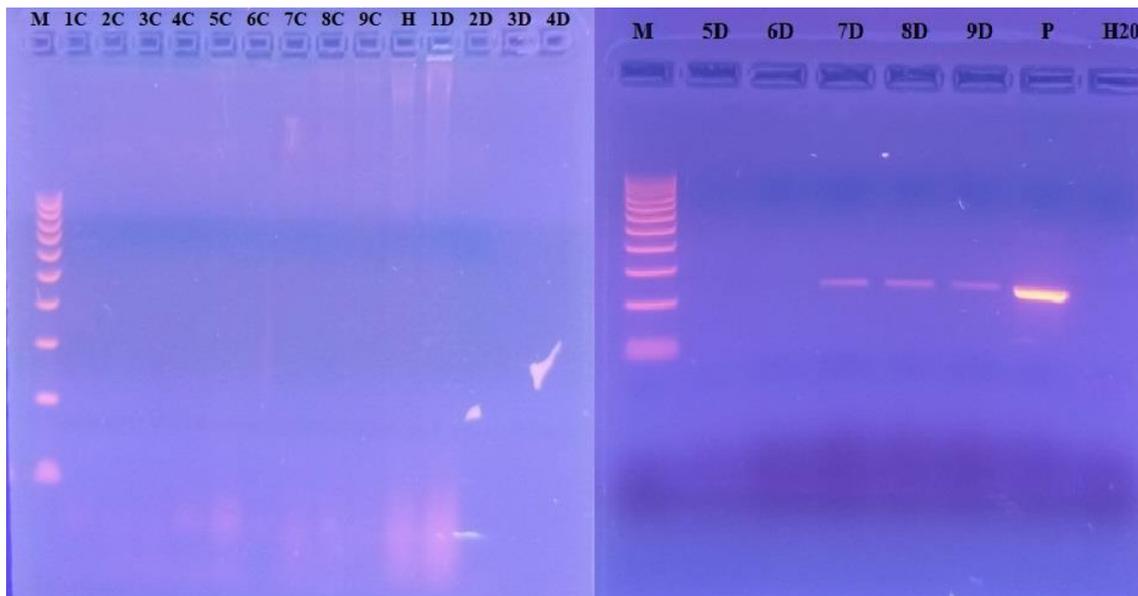


Figura 5.9. Amplificación por PCR en un solo paso de la banda de 243 pb obtenida con cebadores P1 y P2 (Wetzel 1990). M = GeneRuler 1-kb ADN ladder (Invitrogen); H = control sano; P = control positivo PPV; H₂O = control mix PCR; las muestras 1c a 9c corresponden a pulgones que se alimentaron con hojas de ciruela, las muestras 1d a 9d corresponden a pulgones que se alimentaron con hojas de duraznero GF-305. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red.

5.4 Discusión

La especie de áfido que más contribuye a la propagación de PPV dentro de una región geográfica se determina en gran medida por su eficiencia de transmisión y abundancia estacional (Gildow et al., 2004, Wallis et al., 2005). En estudios poblacionales de pulgones realizados en la zona cuarentenaria para Sharka de Mendoza, la especie predominante encontrada, capaz de transmitir PPV, fue *Myzus Persicae* (Mazzitelli et al., 2023; en prensa). Esto resulta de mucha relevancia ya que *M. persicae* es reconocido mundialmente por ser el vector más eficiente de PPV (Cambra y Vidal 2016; Moreno et al., 2009).

En este estudio, se observó que *M. persicae* no pudo adquirir el virus a partir de hojas de ciruelo infectadas con PPV. Esto podría deberse a una baja presencia de células con partículas virales en las hojas utilizadas en el experimento, a una baja concentración viral en el tejido, o bien podría deberse a que la muestra de nueve pulgones utilizada es baja para establecer el porcentaje de transmisión desde ciruelo, como hospedero del PPV. Es importante tener en cuenta que solo una fracción de los pulgones que se alimentan de hojas infectadas tienen acceso a células que contienen partículas virales (Cambra y

Vidal, 2016), lo que podría explicar por qué ninguno de los pulgones utilizados pudo adquirir el virus en este caso. Sin embargo, se demostró que los pulgones sí fueron capaces de adquirir el virus a partir de hojas de duraznero GF-305 infectado, ya que el 33,3% de los pulgones analizados dio resultado positivo para PPV. Este resultado se asemeja a los hallazgos de otros estudios similares, donde se observó que el 22-25% de los *Myzus* analizados adquirieron el virus después de alimentarse de hojas de plantas enfermas (Cambra y Vidal, 2016; Olmos et al., 2005). Estos resultados concuerdan con algunos ensayos experimentales de transmisión por pulgones, los cuales demostraron que un aislado de PPV se transmitía de manera más eficiente a otros cultivares de duraznero a partir de plántulas de GF305 en comparación con árboles jóvenes de otras variedades de *Prunus persica* (Capote et al., 2010). La capacidad de transmisión del PPV-D varía según la especie de áfido y la especie de *Prunus* (Levy et al., 2000a; Labonne et al., 1995; Lupoli et al., 1992).

En este estudio, se pudo constatar la transmisión del virus desde duraznero a duraznero y desde duraznero a ciruelo. Es importante destacar que, aunque *M. persicae* fue capaz de transmitir el virus, lo hizo con una baja eficiencia de transmisión del 3,3% al 6,6%, lo cual permite aceptar la hipótesis 1 planteada en este capítulo. Estos resultados concuerdan con estudios previos que indican que, en general, los aislados típicos del PPV-D no se propagan eficientemente por los áfidos en durazneros. Cambra et al. (2006c) y Labonne et al. (1995) no obtuvieron transmisión por *M. persicae* desde hojas de GF-305 PPV positivo a plántulas de GF-305 sanas utilizando 20 pulgones, pero si obtuvieron transmisión utilizando 200 pulgones por hoja. En otros estudios, como el de Moreno et al. (2009), la eficiencia de transmisión fue más alta, del 16,6% al 36%, pero en esos casos se descartaron los pulgones que no pudieron realizar una punción en la hoja en 5 minutos, lo que probablemente aumentó la efectividad de transmisión.

Este estudio representa la primera evaluación de la capacidad de transmisión de *M. persicae* del aislado de Sharka (PPV-D) presente en la zona cuarentenaria del oasis sur de Mendoza. Los resultados sugieren que el aislado D de Mendoza podría tener similitudes con los aislados D europeos, los cuales

tienen una capacidad limitada para infectar durazneros (Labonne et al., 1955; Moreno et al., 2007; Glasa et al., 2004; Teshale, 2014). Sin embargo, es necesario realizar análisis adicionales, utilizando diferentes cultivares de duraznero y ciruelo, seleccionando los más cultivados e importantes en la provincia y así obtener una mejor evaluación de la eficiencia de transmisión de este pulgón y su comportamiento dentro del área estudiada.

6 Hospedantes alternativos del plum pox virus en áreas cuarentenarias²

6.1 Introducción

El PPV se ha detectado en numerosas especies leñosas ornamentales del género *Prunus* y también en especies silvestres como el endrino (*Prunus spinosa*) (Damsteegt et al., 2007; James y Thompson, 2006). La mayoría de las infecciones han sido obtenidas al inocular en forma artificial, las nuevas razas del virus detectadas en una gama, cada vez mayor, de posibles hospedantes (Tabla 6.1) (James y Thompson, 2006).

Tabla 6.1. Hospedantes alternativos del PPV pertenecientes al género *Prunus* (James y Thompson, 2006).

Especies de <i>Prunus</i> o híbridos	Status del hospedante
<i>P. americana</i>	Experimental
<i>P. besseyi</i>	Experimental
<i>P. x blireana</i>	Natural
<i>P. brigantina</i>	Experimental
<i>P. cerasifera</i>	Natural
<i>P. x cistena</i>	Experimental
<i>P. cocomilia</i>	Experimental
<i>P. curdica</i>	Experimental
<i>P. davidiana</i>	Experimental
<i>P. glandulosa</i>	Natural
<i>P. holosericea</i>	Experimental
<i>P. hortulana</i>	Experimental
<i>P. insititia</i>	Natural
<i>P. japonica</i>	Natural
<i>P. laurocerasus</i>	Experimental
<i>P. mahaleb</i>	Experimental
<i>P. mandshurica</i>	Experimental

² El contenido de este capítulo fue publicado en Piglionico, D., Ojeda, M. E., Lucero, V., Farrando, R., Porcel, L., Picca, C., & Marini, D. (2021). *Spiraea* sp. new natural host of Plum pox virus (Sharka). *European Journal of Plant Pathology*, 159(4), 959–962. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02206-x>

Especies de <i>Prunus</i> o híbridos	Status del hospedante
<i>P. 'Marianna'</i>	Experimental
<i>P. maritima</i>	Experimental
<i>P. mexicana</i>	Experimental
<i>P. microcarpa</i>	Experimental
<i>P. mume</i>	Experimental
<i>P. munsoniana</i>	Experimental
<i>P. nigra</i>	Experimental
<i>P. persica f. atropurpurea</i>	Natural
<i>P. pumila</i>	Experimental
<i>P. salicina</i>	Natural
<i>P. serotina</i>	Natural
<i>P. sibirica</i>	Experimental
<i>P. simonii</i>	Experimental
<i>P. spinosa</i>	Natural
<i>P. tomentosa</i>	Experimental
<i>P. triloba</i>	Experimental

Numerosas plantas herbáceas se citan como hospederas de PPV, aunque pocas han sido estudiadas como reservorios naturales y fuentes potenciales de infección en fincas comerciales. (EPPO 2022; Polak, 2001; Milusheva y Rankova, 2002; Sebestyen et al., 2008). Se sabe muy poco sobre el papel de las malezas y las especies ornamentales como fuente de inóculo para el virus Sharka, aunque las plantas herbáceas se consideran una fuente continua de infección para las especies frutales (Isaac et al., 1998).

El género *Spiraea* pertenece a la misma familia que los *Prunus*, familia *Rosaceae*, y posee alrededor de 80 a 100 especies de arbustos ornamentales. Son nativos del hemisferio norte templado, con la mayor diversidad en el este de Asia. Muchas especies de *Spiraea* se utilizan como plantas ornamentales en climas templados de todo el mundo, particularmente por sus vistosos racimos de flores densas (Figura 6.1).

La corona de novia (*Spiraea* sp.) es un arbusto caducifolio o semiperennifolio utilizado en nuestro país como planta de cerco o como planta ornamental por sus características llamativas. Crece hasta 1,5 m de altura con racimos de flores blancas que nacen a lo largo de ramas arqueadas que florecen en primavera (Lingdi y Alexander, 2003).



Figura 6.1. Planta ornamental “Corona de novia”.

No existen reportes a nivel mundial de infecciones naturales con plum pox virus en especies ornamentales que no pertenezcan al género *Prunus* (EPPO 2022).

El objetivo de este capítulo fue establecer la presencia del virus del Sharka y su caracterización, en la planta ornamental “Corona de Novia” (*Spiraea sp.*). A partir del objetivo de esta investigación se enunció la siguiente hipótesis de trabajo:

H1: El virus del Sharka se encuentra presente en hospedantes alternativos en Mendoza.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Ensayos biológicos, serológicos y moleculares

Durante la primavera de 2018, se observaron hojas con manchas anilladas amarillas o verde claras y clorosis internerval en una planta de *Spiraea sp.* (Figura 6.2) ubicada en el patio de una casa, dentro del área cuarentenaria para PPV en San Rafael, Mendoza. Se recogieron muestras de hojas

sintomáticas de esta planta, las cuales fueron analizadas por la técnica de DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) utilizando un coctel de antisueros policlonales y monoclonales anti-PPV (Bioreba, Reinach BL1, Suiza), según metodología detallada en Anexo 1. Las muestras de DAS-ELISA se consideraron positivas cuando el valor de absorbancia (A405 nm) fue mayor que la media más 3 desviaciones estándar de los controles negativos.



Figura 6.2. Síntomas asociados con infección de virus del Sharka en hojas de *Spiraea* sp. Foto de M.E. Ojeda, INTA, Argentina.

Diez plantas de duraznero “GF 305”, cultivadas en macetas en invernadero a partir de carozos originados de plantas libres de virus, se utilizaron como plantas indicadoras y se inocularon mediante injerto de escudete. Seis de estas plántulas fueron inoculadas con corteza de ramas sintomáticas de *Spiraea*, otras dos plantas se utilizaron como controles negativos no inoculados y las dos restantes se inocularon con corteza obtenida de árboles de ciruelo d’Agen infectados con PPV (controles positivos). Las plantas se mantuvieron en un invernadero aislado a prueba de pulgones, con condiciones ambientales controladas (Desvignes et al., 1999). Dos meses después de la inoculación, se compararon los síntomas entre las plantas inoculadas con *Spiraea*, los controles positivos y negativos. Las hojas sintomáticas de 'GF 305' fueron testeadas mediante DAS-ELISA utilizando un coctel de antisueros policlonales y monoclonales anti-PPV (Bioreba, Reinach BL1, Suiza) (Anexo 1).

Para el diagnóstico molecular se extrajo ARN total a partir de 300 mg de brotes sintomáticos de *Spiraea* y de GF 305 respectivamente, utilizando un

procedimiento modificado de Hughes y Galau (1988) (Sara Spiegel, The Volcani Center, Israel, comunicación personal) (Anexo 2.1). La cantidad y la calidad del ARN fue evaluada mediante fluorometría (anexo 3.1) y electroforesis en gel de agarosa respectivamente (anexo 6.1). Luego las muestras fueron analizadas por PCR convencional (anexo 4.1.1) y en tiempo real (anexo 4.1.2), con los kits QIAGEN OneStep™ RT-PCR y SYBR Green One-Step™ RT-PCR (QIAGEN Inc., Valencia, CA), respectivamente. Se utilizaron cebadores universales para PPV P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') y P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3') (Wetzel et al., 1991). El ARN total extraído de plantas positivas para PPV de ciruelo europeo cv 'd'Agen', ubicado en el sur de Mendoza, se utilizó como control positivo y el ARN total extraído del 'GF305' libre de virus como control negativo.

Las amplificaciones de RT-PCR convencional se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (anexo 6.2.1), se tiñeron con Gel Red® y se visualizaron mediante un transiluminador UV. Los fragmentos de ADN de 243 pb amplificados a partir de dos muestras de *Spiraea* sintomática y dos de "GF 305" inoculado fueron extraídos del gel de agarosa y purificados utilizando AccuPrep® Gel Purification Kit (Bioneer Corporation, Daejeon, Corea). Estos fragmentos se secuenciaron en ambas direcciones utilizando un secuenciador de ADN automatizado (Unidad Genómica, Instituto de Biotecnología-INTA; Argentina). El montaje se llevó a cabo con el paquete del programa BioEdit (Hall, 1999) y las secuencias del consenso se depositaron en GenBank con número de acceso MN587037 (NCBI). Las secuencias se analizaron con el programa BLAST (Altschul et al., 1990) y se compararon con las secuencias disponibles de Gen Bank.

Para conocer a que raza de PPV pertenecían los aislados obtenidos de *Spiraea* y "GF-305" inoculados con esta planta ornamental, se realizó una RT-PCR en tiempo real utilizaron cebadores P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') y PD (5'- CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3') y el kit QIAGEN SYBR One-Step, siguiendo un protocolo modificado de Olmos et al., 1997 (anexo 4.1.2). Además, para un resultado más preciso y confiable, se utilizaron otro juego de cebadores específicos para el serotipo D, que se unen a otra región del

genoma. Estos fueron los cebadores P3D (5'ACATTGCGGAGACAGCACTG3') y P4b (5'TGCCTTCAAACGTGGCACTG 3') que están diseñados para permitir la amplificación de una región que comprende el final del gen b de inclusión nuclear y la porción N-terminal hipervariable del gen de la proteína de la cápside de los aislados de PPV-D. La RT-PCR se realizó utilizando QUIAGEN One Step Kit, siguiendo un protocolo modificado (Candresse et al., 1998) (anexo 4.1.1). Los productos esperados utilizando este juego de cebadores es de 467 pb.

6.3 Resultados

6.3.1 Test biológico

Dos meses después de la inoculación mediante injerto, síntomas similares a los causados por PPV aparecieron en ocho de las diez plantas inoculadas (6 plantas inoculadas con *Spiraea* y 2 controles positivos) ya sea mediante el uso de yemas como de corteza de “corona de novia sintomática” como así también el injerto con el control positivo. Las plantas mostraron manchas cloróticas anilladas, mosaico, hojas distorsionadas o retorcidas y aclaramiento de nervaduras (Figura 6.3). Ninguno de los controles sanos de GF 305 mostró síntomas.



Figura 6.3. Síntomas asociados al Sharka en plantas indicadoras 'GF 305' inoculadas con yemas de plantas sintomáticas de *Spiraea*. Foto de Diana Marini, INTA, Argentina.

6.3.2 Pruebas serológicas

Las muestras de hojas de *Spiraea* sintomáticas resultaron PPV positivas por ELISA. Los valores de absorbancia a 405 nm y 1 h de reacción fueron de

0,508/0,532 y 0,082 para las hojas sintomáticas de *Spiraea* y para los controles negativos, respectivamente. Las plantas sintomáticas de GF 305 inoculadas con *Spiraea* y los controles positivos arrojaron resultados positivos por DAS-ELISA con ODs medios de 1.744/1.874, mientras que los controles sanos mostraron reacciones negativas con OD 0.013.

6.3.3 Pruebas moleculares

6.3.3.1 RT-PCR convencional para el diagnóstico

Todos los extractos de ARN vegetal de las plantas sintomáticas de *Spiraea* y los clones inoculados de GF-305 y controles positivos, amplificaron mediante RT-PCR convencional un fragmento de tamaño esperado de 243 pb. No se observaron bandas de ADN en controles sanos (Figura 6.4).

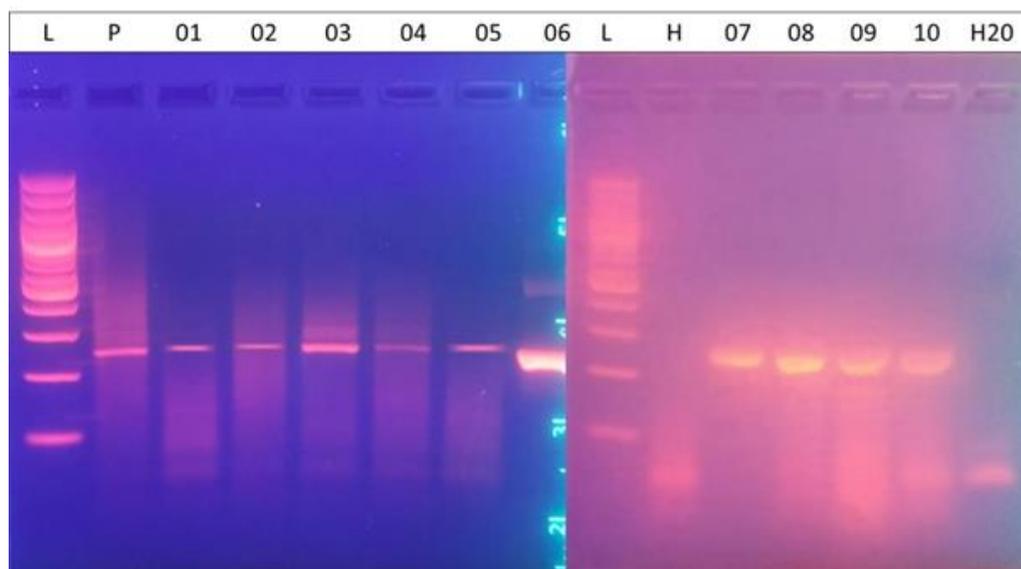


Figura 6.4. Amplificación por PCR en un solo paso de la banda de 243 pb obtenida con cebadores P1 y P2 (Wetzel 1990). L = GeneRuler 100 pb ADN Ladder 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 y 1500 pb (Invitrogen); H = control sano; P= control positivo PPV; H2O= control mix PCR; los carriles 01 a 06 son para las muestras de *Spiraea* y 07 a 10 son para inoculado-GF305. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red.

6.3.3.2 Tipificación molecular de los aislados de PPV mediante dos pares de cebadores diferentes

La reacción de PCR en tiempo real utilizando cebadores P1 y PD fue positiva para las muestras de ARN provenientes de la *Spiraea* sintomática y GF-305 inoculados (Ct menores a 22), y negativa para el control sano de GF-305 (Ct 40,82) (Figura 6.5). Según la bibliografía, se sugiere un valor de CT de 36 como

umbral para la detección de PPV mediante PCR en tiempo real, es decir, las muestras que arrojaban un CT aproximadamente igual o menor a 36 se consideraron positivas, los valores de CT entre 36 y 40 se consideraron sospechosos, y las señales con un CT mayor o igual a 40 se consideraron negativas (Kim et al., 2008).

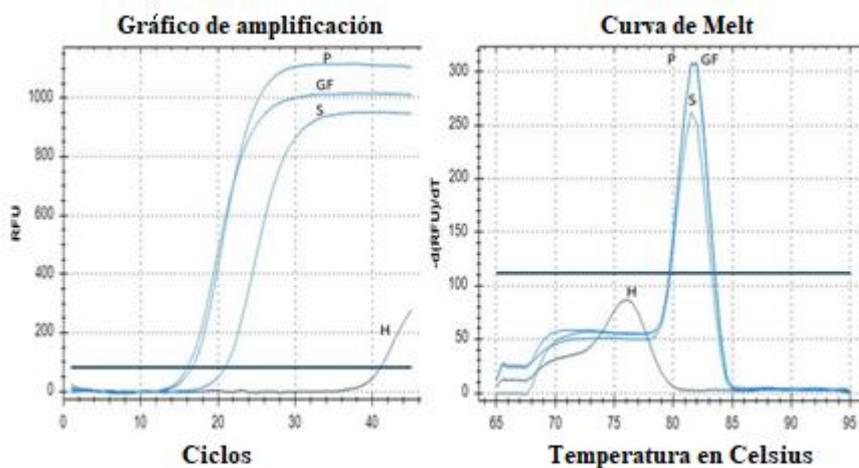


Figura 6.5. Detección del virus PPV-D mediante RT-PCR en tiempo real con SYBR Green y con cebadores P1 y PD. H = control sano (plántulas de GF-305 sanas); P= control positivo; GF= GF-305 inoculado; S= *Spiraea* sintomática.

Las reacciones de RT-PCR convencional con cebadores P3D y P4b sobre *Spiraea* sintomática, también dieron positivas, amplificando un fragmento de 467 pb como se esperaba (Figura 6.6) y demostrando que se trata de la variante D del PPV).

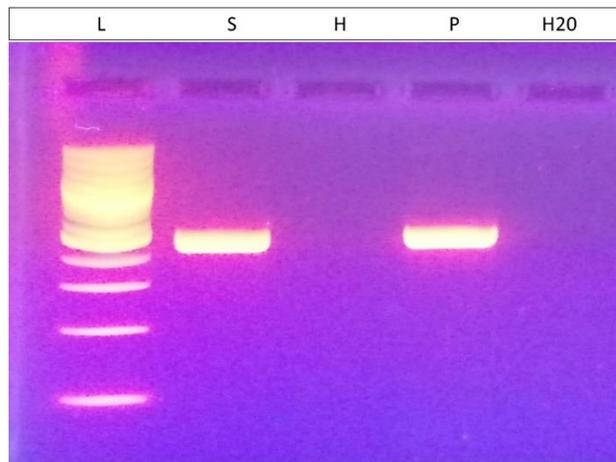


Figura 6.6. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de PPV con cebadores P3D y P4b (Candresse et al., 1998). Producto de amplificación por PCR: banda de 467pb. L = GeneRuler 1-kb DNA Ladder (Invitrogen); S= *Spiraea* sintomática; H = control sano; P= control positivo; H2O= control mix PCR.

6.3.3.3 Secuenciación

Las bandas de 243 pb obtenidas por RT-PCR con cebadores universales P1-P2 de dos muestras sintomáticas de *Spiraea* y dos GF 305 sintomáticas se secuenciaron directamente en ambas direcciones. La secuencia de consenso se depositó en GenBank con el número de acceso MN587037 (Figura 6.7). El análisis por Blast mostró la mayor similitud (100%) con la región carboxi-terminal de la cepa D de las proteínas de la cápside de PPV en todo el mundo.

```

1 gactacagcc tcgccagata tgcctttgat ttttacgaaa tgacttcaac gacacccgta
61 cgggcacgtg aagctcatat ccagatgaag gcagcagcat tgagaaatgt tcaaaatcgt
121 ttatttggct tggatggaaa cgtcgggaaca caagaagagg acacagagag acacaccgct
181 ggtgatgtta atcgcaacat gcacaacctc ctcggtgtga ggggagtgtg gtgggtctc

```

Figura 6.7. Secuencia de consenso obtenida (238 pb) y depositada en GenBank.

6.4 Discusión

Se confirmó la infección natural con el virus del Sharka en una planta ornamental leñosa del género *Spiraea* en el área cuarentenaria del sur de la provincia de Mendoza, mediante una combinación de tres métodos de detección: indexación biológica en GF-305 (Desvignes et al., 1999), prueba serológica DAS-ELISA (Clark y Adams 1977) y dos métodos moleculares (PCR convencional y en tiempo real) (Wetzel et al., 1991). La identificación específica de la cepa por RT-PCR en tiempo real confirmó que el aislado en plantas sintomáticas de *Spiraea sp* y GF 305 pertenece a la raza PPV-D, única raza detectada hasta el

presente en América, como también lo demostraron los resultados obtenidos mediante RT-PCR con los primers P3D y P4b. El extremo 3' del gen de la proteína de la cubierta viral fue secuenciado y mostró un grado de homología de nucleótidos del 100% con la raza PPV D. Después de cumplir con los requisitos para un diagnóstico positivo en un nuevo huésped (Boletín OEPP/EPPO 2004), los resultados obtenidos fueron comunicados al SENASA (nº 14134) y se publicaron en la revista *European Journal of Plant Pathology* (<https://doi.org/10.1007/s10658-021-02206-x>), con estos resultados se pudo aceptar la hipótesis 1 planteada en este capítulo. Este hallazgo permite confirmar que el virus puede infectar naturalmente otros géneros de especies leñosas, emparentados con el género *Prunus* y que la presencia de PPV en esta planta ornamental de la familia *Rosácea* y al género *Spiraea* podría ser una amenaza para la producción de frutales de carozo, no solo de Argentina sino también de otras partes del mundo.

7 Estudios epidemiológicos y caracterización de fitoplasmas en la zona núcleo de producción de durazno para industria en Mendoza

7.1 Introducción

Numerosos trabajos muestran una notable diversidad de fitoplasmas en América del Sur, muchos de ellos con características únicas, lo que ha permitido proponer nuevos subgrupos y especies *Candidatus* (Perez-Lopez et al., 2016; Fernández et al., 2020a; 2020b; Conci et al., 2020). En Argentina se han identificado fitoplasmas de 5 grupos 16Sr diferentes (I, III, VII, X y XIII) y numerosos subgrupos, algunos iguales o similares a los reportados en otras áreas del mundo y numerosos subgrupos exclusivos del cono sur americano. Entre las más de 30 especies de plantas hospederas se destacan cultivos de importancia económica regional y nacional, como los frutales de carozo y pepita (Fernández et al., 2020a).

En durazneros se han detectado fitoplasmas en diferentes regiones ecológicas y de producción. En el área de valles templados de la provincia de Jujuy en la zona de producción de duraznero primicia, desde hace algunos años se presentan severos síntomas de acortamiento de entrenudos, amarillamiento y disminución de tamaño foliar, muerte de ramas y finalmente de la planta, en lotes de producción de durazno para consumo (Curzel et al., 2021). Análisis moleculares de plantas sintomáticas ubicadas en los valles templados de Jujuy, permitieron asociar esta sintomatología con la presencia de un fitoplasma perteneciente al grupo 16SrIII-B (grupo X-disease), nunca citado en esta especie en el país. Este grupo de fitoplasmas es el más frecuentemente identificado en Argentina afectando numerosas especies de importancia económica (Fernández et al, 2013; 2017b). En el año 2019, en la misma región productora de Jujuy, se observaron algunas plantas con síntomas de acortamiento de entrenudos y disminución del tamaño foliar en ciruelos (*Prunus salicina*) identificándose la presencia de dos fitoplasmas diferentes el 16SrIII-B y el 16SrXIII-L (*mexican periwinkle virescens*) (Bongiorno et al., 2020)

En la provincia de Mendoza, se ha detectado un fitoplasma del grupo 16SrX-C (*Ca. Phytoplasma pyri*) asociado a plantas de durazno, causante del Enrollamiento de la Hoja Amarilla del Durazno (PYLR) (Fernández et al., 2017a). Estas plantas presentaban síntomas como hojas cloróticas, enrollamiento y engrosamiento del nervio central, así como secado de ramas, síntomas que se asemejan a los descritos para esta enfermedad (Figura 7.1). Además, son similares al descrito en Chile infectando peral (Rosany et al., 2016) y también en otras regiones del planeta. Los síntomas presentados por este fitoplasma son muy diferentes al que se detectó en durazneros de los Valles Templados de Jujuy (Fernández et al, 2013). Este patógeno es considerado cuarentenario para este cultivo en varios países y representa pérdidas en la producción, así como fuertes limitaciones en la comercialización. Mendoza posee 5.439 ha implantadas con durazno para industria (Tabla 7.1) (IDR, 2021), por lo que la presencia de este patógeno podría causar grandes pérdidas económicas para la provincia. Durante el año 2019, el mismo fitoplasma (*Ca. Phytoplasma pyri*), fue detectado en establecimientos comerciales de pera (*Pyrus communis*) de Alto Valle y Valle Medio en la provincia de Río Negro (Fernández et al., 2019).

Tabla 7.1. Superficie implantada con durazneros de industria por oasis en la provincia de Mendoza, 2021.

Oasis	Superficie en ha
Norte	249,30
Este	370,10
Valle de Uco	3078
Sur	1741,70
TOTAL	5439



Figura 7.1. Síntomas en duraznero. Hojas de duraznero cv Bowen. Hoja de la izquierda corresponde a planta sana, demás hojas a planta infectada con el fitoplasma *Ca. Phytoplasma pyri*.

Hasta el momento, no se ha establecido con certeza la incidencia real de esta enfermedad, los vectores implicados en su transmisión, ni se ha evaluado su evolución, diversidad y el daño que causa. El presente estudio tiene como objetivo establecer la presencia del fitoplasma *Ca. Phytoplasma pyri* en la zona núcleo de producción de duraznero para industria, en la provincia de Mendoza. Para tal fin se llevó a cabo un relevamiento exhaustivo del patógeno en una superficie representativa de la zona de estudio. Se consideró importante relevar con detalle los síntomas que aparecían en los lotes con la finalidad de contrastar luego en el laboratorio la presencia del patógeno y desarrollar así un conocimiento profundo de la sintomatología que describe a la enfermedad a campo. Se utilizaron métodos de reconocimiento visual de síntomas para identificar y mapear las áreas afectadas. Posteriormente, se realizaron análisis moleculares utilizando diversas técnicas de detección e identificación para confirmar la presencia del fitoplasma *Ca. Phytoplasma pyri* en las muestras recolectadas.

Estos enfoques moleculares permitirán no solo confirmar la presencia del fitoplasma, sino también servirían para estudios posteriores en los que se podría estudiar su diversidad genética y evaluar posibles variantes que puedan estar presentes en la zona de estudio, y el estudio de los potenciales vectores

involucrados en la transmisión de la enfermedad. A partir del objetivo de esta investigación se enunció la siguiente hipótesis de trabajo:

H1: Existe una correlación entre síntomas sospechosos y presencia de enfermedades emergentes en el área núcleo de producción de frutales de carozo de Mendoza.

H2: Las plantas madre de los principales viveros proveedores de frutales de carozo están libres de Fitoplasmas.

7.2 *Materiales y métodos*

7.2.1 *Sitio, material vegetal y tipo de muestreo*

El estudio se llevó a cabo durante los meses de verano en las temporadas 2017, 2018 y 2019. Se realizó un muestreo representativo que cubría aproximadamente el 7% (366 ha) de la superficie total (5439 ha) de durazno de industria en las regiones de Oasis Este, Sur y Valle de Uco de la provincia de Mendoza (Figura 7.2), además se monitorearon plantas madre de un vivero de Valle de Uco. Se seleccionaron once fincas que contaban con plantas adultas de durazneros de más de 10 años (Figura 7.3), principalmente de variedades como Pavia Catherina y Bowen (Tabla 7.2). El vivero seleccionado corresponde al que cuenta con la mayor cantidad de plantas a la venta en la zona núcleo de durazno de industria y solo se tomo muestra en el año 2018.

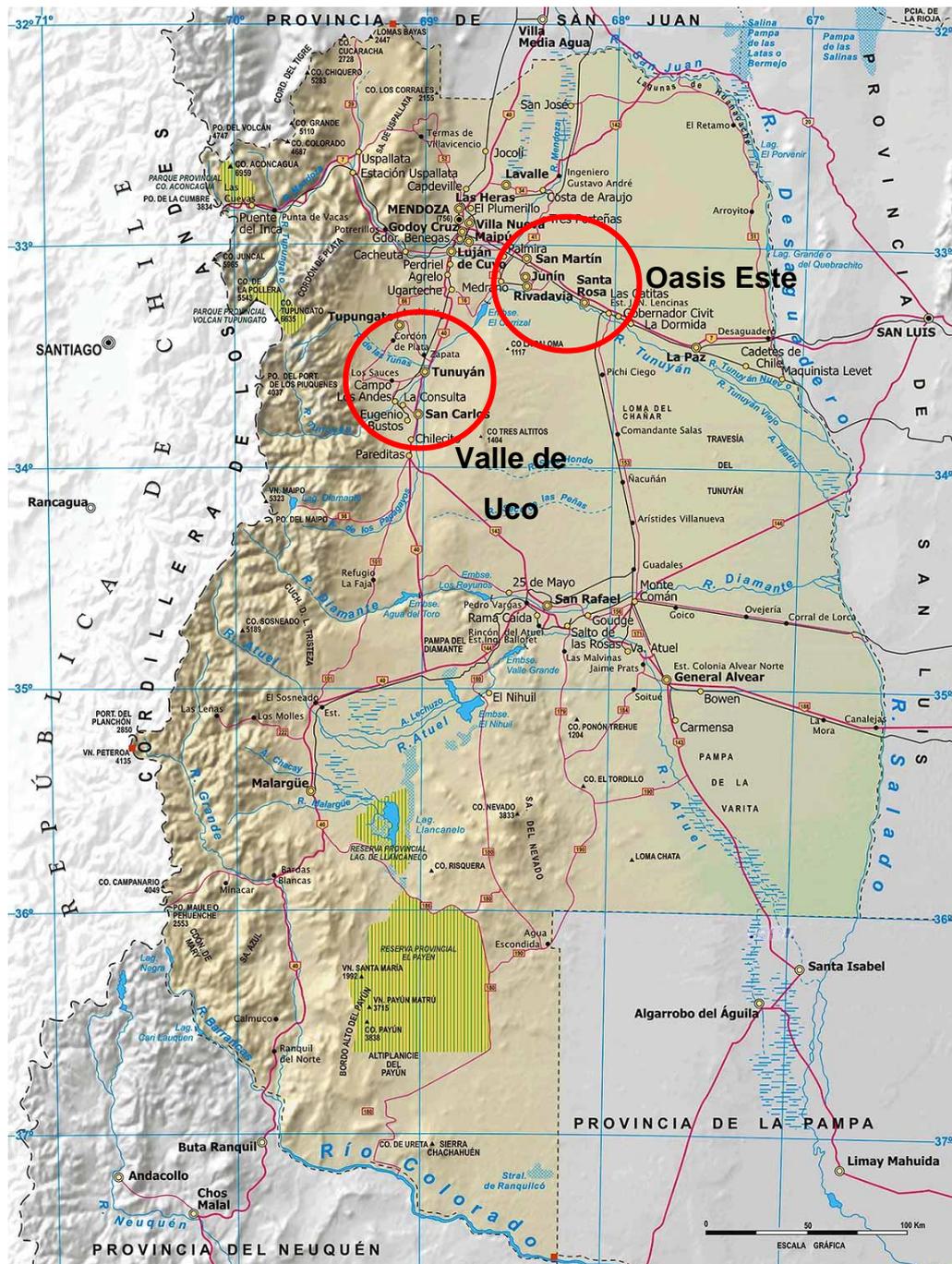


Figura 7.2. Área de estudio definida para fitoplasmas en Mendoza.



Figura 7.3. Selección de árboles sintomáticos y toma de muestra.

En cada finca, se relevó el 20% del total de su superficie al azar. Se realizaron recuentos de plantas que presentaban síntomas sospechosos de infección como amarillamiento severo, acartuchamiento y muerte de ramas. Las plantas sintomáticas se georreferenciaron y se tomó una muestra de material que fue acondicionada en conservadoras y luego en heladeras en frío (4-8°C), hasta su análisis en laboratorio. Posteriormente a cada muestra por separado se les realizó un análisis molecular para la detección de fitoplasmas, al igual que a las muestras seleccionadas en el vivero.

7.2.2 Detección molecular e identificación de fitoplasmas

La totalidad de las muestras sintomáticas tomadas fueron analizadas, mediante la técnica de PCR para confirmar la presencia de fitoplasmas. Para el diagnóstico molecular se realizaron extracciones de ADN total siguiendo el método de Doyle y Doyle (1990) (Anexo 2.2). La cantidad y calidad del ADN obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (Anexo 6.2.2.1) y espectrofotometría (NanoDrop®-ND 1000) (Anexo 3.2). La detección del fitoplasma se realizó mediante la amplificación por PCR del gen 16Sr RNA utilizando los pares de cebadores universales P1/P7 (~1.8 kb) (Deng y Hiruki 1991; Schneider et al. 1995) que amplifican parte del gen 16Sr, región intergénica y el extremo 5' del gen 23Sr (Anexo 4.2.1) de aproximadamente 1800 pb y luego con una dilución 1/25 del producto de la primera ronda se inicia la segunda ronda de PCR (PCR anidado; PCRn) con los cebadores R16F2n/R16R2 (~1.2 kb)

(Gundersen y Lee 1996) que hibridan por dentro de la amplificación del 1° ciclo (Anexo 4.2.2) y generan un fragmento de aproximadamente 1240 pb. Se utilizó ADN de vinca (*Catharanthus roseus*) infectada con fitoplasma ACLL (Torres et al. 2011) como control positivo, y ADN de plantas fehacientemente sanas como el control negativo en las reacciones. Se utilizaron además controles de reacción y de contaminación en el PCRn, para evitar falsos positivos. Las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Anexo 6.2.2.1).

Para la identificación del grupo 16Sr y subgrupo de los fitoplasmas, se utilizó el análisis de RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción). Los fragmentos amplificados de 1.2 kb mediante el uso de los cebadores R16F2n/R16R2 fueron sometidos a digestión (Anexo 5) utilizando las enzimas Tru1I (isoesquizómero de MseI) (Thermo Scientific, USA), RsaI y α TaqI (NEB, USA) (Seemüller y Schneider, 2004), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas enzimas, de acuerdo con el patrón de bandas obtenido, permiten discriminar diferentes grupos 16Sr, y dentro del grupo 16SrX al subgrupo C que es el patógeno que genera la enfermedad bajo estudio. Los perfiles de RFLP fueron identificados en geles de agarosa (Anexo 6.2.2.2). Los patrones se compararon con los previamente descritos (Fernández et al., 2017a; Galdeano et al., 2013; Lee et al., 1998).

7.3 Transmisión del fitoplasma encontrado mediante injerto de yema o corteza a plantas de duraznero GF-305.

Diez plantas de duraznero “GF 305”, cultivadas en macetas en invernadero a partir de carozos originados de plantas libres de patógenos sistémicos, se utilizaron como plantas indicadoras y se inocularon mediante injerto de escudete con material infectado (definidos mediante PCR y PCR-RFLP) proveniente de plantas del Valle de Uco. Las plantas injertadas fueron aisladas de la presencia de insectos, mediante el empleo de malla antiáfidos dispuestos para tal fin.

Se tomaron porciones de tallo de una planta sintomática, positivamente infectada, y se injerto en GF-305 sanos, de entre 3-5 meses de edad. Sobre cada ejemplar sano se realizaron entre 1-2 injertos de escudete y de corteza, para

favorecer la adhesión de los mismos fueron sellados con Parafilm® y mantenidos en invernadero.

Posteriormente se evaluó el desarrollo de la sintomatología emergente desde el momento del injerto y se controló la presencia de fitoplasmas secuencialmente mediante PCR con los cebadores universales P1/P7 y R16F2n/R16R2 según las condiciones descritas en el Anexo 4.2.1 y 4.2.2. Para confirmar la identidad del fitoplasmas se analizaron los patrones PCR-RFLP con las enzimas las enzimas Tru1I (MseI) (Thermo Scientific, USA), RsaI y α TaqI (NEB, USA) (Seemüller y Schneider, 2004), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.4 Resultados

7.4.1 Muestreo

En los tres años de muestreos de fincas, se obtuvieron 89 muestras totales (Tabla 7.2) de plantas que presentaban síntomas compatibles o sospechosos (Figura 7.4). En el año 2018 se extrajo material de 6 plantas del vivero seleccionado.

Tabla 7.2. Resumen de las fincas muestreadas durante las temporadas 2017, 2018 y 2019, junto con la información relevante sobre su ubicación geográfica, la zona en la que se encuentran, la superficie en hectáreas y la cantidad de muestras tomadas en cada finca.

Año	Finca	coordenadas	Zona	Ha	muestras tomadas
2017	1	33°03'44.4"S 68°20'12.0"W	oasis este	60	11
	2	33°10'17.2"S 68°32'12.4"W	oasis este	18	5
	3	33°30'54.0"S 69°10'58.2"W	Valle de Uco	102	9
	4	33°29'53.6"S 69°11'11.8"W	Valle de Uco	3	6
2018	5	32°54'36.6"S 68°24'08.9"W	oasis este	50	8
	6	32°52'17.2"S 68°24'34.6"W	oasis este	30	15
	7	33°08'44.3"S 68°30'08.7"W	oasis este	10	11
	8	33°10'27.0"S 68°33'26.8"W	oasis este	25	6
2019	9	33°32'26.9"S 69°07'13.9"W	Valle de Uco	12	3
	10	33°33'37.4"S 69°10'46.0"W	Valle de Uco	6	6
	11	33°31'34.4"S 69°10'06.4"W	Valle de Uco	50	9
			TOTAL	366	89



Figura 7.4. Síntomas encontrados en las plantas muestreadas compatibles con “Ca. Phytoplasmas pyri”.

7.4.2 Detección e identificación del fitoplasma mediante PCR y PCR-RFLP

En las reacciones de PCR directa utilizando los pares de cebadores universales P1/P7, se observó una amplificación exitosa en seis de los 89 (~8%) extractos de ADN de plantas sintomáticas procesadas (Tabla 7.4). Estas muestras generaron fragmentos del tamaño esperado de 1.8 kb (Figura 7.5) y todas ellas correspondían a la misma finca (finca 11). Las demás muestras colectadas a campo y las 6 muestras obtenidas del vivero no generaron amplificación en esta primera ronda.

Tabla 7.3. Muestras analizadas y muestras positivas por finca mediante PCR directo (P1/P7).

Año	Finca	muestras analizadas	muestras positivas P1/P7
2017	1	11	0
	2	5	0
	3	9	0
	4	6	0
2018	5	8	0
	6	15	0
	7	11	0
	8	6	0
2019	9	3	0
	10	6	0
	11	9	6

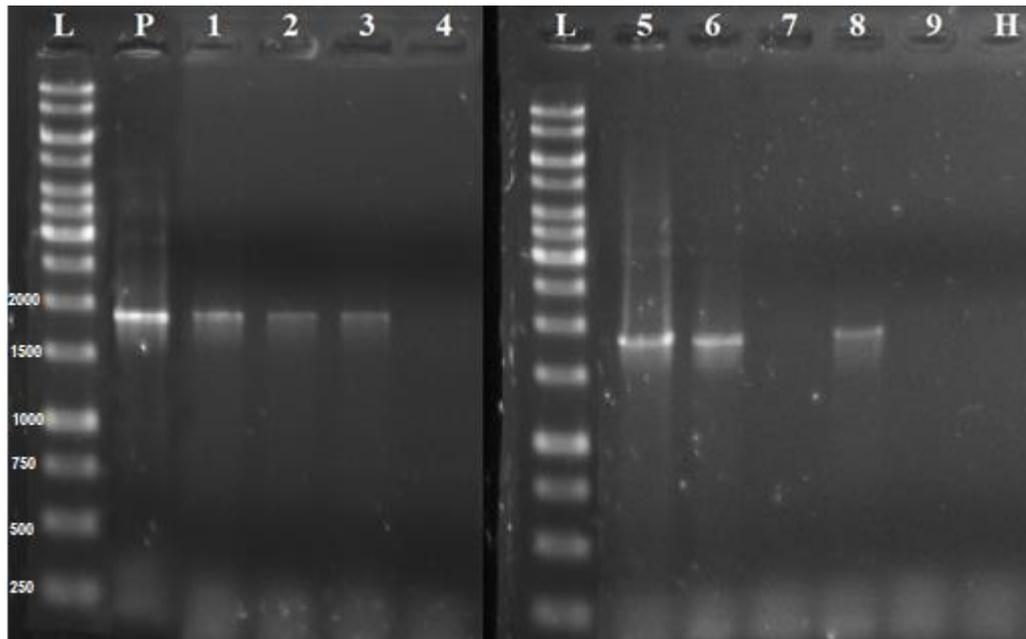


Figura 7.5. Amplificación por PCR directa con los cebadores universales P1 y P7 (~1.8 kb) (Deng y Hiruki 1991); L= Marcador de peso molecular 1 kb de ADN de Promega; H = control sano; P= control positivo; los carriles 01 a 09 son para las muestras correspondiente a la finca 11. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red.

Posteriormente, mediante PCR anidada a partir de una dilución del producto de la primera ronda de PCR, se detectó la presencia del fragmento esperado de 1.2 kb en siete de los 89 (Tabla 7.4) productos obtenidos previamente por PCR directa (Figura 7.6) mientras que las 6 muestras de vivero no amplificaron por lo que fueron consideradas negativas. Teniendo en cuenta estos resultados se calculó el porcentaje total de plantas enfermas, que representa la cantidad de muestras positivas en todas las fincas evaluadas en relación con el total de muestras analizadas. Como resultado se obtuvo que un 8% de las muestras analizadas resultaron positivas para "Ca. P. pyri" (subgrupo 16SrX-C).

Tabla 7.4. Muestras analizadas y muestras positivas por finca mediante PCR anidado (R16F2n/R16R2).

Año	Finca	muestras analizadas	muestras positivas R16F2n/R16R2
2017	1	11	0
	2	5	0
	3	9	0
	4	6	0
2018	5	8	0
	6	15	0
	7	11	0
	8	6	0
2019	9	3	0
	10	6	0
	11	9	7

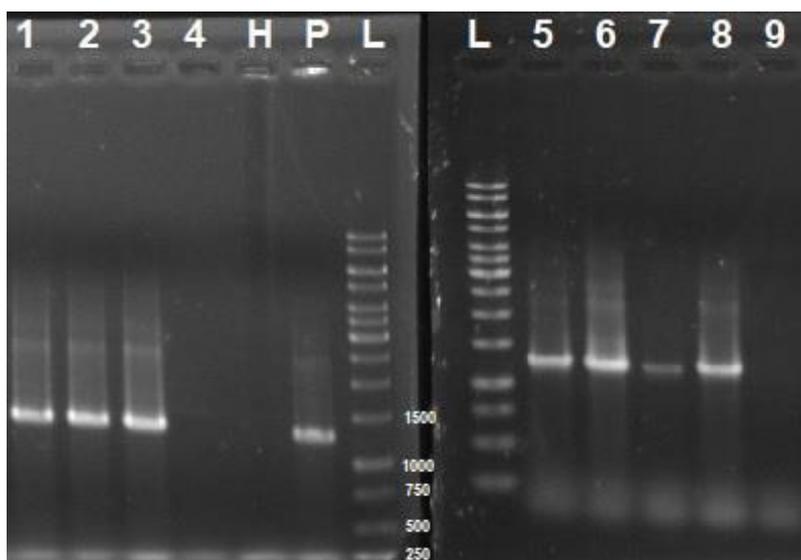


Figura 7.6. Amplificación por PCR anidado con los cebadores R16F2n/R16R2 (~1.2 kb) (Gundersen y Lee 1996). L= Marcador de peso molecular 1 kb de ADN de Promega; H = control sano; P= control positivo; los carriles 01 a 09 son para las muestras correspondiente a la finca 11. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al uno por ciento tamponado con 1x TBE y teñido con Gel Red.

Los patrones de RFLP obtenidos (Figura 7.7), con todas las endonucleasas empleadas en cada resultado positivo de PCR anidado, mostraron un patrón de PCR-RFLP idéntico e indiferenciable a los perfiles de '*Candidatus Phytoplasma pyri*' (16SrX-C) descritos por Seemüller y Schneider (2004) y Fernández et al., 2017a. Estos resultados sugieren que los fitoplasmas

asociados con los síntomas encontrados en duraznero están relacionados con "Ca. P. pyri" (subgrupo 16SrX-C).

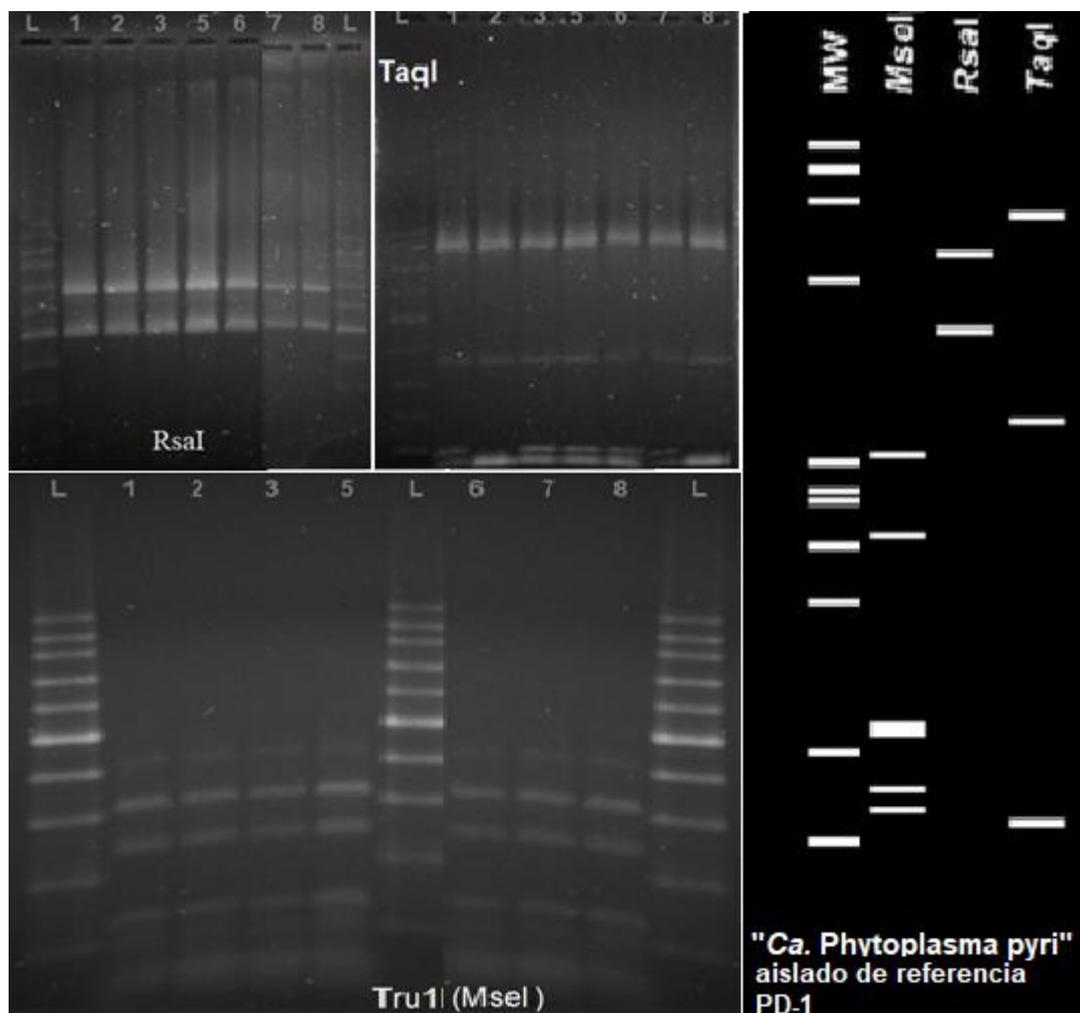


Figura 7.7. Izquierda patrones reales de RFLP de productos de PCR de 1.2 kb del gen 16Sr DNA (cebadores R16F2n/R16R2) digeridos con las enzimas de restricción Tru1I (MseI) (Thermo Scientific, USA), RsaI y α TaqI (NEB, USA), 1,2,3,5,6,7,8: muestras positivas por PCR anidado, L = GeneRuler 100 pb ADN Ladder 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 y 1500 pb (Invitrogen). Derecha patrón in silico de la cepa de referencia del subgrupo 16SrX-C (AJ542543), MW Digestión de ϕ X174 con HaeIII (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 pb).

7.4.3 Transmisión del fitoplasma mediante injerto a duraznero GF-305 y descripción de la sintomatología

A partir de material infectado proveniente de la finca 11, donde se demostró la presencia del "Candidatus Phytoplasma pyri" se injertaron un total de 10 plantas de duraznero GF-305. De este total de plantas injertadas, 7 resultaron positivo para fitoplasmas a los 3 meses de injertado.

El análisis de los patrones PCR-RFLP demostró la presencia del fitoplasma "*Candidatus Phytoplasma pyri*" en los ejemplares analizados.

Respecto a la sintomatología encontrada en los durazneros infectados en invernadero, se observa en primera instancia, aproximadamente 15 días después del injerto, sobrebrotación de yemas axilares y clorosis en algunas hojas (Figura 7.8). Pasado un mes del injerto, se observa muerte de los brotes axilares, clorosis y enrollamiento de hojas (Figura 7.9).



Figura 7.8. Sintomatología temprana expresada en GF-305 infectados con *Candidatus Phytoplasma pyri*: Sobrebrotación de yemas axilares y clorosis.



Figura 7.9. Sintomatología luego de un mes de injertar. muerte de los brotes axilares, clorosis y enrollamiento de hojas.

7.5 Discusión

La enfermedad conocida como PYRL (Peach Yellow Leaf Roll) es extremadamente agresiva en duraznero, ya que provoca síntomas como hojas cloróticas, enrollamiento y engrosamiento del nervio central, así como el secado de ramas y muerte. Esta enfermedad es causada por una variante del fitoplasma denominado "*Candidatus Phytoplasma pyri*" (Seemüller y Schneider 2004), perteneciente al grupo de la Proliferación del Manzano (16SrX). Los fitoplasmas identificados en este estudio inducen síntomas similares a los asociados con PYRL. Los perfiles de RFLP confirmaron que se trata de una cepa de "*Candidatus Phytoplasma pyri*" (subgrupo 16SrX-C) (Seemüller y Schneider, 2004). Este estudio confirma los resultados publicados por Fernández et al., 2017a para la zona este de Mendoza. Demostrando la presencia de una cepa relacionada con '*Candidatus Phytoplasma pyri*' asociada a la enfermedad de amarillamiento del duraznero en Argentina y en América del Sur y confirmando la hipótesis 1 planteada en este capítulo.

Se determinó un bajo porcentaje de plantas sintomáticas infectadas (~8%). Los síntomas pueden ser poco evidentes y variar dependiendo del genotipo de la planta, la edad o las condiciones ambientales, también pueden ser similares a los que producen otros factores bióticos y abióticos, lo que dificulta su identificación precisa. Se encontró que los árboles infectados estaban separados por distancia de varias hileras entre si y rodeados de árboles asintomáticos. Esto podría deberse a que las plantas fueron infectadas con el

patógeno presente al momento de la implantación. La escasa o nula presencia de los vectores responsables de la transmisión de la enfermedad podría ser un motivo por el cual la enfermedad no ha avanzado a plantas aledañas. Estudios anteriores han demostrado que la transmisión de este patógeno es mediada por psílidos, principalmente *Cacopsylla pyricola* en América del Norte (Blomquist y Kirkpatrick, 2002) y *Cacopsylla pyri* en Europa y Asia (Sabaté et al., 2018). Ambos psílidos coexisten en la región paleoártica. *C. pyricola* desempeña un papel clave en la transmisión de "*Candidatus Phytoplasma pyri*", ya sea de perales enfermos a perales sanos o de perales enfermos a durazneros sanos. Informes tempranos de *C. pyricola* tanto en Argentina como en Chile fueron considerados como identificaciones erróneas de *Cacopsylla bidens* (Hodkinson, 1989). En 2016 se informó sobre la presencia de *Cacopsylla pyricola* en Argentina, aunque no se dispone de datos sobre su distribución (SINAVIMO 2016). Por lo tanto, se necesitan estudios adicionales de la distribución de este insecto vector para poder conocer el papel que puede desempeñar en la propagación del fitoplasma de los perales a los durazneros.

Es posible que la presencia de este patógeno en árboles de durazno se deba a la introducción de material infectado desde otras regiones. Sin embargo, se requiere una investigación más exhaustiva para comprender mejor la relevancia epidemiológica de estos fitoplasmas.

Dado que Mendoza es el principal productor de duraznos para la industria en Argentina y considerando que este fitoplasma se clasifica como un patógeno cuarentenario, resulta fundamental establecer la presencia de los vectores en el área de producción. También es necesario realizar un control riguroso del estado sanitario de las plantas que ingresan y se comercializan en el país, incluyendo las plantas en vivero, así como las plantas donantes de yemas y portainjertos. En este estudio, no se pudo confirmar la hipótesis 2 que se planteó, por falta de datos a causa de las restricciones impuestas por la pandemia de COVID 19. Además, se deben identificar hospedantes alternativos que actúen como reservorios, identificar vectores potenciales y llevar a cabo estudios de transmisión. Es crucial profundizar el conocimiento sobre los mecanismos biológicos fundamentales, dilucidar los mecanismos de interacción entre el

fitoplasma y el hospedante y desarrollar sistemas de diagnóstico con sensibilidad y especificidad adecuadas. En este estudio, también se logró mantener un inóculo viable del fitoplasma *Candidatus Phytoplasma pyri* en plantas de duraznero en un invernadero. Los síntomas presentados en el invernadero coinciden con los observados en infecciones naturales (Blomquist y Kirkpatrick 2002; Sabaté et al., 2014). Sin embargo, es necesario trabajar con ejemplares adultos no indicadores y plantas de campo para obtener una mejor comprensión del desarrollo sintomático de la enfermedad. La puesta a punto de este sistema de mantenimiento de este fitoplasma en condiciones controladas es de vital importancia para profundizar en los conocimientos del mismo, ya que nos permite disponer de material en cantidad y calidad para realizar otro tipo de estudios, como análisis genómicos, serológicos, la evaluación de aspectos fisiológicos en la planta, expresión diferencial de genes y cinética de la infección, entre otros. Esto amplía las oportunidades de investigación en esta área.

8 Conclusiones

La aparición y dispersión de nuevas enfermedades cuarentenarias en cultivos frutícolas, fruto del incremento de la globalización, el cambio climático global y los intercambios comerciales entre países, origina una alarma económica, social y medioambiental sin precedentes, así como el incremento de las barreras para arancelarias que obstaculizan la exportación. La detección temprana de estas enfermedades en campos comerciales y viveros, el conocimiento sobre sus comportamientos epidemiológicos y la puesta a punto de técnicas más sensibles de detección son una fuente valiosa de información para ejecutar estrategias de prevención y control.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la presencia de Sharka, enfermedad cuarentenaria presente para Argentina, en montes comerciales de ciruelo d'Agén ubicados dentro de la zona cuarentenaria (ZC) del Oasis Sur de la provincia de Mendoza, aún luego de los esfuerzos iniciales de erradicación. Se corroboró también, en los aislados locales estudiados, que la raza del virus presente es la D, "Diderón", única identificada en Argentina y Sudamérica hasta el presente. La incidencia total calculada dentro de la ZC se incrementó de 12,6 a 25,8% en un lapso de 5 años (3 % de incremento anual), lo cual indica un aumento de la enfermedad en los últimos años. Los resultados son compatibles con el movimiento lento, pero progresivo, observado por esa raza en otras regiones del mundo. Durante los años del ensayo no se detectó la enfermedad en ninguna de las fincas evaluadas fuera de la ZC. En cuanto al comportamiento epidemiológico, se observó la formación de focos infecciosos alrededor de los primeros árboles positivos, lo cual concuerda con otros estudios que han demostrado la transmisión por áfidos a corta distancia. Avances de esta investigación fueron publicados como resumen el marco del 5° Congreso Argentino de Fitopatología y 59° Meeting of the APS Caribbean Division en 2018, *Phytopathology* 112: S1.1. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-112-3-S1.1>.

La eficiencia de transmisión viral observada, bajo condiciones controladas de laboratorio, del pulgón *M. persicae* de duraznero a duraznero fue de 3.3 % y 6,6 % para el primer y segundo año respectivamente. Y desde duraznero a

ciruelo, 3.3 % y 0 %. No hubo transmisión desde ciruelo. Se encontró una baja eficiencia de transmisión acorde a lo esperado para la raza D presente en la ZC.

Con respecto a los hospedantes alternativos de la enfermedad del Sharka, se confirmó mediante ensayos biológicos, serológicos y moleculares, la presencia de PPV en una planta ornamental del género *Spiraea* "Corona de novia", lo que indica que el virus puede infectar naturalmente otros géneros de especies leñosas relacionados con *Prunus*, representando una amenaza potencial para la producción de frutales de carozo no solo en Argentina sino también en otras partes del mundo. La secuencia de consenso se depositó en GenBank con el número de acceso MN587037. Este es un valioso descubrimiento que no había sido citado en otros países.

Sería relevante para futuras acciones no solo mantener el monitoreo en la zona cuarentenaria, sino también ampliar su alcance. Esto incluye expandir la zona de monitoreo y explorar la presencia del virus en otras especies frutales susceptibles, así como en los hospedantes alternativos presentes en la provincia. Además, es crucial analizar la secuencia completa del virus del PPV encontrado en *Spiraea*. Se debe también enfocar en el desarrollo de nuevas técnicas de detección temprana, tanto moleculares como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), así como también la teledetección de enfermedades utilizando vehículos aéreos no tripulados (VANT).

En lo que respecta a la otra enfermedad cuarentenaria estudiada, causada por "*Candidatus Phytoplasma pyri*", se relevó el 7 % de la superficie implantada con durazno de industria en la zona núcleo de duraznero en Mendoza donde se encontró un 8 % de muestras con presencia de la enfermedad, sobre el total de muestras sintomáticas evaluadas. También se monitorearon las plantas madre del vivero que cuenta con la mayor cantidad de plantas a la venta en la zona núcleo de durazno de industria donde no se detectaron plantas positivas. Se requiere una investigación adicional para comprender mejor la relevancia epidemiológica de este fitoplasma y determinar el/los agentes vectores y el rol que pueden desempeñar en su propagación, así como un mayor relevamiento en los viveros de la provincia de Mendoza. Por otra parte, es importante en el futuro continuar desarrollando experiencia en el reconocimiento

de síntomas que producen este tipo de patógenos en diferentes genotipos de duraznero, como así también evaluar si el fitoplasma detectado en esta especie es el mismo que afecta al cultivo de peras en la región.

Cómo parte del trabajo de esta investigación, se pusieron a punto en el laboratorio de virología vegetal del INTA Junín de Mendoza, técnicas moleculares más sensibles para una detección precoz de las enfermedades cuarentenarias estudiadas (RT-PCR en Tiempo Real, Print Capture seguido por Inmunocaptura RT-PCR, Nested PCR, RFLP) pudiéndose detectar e identificar los patógenos en los hospedantes estudiados para PPV y fitoplasmas y también en los vectores de PPV.

En resumen, los hallazgos de este estudio brindan una primera información del comportamiento epidemiológico de estas dos importantes enfermedades y resaltan la importancia de tomar medidas de control y prevención para evitar que se sigan propagando. Es necesario continuar investigando y monitoreando la situación lo que permitirá implementar estrategias de manejo adecuadas y salvaguardar la industria frutícola nacional.

ANEXOS

Anexos

ANEXO 1: TEST SEROLÓGICO DAS-ELISA

Los análisis fueron realizados siguiendo el protocolo de Bioreba (Reinch, Switzerland), con los reactivos provistos por dicha empresa.

Tapizado o sensibilización de placa:

La IgG anti PPV fue diluida 1000x en buffer de recubrimiento (coating), se adicionaron 100 microlitros de la dilución a cada celda. Luego la placa fue cubierta con papel film, logrando un buen sellado, y se colocó en caja húmeda en estufa a 37°C por 4 horas.

Lavado:

Se vaciaron las celdas y se lavaron 3 veces con el buffer de lavado (Tween 20, 2 % en PBS). Luego se removi6 completamente el líquido golpeando enérgicamente la placa sobre una toalla de papel.

Antígeno:

Las muestras recolectadas a campo fueron preparadas para ser utilizadas en la reacción de ELISA. Para ello se pes6 0.5 gramos de hojas tiernas de cada muestra extraída, se las coloc6 en bolsa de molienda y se homogeneizó la muestra diluyéndola 1:20 en buffer de extracción. Se adicionaron 100 µl de cada una de las muestras por pocillo, cada una con una repetición. Además de las muestras se dejan 2 pocillos para controles positivos (D'agen positivo), 4 para controles negativos (GF 305 sanos) y un blanco con buffer extracción. Se sell6 bien la placa y se coloc6 en caja húmeda. La placa se incub6 a 4°C toda la noche.

Lavado:

Se vaciaron las celdas y se lavaron 6 veces con el buffer de lavado, 3 lavados rápidos y 3 lavados de 3 min. Se remueve completamente el líquido golpeando enérgicamente la placa sobre una toalla de papel.

Conjugado:

Se diluy6 la IgG conjugada con la enzima fosfatasa alcalina 1000x en buffer conjugado. Se adicionaron 100 microlitros de la dilución por celda y se

cubrió la placa con papel film logrando un buen sellado, luego se colocó en caja húmeda en estufa a 37°C por 4 horas.

Lavado:

Se repitió el procedimiento indicado anteriormente.

Sustrato de la enzima:

Se diluyó el sustrato de la enzima (p-nitrophenyl phosphate) utilizando 0.75 mg/ml en buffer sustrato y se adicionaron 100 microlitros de la dilución por celda. Se incubó a temperatura ambiente (18 - 25°C) en oscuridad. Luego de 30 - 120 minutos se observa el desarrollo de la reacción de color amarillo. Se registran los resultados mediante la medición de la absorbancia (OD) a 405 nm.

ANEXO 2: EXTRACCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS

2.1 Extracción de ARN total de la planta: Protocolo de Sara Spiegel

Los tejidos frescos fueron homogeneizados en la proporción de 1:10 (p:v) de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1,5% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 300 mM de cloruro de litio, 10 mM de Na₂EDTA, 1% de Nonidet P-40, 1,5% de desoxicolato de Na y 0,5% de 2-mercaptoetanol), en bolsas para ELISA. El extracto fue transferido a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml y se añadió un volumen igual de 3 M de acetato de potasio, pH 6,5. La mezcla se mantuvo en hielo durante 10 minutos y luego se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se mezcló con un volumen igual de isopropanol y se mantuvo durante toda la noche a -20°C. El precipitado de ácido nucleico se recogió mediante centrifugado durante 15 minutos a 12.000 g a 4°C, se lavó con 200 µl de etanol al 70%, y se dejó secar al aire a temperatura ambiente (RT). El pellet se resuspendió en 30 µl de agua destilada estéril y se almacenó a -80°C.

2.2 Extracción de ADN: Protocolo Doyle and Doyle, 1990.

El material vegetal (pecíolo-nervadura central) fue homogeneizado en un mortero estéril con N₂ líquido hasta obtener un polvo homogéneo (se cortaron los dos extremos de la hoja para disminuir los hidratos de carbono). Se transfirió mediante una espátula una pequeña cantidad de material vegetal molido

(aproximadamente una punta de espátula) a un tubo de 1,5 ml estéril. Se añadieron 500µl de CTAB 2% (Tris HCl pH 8 100 mM, NaCl 1,4M, EDTA pH7 20 mM, CTAB 2%), 2-mercaptoetanol 0,2%. Se agitó en el vortex durante 20 segundos. La muestra se incubó en un baño térmico a 65°C durante 30 minutos. Se agitó en el vortex cada 5 minutos. Se añadieron 500µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se agitó en el vortex durante 20-30 segundos hasta homogeneizar la mezcla. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 300µl en dos veces de 150 µl para evitar el arrastre) y se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril. A los 300µl se le agregaron 300µl de cloroformo y se centrifugó durante 4-5 minutos. Se recuperó el sobrenadante (200µl de una sola vez). Se agregó 0,7 volúmenes de isopropanol helado y se mezcló invirtiendo el tubo lentamente de 6 a 8 veces.

La muestra se precipitó a -20°C durante 1 hora y se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó con alcohol etílico al 75% frío, se dejó escurrir y se secó el pellet mediante vacío durante 10 minutos (o en una estufa a 40-50°C). El pellet se resuspendió con 50-100µl de agua de calidad miliQ o buffer TE 1X.

ANEXO 3: CUANTIFICACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS

3.1 Cuantificación de ARN

La cantidad de ARN en cada muestra se determinó por fluorometría, utilizando el fluorómetro Denovix QFX.

Se equilibraron todas las soluciones a temperatura ambiente antes de su uso y se preparó la solución de trabajo mezclando el tinte con el tampón de ensayo en una proporción de 1:200, escalando los volúmenes según fuera necesario para hacer un volumen suficiente para alícuotas de 190 µL de la mezcla para cada estándar y desconocido. Para cada muestra estándar o desconocida, se agregaron 190 µl de la solución de trabajo a un tubo etiquetado. Se ajustó el volumen cuando se agregó más o menos 10 µl de la muestra desconocida. Se utilizaron tubos de PCR de 0,5 ml transparentes a los rayos UV, de paredes finas para las mediciones de ensayo (DeNovix cat# TUBE-PCR-0.5-500 o equivalente). Se agregaron 10 µl de los estándares de 0 ng/µl y 100 ng/µl

y 1-20 µl de muestras de ARN desconocido a los tubos respectivos y se mezcló bien. Se incubaron los tubos de ensayo a temperatura ambiente durante 5 minutos, protegidos de la luz.

Se midieron primero los dos estándares para generar la curva estándar y luego se midieron las muestras de concentración de ARN desconocido.

3.2 Cuantificación de ADN

La cantidad de ADN en cada muestra se determinó mediante el uso del espectrofotómetro de microvolúmenes de UV-Vis Thermo Scientific™ NanoDrop™, utilizando 1 µl del producto obtenido en la extracción de ADN.

ANEXO 4: REACCIONES EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

4.1 PPV

4.1.1 PCR convencional

Se utilizó el kit QIAGEN One-Step™ RT-PCR (QIAGEN Inc., Valencia, CA), para la detección molecular de PPV y la identificación de la raza PPV-D.

Cada reacción de PCR consistió en 5 µl de 1 µg de ARN, 0,4 µl de 25 mM de cada uno de los cebadores, 1 µl de 10 mM dNTPmix, 1 µl de mezcla de enzimas (Transcriptasas Inversas Omniscript y Sensiscript y ADN Polimerasa HotStarTaq), 5 µl de tampón 5x y agua MiliQ para obtener un volumen final de 25 µl.

Para la detección de PPV se utilizaron los cebadores universales para PPV P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') y P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3') (Wetzel et al., 1991). Las condiciones para la RT-PCR fueron de 45°C durante 45 min; 95°C durante 15 min; 40 ciclos (94°C durante 30 s, 60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min); 72°C durante 10 min; conservación a 4°C.

Para la identificación de la raza D se utilizaron los cebadores P3D (5'ACATTGCGGAGACAGCACTG3') y P4b (5'TGCCTTCAAACGTGGCACTG3') (Candresse et al., 1998). Las condiciones para la RT-PCR fueron de 42°C durante 45 min, 92°C durante 2 min y 40 ciclos (92°C durante 30 s, 62°C durante 30 s y 72°C durante 1 min), conservación a 4°C.

4.1.2 PCR en tiempo real

Se utilizó el kit QIAGEN SYBR One-Step (QIAGEN Inc., Valencia, CA) para la identificación de la raza PPV-D. Cada reacción consistió en 1 µl de 1 µg de ARN, 0,1 µl de 10 mM cada uno de los cebadores, 0,12 µl de enzima transcriptasa inversa iScript, 5 µl de mezcla de reacción SYBR green universal 2X iTaq y agua MiliQ a un volumen final de 10 µl.

Se utilizaron cebadores P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') y PD (5'- CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3') (Olmos et al., 1997). Las condiciones de RT-PCR en tiempo real fueron de 50 °C durante 10 min; 95°C durante 1 min; 45 ciclos (95°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s); 65 °C a 95 °C (incremento de 5 °C 15 s) para el análisis de la curva de melting.

4.1.3 PCR por inmunocaptura

Inmunocaptura:

Tapizado o sensibilización de tubo 200 µl para pcr:

Se diluyó la IgG 1000x en el buffer de coating utilizado para test de ELISA y se adicionaron 200 microlitros de la dilución a cada tubo a utilizar. Se tapó el tubo y se incubó a 37°C durante 4 horas.

Lavado:

Se vaciaron los tubos con pipeta y se lavaron 3 veces con el buffer de lavado para test de ELISA.

Antígeno:

Se incubó el extracto de macerado de la muestra (tejidos de la planta). Se maceró la muestra y se homogeneizó en un tubo de 2 ml, diluyendo 1:10 en buffer de extracción para test de ELISA. Se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 min a 4°C para clarificar la savia. Se trasvasaron 150 µl al tubo previamente sensibilizado y se incubó a 4 °C durante toda la noche.

Lavado:

Se vaciaron los tubos con pipeta y se lavaron 3 veces con 200 µl de buffer de lavado.

PCR:

Se agregaron a los tubos 25 µl del mix de PCR convencional y se siguieron las mismas condiciones para la detección molecular de PPV.

4.2 Fitoplasmas

4.2.1 PCR directo (Deng y Hiruki 1991; Schneider et al. 1995)

Cada reacción de PCR consistió en 1 µl de 1 ng de ADN, 4 µl 10mM de cada uno de los cebadores, 4 µl 10 mM de dNTPmix, 0.2 µl de ADN polimerasa GoTaq®, 4 µl de tampón de polimerasa 1X (Promega, EE.UU.) y agua estéril a un volumen final de 40 µl.

Se utilizaron cebadores universales para fitoplasma P1 (5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3') y P7 (5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3') (Deng and Hiruki 1991). Las condiciones para la PCR fueron de 95°C durante 3 min, 35 ciclos (95°C durante 1 min, 55°C durante 30 s y 72°C durante 2 min); 72°C durante 8 min; conservación a 4°C.

4.2.2 PCR anidada (Gundersen y Lee, 1996)

Cada reacción de PCR consistió en 1 µl de dilución 1:25 del producto P1/P7-PCR, 4 µl 10mM de cada uno de los cebadores, 4 µl 10 mM de dNTPmix, 0.2 µl de ADN polimerasa GoTaq®, 8 µl de tampón de polimerasa 1X (Promega, EE.UU.) y agua estéril a un volumen final de 40 µl.

Se utilizaron los cebadores para fitoplasma R16F2n (5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3') y R16R2 (5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3') (Gundersen y Lee, 1996). Las condiciones para la PCR fueron de 95°C durante 3 min, 35 ciclos (95°C durante 1 min, 54°C durante 2 min y 72°C durante 2 min); 72°C durante 8 min; conservación a 4°C.

ANEXO 5: POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Se utilizó el producto del PCR nested, entre 5 µl y 7 µl (según cantidad de amplificación), 1 µl de enzima, 2 µl de buffer específico, y se completó el volumen final con agua hasta 20 µl. El ciclado fue específico para cada enzima, cumpliendo lo explicado por el fabricante.

ANEXO 6: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

6.1 ARN (PPV)

Se preparó una solución de agarosa al 2% (2 g de agarosa por cada 100 ml de buffer TAE 1X) a la que se le añadieron 7,25 µl de GelRed® Nucleic Acid Stain 10000X Water (Sigma-Aldrich). Una vez que la agarosa se solidificó en la cámara correspondiente, se colocó sobre la cuba y se llenó hasta el tope indicado con buffer TAE 0.5X. En cada carril se sembraron entre 1 y 3 µl de ARN, junto con 2 µl de H₂O miliq y 2 µl de RNA Sample Loading Buffer (Sigma-Aldrich). La electroforesis se realizó a 80 V durante 1 hora, aproximadamente hasta que el frente de corrida rápida se encontraba a dos centímetros del borde final. Luego, se visualizó el gel en un transluminador.

6.2 ADN

6.2.1 PPV

Se preparó una solución de agarosa al 2% (2 g de agarosa por cada 100 ml de buffer TBE 1X) a la que se le añadieron 7,25 µl de GelRed® Nucleic Acid Stain 10000X Water (Sigma-Aldrich). Una vez que la agarosa se solidificó en la cámara correspondiente, se colocó sobre la cuba y se llenó hasta el tope indicado con buffer TBE 1X. En la primera calle se sembraron 1 µl del marcador GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher), 1 µl de buffer loading 6X (Promega) y 6 µl de H₂O miliq. En las siguientes calles se sembraron entre 2 y 4 µl del producto de PCR (ADN), junto con 2 µl de H₂O miliq y 2 µl de buffer loading 6X. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 45 minutos, aproximadamente hasta que el frente de corrida rápida se encontraba a dos centímetros del borde final. Luego, el gel se reveló en un transluminador.

6.2.2 Fitoplasma

6.2.2.1 Directo y anidado

Se preparó una solución de agarosa al 1% (1 g de agarosa por cada 100 ml de buffer TAE 0.5X(Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 1 mM, pH 8,0.) y se tiñó con de GelRed® Nucleic Acid Stain 10000X Water (Sigma-Aldrich). Una vez que la agarosa se solidificó en la cámara correspondiente, se colocó sobre la cuba y se llenó hasta el tope indicado con buffer TAE 0.5X. En la primera calle se

sembraron 1 μ l del marcador GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher), 1 μ l de buffer loading 6X (Promega) y 6 μ l de H₂O miliq. En las siguientes calles se sembraron entre 2 y 5 μ l de ADN, junto con 4 μ l de H₂O miliq y 1 μ l de buffer loading 6X. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 45 minutos, aproximadamente hasta que el frente de corrida rápida se encontraba a dos centímetros del borde final. Se reveló el gel en un transluminador.

6.2.2.2 RFLP

Se preparó una solución de agarosa al 1% utilizando una mezcla de 0,5 g de agarosa común y 0,5 g de agarosa metaphor por cada 100 ml de buffer TBE 0.5X, se tiñó con de GelRed® Nucleic Acid Stain 10000X Water (Sigma-Aldrich). Una vez que la agarosa se solidificó en la cámara correspondiente, se colocó sobre la cuba y se llenó hasta el tope indicado con buffer TBE 0.5X. En la primera calle se sembraron 1 μ l del marcador GeneRuler 100 pb ADN Ladder, 2 μ l de buffer loading 6X (Promega) y 7 μ l de H₂O miliq. En las siguientes calles se sembraron 20 μ l del producto de la RFLP, junto con 2 μ l de buffer loading 6X. La electroforesis se llevó a cabo en hielo a 75 V durante 4 horas. Se reveló el gel en un transluminador.

ANEXO 7: PURIFICACIÓN DE ADN

Se utilizó el kit AccuPrep® Gel Purification Kit K-3035-1 de Bioneer Corporation, Daejeon, Corea para la purificación del ADN de la banda de interés en gel de agarosa teñido con un producto químico de tinción de ácido nucleico. A continuación, se describe el procedimiento utilizado:

Se visualizó la banda de ADN en el gel de agarosa teñido y se cortó el gel lo más cerca posible de la banda de interés utilizando un bisturí. La cantidad máxima de gel por muestra fue de aproximadamente 400 mg.

Se agregaron 3 volúmenes de Buffer 1 (gel binding Buffer) por cada peso de gel cortado. La muestra se incubó a 60°C durante 10 minutos, realizando vortex cada 2-3 minutos para asegurar la completa disolución del gel.

Se añadió 1 volumen de isopropanol absoluto a la mezcla y se mezcló inmediatamente mediante pipeteo o inversión. La mezcla se transfirió a una columna de unión en un tubo de recolección de 2 ml y se centrifugó a 13.000

rpm durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se volvió a armar la columna de unión con el tubo de recolección.

Se agregaron 500 μ l de Buffer 2 a la columna de unión, se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió una vez más.

Se centrifugó la columna de unión a 13.000 rpm durante 1 minuto para eliminar completamente el etanol residual y se transfirió la columna de unión a un nuevo tubo de 1,5 ml.

Se agregaron 30 μ l de Buffer 3 al centro del tubo de la columna de unión y se dejó reposar durante al menos 1 minuto a temperatura ambiente (15-25°C). Posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto para eluir el ADN purificado.

Una vez completados estos pasos, se obtuvo el ADN purificado listo para su uso en las siguientes aplicaciones

Bibliografía

Akbaş, B., Morca, A. F., Coşkan, S., Santosa, A. I., Çulal-Kılıç, H., & Çelik, A. (2023). First complete sequences and genetic variation of plum pox virus T strain in *Prunus dulcis* and *Prunus cerasus*. *3 Biotech*, 13(10), 332.

Albrechtova, L. (1990). Determination of plum pox virus in the tissues of peach trees by ELISA during vegetation period. *Zahradnictvi*, 17, 251-262.

Al-Saady, N. A., Khan, A. J., Calari, A., Al-Subhi, A. M., & Bertaccini, A. (2008). '*Candidatus* Phytoplasma omanense', associated with witches' broom of *Cassia italica* (Mill.) Spreng in Oman. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 461–466.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.

Andersen, M. T., Liefing, L. W., Havukkala, I., & Beever, R. (2013). Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of '*Candidatus* Phytoplasma australiense' reveals genome plasticity. *BMC genomics*, 14(1), 529.

Andrejeva, J., Puurand, U., Merits, A., Rabenstein, F., Jarvekulg, L., Valkonen, J. P. T. (1999). Potyvirus helper component-proteinase and coat protein (cp) have coordinated functions in virus-host interactions and the same cp motif affects virus transmission and accumulation. *Journal of General Virology*, 80(Pt 5), 1133–1139.

Arocha, Y., López, M., Piñol, B., Fernández, M., Picornell, B., Almeida, R., Palenzuela, I., Wilson, M., & Jones, P. (2005). '*Candidatus* Phytoplasma graminis' and '*Candidatus* Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with disease of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(6), 2451–2463.

Atanasoff, D. (1932). Plum pox, A new virus disease. *Annals of the University of Sofia, Faculty of Agriculture and Silviculture*, 11, 49–70.

Atreya, C. D., & Pirone, T. P. (1993). Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: Effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90(24), 11919–11923.

Auger, S. (1993). Sharka (plum pox virus) a latent threat for stone fruits in Chile. *Aconex (Chile)*, (41).

Auger S, J., & Esterio G, M. (1995). Sharka disease (plum Pox Virus) in Chile. Aconex (Chile), (47).

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Radek, A. J., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., & Hogenhout, S. A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3682–3696.

Bailey, C. H., & Hough, L. F. (1975). Apricots. En J. Janick y J. N. Moore (Eds.), *Avances in Fruit Breeding* (pp. 367–386). Purdue University Press.

Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T., & Cambra, M. (2011). Plum pox virus. En A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, y W. Jelkmann (Eds.), *Virus and Virus-like Disease of Pome and Stone Fruits* (pp. 185–197). APS Press.

Barba, M., Ilardi, V., & Pasquini, G. (2015). Control of pome and stone fruit virus diseases. *Advances in Virus Research*, 91, 47–83.

Baric, S., & Dalla-Via, J. (2004). A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *Journal of Microbial Biotechnology*, 57, 135–145.

Barnett, O. W. (1990). A summary of potyvirus taxonomy and definitions. En O. W. Barnett (Ed.), *Potyvirus Taxonomy* (pp. 435–445). Springer-Verlag.

Bassi, D., & Monet, R. (2008). Botany and taxonomy. En D. R. Layne y D. Bassi (Eds.), *The peach: botany, production and uses* (pp. 1–36). CABI.

Baugher, A. (2003). Anatomy and taxonomy. En A. Baugher y S. Singha (Eds.), *Concise encyclopedia of temperate tree fruit* (pp. 3–8). Food Products Press.

Bernhard, R., Marénaud, C., & Sutic, D. (1969). Le pêcher GF305 indicateur polyvalent des virus des espèces a noyau. *Annals of Phytopathology*, 1(4), 603–617.

Bertaccini, A., Arocha-Rosete, Y., Contaldo, N., Duduk, B., Fiore, N., Montano, H. G., Kube, M., Kuo, C., Martini, M., Oshima, K., Quaglino, F., Schneider, B., Wei, W. & Zamorano, A. (2022). Revision of the ‘*Candidatus* Phytoplasma’ species description guidelines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(4), 005353.

Bertaccini, A., Paltrinieri, S., & Contaldo, N. (2019). Standard detection protocol: PCR and RFLP analyses based on 16S rRNA gene. *Phytoplasmas: Methods and Protocols*, 83-95.

Bertaccini, A., & Lee, I.-M. (2018). Phytoplasmas: an update. En G. P. Rao, A. Bertaccini, N. Fiore, y L. W. Liefing (Eds.), *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma - Associated Diseases* (pp. 1–29). Springer.

Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., & Contaldo, N. (2014). Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 1763–1788.

Bianco, P. A., Aliverti, I., Casati, P., Belli, B., Comes, S., Fanigliulo, A., & Crescenzi, A. (2004). Detection and characterisation of plum pox virus isolates in Lombardia and Veneto regions (Italy). *Acta Horticulturae*, 657, 165–169.

Blanc, S., López-Moya, J. J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D. W., & Pirone, T. P. (1997). A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology*, 231(1), 141–147. doi:10.1006/viro.1997.8521

Blomquist, C. L., & Kirkpatrick, B. C. (2002). Frequency and seasonal distribution of pear psylla infected with the pear decline phytoplasma in California pear orchards. *Phytopathology*, 92(11), 1218–1226.

Bongiorno, V., Alessio, F., Curzel, V., Nome, C., Fernández, F. D., & Conci, L. R. (2020). 'Ca. Phytoplasma pruni' and 'Ca. Phytoplasma meliae' are affecting plum in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes*, 15, 1-5.

Boonrod, K., Munteanu, B., Jarausch, B., Jarausch, W., & Krczal, G. (2012). An Immunodominant Membrane Protein (Imp) of '*Candidatus* Phytoplasma mali' Binds to Plant Actin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(7), 889–895.

Boudon-Padieu, E., & Grenan, S. (2002). Hot water treatment. En ICGV home page. Recuperado de <http://www.icgv.ch>.

Breniaux, D., Micoud, A., & Ollier, M. (1990). Etude de l'extériorisation du virus de la sharka sur pêcher. Ministère de l'Agriculture et de la Forêt. SRPV Rhône-Alpes.Lyon.

Brown, D. R., May, M., Bradbury, J. M., & Johansson, K.-E. (2010). Class I. Mollicutes. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres,*

Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes (Vol. 4, pp. 140-147).

Buxa, S. V., Degola, F., Polizzotto, R., De Marco, F., Loschi, A., Kogel, K.-H., ... Musetti, R. (2015). Phytoplasma infection in tomato is associated with reorganization of plasma membrane, ER stacks, and actin filaments in sieve elements. *Frontiers in Plant Science*, 6.

CABI. (2022). Compendio de protección de cultivos. Wallingford (Reino Unido), CABI. Recuperado de <http://www.cabi.org/cpc/>

Caglayan, K., Serce, C. U., Gazel, M., Kaya, K., Cengiz, F. C., Vidal, E., & Cambra, M. (2013). Evaluation of the susceptibility of different *Prunus* rootstocks to natural infection of plum pox virus-T. *Journal of plant pathology*, 579-586.

Calari, A., Paltrinieri, S., Contaldo, N., Sakalieva, D., Mori, N., Duduk, B., & Bertaccini, A. (2011). Molecular evidence of phytoplasmas in winter oilseed rape, tomato and corn seedlings. *Bulletin of Insectology*, 64, 157-158.

Cambra, M., Gorris, M. T., Capote, N., Asensio, M., Martínez, M. C., Bertolini, E., ... & López, A. (2004). Epidemiology of plum pox virus in Japanese plums in Spain. In *Proceedings of the Xixth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops: Fruit Tree Diseases* (No. 657, pp. 195-200).

Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., & Llácer, G. (2006a). Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bulletin*, 36, 202-204.

Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., Gorris, M. T., & Capote, N. (2006b). Detection and characterization of plum pox virus: serological methods. *EPPO Bulletin*, 36, 254-261.

Cambra, M., Capote, N., Cambra, M. A., Llácer, G., Botella, P., & López-Quílez, A. (2006c). Epidemiology of sharka disease in Spain. *Bulletin of the OEPP*, 36(2), 271-275.

Cambra, M., Bertolini, E., Martínez, M. C., Gorris, M. T., Vidal, E., & Olmos, A. (2015). Diagnosis and detection of plum pox virus: State-of-the-art and future options. *Acta Horticulturae*, (1063), 149-157.

Cambra, M., & Vidal, E. (2016). Sharka, a vector-borne disease caused by plum pox virus: Vector species, transmission mechanism, epidemiology and mitigation strategies to reduce its natural spread. En *III International Symposium on plum Pox Virus 1163* (pp. 57-68).

Candresse, T., Dosba, F., Quiot, J. B., & Dunez, J. (1993). La sharka. Le point sur les recherches. *L'Arboriculture Fruitière*, 406, 30-35.

Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M. T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J. B., & Dunez, J. (1998). Comparison of monoclonal antibodies and PCR assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox virus. *Phytopathology*, 88, 198-204.

Capote, N., Gorris, M. T., Martínez, M. C., Asensio, M., Olmos, A., & Cambra, M. (2006). Interference between D and M types of plum pox virus in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96, 320-325.

Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M. C., & Cambra, M. (2009). Direct sample preparation methods for the detection of plum pox virus by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, 12, 1-6.

Capote, N., Cambra, M. A., Botella, P., Gorris, M. T., Martínez, M. C., López-Quílez, A., & Cambra, M. (2010). Detection, characterization, epidemiology and eradication of plum pox virus Marcus type in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 92, 619-628.

Carbonell, A., Maliogka, V. I., J.J., P., Salvador, B., San León, D., García, J. A., and Simón Mateo, C. 2013. Diverse amino acid changes at specific positions in the N-terminal region of the coat protein allow plum pox virus to adapt to new hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26:1211-1224.

Carrington, J. C., Jensen, P. E., & Schaad, M. C. (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus ci protein in cell-to-cell movement. *Plant Journal*, 14, 393-400.

Çelik, A., & Ertunç, F. (2021). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) of plum pox potyvirus Turkey (PPV-T) strain. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(3), 663-671.

Chiesa, S., Prati, S., Assante, G., Maffi, D., & Bianco, P. A. (2007). Activity of synthetic and natural compounds for phytoplasma control. *Bulletin of Insectology*, 60, 313-314.

Chirkov, S., Sheveleva, A., Ivanov, P., Zakubanskiy, A., & Osipov, G. (2018). Analysis of genetic diversity of Russian sour cherry plum pox virus isolates provides evidence of a new strain. *Plant Disease*, 102, 569-575.

Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., & Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10, 526-535.

Christof, A. (1938). Virus diseases of genus *Prunus* in Bulgaria. *Phytopathology Z*, 11, 360-422.

Chung, B. N., & Jeong, M. I. (2014). Identification of "stolbur" phytoplasmas in *Petunia hybrida* seedlings. *Phytopathogenic Mollicutes*, 4, 5-8.

CIPF. 1997. Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. Roma, CIPF, FAO

Clark, M. F., & Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.

Collar, J. L., Avilla, C., Duque, M., & Fereres, A. (1995). Assessment of potato virus Y (PVY) spread in bell peppers treated with different insecticides. In Abstracts, 6th International Plant Virus Epidemiology Symposium: Epidemiological Aspects of Plant Virus Control (pp. 3). Ortra, Tel Aviv.

Conci, L., Saavedra Pons, A., Guzman, F., Fernández, F., Galdeano, E., Perez Grosso, T., Torres, L., & Meneguzzi, N. (2014). Advances in knowledge about phytoplasma diseases in Argentina. In A. Bertaccini (Ed.), *Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases Management: How to Reduce Their Economic Impact* (pp. 288). Bologna, Italia: ISBN 978-88909922-0-9.

Conci, L., Fernández, F., Plazas, C., & Guerra, G. (2020). Fitoplasmas en Argentina. Situación actual. *Investigación, Ciencia y Universidad*, 3(4), 81. ISSN 2525-1783.

Constable, F., Gibb, K., & Symons, R. (2003). Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52, 267-276.

Contaldo, N., Satta, E., Zambon, Y., Paltrinieri, S., & Bertaccini, A. (2016). Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 105-110.

Costanzo, S. (2012). New Pest Response Guidelines. In R. E. Davis (Ed.), *Selected 'Candidatus' Phytoplasma spp.' of Apple, Grape and Peach* (pp. 1-210). The U.S. Department of Agriculture.

Crescenzi, A., d'Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., Boscia, D., & Hadidi, A. (1997a). Characterization of the sweet cherry isolate of plum pox potyvirus. *Plant Disease*, 81, 711-714.

Crescenzi, A., d'Aquino, L., Nuzzaci, M., Ostuni, A., Bavoso, A., Comes, S., De Stradis, A., & Piazzolla, P. (1997b). Production of strain-specific antibodies against a synthetic polypeptide corresponding to the n-terminal region of the plum pox potyvirus coat protein. *Journal of Virological Methods*, 69, 181-189.

Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C., & Carrington, J. C. (1995). Long-distance movement factor: A transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell*, 7, 549-559.

Dal Zotto, A., Ortego, J. M., Raigon, J. M., Caloggero, S., Rossini, M. N., & Ducasse, D. (2006). First Report in Argentina of plum Pox Virus Causing Sharka Disease in *Prunus*. *Plant Disease*, 90(4), 523.

Dal Zotto, A., Porcel, L. B., Marini, D. B., Picca, C. N., Córdoba, M., & Teich, I. (2020). Spatio and temporal spread of plum pox virus infecting European plum (*Prunus domestica* L. cv. d'Agen) orchard in Mendoza, Argentina. Distribución espacial y temporal del plum pox virus en un monte de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L cv d'Agen) de Mendoza, Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

Dallot, S., Bousalem, M., Boeglin, M., Renaud, L. Y., & Quiot, J. B. (1996). Almond trees and sharka: Assessment under controlled conditions of the susceptibility of almond to the main types of plum pox potyvirus and survey for natural infections in France. Joint EPPO/MPU Conference on Almond Protection, Valencia, November 1996, 33.

Dallot, S., Labonne, G., Boeglin, M., Quiot-Douine, L., Quiot, J. B., & Candresse, T. (1998). Peculiar plum pox potyvirus D-populations are epidemic in peach trees. *Acta Horticulturae*, 472, 355-365.

Dallot, S., Gottwald, T., Labonne, G., & Quiot, J. B. (2004). Factors affecting the spread of plum pox virus strain M in peach orchards subjected to roguing in France. *Phytopathology*, 94(12), 1390-1398. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO.2004.94.12.1390>. PubMed.

Damsteegt, V. D., Scorza, R., Stone, A. L., Schneider, W. L., Webb, K., Demuth, M., & Gildow, F. E. (2007). *Prunus* host range of plum pox virus (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91(1), 18-23.

Daros, J. A., Schaad, M. C., & Carrington, J. C. (1999). Functional analysis of the interaction between vpg-proteinase (nia) and rna polymerase (nib) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *Journal of Virology*, 73, 8732-8740.

De Blas, C., Borja*, M. J., Saiz, M., & Romero, J. (1994). Broad spectrum detection of cucumber mosaic virus (CMV) using the polymerase chain reaction. *Journal of phytopathology*, 141(3), 323-329.

Decroocq, V., Foulongne, M., Lambert, P., Le Gall, O., Mantin, C. (2005). Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistance to sharka disease in *Prunus davidiana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 272, 680–689.

Decroocq, V., Badenes, M.L., Neumuller, M. (2011). Breeding for resistance to plum pox virus. In *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits* (pp. 401–6). A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann (Eds.). Saint-Paul, USA: APS Press.

Deng S, Hiruki C (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14, 53–61.

Desvignes JC. (1976). The virus diseases detected in greenhouse and in field by the peach seedling GF305 indicator. *Acta Horticulturae*, 67, 47-48.

Desvignes, J. C., Boyé, R., Cornaggia, D., Grasseau, N., Hurtt, S., & Waterworth, H. (1999). Virus diseases of fruit trees. (Diseases due to viroids, viruses, phytoplasmas and other undetermined infectious agents). Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL).

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967). Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33, 259-266.

Dosba F, Lansac M, Pêcher G, Teyssier B, Piquemal JP, Michel M. (1986). Plum pox virus detection by ELISA technique in peach and apricot infected trees at different growing stages. *Acta Horticulturae*, 193, 187-191.

Dosba F, Lasac M, Desvignes JC. (1988). Plum pox virus PPV. Virus de lavariolle du prunier. *Phytoma*, 395, 31-32.

Dosba F, Lansac M, Eyquard JP. (1994). Résistance des *Prunus* a la sharka. *Bulletin EPPO*, 24, 3, 691-696.

Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from faesh tissue. *Focus*, 12, 13-15.

Dukes, J.P., King, D.P., Alexandersen, S. (2006). Novel reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of foot and mouth disease virus. *Archives of Virology*, 151, 1093–1106.

EPPO. (2004). Diagnostic protocol for regulated pests. Plum pox potyvirus. *EPPO Bulletin*, 34, 247-256.

EPPO (2022). EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int>

Fanigliulo A, Comes S, Crescenzi A. (2004). Evaluation of cherry cultivars for their response to infection by plum pox virus Sweet Cherry strain. *Acta Horticulturae*, 657, 309-316.

FAO. 1990. Glosario de términos fitosanitarios de la FAO, *Boletín fitosanitario de la FAO*, 38(1): 5–23. [equivalente actual: NIMF 5].

FAO. 1995. Ver NIMF 5, 1995.

FAO. IPPC Secretariat. (2022). Glossary of phytosanitary terms. International Standard for Phytosanitary Measures No. 5. Rome. FAO on behalf of the Secretariat of the International Plant Protection Convention.

Fereres, A., Racca, B. (2015). Plant viruses transmission by insects. In *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000760.pub3/abstract>.

Fernández, F. D., Guzmán, F. A., Curzel, V., Bejarano, N., & Conci, L. R. (2013). Detection and molecular characterization of a phytoplasma affecting *Prunus persica* L. in Jujuy, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 627-631.

Fernández F, Meneguzzi N, Conci L. (2017b). Identification of three novel subgroups within the X-disease group associated with strawberry redness disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 753-758.

Fernández, F. D., Marini, D., Farrando, R., & Conci, L. R. (2017a). First report of a '*Candidatus* Phytoplasma pyri' strain in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes*, 12, 1-4.

Fernández, F.D., Conci, L.R. (2019). First report of '*Candidatus* Phytoplasma pyri'-related strain causing pear decline in Argentina. *Crop Protection*, 121, 28-33.

Fernández, F. D., Galdeano, E., & Conci, L. R. (2020a). Phytoplasmas diversity and identification of new aster yellows subgroup (16SrI) associated with weed species in Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 35-43.

Fernández, F. D., Zübert, C., Huettel, B., Kube, M., & Conci, L. R. (2020b). Draft Genome Sequence of “*Candidatus Phytoplasma pruni*” (X-disease group, subgroup 16SrIII-B) strain ChTDIII from Argentina. *Microbiology Resource Announcements*, 9(38), 10-1128.

Fernández, F. D., & Conci, L. R. (2021). Genome characterization of ‘*Candidatus Phytoplasma meliae*’ (isolate ChTYXIII). *bioRxiv*, 2021-05.

Fiore, N., Araya, C., Zamorano, A., González, F., Mora, R., Sánchez-Navarro, J., ... & 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.

Fraser, R. W., Cook, D. C., Mumford, J. D., Wilby, A., & Waage, J. K. (2006). Managing outbreaks of invasive species: eradication versus suppression. *International Journal of Pest Management*, 52(4), 261-268.

Fukuta, S., Iida, T., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J., Kanbe, M., Ishimoto, Y. (2003). Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Archives of Virology*, 148, 1713-1720.

Fukuzawa, N., Itchoda, N., Ishihara, T., Goto, K., Masuta, C., Matsumura, T. (2010). Hc-pro, a potyvirus RNA silencing suppressor, cancels cycling of cucumber mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* plants. *Virus Genes*, 40, 440–446.

Galdeano, E., Guzmán, F. A., Fernández, F., & Conci, L. R. (2013). Genetic diversity of 16SrIII group phytoplasmas in Argentina. Predominance of subgroups 16SrIII-J and B and two new subgroups 16SrIII-W and X. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 753-764

García J.A., Riechmann J.L., Laín S., Martín M.T., Guo H., Simon L., Fernández A., Dominguez E., Cervera M.T. (1994). Molecular characterization of plum pox potyvirus. *Bulletin EPPO*, 24(3), 443-554.

García, J. A., Glasa, M., Cambra, M., and Candresse, T. (2014). Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15, 226-241.

Gentit, P. (2006). Detection of plum pox virus: biological methods. OEPP/EPPO Bulletin, 36, 251-253.

Gildow, F., Damsteegt, V., Stone, A., Schneider, W., Luster, D., & Levy, L. (2004). Plum pox in North America: identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. Phytopathology, 94, 868–874.

Giunchedi, L. (1986). Piante ospiti e sintomatologia della vaiolatura delle drupacee. Informatore Fitopatologico, 7-8, 11-18.

Glasa, M., Palkovics, L., Kominek, P., Labonne, G., Pittnerova, S., Kudela, O., Šubr, Z., Candresse, T. (2004). Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. Journal of General Virology, 85, 2671–2681.

Glasa, M., Prikhodko, Y., Predajňa, L., Nagyová, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., ... & Candresse, T. (2013). Characterization of sour cherry isolates of plum pox virus from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. Phytopathology, 103(9), 972-979.

Golino, D. A., Oldfield, G. N., Gumpf, D. J. (1989). Experimental hosts of the beet leafhopper-transmitted virescence agent. Plant Disease, 73, 850-854.

Gottwald, T., Avinent, L., Llácer, G., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. (1995). Analysis of the spatial spread of sharka (plum pox virus) in apricot and peach orchards in Eastern Spain. Plant Disease, 79(3), 266-278.

Gottwald, T. (2006). Epidemiology of sharka disease in North America. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 36(2), 279-286.

Gottwald, T. R., Wierenga, E., Luo, W. Q., Parnell, S. (2013). Epidemiology of plum pox "D" strain in Canada and the USA. Canadian Journal of Plant Pathology, 35, 442-457.

Goytia, E., Fernández-Calvino, L., Martínez-García, B., López-Abella, D., López-Moya, J.J. (2006). Production of plum pox virus HC-Pro functionally active for aphid transmission in a transient-expression system. Journal of General Virology, 87(11), 3413-3423.

Gundersen, D.E., Lee, I.-M., Rehner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas), a basis for their classification. Journal of Bacteriology, 176, 5244-5254.

Gundersen, D. E., & Lee, I. M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathologia mediterranea, 144-151.

Guo, D.Y., Rajamaki, M.L., Saarma, M., Valkonen, J.P.T. (2001). Towards a protein interaction map of potyviruses: Protein interaction matrices of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *Journal of General Virology*, 82, 935-939.

Gurr, G. M., Johnson, A. C., Ash, G. J., Wilson, B. A. L., Ero, M. M., Pilotti, C. A., Dewhurst, C. F., You, M. S. (2016). Coconut Lethal Yellowing Diseases: A Phytoplasma Threat to Palms of Global Economic and Social Significance. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1521.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Hamity, C., Curzel, V., Bejarano, N., Zapana, N., Fernández, F., Guzmán, F., Conci, L. (2017). Avances en el conocimiento de la epidemiología del amarillamiento del duraznero. Cicadélidos vectores. *Actas del VII Encuentro Latinoamericano de Prunus sin Fronteras*, 27.

Harris, K. F. (1990). Aphid transmission of plant viruses. In V. L. Mandahar (Ed.), *Plant viruses, 2. Pathology* (pp. 177-204). CRC Press.

Harrison, N. A. (1999). *Phytoplasma Taxonomy*. First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes. Retrieved from <http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>.

Henson, J. M., French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 81-109.

Herranz, M. C., Sanchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., Pallas, V. (2005). Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *Journal of Virological Methods*, 124(1-2), 49-55.

Herrera, G. (1994). Detección de la enfermedad de Sharkas (plum pox virus) en una vieja colección de carozos de la subestación experimental Los Tilos (INIA), Chile. *Agricultura Técnica*, 54(2), 187-191.

Herrera, G., & Madariaga, M. (2003). Diseminación natural del virus causante de la enfermedad de Sharka (plum pox virus, PPV) en tres temporadas en un huerto de damasco. *Agricultura Técnica*, 63(2), 202-206.

Herrera, G. (2013). Investigations of the plum pox virus in Chile in the past 20 years. *Chilean journal of agricultural research*, 73(1), 60-65.

Hnasko, R. (Ed.). (2015). ELISA. *Methods in Molecular Biology*.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5>

Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Harrison, N., Dickinson, M. (2008). Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of *Candidatus* Phytoplasma. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1826-1837.

Hodkinson, I. D. (1989). Jumping plant lice (psyllids) and significant aspects of two recent introductions into South America and the Pacific. *FAO Plant Protection Bulletin*, 37(4), 180-181.

Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., & Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 403-423.

Hong, X. Y., Chen, J., Shi, Y. H., & Chen, J. P. (2007). The '6k1' protein of a strain of soybean mosaic virus localizes to the cell periphery. *Archives of Virology*, 152, 1547-1551.

Hubert, I., Parqueteau, B., & Pecheur, G. (1988). La lutte contre la sharka en France. L'action du service de la protection des végétaux. *Bulletin Technique d'Information*, 465-480.

Hughes, D., & Galau, G. (1988). Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant Molecular Biology Reporter*, 6(4), 253–257.

Hughes, G., Gottwald, T. R., & Levy, L. (2002). The use of hierarchical sampling in the surveillance program for plum pox virus incidence in the United States. *Plant Disease*, 86(3), 259-263.

Hull R (1986) The potential for using dot-blot hybridisation in the detection of plant viruses. In: Jones RAC and Torrance L (eds.) *Developments in Applied Biology 1: Developments and Applications in Virus Testing* (pp. 3–12) Association of Applied Biologists, Cambridge, 300 pp.

Hull, R., & Al-Hakim, A. (1988). Nucleic acid hybridization in plant virus diagnosis and characterization. *Trends in Biotechnology*, 6, 213-218.

ICSB-Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. (1997). Minutes of the interim meetings. 12 and 18 July 1996, Orlando, Florida, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47, 911-914.

IDR (Instituto de Desarrollo Rural), Mendoza, Argentina.
<https://www.idr.org.ar/>.

IPPC 2020. <https://www.ippc.int/>. NIMF 27. Anexo 2. Virus de la sharka del ciruelo (2018). Roma, CIPF, FAO

Isaac, M., Preda, S., & Marcu, M. (1998). Aphid species - vectors of plum pox virus. *Acta Virologica*, 42, 233-234.

James, D., & Thompson, D. (2006). Hosts and symptoms of plum pox virus: ornamental and wild *Prunus* species. *EPPO Bulletin*, 36(2), 222-224.

James, D., Varga, A., Sanderson, D., & Svircev, A. M. (2013). Genetic diversity of plum pox virus: Strains, diseases, and related challenges for control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35, 431-441.

Jimenez, I., Lopez, L., Alamillo, J. M., Valli, A., & Garcia, J. A. (2006). Identification of a plum pox virus CI-interacting protein from chloroplast that has a negative effect on virus infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 350-358.

Josifovic, M. (1937). Mosaic of plum. *Archiv Ministerstva Poljoprivredna*, 4(7), 131-143.

Kalashyan, A., Bilkey, N. D., Verderevs, T. D., & Rubina, E. U. (1994). Plum pox virus on sour cherry in Moldavia. *Bulletin EPPO*, 24(3), 645-649.

Kasschau, K. D., Cronin, S., & Carrington, J. C. (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology*, 227, 25-26.

Kaya, K., Gazel, M., Serçe, Ç. U., Elçi, E., Cengiz, F. C., Cambra, M., & Caglayan, K. (2014). Potential vectors of plum pox virus in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Entomologia generalis*, 35(1-2), 137-150.

Kennedy, J. S., & Thomas, A. A. G. (1974). Behaviour of some low-flying aphids in wind. *Annals of Applied Biology*, 76, 143-159.

Kil, E. J., Ho, P. T., Fadhila, C., Lal, A., Vo, T. T. B., Kim, M., & Lee, S. (2021). Plum pox virus: diagnosis and spread inhibition by weed control. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128, 1091-1099.

Kim, W. S., Stobbs, L. W., Lehman, S. M., James, D., & Svircev, A. M. (2008). Direct real-time PCR detection of plum pox virus in field surveys in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30(2), 308-317.

Klarik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real-Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8, 108.

Konnerth, A., Krczal, G., & Boonrod, K. (2016). Immunodominant membrane proteins of phytoplasmas. *Microbiology*, 162(8), 1267-1273.

Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A. M., Reinhardt, R., & Seemüller, E. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *BMC Genomics*, 9, 306.

Kumari, S., Nagendran, K., Rai, A. B., Singh, B., Rao, G. P., & Bertaccini, A. (2019). Global status of phytoplasma diseases in vegetable crops. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1349.

Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J. B., Avinent, L., & Llácer, G. (1995). Aphids as potential vectors of plum pox virus: Comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Hort.*, 386, 207-217.

Labonne, G., Quiot, J. B. (2001). Aphids can acquire plum pox virus from infected fruits. *Acta Hort.*, 550, 79-83.

Labonne, G., & Dallot, S. (2006). Epidemiology of sharka disease in France. *EPPO Bulletin*, 36(2), 267-270.

Lain, S., Riechman, J.L., & García, J.A. (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus. *Virus Research*, 13, 157-172.

Langenberg, W.G., & Zhang, L.Y. (1997). Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology*, 118, 243-247.

Lansac, M., Bernhard, R., Massonie, G., Maison, P., Kerlan, C., Dunez, J., & Morvan, G. (1982). La sharka: connaissances actuelles. 3 *Journ.Franc.Etud.Info.ACTA.Paris*, Octobre 1979, 452-468.

Lee, I.M., Hammond, R.W., Davis, R.E., & Gundersen, D.E. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of MLOs. *Phytopathology*, 83, 834–842.

Lee, I., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., & Bartoszyk, I.M. (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16SrRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1153–1169.

Lee, I., Davis, R., & Gundersen-Rindal, D. (2000). *Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes*. *Annual Review of Microbiology*, 54, 221-255.

Lee, I., Bottner, K.D., Secor, G., & Rivera-Varas, V. (2006). '*Candidatus Phytoplasma americanum*', a phytoplasma associated with a purple top wilt

disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1593–1597.

Lee, S., & Wen, J. (2001). A phylogenetic analysis of *Prunus* and the *Amygdaloideae* (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 88(1), 150-160.

Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., & Seemüller, E. (1999). Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 55, 59-68.

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. *Bulletin EPPO*, 24(3), 595-604.

Levy, L., Damsteegt, V., & Welliver, R. (2000a). First Report of plum pox virus (Sharka Disease) in *Prunus persica* in the United States. *Disease notes, Plant Disease*, 84(2), 202.

Levy, L., Damsteegt, V., Scorza, R., & Kolber, M. (2000b). Plum pox potyvirus disease of stone fruits. Online. APSnet Feature, March.

Li, X.H., Valdez, P., Olvera, R.E., & Carrington, J.C. (1997). Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (nib): Subcellular transport and protein–protein interaction with vpg/proteinase (nia). *Journal of Virology*, 71, 1598–1607.

Lim, P., & Sears, B. (1989). 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 171(11), 5901-5906.

Lin, L., Shi, Y.H., Luo, Z.P., Lu, Y.W., Zheng, H.Y., Yan, F., Chen, J., Chen, J.P., Adams, M.J., & Wu, Y.F. (2009). Protein–protein interactions in two potyviruses using the yeast two–hybrid system. *Virus Research*, 142, 36–40.

Lingdi, L., & Alexander, C. (2003). *Spiraea*. *Flora of China*, 9, 47-73.

Llácer, G., & Cambra, M. (1986). Occurrence of plum pox virus in Spain in a new natural host: *Prunus salicina* Lindl (Japanese plum). *Plant Disease*, 70(2), 173.

Llácer, G. (1994). Sharka en frutales. Actualización. VII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Sitges, Octubre de 1994, 21.

Llácer, G., & Cambra, M. (2006). Hosts and symptoms of plum pox virus: fruiting *Prunus* species. *EPPO Bulletin*, 36, 219-221.

Looney, N.E., & Jackson, D. (1999). Stonefruit. In: Jackson, D.I., & Looney, N.E. (eds.), *Temperate and subtropical fruit production* (2nd ed.). CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 171-188.

López-Moya, J.J., Wang, R.Y., & Pirone, T.P. (1999). Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *Journal of General Virology*, 80(12), 3281–3288.

Lowery, D.T., Sears, M.K., & Hammer, C.S. (1990). Control of turnip mosaic virus of rutabaga with applications of oil, whitewash, and insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 83, 2352-2356.

Lowery, D.T., Vickers, P., & Bittner, L. (2009). Research Update: Aphid transmission, host range and management of plum pox virus. Report to the PPV International Expert Panel Meeting, January 12-14, 2009, St. Catharines, ON, Canada.

Lowery, D.T., Vickers, P.M., Bittner, L.A., Stobbs, L.W., & Footitt, R.G. (2015). Aphid transmission of the Ontario isolate of plum pox virus. *Journal of Economic Entomology*. DOI: 10.1093/jee/tov172.

Lupoli, R., Labonne, G., & Yvon, M. (1992). Variability in the transmission efficiency of potyviruses by different clones of *Aphis gossypii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 5, 291-300.

Maghraby, I. E., Matić, S., Fahmy, H., & Myrta, A. (2007). Viruses and viroids of stone fruits in Egypt. *Journal of Plant Pathology*, 427-430.

Mainou, A., & Syrgiannidis, G. (1992). Evaluation of peach and nectarine varieties according to resistance to sharka (plum pox) virus RNA. *Acta Horticulturae*, 309, 221-227.

Maiss, E., Timpe, U., Briske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D., & Katinger, H.W.D. (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *Journal of General Virology*, 70(3), 513–524. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-70-3-513>. PubMed.

Marcone, C. (2014). Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. *Annals of Applied Biology*, 165, 199–221.

Marcone, C., Guerra, L. J., & Uyemoto, J. K. (2014). Phytoplasmal diseases of peach and associated phytoplasma taxa. *Journal of Plant Pathology*, 96(1).

Marcone, C., & Rao, G. P. (2019). Control of Phytoplasma Diseases Through Resistant Plants. In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - II* (pp. 165–184).

Marini, D.B., Farrando R.J., Ojeda M.E., Porcel, L., García, L. (2012). Evidencias de la no transmisibilidad del virus del Sharka a través de semillas en ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) en Argentina. *Revista Análisis de Semillas*. Nº 21, Vol. 1, Tomo 6. Pgs. 88-91

Marini, D.B., Rossini, M., Dal Zotto, A., & Porcel, L. (2015). Frutales de carozo. Capítulo: plum pox virus (sharka). Plagas cuarentenarias de frutales de la República Argentina. *Avances en los resultados*. INTA, 75-89. ISBN 978-987-521-627-3.

Marini, D.B., Farrando, R., Ojeda, M. E., Porcel, L., Lucero, V., Piglionico, D., & Picca, C. (2019). Estudio de sensibilidad de seis genotipos de *Prunus* a la enfermedad del sharka, en invernadero de condiciones controladas en Mendoza, Argentina. *Revista. Resumen. Congreso. VIII Encuentro Latinoamericano Prunus Sin Fronteras*.

Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., & Audergon, J. M. (2000). Behaviour of apricot cultivars in the presence of sharka (plum pox potyvirus): a review. *Agronomie*, 20, 407-422.

Martínez-Gómez, P., & Dicenta, F. (2001). Distribution of coat protein and nucleic acid of plum pox virus (PPV) in seedlings of peach rootstock GF305 and apricot cv. Real Fino. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, 157-164.

Más, P., Sánchez-Navarro, J., Sánchez-Pina, M. A., & Pallás, V. (1993). Chemiluminiscent and colorigenic detection of cherry leaf roll virus with digoxigenin-labeled RNA probes. *Journal of Virological Methods*, 45, 93-102.

Materazzi, A., Audergon, J. M., Bruchou, C., & Lecoq, H. (1991). Sensibilité de sémis de pêcher GF305 a la "sharka" ou PPV. Resultats preliminaires concernant la comparaison de deux types d'inoculation. 2^o Rencontre du Group Abricotier, Avignon, May 1991, 147-148.

Matthews, R. E. F. (1991). Criteria for the recognition of strains. *Plant Virology*. 3rd ed. Academic Press, San Diego, CA, 482-503.

Matthews, R. (1993). Experimental transmission of viruses and diagnosis. In R. Matthews (Ed.), *Plant Virus Diseases* (pp. 49-72). CRC Press, Inc.

Matthews, R. E. F., & Hull, R. (2002). *Matthews' plant virology*. Gulf professional publishing.

Mazzitelli, M. E., Dal Zotto, A., Pigliónico, D., Farrando, R., Porcel, L., Ojeda, M. E., Raigón, J. M., & Marini, D. (2023). Aphid species populations and their seasonal fluctuation in *Prunus* orchards affected by Sharka disease within the quarantine areas of Argentina: Poblaciones de especies de pulgones y sus dinámicas estacionales en fincas de *Prunus* afectadas por la enfermedad del Sharka dentro de las áreas cuarentenarias de Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 82(3), 21-27.

McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C. J., Chen, T. A., Chiykowski, L. N., Cousin, M. T., Seemüller, E. (1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In R. F. Whitcomb & J. G. Tully (Eds.), *The Mycoplasmas*, Vol V (pp. 545-640). Academic Press.

Milusheva, S., & Rankova, Z. (2002). Plum pox potyvirus detection in weed species under field conditions. *Acta Horticulturae*, 577, 283-287.

Montano, H. G., Davis, R. E., Dally, E. L., Hogenhout, S., Pimentel, P., & Brioso, P. S. T. (2001). '*Candidatus* Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches'-broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1109–1118.

Moreno, A., N. Capote, M. C. Martinez, M. T. Gorris, & M. Cambra. (2007). Experimental transmission of D and M types of plum pox virus by aphids in *Prunus persica*. Abstracts of the European Meeting on plum pox, Pula Croatia, September 24–28, 2007. University of Zagreb, Zagreb, Croatia.

Moreno, A., Fereres, A., & 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. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-009-0450-5>. PubMed.

Morvan, G., & Audergon, J. M. (1989). La Sharka une menace toujours présente. *L'Arboriculture Fruitière*, 423, 35-40.

Musetti, R., Scaramagli, S., Vighi, C., Pressaco, L., Favali, M.A. (1999). The involvement of polyamines in phytoplasma-infected periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) plants. *Plant Biosyst.* 133 (1), 37-45.

Musetti, R., Favali, M. A., & Pressacco, L. (2000). Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios*, 102, 133-147.

Naderali, N., Nejat, N., Vadamalai, G., Davis, R. E., Wei, W., Harrison, N. A., ... & Zhao, Y. (2017). '*Candidatus* Phytoplasma wodyetiae', a new taxon associated with yellow decline disease of foxtail palm (*Wodyetia bifurcata*) in

Malaysia. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 67(10), 3765-3772.

Namba, S. (2019). Molecular and biological properties of phytoplasmas. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 95(7), 401-418.

Navrátil, M., Cikánek, D., Hilbgert, I., Kristofová, H., Karesová, R. (1992). Monoclonal antibodies against plum pox virus. Acta Horticulturae, 309, 169-173.

Nejat, N., Vadamalai, G., Davis, R.E., Harrison, N.A., Sijam, K., Dickinson, M., Abdullah, S.N.A., Zhao, Y. (2013). '*Candidatus* Phytoplasma malaysianum', a novel taxon associated with virescence and phyllody of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). Int J Syst Evol Microbiol, 63, 540–548.

Nemchinov, L., Hadidi, A. (1996). Characterization of the sour cherry strain of plum pox virus. Phytopathology, 86(6), 575-580.

Nemeth, M. (1986). Virus, mycoplasma, and rickettsia diseases of fruit trees. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.

Németh, M. (1994). History and importance of plum pox in stone-fruit production. Bulletin EPPO, 24(3), 525-537.

Nikolaeva, O.V. (1995). Nucleic Acid Hybridization Methods in Diagnosis of Plant Viruses and Viroids. In "Molecular Methods in Plant Pathology". Ed. R. P. Singh and U. S. Singh. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 133-143.

NIMF 5. 1995. Glosario de términos fitosanitarios. Roma, CIPF, FAO. [publicado 1996].

Noelting, M. C., Ferreira, J., Galvão, S. R., Greizerstein, E. J., Molina, M. D. C., López, C., Bedendo, I. P. (2019). *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus*: A new host of '*Candidatus* Phytoplasma hispanicum' (subgroup 16Sr XIII-A). J Phytopathol, 00, 1–6.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucl. Acids Res., 28, e63.

Ogawa, J.M., Zehr, E., Bird, G., Richie, D., Uriu, K., Uyemoto, J. (1995). Compendium of stone fruit diseases. APS, St. Paul, MN, US.

Olmos, A., Angel Dasí, M., Candresse, T., Cambra, M. (1996). Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of plum pox virus (PPV) in plant tissues. Nucleic Acids Research, 24(11), 2192-2193.

Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M. A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M. T., Asensio, M. (1997). Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by Heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68(2), 127–137.

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. *Journal of Virological Methods*, 128, 151-155.

Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E., Cambra, M. (2007). Molecular diagnostic methods for plant viruses. In: Z.K. Punja, S. De Boer, H. Sanfaçon (eds.) *Biotechnology and plant disease management*, 227-249. CAB International.

Olmos, A., Boonham, N., Candresse, T., Gentit, P., Giovani, B., Kutnjak, D., ... & Massart, S. (2018). High-throughput sequencing technologies for plant pest diagnosis: challenges and opportunities. *EPPO Bulletin*, 48(2), 219-224.

Ortego, J. (2008). Informe fitosanitario sobre sharka. EEA Junín - INTA. Proyecto Nacional NUSO "Diagnóstico precoz para la prevención de las enfermedades Tizón de Fuego y sharka en frutales de pepita y carozo en Argentina".

Pacifico, D., Galetto, L., Rashidi, M., Abbà, S., Palmano, S., Firrao, G., ... & Marzachi, C. (2015). Decreasing global transcript levels over time suggest that phytoplasma cells enter stationary phase during plant and insect colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2591-2602.

Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F., Morita, K. (2004). Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 257–263.

Pasquini, G., Mazzei, M., Barba, M. (1995). Improvement of detection of plum pox virus in stone fruits by ELISA. *Acta Horticulturae*, 384, 543-547.

Pasquini, G., Barba, M. (2006). The question of seed transmissibility of plum pox virus. *EPPO Bull.*, 36, 287–292.

Pérez-López, E., Luna-Rodríguez, M., Olivier, C., & Dumonceaux, T. (2016). The underestimated diversity of phytoplasmas in Latin America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 492-513.

Pertot, I., Musetti, R., Pressacco, L., & Osler, R. (1998). Changes in indole-3-acetic acid level in micropropagated tissues of *Catharanthus roseus* infected

by the agent of the clover phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasma morphology. *Cytobios*, 95, 13-23.

Pham, H. M., Nakajima, C., Ohashi, K., & Onuma, M. (2005). Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1646-1650.

Pirone, T. P. (1991). Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. *Seminars in Virology*, 2(1), 81-87.

Pirone, T. P., & Blanc, S. (1996). Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 227-247.

Polak, J. (2001). European spindle tree and common privet, new natural hosts of plum pox virus. *Acta Horticulturae*, 550, 125-128.

Potter, D., Eriksson, T., & Evans, R. C. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 266(1-2), 5-43.

Programa Nacional Frutales: superficie ocupada por plantaciones frutales en el país y cambios en su estructura productiva, Enrique E. Sanchez. – Buenos Aires: Ediciones INTA, Estación Experimental Agropecuaria, Balcarce, 2020.

Purcell, A. H., & Suslow, K. G. (1984). Surveys of leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) and pear psylla (Homoptera: Psyllidae) in pear and peach orchards and the spread of peach yellow leaf roll disease. *Journal of Economic Entomology*, 77, 1489-1494.

Puurand, U., Makinen, K., Paulin, L., & Saarma, M. (1994). The nucleotide sequence of potato virus A genomic RNA and its sequence similarities with other potyviruses. *Journal of General Virology*, 75, 457-461.

Puustinen, P., & Makinen, K. (2004). Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase NIb correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38103-38110.

Quiot, J. B., Labonne, G., Boeglin, M., Adamolle, C., Renaud, L. Y., & Candresse, T. (1995). Behaviour of two isolates of plum pox virus inoculated on peach and apricot trees. First results. *Acta Horticulturae*, 386, 290-294.

Rajamäki, M. L., & Valkonen, J. P. (2003). Localization of a potyvirus and the viral genome-linked protein in wild potato leaves at an early stage of systemic infection. *Molecular plant-microbe interactions*, 16(1), 25-34.

Rao, G. P., Bertaccini, A., Fiore, N., & Liefting, L. W. (2018). *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria* (p. 345). Singapore: Springer.

Rashidi, M., Galetto, L., Bosco, D., Bulgarelli, A., Vallino, M., Veratti, F., & Marzachi, C. (2015). Role of the major antigenic membrane protein in phytoplasma transmission by two insect vector species. *BMC Microbiology*, 15, 233.

Ravelonandro, R., Delbos, R., Varveri, C., & Dunez, J. (1988). Capsid protein of plum pox virus. Structure and comparison with other Potyvirus. *Acta Horticulturae*, 235, 305-311.

Rehder, A. (1940). *Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America, exclusive of the subtropical and warmer temperate regions (Vol. 1) (2nd ed.)*. Macmillan.

Renaudin, J., Béven, L., Batailler, B., Duret, S., Desqué, D., Arricau-Bouvery, N., ... & Foissac, X. (2015). Heterologous expression and processing of the flavescence dorée phytoplasma variable membrane protein VmpA in *Spiroplasma citri*. *Bmc Microbiology*, 15(1), 1-12.

Restrepo-Hartwig, M. A., & Carrington, J. C. (1994). The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane-associated and involved in viral replication. *Journal of Virology*, 68(4), 2388-2397.

Richert-Pöggeler, K. R., Franzke, K., Hipp, K., & Kleespies, R. G. (2019). Electron microscopy methods for virus diagnosis and high resolution analysis of viruses. *Frontiers in microbiology*, 9, 3255.

Riechmann, J. L., Lain, S., & García, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*, 73(1), 1-16.

Rodríguez Cerezo, E., Ammar, E., Pirone, T. P., & Shaw, J. G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology*, 74, 1945-1949.

Rodríguez Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J. G., Lomonosoff, G. P., Qiu, S. G., Linstead, P., Shanks, M., & Risco, C. (1997). The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology*, 236(2), 296-306.

Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L., & Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, 237(2), 283-295.

Romanazzi, G., Musetti, R., Marzachi, C., & Casati, P. (2009). Induction of resistance in the control of phytoplasma diseases. *Petria*, 19, 113-129.

Facundo, R., Quiroga, N., Méndez, P., Zamorano, A., & Fiore, N. (2017). First report of '*Candidatus Phytoplasma pyri*' on pear in Chile. *Plant Disease*, 101(5), 830-830.

Rossini, M., Wagner, F., Emili, S., Ascianto, K., Marini, D., Porcel, L., Raigón, J., Arroyo, L., & Dal Zotto, A.A. (2009). Monitoreo de Sharka en las regiones productoras de frutas de carozo de Argentina. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Termas de Río Hondo, Stgo. del Estero. Octubre 2009.

Rossini, M., Wagner, F., Ascianto, K., Marini, D., Porcel, L., Dal Zotto, A., ... & Ojeda, M. (2011). Análisis de la presencia de Sharka en plantas madres del género *Prunus* en Argentina. resúmenes IV Encuentro tres Fronteras y II Encuentro Internacional Sin Fronteras en el cultivo de Duraznero. Mendoza, 29.

Rowhani, A., Uyemoto, JU., Golino, D., & Martelli, G. (2005). Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 261-278.

Roy, AS., & Smith, IM. (1994). plum pox situation in Europe. *Bulletin EPPO*, 24(3), 515-525.

Rümpler, F., Gramzow, L., Theißen, G., & Melzer, R. (2015). Did Convergent Protein Evolution Enable Phytoplasmas to Generate "Zombie Plants"? *Trends in Plant Science*, 20(12), 798-806.

Sabaté, J., Laviña, A., & Batlle, A. (2014). First report of '*Candidatus phytoplasma pyri*' causing peach yellow leaf roll (PYLR) in Spain. *Plant Disease*, 98, 989.

Sabaté, J., Rodon, J., Artigues, M., Laviña, A., & Batlle, A. (2018). Transmission of '*Candidatus Phytoplasma pyri*' by naturally infected *Cacopsylla pyri* to peach, an approach to the epidemiology of peach yellow leaf roll (PYLR) in Spain. *Plant Pathology*, 67(4), 978-986.

Schneider, B., Seemüller, E., Smart, CD., & Kirkpatrick, BC. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin R, Tully JG (eds) *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, vol I. Academic Press, San Diego, pp 369-380.

Schneider, W.L., Sherman, D.J., Stone, A.L., Damsteegt, V.D., & Frederick, R.D. (2004). Specific detection and quantification of plum pox virus by real-time fluorescent reverse-transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 120, 97-105.

Schulze-Menz, G.K. (1964). Rosaceae. In: Melchior H. (ed.) Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien II. 12th edn. Gerbrüder Borntraeger, Berlin, pp. 209-218.

Scorza, R., Callahan, A., Dardick, C., Ravelonandro, M., & Polak, J. (2013). Genetic engineering of plum pox virus resistance: "HoneySweet" plum- from concept to product. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 115, 1-12.

Sebestyén, D., Nemeth, M., Hangyal, R., Krizbai, L., Ember, I., Nyerges, K., Kolber, M., Kiss, E., & Bese, G. (2008). Ornamental *Prunus* species as new natural hosts of plum pox virus and their importance in the spread of the virus in Hungary. *Journal of Plant Pathology*, 90(1), 57-61.

Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., & Göschl, M. (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Plant Pathology*, 80, 3-26.

Seemüller, E., & Schneider, B. (2004). 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1217-1226.

Seemüller, E., & Harries, H. (2010). Plant resistance. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Eds Weintraub PG, Jones P. CABI, Wallingford, United Kingdom, 147-169 pp.

Sharma, S.K., Gupta, O.P., Pathaw, N., Sharma, D., Maibam, A., Sharma, P., Sanasam, J., Karkute, S.G., Kumar, S., & Bhattacharjee, B. (2021). CRISPR-Cas-Led Revolution in Diagnosis and Management of Emerging Plant Viruses: New Avenues Toward Food and Nutritional Security. *Frontiers in Nutrition*, 8, 751512.

Sheveleva, A., Osipov, G., Gasanova, T., Ivanov, P., & Chirkov, S. (2021). Plum pox virus strain C isolates can reduce sour cherry productivity. *Plants*, 10(11), 2327.

Sihelská, N., Glasa, M., & Šubr, Z.W. (2017). Host preference of the major strains of plum pox virus - Opinions based on regional and worldwide sequence data. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(3), 510-515.

Sinclair, W.A. (2000). Elm yellows in North America. In: *The Elms: Breeding, Conservation, and Disease Management*. Ed Dunn CP. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 121-136 pp.

Sinclair, W.A., Townsend, A.M., Griffiths, H.M., & Whitlow, T.H. (2000a). Responses of six Eurasian *Ulmus* cultivars to a North American elm yellows phytoplasma. *Plant Disease*, 84, 1266-1270.

Sinclair, W.A., Gleason, M.L., Griffiths, H.M., Iles, J.K., Zriba, N., Charlson, D.V., Batzer, J.C., & Whitlow, T.H. (2000b). Responses of 11 *Fraxinus* cultivars to ash yellows phytoplasma strains of differing aggressiveness. *Plant Disease*, 84, 725-730.

Smith, I.E., Candresse, T., & Dosba, F. (1994). La Sharka. Où en est-on en Europa et ailleurs? *L'Arboriculture Fruitière*, 471, 29-42.

Sochor, J., Babula, P., Adam, V., Krska, B., & Kizek, R. (2012). Sharka: The Past, The Present and The Future. *Viruses*, 4(11), 2853-2901.

Šubr, Z., Kamencayová, M., & Glasa, M. (2015). Experimental mixed infection by plum pox virus strains confirms their natural host preference. *Acta Horticulturae*, 1063, 29-32.

Sugio, A., Kingdom, H., MacLean, A., Grieve, M., Hogenhout, S. (2011a). Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *PNAS*, 108(48), E1254–E1263.

Sugio, A., MacLean, A.M., Kingdom, H.N., Grieve, V.M., Manimekalai, R., & Hogenhout, S.A. (2011b). Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 175-195.

Sugio, A., and Hogenhout, S.A. (2012). The Genome Biology of Phytoplasma: Modulators of Plants and Insects. *Current Opinion in Microbiology*, 15, 247-254.

Sutic, D. (1971). Etat des recherches sur le virus de la sharka. *Annales de Phytopathologie Supplement*, 161–170.

Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H. Y., Yamaji, Y., ... & Namba, S. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(11), 4252-4257.

Tedeschi, R., Ferrato, V., Rossi, J., Alma, A. (2006). Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology*, 55, 18–24.

Teshale, J. (2014). Sharka of stone fruits (plum pox virus): a destructive diseases of Mediterranean fruit tree species. *Res. Plant Sci.*, 2(2), 45-49.

The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group. (2004). '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 1243-1255.

Torres L, Galdeano E, Fernández F, Meneguzzi N, Conci L. (2011). Establishment of the new subgroup 16Srl-S (rr-rp) tuf-H belonging to '*Ca. Phytoplasma asteris*' in wild and cultivated plants in Argentina. *J Plant Pathol*, 93, 311–320.

Toruño, T., Music, M., Simi, S., Nicolaisen, M., Hogenhout, S. (2010). Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Mol Microbiol.*, 77, 1406–1415.

Tran-Nguyen, L., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., Gibb, K. (2008). Comparative genome analysis of '*Candidatus* Phytoplasma australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and '*Ca. Phytoplasma asteris*' strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3979-3991.

Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Arruda, P., Haenni, A.L., Bernardi, F. (2000). Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology*, 268, 104-111.

Valli, A., Gallo, A., Calvo, M., Pérez, J. J., and García, J. A. 2014. A novel role of the 24 potyviral helper component proteinase contributes to enhance the yield of viral 25 particles. *J. Virol.* 88:9808-9818.

Vanee, V.B., Berger, P.H., Carrington, J.C, Hunt, A.G., Shi, X.M. (1995). 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology*, 206, 583-590.

Varga, A., James, D. (2005). Detection and differentiation of plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: A rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, 123, 213-220.

Varga, A., James, D. (2006). Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of plum pox virus. *J Virol Methods*, 138(1–2), 184–190.

Varveri, C. (2006). Epidemiology of plum pox virus strain M in Greece. *Bull. OEPP*, 36(2), 276–278.

Varveri, C., Bretout, C., Dunez, J. (1986). Synthesis and Characterization of a DNA Complementary to plum pox virus RNA to be Used as a Specific Detection Probe. *Acta Horticulturae*, 193, 173-181.

Varveri, C., Candresse, T., Cugusi, M., Ravelonandro, M., Dunez, J. (1988). Use of a ³²P-Labeled Transcribed RNA Probe for Dot Hybridization Detection of plum pox virus. *Phytopathology*, 78(10), 1280-1283.

Varveri, C., Ravelonandro, M., Dunez, J. (1987). Construction and Use of a Cloned cDNA Probe for Detection of plum pox virus in Plants. *Phytopathology*, 77(8), 1221-1224.

Verchot, J., Carrington, J.C. (1995). Evidence that the potyvirus PI proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J. Virol.*, 69, 3668-3674.

Viršček, M., Mavrič, I., Urbančič-Zemljič, M., Škerlavaj, V. (2004). Detection of plum pox potyvirus in weeds. *Acta Horticulturae*, 657, 251-254.

Vozárová, Z., Kamencayová, M., Glasa, M., and Šubr, Z. 2013. plum pox virus accumulates mutations in different genome parts during a long-term maintenance in *Prunus* host plants and passage in *Nicotiana benthamiana*. *Acta Virol* 57:369-372.

Wallis, C. M., Fleischer, S. J., Luster, D., & Gildow, F. E. (2005). Aphid (Hemiptera: Aphididae) species composition and potential aphid vectors of plum pox virus in Pennsylvania peach orchards. *Journal of economic entomology*, 98(5), 1441-1450.

Waltermann, A., Maiss, E. (2006). Detection of 6k1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus infected *nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.*, 87, 2381–2386.

Wang, A., Sanfaçon, H., Stobbs, L. W., James, D., Thompson, D., Svircev, A. M., & Brown, D. C. W. (2006). Plum pox virus in Canada: progress in research and future prospects for disease control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28(2), 182–196.

Wang, X.H., Kohalmi, S.E., Svircev, A., Wang, A.M., Sanfacon, H., Tian, L.N. (2013). Silencing of the host factor eIF(iso)4E gene confers plum pox virus resistance in plum. *PLOS ONE*, 8, e50627.

Wei, W., Davis, R.E., Lee, I.-M., Zhao, Y. (2007). Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes, identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1855–1867.

Wei, W., Lee, I.-M., Davis, R.E., Suo, X., Zhao, Y. (2008). Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2368–2377.

Weintraub, P.G., Beanland, L. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51, 91–111.

Weintraub, P.G., Jones, P. (2010). *Phytoplasmas: Genomes, Plant hosts and vectors*. CAB International. ISBN 9781-84593-530-6. pp329.

Wen, R.H., Maroof, M.A.S., Hajimorad, M.R. (2011). Amino acid changes in p3, and not the overlapping pipo–encoded protein, determine virulence of soybean mosaic virus on functionally immune rsv1–genotype soybean. *Molecular Plant Pathology*, 12, 799–807.

Westwood, M. N. *Temperate-zone pomology*. 1993; Timber PressPortland. OR. USA, 100-101.

Wetzel, T., Tavert, G., Teycheney, P.Y., Ravelonandro, M., Candresse, T., Dunez, J. (1990). Dot hybridization detection of plum pox virus using P-labeled RNA probes representing non-structural viral protein genes. *Journal of Virological Methods*, 30, 161-172.

Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Dunez, J. (1991). A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33(3), 355–365.

Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., Dunez, J. (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 39, 27-37.

Whitcomb, R., Tully, E. (1989). *The Mycoplasmas Vol. V*. San Diego: Academic Press, Inc.

Woese, C.R., Maniloff, J., Zablen, L.B. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *PNAS*, 77, 494-498.

Yarza, P., Yilmaz, P., Priesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., ... & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645.

Zawadzka, B., Rozpara, E., Grzyb, Z., Malinowski, T. (1994). Susceptibility of some North American and Yugoslav plum cultivars to plum pox potyvirus in Poland. Bulletin EPPO, 24(3), 767-770.

Zeven, A. C., & De Wet, J. M. (1982). Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity: excluding most ornamentals, forest trees and lower plants. Pudoc.

Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.-M., Shao, J., Suo, X., Davis, R.E. (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59.

Zhao, Y., Davis, R., Wei, W., Lee, I. (2015). Should '*Candidatus* Phytoplasma' be retained within the Order Acholeplasmatales? International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65, 1075-1082.

Zhao, Y., Davis, R. (2016). Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66(5), 2121-2123. doi: 10.1099/ijsem.0.000999