

EL DECAIMIENTO DEL PERAL EN URUGUAY: GENERALIDADES Y TRABAJOS EXPERIMENTALES DE INIA LAS BRUJAS.

Diego C. Maeso¹, Anabel Martínez⁴, María T. Federici², Lucía Goncalves¹, Mariana Silvera¹, Danilo Cabrera³, Saturnino Núñez¹, Wilma Walasek¹ y Luciano Giunchedi⁵

¹ INIA LB, Sección Protección Vegetal.

² INIA LB, Unidad de Biotecnología.

³ INIA LB, Sección Fruticultura.

⁴ Tesista Fac. Ciencias.

⁵ Universidad de Bologna, Italia.

Introducción

Antecedentes

El decaimiento del peral, “pear decline” o “moria del pero”, es una enfermedad que afecta al cultivo en casi todas las zonas productoras del mundo. Su primer reporte se hace en el norte de Italia hacia 1908 para luego distribuirse en Europa fundamentalmente España, Francia e Inglaterra (Giunchedi, 2003). En Norteamérica se lo cita por primera vez en la costa oeste de Canadá y EEUU en 1946 luego de su introducción en portainjertos y la de su vector desde Europa. De allí alcanzó la costa este en los años 70 donde hizo estragos debido a la sensibilidad de los materiales utilizados (Seemüller, 1989).

Agente causal

El agente causal es un fitoplasma (*Candidatus phytoplasma pyri*), organismo relacionado con las bacterias gram positivas (Eubacteria-Mollicute), sin pared celular (por lo que adopta diferentes formas, pleomorfo) que habita en el floema de las plantas afectadas.

Síntomas

Como su nombre lo indica, la enfermedad provoca un decaimiento general de la planta cuya severidad y característica depende de algunos factores. Se describen dos tipos de decaimiento: rápido o lento.

El decaimiento rápido se produce en aquellos árboles injertados sobre portainjertos susceptibles (perales silvestres orientales o algunos tipos de *Pyrus communis*). En ese caso, las plantas en verano o comienzo de otoño se marchitan rápidamente, se secan y su follaje se oscurece muriendo en cuestión de semanas o días.

En los árboles con decaimiento lento, también hacia fin de verano-principio de otoño, se observan tres tipos de síntomas: curvado, enrojecimiento y caída prematura del follaje. En el curvado, las hojas se pliegan hacia abajo por su nervadura principal mientras sus bordes lo hacen hacia arriba. A medida que avanza la estación éstas toman coloración rojiza la cual es diferente entre las variedades. A modo de ejemplo, la coloración producida por el decaimiento lento en la variedad Williams es púrpura brillante, en Abate Fetel rojo-vino, en Kaiser rojo muy oscuro, mientras que en algunas

variedades el follaje no se enrojece sino que se vuelve amarillo (Conference) o directamente se cae (Doyenne du Comice).

A raíz de los perjuicios ocasionados en otoño se generan problemas en la brotación y floración produciéndose incluso la muerte del árbol en la temporada siguiente.

Para comprender estas variaciones en síntomas debemos tener en cuenta que éstos son derivados de la acumulación de savia elaborada en la parte aérea ocasionada por perjuicios en el floema. Dado que esos perjuicios pueden ser también causados o aumentados por otros motivos, como la incompatibilidad variedad-portainjerto, es casi imposible, ante una planta aislada, conocer la causa sin efectuar un análisis de laboratorio y tomar en cuenta los demás factores que influyen. Sin embargo, el decaimiento ocasionado por fitoplasmas generalmente se registra en plantas aisladas y puede no distribuirse en todo el monte.

Al descubrir la zona de injerto de plantas con este tipo de síntomas se observa una línea oscura en el floema.

Aspectos que inciden sobre la evolución y magnitud de los síntomas

En condiciones de campo, el vigor de la combinación variedad-pie es más importante, en cuanto a determinar la magnitud de los síntomas, que la sensibilidad de un portainjerto. Por esa razón portainjertos moderadamente resistentes a la colonización por el fitoplasma pero poco vigorosos, como los membrilleros, evidencian síntomas acentuados. Mientras que portainjertos sensibles pero más vigorosos, como los francos de *Pyrus communis*, evidencian síntomas leves.

Los efectos de los ataques producidos en los primeros años de vida (los primeros 5-6 años de edad) son en general, como ocurre con otras enfermedades de este tipo, mucho más drásticos. Cuando las plantas son infectadas en etapas más avanzadas, normalmente manifiestan síntomas otoñales leves, pero rara vez los síntomas fuertes primaverales, salvo en aquellas combinaciones muy susceptibles.

La evolución de una planta afectada es diferente, como vimos, según el portainjerto sobre el cual está. Los árboles injertados sobre franco, pueden presentar desarrollo reducido, enrojecimiento precoz de las hojas, escaso cuajado de flores, y reducción del tamaño de frutos. Sin embargo, cuando el porta injerto es membrillero el cuadro sintomatológico puede evolucionar de dos maneras según sea la posterior re-infestación con psila y su vigor. Cuando la combinación es de vigor reducido y la planta está sujeta a ataques frecuentes de psila, el decaimiento lento lleva a la progresiva reducción de la actividad vegetativa con la eventual muerte del vegetal en 3-4 años. Cuando la combinación es de vigor medio a alto y las plantas no están sujetas al ataque de psila los síntomas permanecen 1-2 años y luego mejoran hasta llegar a la normalidad.

Una vez introducido a la planta, el patógeno tiene un ciclo diferente dependiendo del portainjerto. Durante la estación vegetativa tanto el floema de la parte aérea como de la raíz se encuentran funcionales, pero cuando la planta entra en receso, solamente el floema de la raíz queda en funcionamiento y allí entra en juego la relación entre el patógeno y el portainjerto. Los pies francos favorecen la multiplicación del fitoplasma por lo que éste puede permanecer en el floema de las raíces durante el receso. Contrariamente, los membrilleros no la favorecen y por lo

tanto impiden su supervivencia durante el invierno en el floema radicular comenzando las plantas la nueva temporada libres o con reducida infección.

Transmisión

Los principales medios para la transmisión de esta enfermedad son el uso de materiales vegetativos infectados y los insectos del género *Cacopsilla*.

La transmisión por materiales vegetativos es variable dada la irregular distribución del patógeno en la planta tanto en las diferentes partes de ésta como durante la temporada. Generalmente la transmisión por esta vía es mayor en plantas autoradicadas o sobre franco o *Pyrus* spp. y hacia fin del período vegetativo (otoño) cuando la planta alcanza su título máximo de fitoplasmas.

La transmisión por psila en cambio es el modo más eficiente tanto durante la temporada vegetativa como en el receso. Se ha comprobado que las psilas invernantes portan el fitoplasma y son las encargadas de realizar las primeras infecciones la temporada siguiente. A medida que avanzan las generaciones, éstas se vuelven proporcionalmente más infectivas al aumentar el número de plantas infectadas en el monte.

Control

Para evitar los perjuicios de esta enfermedad es necesaria la integración de varias medidas.

En primer lugar es conveniente partir de material propagativo libre de decaimiento, no tanto porque ésta sea la forma más importante de transmisión, sino porque puede significar el transporte de la enfermedad a larga distancia y a su vez con mayor impacto, ya que se da en las primeras etapas de vida de la planta.

Otro grupo de medidas son aquellas tendientes a evitar la transmisión actuando sobre el insecto vector, fundamentalmente en los primeras temporadas de instalado el monte. Para ello en otros países se dirige el control químico sobre las formas invernantes y las primeras generaciones de psila lo cual enlentece el aumento de la infección.

También contribuye evitar medidas que promuevan gran actividad vegetativa, que favorecen la infestación con psila (irrigación, fertilización nitrogenada, poda, etc.). Sin embargo, en algunos casos, manteniendo el control del insecto, aunque parezca contradictorio, se utilizan estas medidas como forma de ayudar a mejorar a las plantas con decaimiento lento y evitar su deterioro.

Otra medida conveniente es eliminar a las plantas que han permanecido enfermas por varias temporadas y que no se prevé su mejoría para evitar que sirvan de inóculo para el resto.

Si bien el uso de combinaciones poco vigorosas tiene sus ventajas (precocidad, eficiencia productiva, etc.) se debe tener en cuenta que son las más afectadas por el decaimiento. Es reconocido como una de las medidas más efectivas el uso de francos o plantas auto radicadas las cuales raramente muestran síntomas de decaimiento. En este caso se emplean medidas destinadas al control de su expansión vegetativa (poda de raíces).

Investigación de INIA sobre el decaimiento del peral.

La investigación llevada a cabo por INIA desde 1995 hasta el momento puede ser dividida en tres etapas.

En la primera etapa con la colaboración del Dr. Luciano Giunchedi de la Università degli Studi de Bologna se llevó a cabo un relevamiento y se diagnosticó la presencia de esta enfermedad en Uruguay.

En la segunda etapa (2005-2011) se ajustó el diagnóstico molecular en planta e insectos para luego realizar el seguimiento de la infección en un experimento de evaluación de diferentes variedades, portainjertos y filtros.

Por último en la tercera etapa, comenzada en el 2009, los estudios se enfocaron en el estudio de la enfermedad vinculada a su insecto vector.

Primera etapa: Relevamiento preliminar

Durante el mes de abril 1995 se realizó un relevamiento en el cual se tomaron 70 muestras de plantas de peral tanto del campo experimental de INIA Las Brujas como de la zona productora de Melilla. Se tomaron muestras de ramas 1-2 años registrándose el estado e historia de la planta: presencia de enrojecimiento, epinastia (curvado de hojas), defoliación, ataques de psila, variedad y porta injerto. Las mismas fueron enviadas al laboratorio del Dr. Giunchedi donde fueron analizadas para conocer si estaban infectadas por fitoplasmas usando la tinción de floema en cortes con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), reactivo fluorescente que se adhiere al ADN evidenciando la presencia de estos organismos. Como comparación, un pequeño grupo fue analizado por PCR (reacción de cadena de la polimerasa) de reciente implementación para este patógeno en ese momento. Los resultados se muestran en el cuadro 1. En total se detectaron fitoplasmas en el 50% de las plantas relevadas.

Con los resultados y la información colectada se efectuó un análisis de asociación entre detección de fitoplasmas y diferentes características de la planta relevada construyendo un damero de contingencias que tomó en cuenta las cuatro posibilidades (atributo-infectada, atributo-sin infección, atributo-infectadas, atributo-no infectadas) mediante la prueba χ^2 . Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la detección de fitoplasmas y la infestación con psila y con la presencia de color rojizo en el follaje y la defoliación prematura (cuadro 2).

Cuadro 1. Detección de fitoplasmas mediante tinción DAPI en árboles de peral de INIA LB y Melilla, abril 1995.

<i>Cultivar</i>	<i>Porta injerto</i>	<i>Lugar</i>	<i>Muestras con fitoplasmas</i>	<i>%</i>	<i>Total de muestras</i>
Williams	<i>P.betulifolia</i>	INIA LB A ¹	5	83	6
Sta. María	<i>P.betulifolia</i>	INIA LB A ¹	3	50	6
Favorita	<i>P.betulifolia</i>	INIA LB A ¹	3	50	6
		SUBTOTAL	11	61	18
Williams	<i>P.betulifolia</i>	INIA LB B ²	2	33	6
Sta. María	<i>P.betulifolia</i>	INIA LB B ²	1	17	6
Favorita	<i>P.betulifolia</i>	INIA LB B ²	2	33	6
		SUBTOTAL	5	28	18
R.Williams	Membrillo	INIA LB C	1	50	2
Packham's	<i>P.betulifolia</i>	Melilla A	2	67	3
Williams	<i>P.betulifolia</i>	Melilla A	0	0	3
Williams	<i>P.betulifolia</i>	Melilla B	3	50	6
Williams	Membrillo	Melilla C	3	10	3
				0	
Williams	<i>P.betulifolia</i>	INIA LB D	1	25	4
Williams	<i>P. calleryana</i>	INIA LB D	2	50	4
Williams	Peracho	INIA LB D	3	75	4
Williams	<i>P. communis</i>	INIA LB D	2	50	4
		TOTAL	35	50	70

¹ Espaldera con fuerte ataque de psila.

² Espaldera sin ataque de psila.

Cuadro 2. Asociación entre la detección de fitoplasmas mediante tinción DAPI y algunos parámetros relevados en 1995.

Característica	Grupo analizado	Fitoplasma Detectado	Fitoplasma no detectado	Significancia prueba chi ²
Alta infestación de psila	INIA LB A	11	7	9%
Baja infestación de psila	INIA LB B	16	20	
Color rojizo en follaje	Total de las muestras	23	16	10%
Color normal		7	14	
Color rojizo en follaje	Porta injerto <i>P. betulifolia</i>	15	12	8%
Color normal		7	18	
Color rojizo en follaje	Williams	15	10	10%
Color normal		3	9	
Color rojizo en follaje	Zona Melilla	7	6	2%
Color normal		0	9	
Hojas curvadas	Zona Melilla	5	3	15%
Follaje normal		0	4	
Caída prematura de hojas	Williams	16	7	1%
Sin caída		5	14	
Caída prematura de hojas	Zona Melilla	6	0	6%
Sin caída		2	4	

Segunda etapa: ajuste del diagnóstico molecular en INIA y seguimiento de la infección en diferentes combinaciones de variedad, porta injerto y filtro.

A) Ajuste del diagnóstico molecular.

Durante el período 2006-2007 se realizó el ajuste de la detección del fitoplasma causante del decaimiento del peral por PCR en nuestras condiciones (Martínez, 2008). En ese trabajo se determinó cuál eran el protocolo de extracción de ADN, el momento del ciclo y la parte de la planta para la toma de muestra, más adecuados para la detección de fitoplasmas en peral. De acuerdo a los resultados obtenidos, que concuerdan con la bibliografía, el mejor momento para detectar a este patógeno en perales es en otoño (cuadro 3), el órgano donde mejor se detectó fue en ramas de 1-2 años (figura 1) y el protocolo con el cual se obtuvieron mejores resultados el de Marzachi *et al*, 1999.

Cuadro 3. Detección de fitoplasmas en peral mediante PCR, ADN extraído mediante protocolo de Marzachi *et. al.* (1999). Influencia de tejido y momento de muestreo.

Planta	1.1.1.1 Momento de extracción de muestra							
	Diciembre 06 (crec. vegetativo)			Marzo 07 (otoño)			Junio 07 ¹ (receso invernal)	
	Tallo	Nervadura	Raíz	Tallo	Nervadura	Raíz	Tallo	Raíz
1-3	-	-	+	+	+	-	+	-
1-4	+ ²	-	-	+	+	-	-	-
2-1	-	+	-	+	-	-	-	-
2-2	-	-	-	+	-	-	-	-
9-4	-	-	-	+	-	-	-	-
58-1	-	-	-	+	+	-	-	-
58-2	-	-	-	+	+	-	-	-
79-3	-	-	-	+	+	-	-	-
79-4	-	-	-	+	+	-	+	-

- 1 No se analizaron nervaduras en el mes de Junio ya que los árboles no tenían hojas en ese momento.
- 2 += Detección de fitoplasmas mediante PCR.

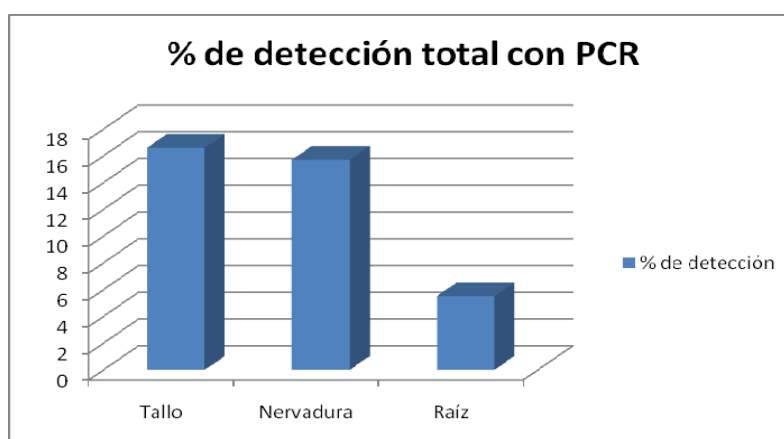


Figura 1. Porcentaje de detección de fitoplasmas en un total de 27 muestras analizadas (nueve en cada uno de los tejidos usados, dic. 06-jun. 07).

En resumen, el procedimiento ajustado correspondió al análisis de ramas de 1-2 años (preferentemente floema de su base) en otoño siguiendo el procedimiento de extracción de ADN de Marzachi *et al* 1999, con la realización de una PCR con primers específicos para fitoplasmas de grupo SrX (Lorenz, K. *et al.* 1995) (f01: 5' CGGAACTTTTAGTTTCAGT 3' y 5' AAGTGCCCAACTAAATGAT 3') y con el siguiente ciclo: 94° C 1 minuto, 55° C 1 minuto y 15 segundos (34 repeticiones), 72° C 1 minuto y 30 segundos y 72° C 10 minutos.

Utilizando esta metodología ajustada se logró amplificar en aquellas plantas con fitoplasmas de este grupo una banda con una dimensión cercana a 930 pb (figura 2). Para tener mayor certeza que esa banda corresponde al fitoplasma causante de decaimiento del peral, a continuación se observó el patrón de la longitud de los

fragmentos del amplicon (RFLP) cortados por la enzima de restricción RSA I (786.5 y 242 pb, figura 3).

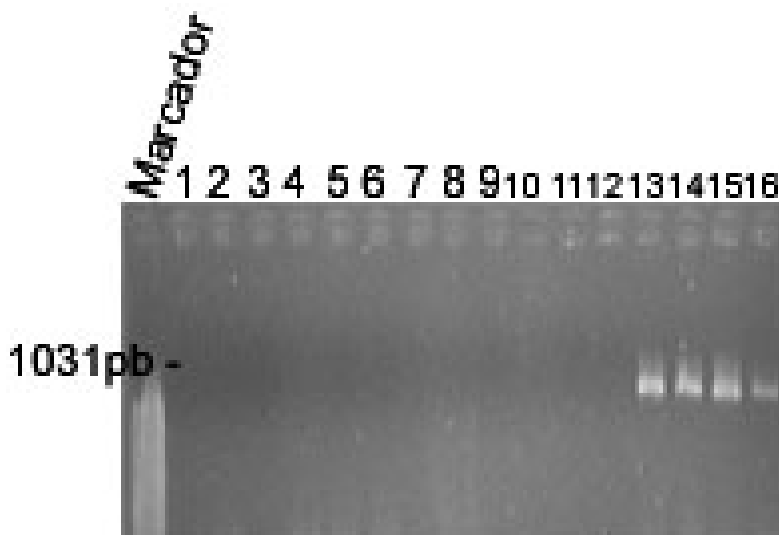


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% en TAE 0.5X de los productos de la amplificación por PCR obtenida con los primers f01y r01.

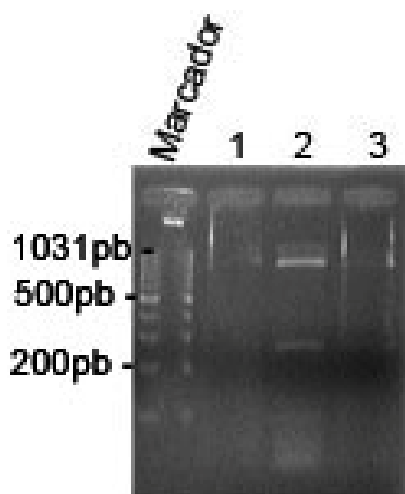


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% en TAE 0.5X, restricción con RsA I. En el gel se observan en la línea 2 dos bandas correspondientes a la digestión.

B) Seguimiento de experimento en combinaciones de variedades/filtro/portainjerto.

Durante esta segunda etapa se realizó el seguimiento desde el punto de vista de esta enfermedad de un experimento en el cual se compararon 20 combinaciones diferentes de variedades de pera, portainjertos y filtros en un diseño de parcelas al

azar con cuatro repeticiones. El detalle de las mismas se muestra en el cuadro 4. La parcela constaba de cuatro plantas de las cuales se evaluaron las dos centrales.

Cuadro 4. Combinaciones de variedades-porta injertos y filtros incluidas en el experimento.

Tratamientos	Combinación	Abreviación	Vigor de la combinación
1	Williams/Old Home/membrillo BA29	Williams/OH/BA29	Medio
2	Williams/Beurre Hardy/membrillo BA29	Williams/BH/BA29	Medio
3	Williams/ membrillo BA29	Williams/BA29	Medio
4	Williams/ Old Home/membrillo EMC	Williams/OH/EMC	Bajo
5	Williams/Beurre Hardy/membrillo EMC	Williams/BH/EMC	Bajo
6	Williams/membrillo EMC	Williams/EMC	Bajo
7	Williams/ Old Home/membrillo Adams	Williams/OH/AD	Bajo
8	Williams/ Beurre Hardy /membrillo Adams	Williams/BH/AD	Bajo
9	Williams/ membrillo Adams	Williams/AD	Bajo
10	Packham's/ membrillo BA29	Packham's/BA29	Medio
11	Packham's/ membrillo EMC	Packham's /EMC	Bajo
12	Packham's/ membrillo Adams	Packham's / AD	Bajo
13	Abate Fetel/ membrillo BA29	Abate Fetel/ BA29	Medio
14	Abate Fetel/ membrillo EMC	Abate Fetel/EMC	Bajo
15	Abate Fetel/ membrillo Adams	Abate Fetel/AD	Bajo
16	Abate Fetel - autorradicada	Abate Fetel	Alto
17	Williams/ Old Home x Farmingdale 40	Williams/OHF 40	Alto
18	Williams/ Old Home x Farmingdale 69	Williams/OHF 69	Alto
19	Abate Fetel/ Old Home x Farmingdale 40	Abate Fetel/OHF 40	Alto
20	Abate Fetel/ Old Home x Farmingdale 69	Abate Fetel/OHF 69	Alto

El experimento fue plantado en el año 2003 y el seguimiento fue realizado en el período 2005-2011. Éste consistió de la evaluación de síntomas y el análisis de fitoplasmas en otoño. Los resultados fueron sujetos a análisis de variancia con posterior separación de medias y a un análisis de la asociación entre presencia de fitoplasmas y desarrollo de síntomas.

B1) Evaluación de síntomas atribuibles al decaimiento del peral.

La evaluación de síntomas fue efectuada en tres oportunidades, la primera a su inicio, la siguiente a los 15-20 días, y la última, previo a la entrada en receso. En general, con variaciones entre años, correspondieron a: fin de marzo-principio de abril, mediado-fin de abril y principio de mayo. Los síntomas evaluados fueron epinastia (“curvado” de hojas), enrojecimiento y defoliación. Para evaluar epinastia y enrojecimiento se usó una escala arbitraria 0-5 donde 0 = sin síntomas y 5= la mayor expresión de síntomas.

Con los resultados se realizó un análisis de variancia con posterior separación de medias para ver diferencias entre los tratamientos. Para determinar una tendencia general en el período se promediaron los resultados de todas las temporadas de forma de señalar cuál/es de las combinaciones presentaban mayor magnitud de síntomas en el período (cuadros 5, 6 y 7).

Este análisis mostró que aquellas combinaciones autoradicadas o sobre OHx F 40 ú OHx F 69 presentaron menor intensidad de síntomas (fundamentalmente enrojecimiento y defoliación) frente a aquellas en que se utilizan membrillero como portainjerto.

Cuadro 5. Análisis del promedio de los resultados de las evaluaciones del período. Epinastia.

Tratamiento		Primera evaluación		Segunda evaluación		Tercera evaluación	
1	W/OH/BA29	2.8	e	2.7	f	3.1	c
2	W/BH/BA29	2.1	cde	2.3	bcdef	2.5	bc
3	W/BA29	2.1	cde	2.4	bcdef	2.6	bc
4	W/OH/EMC	2.0	cde	2.4	def	2.8	bc
5	W/BH/EMC	2.3	de	2.2	abcdef	2.5	bc
6	W/EMC	2.0	cd	2.1	abcde	2.6	bc
7	W/OH/AD	2.1	cde	2.5	ef	3.1	bc
8	W/BH/AD	2.2	cde	2.3	bcdef	2.9	bc
9	W/AD	2.3	cde	2.5	def	2.6	bc
10	PK/BA29	1.9	cd	2.2	abcdef	2.5	bc
11	PK/EMC	2.0	cd	2.0	abcd	2.2	b
12	PK/AD	2.0	cde	1.9	abc	2.4	bc
13	AF/BA29	1.6	bc	2.0	bcdef	1.9	a
14	AF/EMC	1.9	cd	2.2	cdef	1.8	a
15	AF/AD	1.9	cd	2.0	bcdef	2.0	a
16	AF	0.7	a	1.5	a	1.5	a
17	W/OHF40	1.7	bcd	2.2	bcdef	2.7	bc
18	W/OHF69	1.7	bcd	2.2	abcde	2.8	bc
19	AF/OHF40	1.8	bcd	2.3	bcdef	2.8	bc
20	AF/OHF69	1.2	ab	1.7	ab	1.7	a
Coeficiente de variación (%)		9		6		8	

Cuadro 6. Análisis del promedio de los resultados de las evaluaciones del período.

Enrojecimiento.

Tratamiento		Primera evaluación		Segunda evaluación		Tercera evaluación	
1	W/OH/BA29	1.0	ef	1.4	f	2.2	defg
2	W/BH/BA29	0.4	abcd	0.9	def	2.4	efg
3	W/BA29	0.6	de	1.2	ef	2.3	defg
4	W/OH/EMC	0.5	cd	0.8	ef	1.9	bcde
5	W/BH/EMC	0.4	bcd	0.8	de	2.1	defg
6	W/EMC	0.7	de	1.3	ef	1.9	cdef
7	W/OH/AD	0.6	de	1.0	ef	2.0	cdef
8	W/BH/AD	0.5	de	1.3	ef	2.3	defg
9	W/AD	0.5	de	1.1	ef	1.7	bcde
10	PK/BA29	0.7	de	0.7	cd	1.1	abc
11	PK/EMC	0.5	de	0.8	cd	1.5	bcde
12	PK/AD	0.7	de	0.8	bcd	1.3	abcd
13	AF/BA29	1.4	f	2.1	g	3.0	fg
14	AF/EMC	2.2	g	2.6	g	3.6	g
15	AF/AD	2.0	g	2.5	g	3.7	fg
16	AF	0.1	abc	0.3	bcd	1.0	ab
17	W/OHF40	0.0	a	0.1	ab	0.8	ab
18	W/OHF69	0.1	ab	0.2	abc	0.8	ab
19	AF/OHF40	0.1	a	0.0	a	0.6	a
20	AF/OHF69	0.4	abcd	0.5	de	1.3	abc
Coeficiente de variación (%)		13		10		14	

Cuadro 7. Análisis del promedio de los resultados de las evaluaciones del período.

Defoliación.

Tratamiento		Primera evaluación		Segunda evaluación		Tercera evaluación	
1	W/OH/BA29	0.8	bcd	2.4	fg	4.0	c
2	W/BH/BA29	0.3	abc	1.8	defg	3.0	c
3	W/BA29	0.1	ab	1.6	def	3.4	c
4	W/OH/EMC	1.0	cd	2.8	efg	3.8	c
5	W/BH/EMC	0.3	abc	1.8	defg	3.3	c
6	W/EMC	0.6	abcd	2.2	fg	3.8	c
7	W/OH/AD	0.5	abcd	2.5	fg	4.0	c
8	W/BH/AD	0.4	abc	1.9	efg	3.3	c
9	W/AD	0.6	abcd	2.4	fg	4.0	c
10	PK/BA29	0.6	abcd	2.1	efg	3.1	c
11	PK/EMC	0.4	abc	2.2	fg	3.2	c
12	PK/AD	1.3	d	2.4	fg	3.2	c
13	AF/BA29	0.4	abc	1.9	efg	3.3	c
14	AF/EMC	0.3	abc	1.7	defg	3.0	c
15	AF/AD	0.6	abcd	2.3	fg	3.6	c
16	AF	0.0	a	0.1	a	0.8	a
17	W/OHF40	0.4	abc	1.0	cde	1.6	b
18	W/OHF69	0.0	a	0.7	bc	1.1	ab
19	AF/OHF40	0.1	ab	1.3	cde	1.8	b
20	AF/OHF69	0.0	a	0.4	ab	0.8	a
Coeficiente de variación (%)		21		12		9	

B2) Detección de fitoplasmas.

Coincidiendo aproximadamente con la segunda fecha de evaluación se analizó por PCR una de las dos plantas centrales de cada parcela durante el período (total 80 plantas).

En la figura 4 se muestra el porcentaje de muestras en las que fueron detectados fitoplasmas. Se observa que el porcentaje de detección fue muy variable entre temporadas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cuanto a detección de fitoplasmas en ninguna de las temporadas estudiadas.

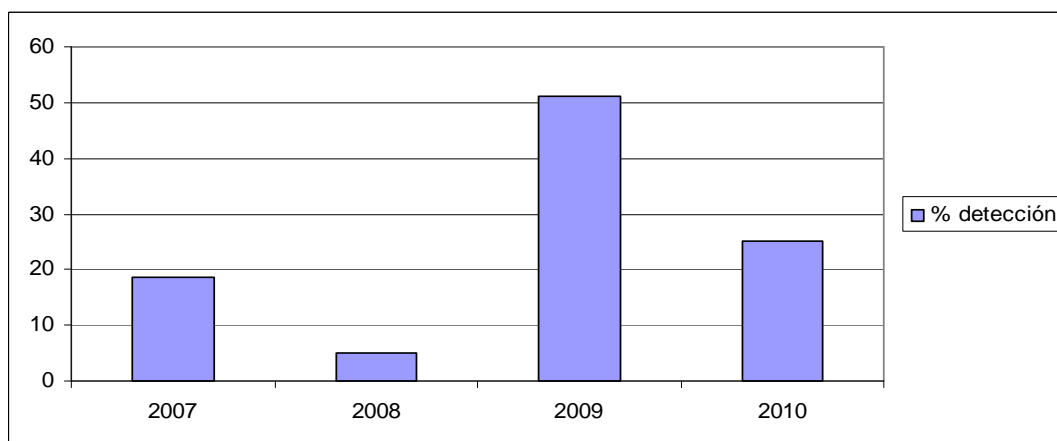


Figura 4. Porcentaje de detección de fitoplasmas en ensayo de ariedades/portainjertos de peral sobre un total de 80 muestras en el periodo 2007-2010.

Con esos resultados se analizó la evolución de la detección en el tiempo encontrándose que en solamente seis plantas (22%) fueron detectados fitoplasmas en dos temporadas consecutivas, correspondientes a los portainjertos OHxF40, OHxF 69, AD y BA29. Únicamente en una planta se detectaron fitoplasmas en tres temporadas seguidas correspondiendo a la combinación W/BH/BA29. Luego, en dos plantas la detección se registró en tres oportunidades cualesquiera en la serie y en ocho en dos oportunidades (figura 5).

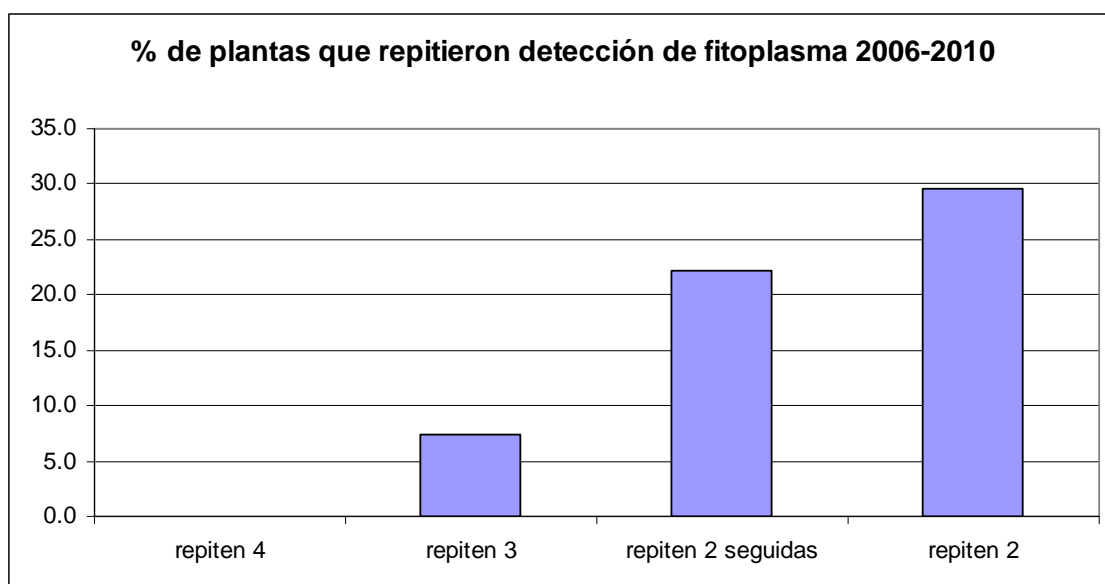


Figura 5. Porcentaje de plantas en las que se detectaron fitoplasmas en más de una temporada sobre un total de 80 muestras.

B3) Relación entre detección de fitoplasmas y variedades, portainjertos con y sin filtros.

Con los resultados de la detección de fitoplasmas se estudió si existía asociación entre ésta y alguna variedad, portainjerto o filtro. Para ello se realizó la prueba χ^2 a los datos presentados como alternativas. Únicamente se encontró asociación estadísticamente significativa entre la detección en otoño 2007 y la variedad Abate Fetel. En el cuadro 8 se muestra el porcentaje de detección según variedad, se observa que a pesar de no existir asociación significativa en otras temporadas, la detección en esta variedad siempre fue mayor.

Tampoco se encontró asociación entre la detección y el porta injerto usado en esa planta. Sin embargo, al igual que el caso anterior, hubo una tendencia a que la detección fuera mayor en plantas autoradicadas y con los portainjertos OHxF 40 y OHxF 69 (cuadro 9).

Cuadro 8. Porcentaje de detección de fitoplasmas por PCR según variedad.

Variedad	2007	2008	2009	2010	% Prom.	Nº total plantas
Abate Fetel	41	4	54	54	38	24
Packham's	27	0	50	41	30	12
William's	7	7	50	29	23	44
Significancia asociación	5%	--	--	--	--	80

Cuadro 9. Porcentaje de detección de fitoplasmas por PCR según portainjerto.

Porta injerto	2007	2008	2009	2010	promedio
BA29	20	0	40	15	19
EMC	20	0	50	15	21
ADAMS	15	10	55	15	24
Autoradicada	50	0	25	25	25
OHxF40	13	13	75	38	35
OHxF69	25	13	63	38	35

B4) Relación entre detección de fitoplasmas y síntomas.

Al igual que en el ítem anterior se estudió si existía asociación entre la detección de fitoplasmas y los síntomas evaluados, discriminando entre las diferentes posibilidades (variedades, porta injertos, etc.). Para ello se calculó el número de plantas con determinado grado de síntomas y se distribuyeron de acuerdo a si existía o no detección de fitoplasmas.

Usando el total de las plantas analizadas contra los síntomas en los tres momentos de evaluación se encontró asociación estadísticamente significativa entre la detección y la presencia de epinastia y enrojecimiento superior al grado 3 (2007 y 2010).

Separando a las plantas según la variedad, para la variedad Abate Fetel se encontró asociación entre detección y enrojecimiento en 2008, para Packamps con epinastia en 2009 y enrojecimiento en 2007 y 2009, y para Williams con epinastia en 2007 y enrojecimiento 2010.

Haciendo lo mismo según los porta injertos se encontró asociación entre detección de fitoplasmas y presencia de epinastia para EMC en 2010, AD en 2009, y OHxF 40 en 2007 y con enrojecimiento para BA29 (2007,2010), EMC (2010), AD (2009), OHxF 40 (2007) y OHxF 69 (2007).

Tercera etapa: detección en psila en la estación y seguimiento de la detección en experimento de control de psila

A) Detección en psila.

Para estudiar la variación en la detección en psila durante el ciclo se muestrearon individuos del vector en diferentes cultivos durante el período mayo 2009-abril 2011. Los individuos fueron separados en grupos de 5-10 (según disponibilidad) y analizados mediante la prueba PCR. La cantidad de insectos mínima a incluir en cada grupo para obtener detección fue calculada en experimentos previos.

Los cultivos donde se muestreó fueron: A) INIA LB Experimento variedades y porta injertos, B) INIA LB experimento de porta injertos para la variedad Abate Fetel, C) INIA LB experimento de control de psila, D) Melilla, monte con alta infestación con psila.

En la figura 6 se muestra la evolución de la detección así como de la cantidad de insectos muestreados en los diferentes montes.

Como se puede apreciar se pudieron detectar fitoplasmas en el vector en todos los muestreos.

B) Detección en experimento de control de psila.

En esta prueba se seleccionaron diez plantas (cinco con síntomas y cinco sin síntomas) correspondientes a cuatro opciones: 1) buen control del insecto, 2) plantas testigo sin insecto, 3) testigo sin tratar con infestación y 4) tratamiento con menor control. Estas plantas se analizaron por PCR para conocer si estaban infectadas por fitoplasmas. Los tratamientos insecticidas fueron aplicados en abril 2010 y el monte correspondía a la variedad Williams sobre membrillo posiblemente afrancado. En el cuadro 10 se muestran los resultados de la detección habiéndose encontrado una asociación significativa entre presencia de síntomas y detección de fitoplasmas con estos resultados.

Cuadro 10. Detección de fitoplasmas y presencia de síntomas en experimento de control de psila.

Tratamiento	Enrojecimiento/Epinastia	Nº plantas	Nº PCR+	% detec.
Buen control	con síntomas	6	6	100
	sin síntomas	5	1	20
Testigo sin psila	con síntomas	5	2	40
	sin síntomas	5	0	0
Testigo sin tratar	con síntomas	5	2	40
	sin síntomas	5	1	20
Menor control	defoliadas y con síntomas	10	10	100

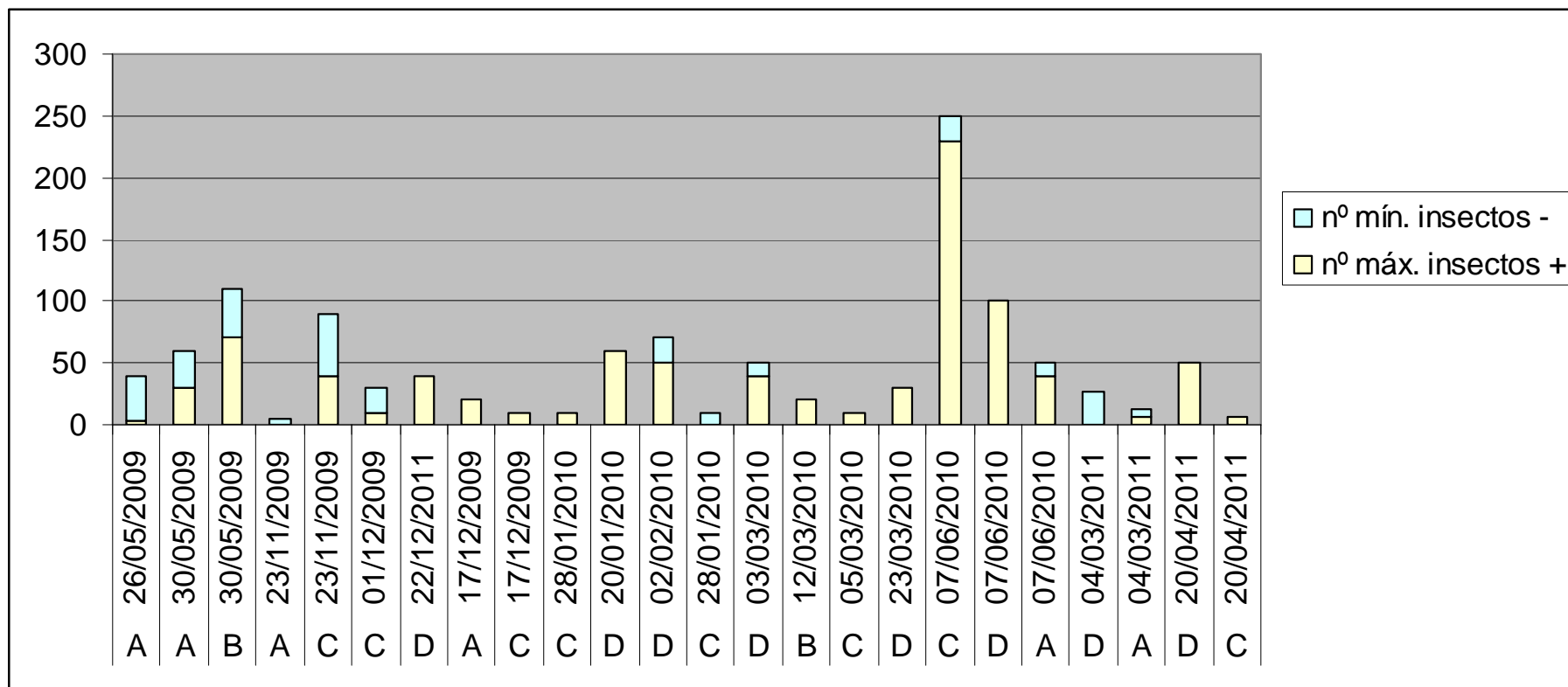


Figura 6. Detección de fitoplasmas en psila en el período mayo 2009-abril 2010. Montes: A) INIA LB Experimento variedades y porta injertos, B) INIA LB experimento de porta injertos para la variedad Abate Fetel, C) INIA LB experimento de insecticidas para el control de psila, D) Melilla, monte con alta infestación con psila.

CONCLUSIONES

- Se confirmó la presencia en nuestro país de la enfermedad conocida como decaimiento del peral.
- Mediante la técnica de PCR se puede detectar al fitoplasma que la causa tomando las muestras de floema de la base de ramas de 1-2 años en otoño.
- La importancia de esta enfermedad depende de la combinación variedad/portainjerto utilizada.
- Su efecto se confunde con otros factores que provocan la misma sintomatología (compatibilidad).
- Deberá ser un factor a considerar en la elección de un portainjerto, fundamentalmente al utilizar combinaciones poco vigorosas ya que su efecto agravaría los problemas de afinidad.
- Su incidencia está muy relacionada con el nivel de la infestación de psila, habiéndose encontrado más frecuentemente en montes con alta infestación.
- Se detectó al patógeno en su vector durante todo el año confirmando lo observado en otros países.

Bibliografía

- Giunchedi, L. 2003. Malattie da virus, viroidi e fitoplasmi degli alberi da frutto Edagricole. Bologna. 337 p.
- Lorenz, K. H., Schneider, B., Ahrens, U., and Seemuller, E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85:771-776.
- Martínez, A. 2008. Detección de fitoplasmas en plantas de peral y su relación con desórdenes del cultivo. Trabajo Especial II. Facultad de Ciencias. 116 p.
- Marzachi, C., Alma, A., D'Aquilio, M., Minuto, G., Boccardo, G., 1999. Detection and identification of phytoplasma infecting cultivated and wild plants in Liguria (Italian Riviera). *J. Plant Pathol.* 81, 127-136.
- Seemüller, E. 1989. Pear decline. In. *Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders*. SP0003. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics. Washington State University. p 188-201.