Virus de cucurbitáceas en el sudeste español: viejos conocidos y nuevas amenazas, como el virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV)

Miguel Juárez y Miguel A. Aranda

Phytoma España nº. 251 (agosto/septiembre) pp 31-36
Blog cienciacebas

Índice

1. Un poco de historia: Muestreos anteriores a 2011 en cucurbitáceas en Murcia

2. Cómo hicimos la primera identificación de ToLCNDV

3. ¿Qué se sabe de este virus?

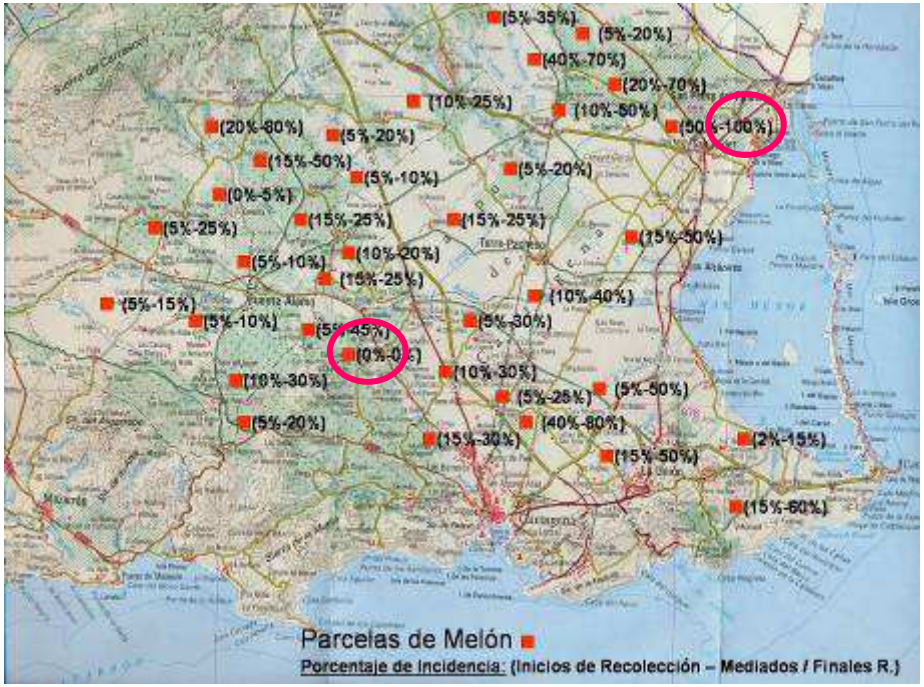
4. Métodos de diagnóstico

5. ¿Qué podemos esperar?

6. Medidas a aplicar

Muestreos en Campo de Cartagena, Murcia (2003-2004)

Parcelas de melón

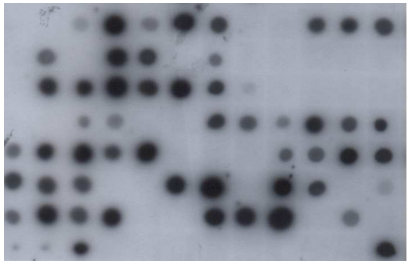


Parcelas de calabacín

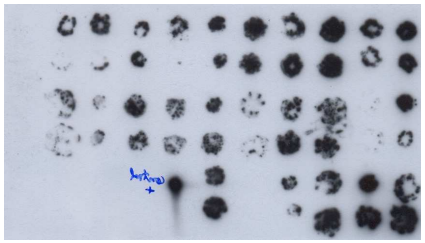
Muestreo de plantas con síntomas de virosis

Muestreos en Campo de Cartagena (2003-2004). Síntomas

Muestreos en Campo de Cartagena (2003-2004). Diagnóstico de virus



Ej. detección de WMV por hibridación en "dot-blot"



Ej. detección de CABYV por hibridación en improntas de secciones de pecíolos

Virus	Acrónimo	Familia
Beet pseudo yellows virus	BPYV	*Closteroviridae*
Virus del falso amarilleo de la remolacha		
Cucurbit aphid-borne yellows virus	CABYV	*Luteoviridae*
Virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones		
Cucumber mosaic virus	CMV	*Bromoviridae*
Virus del mosaico del pepino		
Cucumber vein yellowing virus	CVYV	*Potyviridae*
Virus del amarilleo de las venas del pepino		
Cucurbit yellow stunting disorder virus	CYSDV	*Closteroviridae*
Virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas		
Melon necrotic spot virus	MNSV	*Tombusviridae*
Virus de las manchas necróticas del melón		
Papaya ring spot virus	PRSV	*Potyviridae*
Virus de las manchas anulares de la papaya		
Watermelon mosaic virus	WMV	*Potyviridae*
Virus del mosaico de la sandía		
Zucchini yellow mosaic virus	ZYMV	*Potyviridae*
Virus del mosaico amarillo del calabacín		

Muestreos en Campo de Cartagena (2003-2004). Virus en melón y calabacín

Virus	Muestras infectadas (% de infección)		
	Melón[a]	Calabacín[b]	TOTAL
CABYV	583 (83,3)	147 (65,6)	730 (79,0)
CYSDV	220 (31,4)	10 (4,5)	230 (24,9)
BPYV	156 (22,3)	47 (21,0)	203 (22,0)
WMW	149 (21,3)	14 (6,2)	163 (17,6)
CVYV	21 (3,0)	63 (28,1)	84 (9,1)
MNSV	40 (5,7)	1 (0,4)	41 (4,4)
CMV	34 (4,9)	1 (0,4)	35 (3,8)
ZYMV	25 (3,6)	7 (3,1)	32 (3,4)
PRSV	17 (2,4)	3 (1,3)	20 (2,2)

700 muestras de melón, 224 muestras de calabacín de 48 parcelas. 90% infectadas con alguno de los virus

Muestreos en Campo de Cartagena (2003-2004). Infecciones mixtas

Infección[a]	**Muestras infectadas (% del total de las muestras infectadas)**[b]		
	Melón	Calabacín	TOTAL
Doble	**299 (46,3)**	**82 (46,6)**	**381 (46,5)**
CABYV-CYSDV	117 (18,1)	-	117 (14,2)
CABYV-WMV	98 (15,2)	-	98 (11,9)
CABYV-BPYV	52 (8,0)	42 (23,9)	94 (11,4)
CABYV-CVYV	-	29 (16,5)	29 (3,5)
Triple	**105 (16,3)**	**17 (9,7)**	**122 (14,8)**
BPYV-CABYV-CYSDV	99 (15,3)	4 (2,3)	103 (12,5)
Más de tres	**22 (3,4)**	**-**	**22 (2,7)**
PRSV-ZYMV-MNSV-WMV-CABYV	2 (0,3)	-	2 (0,2)
PRSV-ZYMV-MNSV- WMV-CABYV-CVYV	4 (0,6)	-	4 (0,5)
PRSV-ZYMV-MNSV-CMV-WMV-CABYV-CVYV	2 (0,3)	-	2 (0,2)
Total	**426 (65,9)**	**99 (56,2)**	**525 (63,9)**

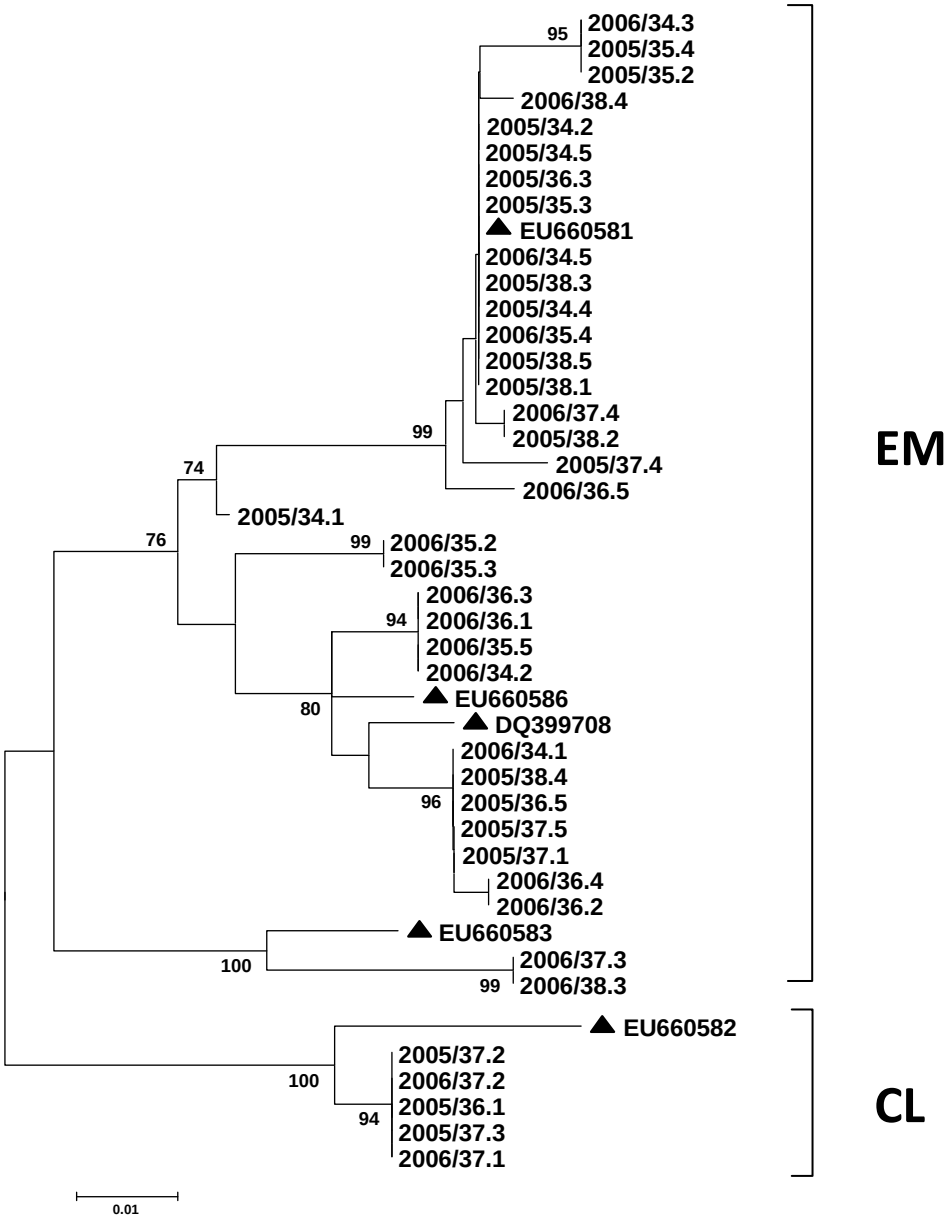
Muestreos en Campo de Cartagena (2003-2004). Conclusiones

1. **El virus prevalente fue CABYV.**

1. **Virus transmitidos por mosca blanca (CYSDV, BPYV y CVYV) siguieron a CABYV en importancia, con frecuencias próximas al 30%.**

2. **La proporción de infecciones mixtas fue muy alta, superior al 60%.**

Muestreos 2005-2011. Nuevos virus: cepa Emergente del virus del mosaico de la sandía (WMV-EM)

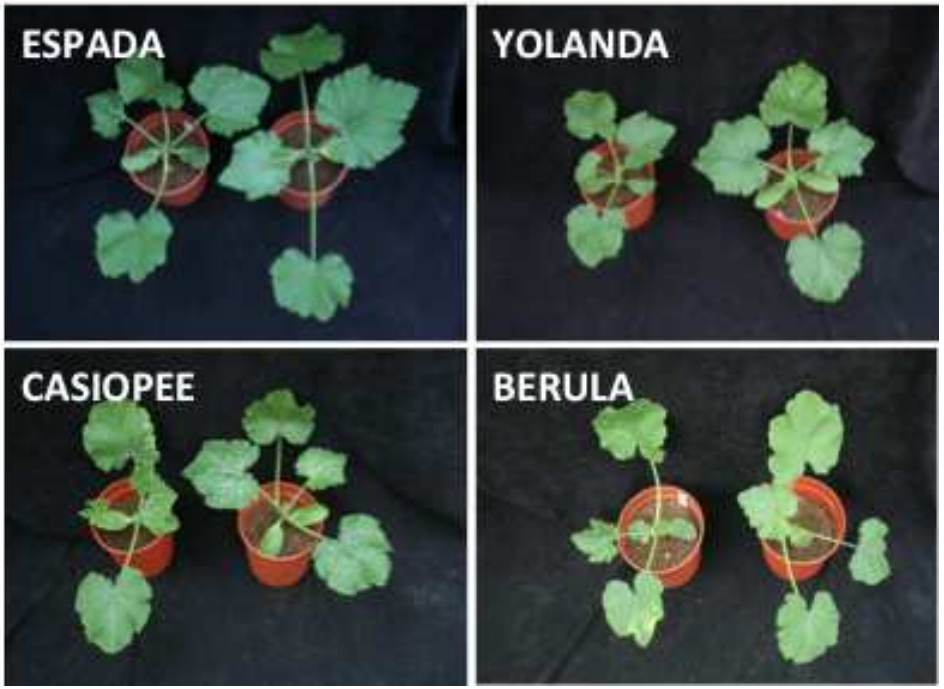


Muestreos 2005-2011. Nuevos virus: virus Marroquí del mosaico de la sandía (MWMV)

A

Cultivar	Gravedad de síntomas (0-4)
Berula	3,5
Alexander	3,5
SF-9423	3,5
Espada	3,5
Hobbit	3,7
Yolanda	3,5
Negro Belleza	4
Casiopee	3,8
Pixar	3,8
Lucía	4
Cora	3,5
Amalia	3,5
Taylor	3,5
Brillante	3
Charlotte	3,5
Skandia	3,5
Amalthee	3,5
Jedida	3,5
Kouros	3,2

B



Muestreos 2005-2011. Conclusiones

1. **Han aparecido dos virus nuevos, la cepa emergente de WMV, y MWMV.**

2. **CABYV siguió siendo el virus prevalente.**

3. **Durante este periodo, al menos en Campo de Cartagena, la importancia de las virosis transmitidas por mosca blanca cedió terreno frente a las trasmitidas por pulgones. OJO!! No tenemos datos cuantitativos de la calidad de los del muestre 2003-2004.**

1. **No hemos vuelto a detectar BPYV en Campo de Cartagena.**

ToLCNDV

Cronología de la detección

- **En el otoño de 2011, un número indeterminado de plantas de calabacín con sospecha de estar infectadas por algún virus causante de "mosaicos" en hoja fueron negativas en análisis ELISA frente a "*Potyvirus* " y otros virus conocidos (SqMV, CGMMV,..)**

ToLCNDV

Cronología de la detección

- **Una misma situación se repitió durante el otoño de 2012, con una incidencia variable, de entre un 2% y un 80% en al menos 12 parcelas y distribuidas por toda la Comarca de Campo de Cartagena.**

Cultivo de calabacín en aire libre

Cultivo de calabacín en invernadero

ToLCNDV

Sintomatología: Calabacín

- **En infección temprana (entre 1 y 2 semanas de edad), fuerte rizado y amarilleo de las hojas jóvenes, con aspecto de una infestación incipiente por pulgones.**
- **En este estadio las plantas detienen su crecimiento y la infección no deja a las plantas evolucionar y es imposible que la planta pueda llegar a dar frutos.**

ToLCNDV

Sintomatología: Calabacín

- **Detalle de hojas en plantas desarrolladas:**

Fase inicial infección:
Clorosis internervial

Estadio más avanzada:
Mosaico con suave abullonado.

ToLCNDV

Sintomatología: Calabacín

- **Plantas desarrolladas en <u>invernadero</u>: Deformación foliar hacia el haz o "acucharamiento"**

ToLCNDV

Sintomatología: Calabacín

- **Plantas desarrolladas en <u>cultivo de aire libre</u>: Deformación foliar hacia el envés y deformaciones variadas.**

ToLCNDV

Sintomatología: Calabacín

- **En frutos de plantas desarrolladas: Rizado suave de la piel con suaves protuberancias en los frutos más desarrollados.**

ToLCNDV

Cómo hicimos la primera identificación del virus

GGGTTGTGAAGGCCCTTGTAAGGTGCAATCGTTTGAAT
CCCGGCACGATGTCTCGCATATTGGCAAAGTCATGTGT
GTTAGTGATGTTACTCGAGGCACCGGACTCACACATCG
CGTAGGCAAGCGATTTTGTGTGAAATCTGTCTATGTACT
GGGAAAAATATGGATGGATGAAAATATCAAAACTAAAA
ATCATACTAATAGTGTTATGTTCTTTCTTGTTCGTGACCG
GCGTCCAACCGGAACCCCTCAAGATTTTGGGGAAGTTT
TCAATATGTTTGATAATGAACCTAGCACAGCCACGGTG
AAGAACATGCATCGTGATCGTTATCAAGTCTTACGGAA
GTGGCATGCTACTGTGACGGGAGGAACGTATGCATCAA
GGGAGCAAGCATTAGTTAGGAAGTTTGTTAGGGTTAAT
AATTATGTTGTTTACAATCAACAAGAGGCCGGCAAGTA
TGAGAATCATACTGAAAATGCATTAATGTTGTATATGGC
GTGTACA

→ **Extracto de DNA**

↓

PCR con cebadores genéricos para begomovirus

↓

Secuenciación

↓

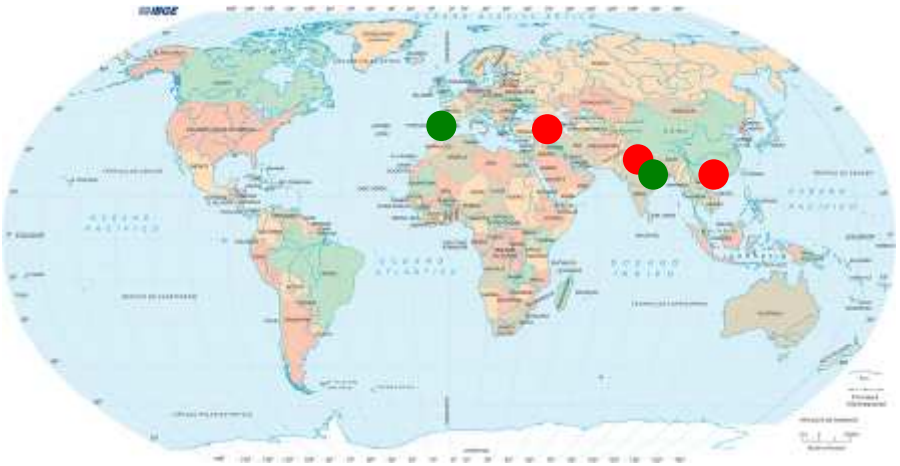
Búsqueda en las bases de datos

↓

97% similitud con una cepa de ToLCNDV que causa rizado amarillo de la hoja del pepino en India

ToLCNDV

¿Qué se sabe de este virus?



Es un begomovirus de la familia *Geminiviridae*, de genoma bipartito que suele ir acompañado por beta-satélites

Se describió en India en 1995 como uno de los virus del complejo del rizado amarillo del tomate (cuchara)

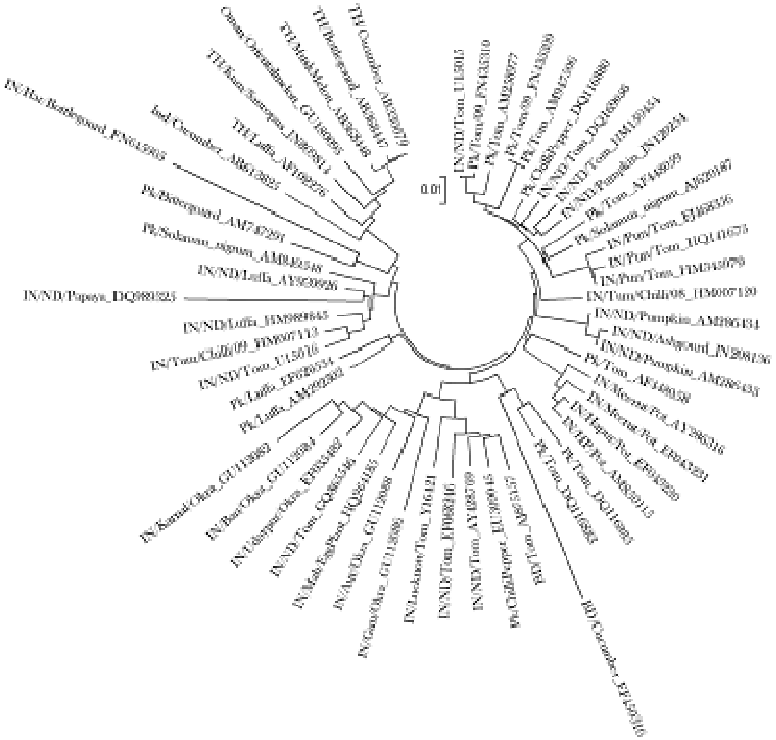
Se ha expandido por otras regiones de Asia

En los 2010´ se describió en India una cepa de cucurbitáceas. La que nosotros hemos descrito es muy similar a esta: En colaboración con EELM-CSIC (Málaga) hemos secuenciado los componentes genómicos A y B y se mantiene el 97% de homología observado inicialmente.

ToLCNDV

¿Qué se sabe de este virus?

Al principio, la gama de huéspedes parecía limitada a solanáceas, incluyendo tomate, pimiento (chile), patata y berenjena. Más adelante se observó que este virus también afectaba cucurbitáceas, incluyendo pepino, melón, calabaza, *Luffa*, sandía y calabacín



ToLCNDV se transmite de forma persistente y circulativa por mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.). No se ha determinado que se transmita por contacto ni por la semilla

ToLCNDV

Sintomatología: Melón tipo Galia

- **Clorosis y deformación de hoja, entrenudos cortos de tallos, bajo rendimiento.**

Fotos tomadas en 1ª semana de septiembre en una plantación realizada la 1ª semana de junio en Miranda (Cartagena).

ToLCNDV

Sintomatología: Melón tipo Piel de sapo

- **Mosaicos con cierto abullonado en hoja**
- **Clorosis y deformación de hoja, entrenudos cortos de tallos, bajo rendimiento…**

Fotos obtenidas la 2ª semana de septiembre
en una plantación realizada
en 1ª semana de Junio en Roldán.

ToLCNDV

Sintomatología: Melón

Ensayo de melón en un invernadero de Almería

ToLCNDV

Sintomatología: Calabaza tipo Cacahuete

- **Clorosis y mosaico jaspeado en hoja, entrenudos cortos de tallos….**

Fotografías tomadas en septiembre en Miranda (Cartagena)

ToLCNDV

Sintomatología: Pepino

- **Mosaico y deformación en hoja, y parada del crecimiento**

Fotografías obtenidas en septiembre en un invernadero en Miranda (Cartagena)

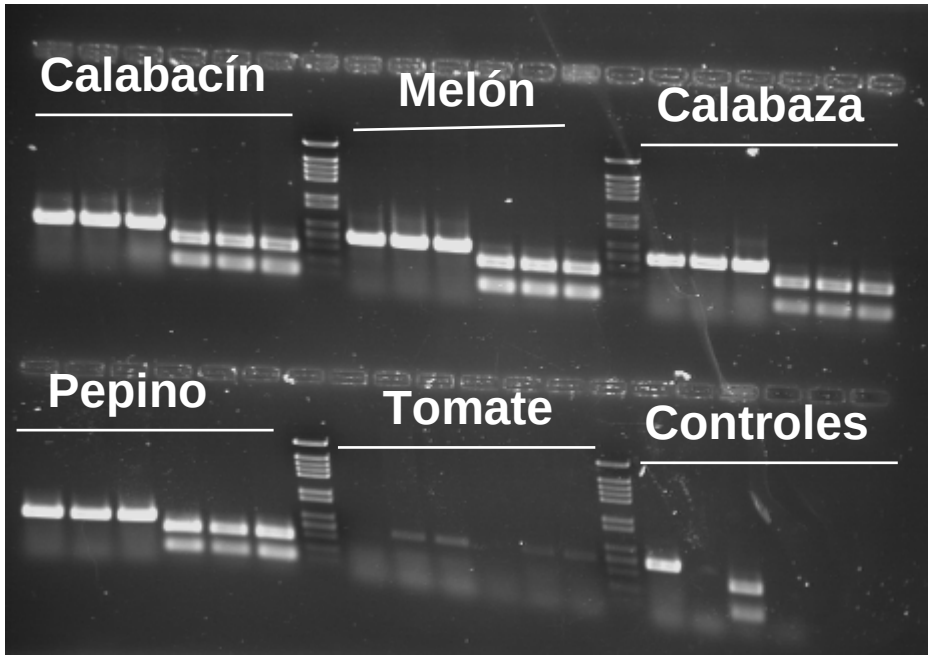
ToLCNDV

Métodos de diagnóstico

ELISA: Antisueros comerciales para detectar el virus de la cuchara, para *Squash leaf curl virus* (SLCV) y para *Watermelon chlorotic stunt virus (*WmCSV) reconocen ToLCNDV

PCR-RFLP

GGGTTGTGAAGGCCCTTGTAAGGTGCAATCGTTTGAAT
CCCGGCACGATGTCTCGCATATTGGCAAAGTCATGTGT
GTTAGTGATGTTACTCGAGGCACCGGACTCACACATCG
CGTAGGCAAGCGATTTTGTGTGAAATCTGTCTATGTACT
GGGAAAAATATGGATGGATGAAAATATCAAAACTAAAA
ATCATACTAATAGTGTTATGTTCTTTCTTGTTCGTGACCG
GCGTCCAACCGGAACCCCTCAAGATTTTGGGGAAGTTT
TCAATATGTTTGATAATGAACCTAGCACAGCCACGGTG
AAGAACATGCATCGTGATCGTTATCAAGTCTTACGGAA
GTGGCATGCTACTGT
*Sph*I
GACGGGAGGAACGTATGCATCAAGGGAGCAAGCATTA
GTTAGGAAGTTTGTTAGGGTTAATAATTATGTTGTTTAC
AATCAACAAGAGGCCGGCAAGTATGAGAATCATACTGA
AAATGCATTAATGTTGTATATGGCGTGTACA



Hibridación molecular: ya disponemos de sondas específicas

ToLCNDV

¿Qué podemos esperar?

Virus	Gama de huéspedes	Transmisión	Forma de transmisión vectorial	Plasticidad genética	Resistencias
CYSDV (amarilleo)	Restringida	Mosca	Semipersistente	Poca	Tolerancia
CABYV (amarilleo)	Restringida	Pulgón	Semipersistente	Poca	No
CVYV (venas amarillas)	Restringida	Mosca	No persistente	Poca	Tolerancia
TSWV (bronceado)	Muy amplia	Thrips	Persistente propagativa	Poca	Resistencias
TYLCV (cuchara)	Restringida	Mosca	Persistente circulativa	Grande	Ty1, Ty2, Ty3
ToLCNDV	Amplia	Mosca	Persistente circulativa	Muy grande	No (Ty3??)

Riesgo:

- **Alto**
- **Medio**
- **Moderado**

ToLCNDV

Medidas a aplicar: **Todas se basan en lo mismo: que no haya o haya poca fuente de inóculo (plantas infectadas) y que la mosca blanca esté controlada.**

A nivel de parcela:

Fuente de inóculo:

HIGIENE.- Mantener totalmente limpias, de restos de cultivos anteriores y de hierbas, las parcelas destinadas a nuevas plantaciones durante un mínimo de 2 a 3 semanas.

ELIMINACIÓN DE PLANTAS VIROSADAS.-

Control del vector:

BARRERAS FÍSICAS.- En invernaderos, cerramientos y mallas. Al aire libre, ¿agrotextiles?

TRAMPAS ADHESIVAS.- En el caso de cultivos protegidos, durante las primeras semanas del cultivo

TRATAMIENTOS FITOSANITARIOS.- Tratamientos al uso contra mosca blanca. OJO!! Tratamientos sanitarios a base de productos fortificantes o sustancias que actúan estimulando las defensas naturales de la plantas, no está demostrada la eficacia contra las enfermedades producidas por virus

ToLCNDV

Medidas a aplicar: **Todas se basan en lo mismo: que no haya o haya poca fuente de inóculo (plantas infectadas) y que la mosca blanca esté controlada.**

Medidas adicionales a nivel de zona de producción:

Fuente de inóculo:

EVITAR EL SOLAPAMIENTO DE CULTIVOS SUSCEPTIBLES. Especial atención a:

1. **Plantaciones tardías de melón (1eros de junio hasta septiembre)**
2. **Plantaciones de calabaza tipo cacahuete durante el verano**
3. **Plantaciones de otoño invierno de calabacín y pepino de invernadero**

NO ABANDONAR PLANTACIONES. Por ejemplo, abandono de plantaciones de primavera-verano de melón

HIGIENE. Mantener las parcelas, entre ciclos de cultivo, limpias en todo momento de restos de plantaciones anteriores y de hierbas que pudieran mantener y multiplicar el virus o su vector

Control del vector:

RESPETAR LA FAUNA AUXILIAR

ToLCNDV

CONCLUSIONES:

1. **Estamos ante un problema que parece grave o muy grave.**

2. **De momento, la cepa que ha entrado parece que afecta sólo a cucurbitáceas. La mayor amenaza es que llegue a afectar también a solanáceas, o que evolucione hacia afectar a solanáceas, o que entre otra cepa que también afecte a solanáceas. OJO!! Observaciones de IFAPA-Sanidad Vegetal de Almería indican detección en solanáceas.**

3. **Las medidas a aplicar son limitadas, y todas se refieren a dos cuestiones básicas: limitar la fuente de inoculo (plantas infectadas en el campo) y mantener controladas las poblaciones de mosca blanca. OJO!! No hay tratamientos milagrosos que vayan a salvar nuestra parcela y no la del vecino.**

4. **Aunque las medidas sean limitadas, hay que actuar. Y preferentemente, de forma coordinada.**

ToLCNDV. Investigación en marcha y futura

SOLICITUD DE PROYECTO COORDINADO: Biología, epidemiologia y control de ToLCNDV, causa de una nueva enfermedad de gravedad creciente en el sudeste español (RTA2013):

1.Epidemiología
2.Interacción con huéspedes
3.Control biológico
4.Control mediante resistencia genética

IFAPA, UPV, UMH/CEBAS-CSIC, Labcolor/Abiopep

CONCLUSIONES GENERALES

1. **Parece que las mayores amenazas pueden venir por parte de la evolución de los virus presentes, o por la introducción de nuevos virus, dando lugar a virosis emergentes. Ejemplos muy claros son WMV-EM, MWMV y ToLCNDV.**

2. **¿Podemos hacer algo frente a virosis emergentes? *"Es imprescindible un conjunto amplio y muy serio de medidas, que impliquen a productores, técnicos, empresas de semillas, administraciones e investigadores, para evitar las introducciones de nuevos virus en nuestro país".***

3. **Además (o sobre todo): (i) No olvidarse del sentido común, el control integrado de plagas y enfermedades, y las buenas prácticas agrícolas siguen siendo la receta. (ii) No olvidarse de la investigación ni de los investigadores.**

Gracias por su atención!

EQUIPO DE EPIDEMIOLOGÍA DE VIRUS DE PLANTAS DE UMH/CEBAS-CSIC

Mona Kassem
Raquel N. Sempere
Pedro Gómez
Manuel Miras
Eduardo Méndez López
Blanca Gosalvez
Miguel Juárez y Miguel A. Aranda