

Contraste entre acumulación y transmisión en infecciones mixtas de WMV y CYSDV en melón

Las infecciones mixtas de potyvirus y crinivirus son frecuentes en cucurbitáceas. A pesar de esto, se ignora en gran medida cómo puede afectar la presencia de dos virus en una misma planta a aspectos tan importantes como su capacidad patogénica y su relación con insectos vectores. Para abordar estos temas, se han generado infecciones mixtas del potyvirus *Watermelon mosaic virus* (WMV) y el crinivirus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) en plantas de melón, cuantificando la carga de cada virus a lo largo del tiempo, y se han realizado ensayos de transmisión del potyvirus por pulgones, y del crinivirus por moscas blancas. Nuestros resultados muestran que los cambios de acumulación de cada virus en infecciones mixtas no se trasladaron directamente a las frecuencias de transmisión por vectores: aunque la mayor acumulación de CYSDV ocurría en las primeras semanas de la infección mixta, no aumentó la eficacia de la transmisión por mosca blanca hasta tiempos más tardíos. En el caso de WMV, su menor acumulación en las plantas doblemente infectadas no afectó a su transmisión por pulgones, algo que podría ser explicado por los cambios observados en el comportamiento de los vectores. Estos resultados apuntan a que las infecciones mixtas pueden jugar un papel importante en la diseminación de virus en cucurbitáceas.

María Luisa Domingo-Calap, Ana Beatriz Moreno y Juan José

López-Moya

Centro de Investigación en Agrigenómica CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB, Cerdanyola del Vallès, Barcelona.

Juan Antonio Díaz Pendón

Instituto de Horticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Algarrobo-Costa, Málaga.

Aranzazu Moreno y Alberto Fereres

Instituto de Ciencias Agrarias, ICA, CSIC, Madrid.

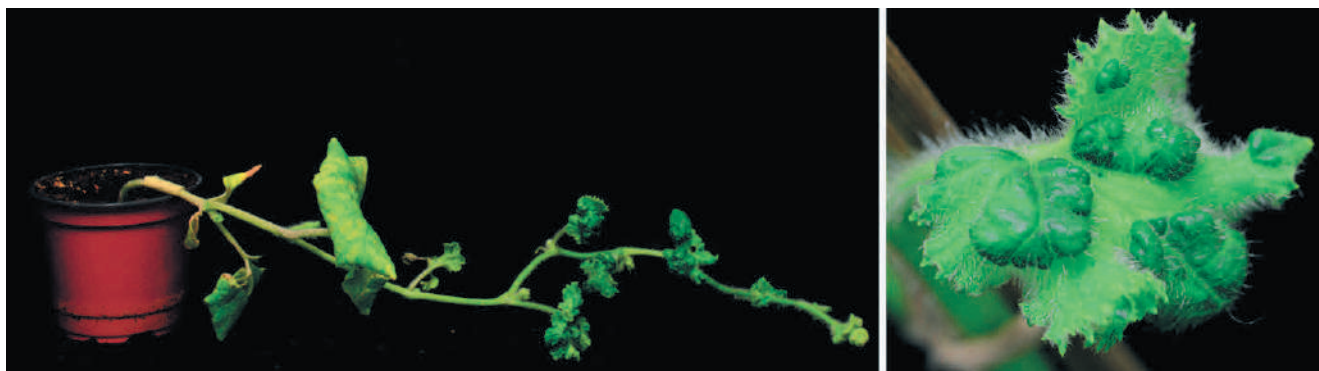


Figura 1. Síntomas de WMV en melón variedad Piel de Sapo (semillas Fitó), a los 36 días después de la inoculación (d.p.i.). Se muestra detalle de síntomas en hoja (imágenes originales de los autores).



Figura 2. Síntomas de CYSDV en melón variedad Piel de Sapo (36 d.p.i.). Se muestra detalle del típico síntoma de amarilleo (imágenes originales de los autores).

Antecedentes

Actualmente el melón es una de las hortalizas más importantes después del tomate, con China liderando la producción mundial, y España la de la Unión Europea, siendo las zonas productoras más importantes Andalucía, Murcia, Castilla La Mancha y Comunidad Valenciana. Debido a su interés agronómico y a la disponibilidad de su genoma recientemente secuenciado (García-Mas y col., 2012), el melón se considera un organismo modelo para la investigación en cucurbitáceas.

Las plantas están continuamente expuestas a factores adversos externos, tanto abióticos como bióticos, y a nuestro grupo le interesa saber cómo los microorganismos patógenos, en concreto los virus, actúan causando enfermedades. La dispersión por vectores es la vía natural utilizada por los virus para pasar de unas plantas a otras, siendo la mayoría de los virus transmitidos de esta manera (Roossinck, 2015). Entre ellos, los pulgones y las moscas blancas tienen la capacidad de

transmitir el mayor número de especies de virus conocidos. Los virus con los que trabajamos son transmitidos de forma no persistente, con periodos muy cortos de adquisición y retención, y semipersistente, con periodos de adquisición e inoculación algo más largos (Palacios y col., 2002).

Los patosistemas planta - patógeno - vector (Hull, 2013) son complejos ya que sus componentes pueden interactuar entre sí de diferentes maneras: el patógeno depende del vector para su transmisión y dispersión; el patógeno puede afectar directa o indirectamente al vector; el patógeno y el vector pueden competir por la misma planta huésped, y además ambos pueden inducir mecanismos de defensa (Bellière y col., 2005). Existe controversia sobre los efectos finales de estas complejas interacciones, debido a que cada patosistema se puede comportar de una manera específica y no generalizable.

Las infecciones mixtas de virus en plantas son muy comunes en la naturaleza (Syller, 2012) y éstas

ocurren cuando dos o más virus invaden a un mismo huésped y son capaces de establecerse en él. Cuando la infección por diferentes virus tiene lugar simultáneamente, se conoce como co-infección; si la llegada tiene lugar en tiempos distintos, se denomina super-infección (Saldaña y col., 2003). Las interacciones además pueden ser sinérgicas, cuando un virus aumenta la virulencia o complementa al otro para replicarse, moverse o ser transmitido, viéndose el huésped perjudicado de uno u otro modo; o bien antagónicas, cuando la aptitud de un virus se ve disminuida por la presencia de otro. En ocasiones se producen interacciones complejas virus-virus que pueden ser sinérgicas y antagónicas, según sean los efectos para cada uno de los participantes (Mascia y Gallitelli, 2016). En algunos casos, las infecciones mixtas de virus en plantas dan lugar a enfermedades definidas como síndromes específicos que pueden causar graves pérdidas económicas en los cultivos afectados.

Virus, plantas e insectos empleados en los procedimientos experimentales

El potyvirus *Watermelon mosaic virus* (WMV) es un patógeno de gran importancia económica en cucurbitáceas, especialmente en las regiones mediterráneas (Lecoq y col., 1998). Se trata de un virus transmitido de manera no persistente por pulgones, capaz de infectar a numerosas cosechas y malas hierbas. El aislado empleado deriva de un clon infectivo cedido por la Dra. C. Desbiez del INRA-PACA, Avignon, Francia (Desbiez y col., 2012). En la Figura 1 pueden observarse síntomas característicos que produce este virus en melón.

Por su parte, el crinivirus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) es también una amenaza para los cultivos de cucurbitáceas, y su incidencia está aumentando en gran parte de la cuenca mediterránea (Lecoq y Desbiez, 2012). Como el resto de virus de la familia *Closteroviridae*, se encuentra restringido al floema y se transmite por mosca blanca de manera semipersistente (Navas-Castillo y col., 2014). El aislado empleado fue proporcionado por la Dra. M.L. Gómez-Guillamón (IHSM, CSIC-UMA, 'La Mayora', Málaga), causando un amarilleo muy característico (Figura 2).

Los pulgones de la especie *Myzus persicae* proceden de una población clonal mantenida por los Dres. A. Fereres y A. Moreno (ICA-CSIC Madrid). Las colonias de moscas blancas de la especie *Bemisia tabaci* derivan de la colección del IHSM y de la Dra. R. Gabarra (IRTA Cabrils), y corresponden a los biotipos MED y MEAM1 (antiguos Q y B). Para transmitir WMV y CYSDV, se han respetado los tiempos de adquisición e inoculación necesarios (Tabla 1). Para las co-infecciones, primero se inoculó CYSDV, y al retirar las moscas se inoculó WMV empleando pulgones. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento.

Se realizaron ensayos de transmisión primaria (con vectores virulíferos) para WMV y CYSDV, empleando pulgones y moscas blancas en cada caso, y como fuentes de inóculo plantas en infección sencilla y



Figura 3. Disposición de plantas en cada umbráculo, con 3 plantas inóculo rodeadas por 20 plantas receptoras (imagen original de los autores).

Virus	Tipo de transmisión	Vector natural	Tiempo ayuno	Tiempo adquisición	Tiempo inoculación	Insectos /planta
WMV	No persistente	Pulgón ¹	3 horas	10 minutos	30 minutos	10
CYSDV	Semi-Persistente	Mosca blanca ²	-	48 horas	48 horas	40

¹ Los pulgones se manipularon con ayuda de un pincel, sometidos a un período de ayuno de 3 horas en viales cerrados previo a la adquisición.

² Las moscas blancas se recolectaron por aspiración y se colocaron en cajas pinza sobre las hojas, o se liberaron directamente en cajas confinadas junto a las plantas.

Tabla 1. Transmisión por vectores de WMV y CYSDV.

mixta. Para CYSDV se hicieron también experimentos de transmisión secundaria, liberando moscas no virulíferas en umbráculos visitables con plantas infectadas (solo con CYSDV o co-infectadas con ambos virus) rodeadas por plantas no infectadas o previamente inoculadas con WMV. La densidad de vectores fue de 40 moscas por cada planta receptora (Figura 3).

El diagnóstico molecular se realizó a partir de muestras de tejido congelado y triturado en Tissue lyser (QIAGEN), seguido de extracción con el reactivo comercial TRIzol (Invitrogen). Se obtuvo el cDNA correspondiente empleando el kit comercial Reverse Transcription (Applied Biosystems™), y se amplificaron fragmentos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con TaKaRa Ex

Taq®. También se utilizó hibridación molecular 'Tissue print' para detectar CYSDV en improntas sobre membranas (Roche) de secciones transversales de peciolo de hojas, empleando una sonda específica de RNA marcada con digoxigenina y detección por quimioluminiscencia (ChemiDoc-Bio-Rad).

Los títulos virales se determinaron mediante qRT-PCR absoluta con SYBRGreen (Roche) en cDNAs obtenidos de RNAs totales tratados con DNasa (ThermoScientific), comparando con rectas patrón derivadas de transcritos específicos de cada virus (Saunders, 2004).

Para registrar el comportamiento alimenticio de *M. persicae*, se realizaron registros de EPG (electrical penetration graph) de una hora de duración con pulgones adultos áp-

QUELATOS DE HIERRO MASSÓ



ESANTRENE HP



Ferrum XQ



Hampiron HQ



MAGMA
XMZ MASSÓ



ZELSIUS



Escalera de color



COMERCIAL QUÍMICA MASSÓ, S.A.
Viladomat, 321, 5º - 08029 Barcelona
Tel. 93 495 25 00 - Fax 93 495 25 02
www.massoagro.com

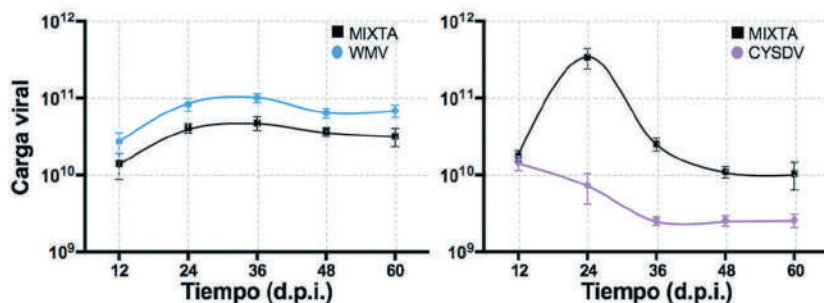


Figura 4. Carga viral en infecciones sencillas y mixtas a lo largo del tiempo. En el eje de ordenadas se representan media y error estándar de los valores cuantitativos para WMV (izquierda) y para CYSDV (derecha), de grupos de plantas infectadas con WMV (línea azul), con CYSDV (línea rosa) y con ambos (líneas negras). Los puntos temporales se indican en el eje de abscisas. Las comparaciones para cada virus y tiempo se realizaron mediante U-Mann Whitney (distribución no Gaussiana) o T-test no-paramétrico (puntos con distribución Gaussiana). Desde los 24 d.p.i., las diferencias de carga viral mostraron niveles de significación inferiores a 0.05 para WMV, y a 0.001 para CYSDV.

teros sobre cada tipo de planta. La adquisición y el análisis de los datos se realizaron mediante el programa informático Stylet+ (EPG-Systems, Wageningen, Holanda), y las variables fueron procesadas y calculadas en hojas de cálculo (Backus y col., 2007; Sarria y col., 2009).

Resultados

Análisis de la carga viral de CYSDV y WMV en infecciones sencillas y mixtas

El seguimiento de las plantas infectadas durante 60 días nos permitió comparar la evolución de las infecciones sencillas y dobles. En el caso de CYSDV, los datos muestran que la carga viral aumentó significativamente en presencia de WMV con un pico de acumulación a 24 d.p.i., resultando en un caso claro de sinergismo. Por el contrario, en el caso de WMV la carga viral fue menor en infecciones mixtas respecto a los valores que se alcanzan en infecciones sencillas (Figura 4).

Transmisión en laboratorio

Los experimentos de transmisión bajo condiciones controladas se realizaron con plantas infectadas de 24 d.p.i. y de 52 d.p.i. como fuentes de inóculo. En el primer punto temporal las diferencias eran muy marcadas, y se corresponde con el pico de máxima acumulación de CYSDV en infecciones mixtas (Figura 5). En cada caso se ensayaron un número total de plantas receptoras por cada fuente de inóculo por encima de 100.

Como puede observarse en los paneles superiores de la Figura 6, el porcentaje de transmisión de CYSDV fue ligeramente menor a partir de plantas con infección mixta a 24 d.p.i. a pesar de la mayor acumulación del virus que ya se ha mencionado en ese punto temporal. En cambio, se observó una mayor tasa de transmisión cercana al 100% a partir de plantas en infección mixta a 52 d.p.i.

En el caso de WMV (paneles inferiores de la Figura 6), la tasa de transmisión no varió significativamente

entre infecciones sencillas y mixtas, a pesar de las diferencias observadas en la acumulación viral, por lo que se decidió evaluar el comportamiento alimenticio de los pulgones sobre los diferentes tipos de inóculos.

Estudio del comportamiento alimenticio de *M. persicae*

La posible influencia de la presencia de CYSDV sobre la transmisión por pulgón de WMV se analizó en experimentos de EPG (Electrical Penetration Graph), monitorizando el comportamiento alimenticio de *M. persicae* asociado a la transmisión de virus no persistentes. La comparación se hizo entre plantas infectadas con WMV, y plantas co-infectadas con WMV+CYSDV, incluyendo como controles plantas no inoculadas y plantas infectadas únicamente con CYSDV. Se obtuvieron en paralelo registros EPG durante al menos una hora (Figura 7) para los cuatro tipos de tratamientos.

En cada uno de los registros se identificaron ondas correspondientes a períodos de no prueba (np), de penetración intercelular (C) y de prueba intracelular (pd) con el programa Stylet+, y los valores de estos parámetros se compararon mediante U Mann-Whitney. Se observó así una mayor duración de las ondas pds en las plantas infectadas con WMV +CYSDV, tanto por insecto como por evento. Puesto que este tipo de onda está asociada con la transmisión de virus no persistentes, se realizó un análisis de la duración de cada una de las subfases dentro de las pruebas pds. Como se muestra en la Figura 8, la duración de la subfase denominada II-3, y que está relacionada con la adquisición de virus no persistentes (Collar y col., 1997), resultó ser mayor en plantas infectadas con



Figura 5. Grupos de plantas infectadas con CYSDV, con WMV y con CYSDV+WMV, a los 24 d.p.i. (imagen original de los autores).

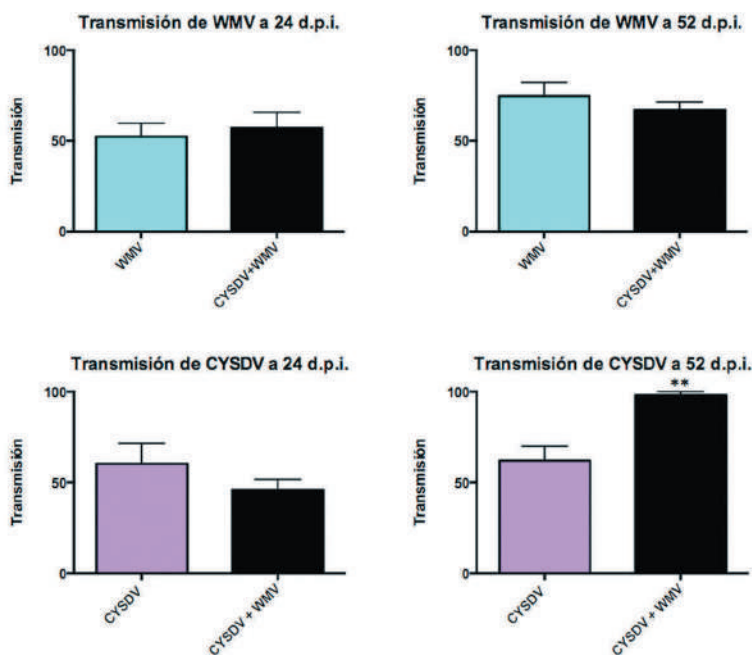


Figura 6. Frecuencias de transmisión de CYSDV y WMV a 24 d.p.i. y a 52 d.p.i. Las comparaciones con un T-test no paramétrico únicamente mostraron diferencias significativas en la transmisión de CYSDV a tiempos largos para fuentes de inóculo con infecciones sencillas o mixtas.

WMV+CYSDV. También se cuantificó un mayor número de pulsos durante la fase correspondiente. Estos incrementos de parámetros relacionados con la adquisición del virus podrían ayudar a explicar el mantenimiento de la tasa de transmisión de WMV, a pesar de la disminución de la carga viral observada en el caso de infecciones mixtas.

Transmisión en semi-campo de CYSDV

Las diferencias del modo de transmisión, no persistente en el caso de WMV y semipersistente en CYSDV, nos llevaron a plantear experimentos diferentes para este último virus. Dada la mayor duración de los períodos de adquisición e inoculación en el caso de CYSDV, así como la mayor movilidad de las moscas blancas comparadas con los pulgones, nos propusimos realizar ensayos de preferencia y de transmisión secundaria en condiciones que denominamos

de semi-campo. Estos experimentos se llevaron a cabo en umbráculos en el IHSM, CSIC-UMA 'La Mayora', Málaga, comparando como fuentes de inóculo plantas infectadas con CYSDV o con CYSDV+WMV, y diferentes plantas potencialmente receptoras, con y sin presencia del virus heterólogo WMV, bien en umbráculos separados, o bien alternando plantas no infectadas e infectadas dentro del mismo umbráculo. Los resultados no mostraron diferencias en cuanto a la fuente de inóculo (plantas en infección sencilla o mixta), y únicamente se observó una mayor tasa de transmisión hacia plantas receptoras previamente infectadas con WMV.

Discusión y conclusiones

Las adecuadas condiciones climáticas del sureste español lo hacen un lugar muy apto para una actividad agrícola intensiva dedicada a la producción

de calidad de diferentes especies hortícolas, pero al mismo tiempo pueden favorecer una alta incidencia de diversas enfermedades, entre las cuales hay que destacar aquellas causadas por virus. La investigación sobre virosis de hortícolas en nuestro país constituye un esfuerzo colectivo muy notable, con numerosos grupos de trabajo enfocados a buscar estrategias de control que sean adecuadas para mantener la productividad de los cultivos, también en condiciones de producción intensiva.

Nuestro grupo de investigación se ha centrado recientemente en el estudio de infecciones mixtas de virus en plantas cultivadas, y este trabajo en concreto se ocupa de la infección mixta de WMV y CYSDV en melón.

Las comparaciones de la carga viral entre infección sencilla o mixta en plantas de melón susceptibles a ambos virus mostraron en infecciones mixtas un aumento de la acumulación de CYSDV, mientras que la acumulación de WMV se vio ligeramente reducida.

Los ensayos de transmisión de WMV y de CYSDV a distintos tiempos nos permitieron observar un aumento de la transmisión de CYSDV en momentos avanzados de la infección mixta, sugiriendo que la infección de WMV con el crinivirus CYSDV podría suponer un claro beneficio para la dispersión de este último.

En el caso de WMV, la reducción de acumulación viral en infección mixta no afectó a las tasas de transmisión observadas. Los ensayos de comportamiento alimenticio de pulgones empleando la técnica EPG nos ayudaron a explicar este resultado, al identificar una mayor duración de una subfase dentro de las pruebas intracelulares asociada a la actividad de adquisición de virus no persistentes, que potencialmente podría compensar la menor carga de virus.

Por otra parte, tanto en los experi-

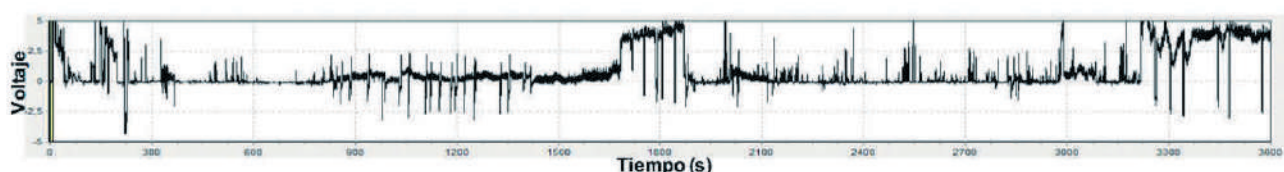


Figura 7. Ejemplo de registro EPG de 1 hora de duración.

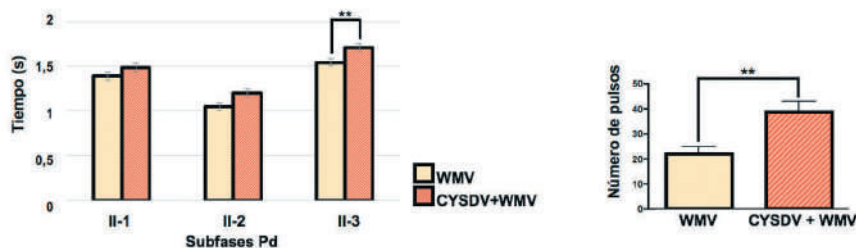


Figura 8. Comparación de la duración de las subfases denominadas II-1, II-2 y II-3 de las pruebas intracelulares (pd), y número de pulsos en insectos vectores alimentados en plantas infectadas con WMV o con CYSDV+WMV.

mentos de transmisión en laboratorio como en condiciones de semi-campo, las tasas de transmisión de CYSDV fueron similares a partir de plantas en infección sencilla y mixta. No obstante, se observó que la transmisión a plantas receptoras previamente infectadas con WMV superaba a las no infectadas, lo que podría contribuir a una mayor preva-

lencia de infecciones mixtas.

Para concluir, y poniendo en conjunto todos nuestros resultados, podríamos decir que las infecciones mixtas de WMV+CYSDV pueden suponer efectos beneficiosos desde la perspectiva de ambos virus: en el caso de CYSDV, la carga viral aumenta considerablemente y parece que se favorece su dispersión en momentos

tardíos de la infección; mientras que en el caso de WMV, a pesar de que la carga viral disminuye ligeramente, el efecto sobre el comportamiento alimenticio de su vector natural parece compensar esa reducción, por lo que de nuevo se podría favorecer la propagación del virus como parte de una estrategia para la manipulación de sus vectores (Ingwell y col., 2012).

Aunque nuestros resultados no abordan todavía en detalle los mecanismos específicos que pueden mediar los efectos de cada virus en las plantas, y a través de ellas sobre sus vectores, sí ofrecen una primera evidencia cuantificable del papel ecológico que podrían tener las infecciones mixtas de virus, proporcionando una base sobre la cual continuar analizando su prevalencia, y siempre en el contexto de la necesidad de estrategias eficaces de control de virus.

Bibliografía

- Backus, E.A., Cline, A.R., Ellerseick, M.R. & Serrano, M.S. (2007). *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential Electrical Penetration Graph data. *Annals of the Entomological Society of America*, 100: 296-310.
- Belliure, B., Janssen, A., Maris, P.C., Peters, D. & Sabelis, M.W. (2005). Herbivore arthropods benefit from vectoring plant viruses. *Ecology Letters*, 8: 70-9.
- Collar, J.L., Avilla, C. & Fereres, A. (1997). New correlations between aphid stylet paths and nonpersistent virus transmission. *Environmental Entomology*, 26: 537-544.
- Desbiez, C., Chandeysson, C., Lecoq, H. & Moury, B. (2012). A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses. *Journal of Virological Methods*, 183: 94-97.
- García-Mas, J. y col. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 11872-11877.
- Hull, R. (2013). *Plant Virology: Fifth Edition*. Academic Press, 1118 p.
- Ingwell, L.L., Eigenbrode, S.D. & Bosque-Pérez, N.A. (2012). Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports*, 2: 578.
- Lecoq, H. & Desbiez, C. (2012). Viruses of cucurbit crops in the mediterranean region. An ever-changing picture. *Advances in Virus Research*, 84: 67-126.
- Lecoq, H., Wisler, G. & Pitrat, M. (1998). Cucurbit viruses: the classics- and the emerging. *Fruits*, 75: 208-211.
- Mascia, T. & Gallitelli, D. (2016). Synergies and antagonisms in virus interactions. *Plant Science*, 252: 176-192.
- Navas-Castillo, J., López-Moya, J.J. & Aranda, M.A. (2014). Whitefly-transmitted RNA viruses that affect intensive vegetable production. *Annals of Applied Biology*, 165: 155-171.
- Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A. & Fereres, A. (2002). Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *Journal of General Virology*, 83: 3163-3171.
- Roossinck, M.J. (2015). Plants, viruses and the environment: ecology and mutualism. *Virology*, 479-480: 271-277.
- Saldaña, J., Elena, S.F. & Solé, R. V. (2003). Coinfection and superinfection in RNA virus populations: a selection-mutation model. *Mathematical Biosciences*, 183: 135-160.
- Sarria, E., Cid, M., Garzo, E. & Fereres, A. (2009). Excel Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. *Computers and Electronics in Agriculture*, 67: 35-42.
- Saunders, N. A. (2004). Real-time PCR. *Methods in Molecular Biology*, 266: 191-211.
- Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology*, 13: 204-216.