

El “cribado” de la sandía, un nuevo virus encontrado en España

Leticia Ruiz García, Almudena Simón Martínez, Óscar Crespo Romo, Carmen García García, Julio M. Gómez Vázquez y Dirk Janssen (IFAPA La Mojonera, Almería. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía. Email: dirk.janssen@juntadeandalucia.es).

El rastreo genético de unas plantas de sandía en un invernadero de Almería que presentaban síntomas de necrosis en frutos, hojas y tallos ha permitido identificar una nueva cepa de virus de cribado del melón o *Melon necrotic spot virus* (MNSV), nunca antes descrita en España. Un equipo del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) de la Mojonera, comandado por Dirk Janssen, ha sido el responsable de la investigación que ha permitido este hallazgo, que ha sido bautizado como MNSV-W-SP (watermelon-Spain). En el siguiente artículo se expone el proceso de detección del agente patógeno y se proponen medidas de control.

El virus del cribado del melón

Melon necrotic spot virus (MNSV) es conocido como el virus de las manchas necróticas del melón o ‘virus del cribado del melón’, en referencia a las distintas manifestaciones durante la infección. Los síntomas en melón y pepino se caracterizan por la aparición de pequeñas manchas cloróticas de 0,5 a 2 mm en las hojas que evolucionan a necróticas. Otro síntoma típico, y conocido como “enrejado”, es la necrosis de las nerviaciones de las hojas inferiores e intermedias. Pueden aparecer estrías necróticas en el cuello y tallo de las plantas, a veces como único síntoma de la enfermedad, o una necrosis marrón en la base del tallo que solo afecta a la epidermis, y que también constituya el único síntoma de la enfermedad. Esto puede estar asociado con la muerte de la planta (Cuadrado y col., 1993).

El MNSV ha sido descrito en América, Asia, África y Europa. En España, fue detectado por primera vez en 1984 en cultivos protegidos de melón en la zona de Almería (Martínez de Salinas y col., 1987). El colapso del melón se extendió por toda la costa almeriense, constituyendo un factor limitante para su cultivo (Cuadrado y col., 1993). Posteriormente, el virus fue aislado en cultivos de pepino y sandía. Aparte de la provincia de Almería, MNSV ha sido detectado también en las provincias de Córdoba, Granada y Sevilla, y en otras zonas de España como Zaragoza, Valencia,



Foto 1. Síntomas de MNSV-W-SP en sandía: necrosis en una planta (a), deformación externa (b) y necrosis interna (c) de un fruto.

Alicante, Murcia, Tenerife e Ibiza. El virus tiene un estrecho rango de plantas hospedadoras, limitado a especies pertenecientes a la familia *Cucurbitaceae*. Se han descrito solo tres especies capaces de ser infectadas sistémicamente tras inoculaciones mecánicas artificiales con el virus: *Cucumis anguria*, *C. melo* y *C. sativus*. Además, solamente se han observado lesiones locales, confinadas en las hojas inoculadas de *Gomphrena globosa* (*Amaranthaceae*), *Nicotiana benthamiana* y *N. clevelandii* (*Solanaceae*). MNSV pertenece al género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae*. En condiciones naturales, MNSV es transmitido por el hongo *Olpidium bornovanus* (Campbell y col., 1996) y por semilla ya que puede estar presente en la superficie y en el endospermo de plantas enfermas.

Un “cribado” de sandía

En la provincia de Almería, durante el mes de mayo de 2014, se observaron síntomas de necrosis en frutos, hojas y tallos en plantas de sandía en un invernadero (Foto 1). Se observó una incidencia cercana al 100% de dichos síntomas e incluso muchas de las plantas afectadas murieron. Sandías sintomáticas se usaron en el laboratorio como fuente de inóculo sobre plantas de sandía (*Citrullus lanatus*), melón (*Cucumis melo*), pepino (*C. sativus*), calabaza vinatera (*Lagenaria siceraria*), calabacín (*Cucurbita pepo*) y calabaza (*C. maxima*). Tan solo en las plantas de sandía se reprodujeron los síntomas de necrosis e incluso la muerte de la planta, mientras que el resto de las cucurbitáceas inoculadas permanecieron asintomáticas. Los síntomas observados en las plantas de sandía inoculadas resultaron similares a aquellos descritos para MNSV. Sin embargo, cuando las muestras sintomáticas se sometieron a un análisis rutinario mediante ELISA (Loewe), el resultado fue negativo.

Una característica de muchos virus de ARN es que forman ARNs de cadena doble (ARNcd) durante su ciclo replicativo. Esta característica es usada frecuentemente en el diagnóstico en virus de plantas. El análisis de ARNcd a partir de muestras de sandía sintomáticas reveló la presencia de una banda de 4.3 kb aproximadamente similar a la que producen los miembros del género *Carmovirus*. Basándonos en secuencias genómicas de otros aislados de MNSV disponibles en la base de datos GenBank, diseñamos varias parejas de cebadores de secuencia degenerada para diferentes zonas del genoma. Estos cebadores se utilizaron en reacciones de RT-PCR a partir de extracciones

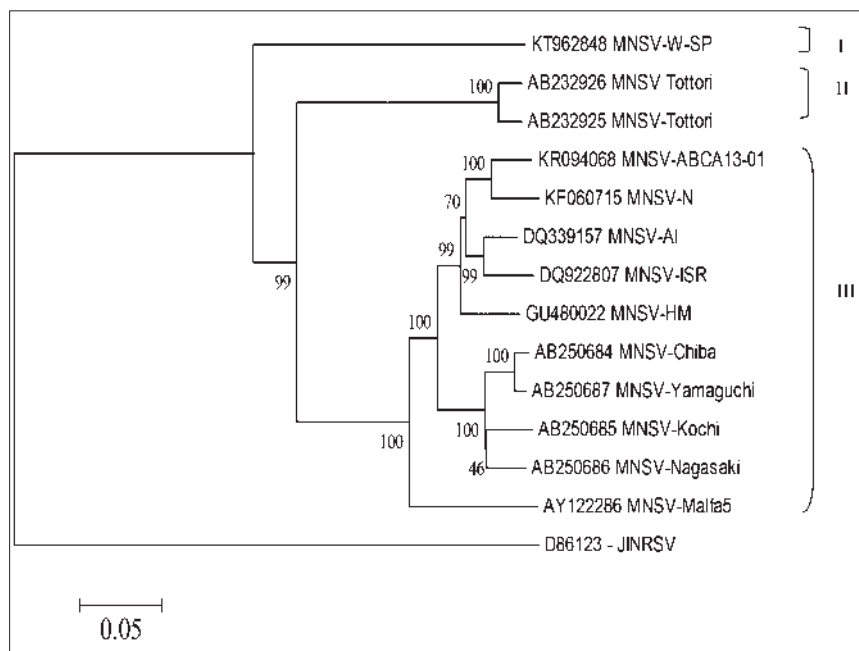


Figura 1. Árbol filogenético de la secuencia parcial del gen que codifica para la proteína de la cápsida (996 nt) de MNSV-W-SP y distintos aislados de MNSV seleccionados de la base de datos GenBank. El árbol fue construido utilizando el método del vecino más cercano (Neighbour-Joining) con 1.000 réplicas. Como outlier, se usó Japanese iris necrotic ring virus (JINRV). I: aislado de MNSV W-SP que infecta a sandía pero no a melón; II: aislados de MNSV de Japón que infectan a sandía pero no melón; III: grupo de aislados de MNSV capaces de infectar melón.

de ARN total de material vegetal infectado. Se obtuvo un amplicón de 422 pb que fue clonado en un plásmido comercial (pGemT, Promega) y posteriormente fue secuenciado. El análisis Blast de la secuencia obtenida mostró una identidad nucleotídica del 78% con un aislado de MNSV (código GenBank AY122286) descrito con anterioridad en el sudeste de España. Con el objetivo de obtener un fragmento nucleotídico más largo y que aportase más información sobre el nuevo aislado de MNSV se utilizó la tecnología de secuenciación de alto rendimiento 'Illumina' (Solexa). Esta tecnología es capaz de generar miles o millones de secuencias a la vez. Utilizando esta técnica y la “secuenciación por paseo” o *primer walking* se obtuvo una secuencia de 2.211 nucleótidos que presentó la mayor identidad nucleotídica y aminoacídica con cuatro regiones del genoma del MNSV (código AY122286): 75 y 86% con el gen que codifica la replicasa (p89); 79 y 80% con p7A, 77 y 74% con p7B, que son dos genes que codifican proteínas de movimiento, y 67 y 72% con la proteína de la cápsida (gen p42), respectivamente. De esta manera se confirmó que era ésta una nueva cepa de MNSV no descrita hasta el momento y denominada como MNSV-W-SP (watermelon-

Spain). La secuencia obtenida se depositó en la base de datos GenBank con el código KT962848 (Ruiz y col., 2016). Basada en esta secuencia se diseñó un par de cebadores (MNP011up, 5'-TTCCCGAGATGCGTTAGAGTG-3', y MNP011low (5'-AGGGACCGACGAGTAGGAAT-3'), que amplifican una secuencia parcial de la región de la polimerasa y que producen, a partir de muestras de campo con síntomas y en plantas inoculadas, amplicones de 488 pb cuando se analizan por RT-PCR.

Con anterioridad se describió en Japón (Ohki y col., 2008) una cepa de MNSV de sandía que no causa enfermedad en melón y que es serológicamente diferente a las cepas comunes, que sí infectan al melón (códigos AB232926 y AB232925). Al igual que la cepa japonesa, MNSV-W-SP, afecta sólo a cultivos de sandía y, además, como se puede observar en el árbol filogenético (Figura 1), es genéticamente diferente a la cepa anteriormente descrita. MNSV-W-SP es por tanto, una nueva cepa de MNSV descrita por primera vez en España y cuyo rango de hospedadores hortícolas está restringido al cultivo de la sandía. Uno de los métodos más efectivos para controlar la enfermedad ha sido el uso de injertos en diversas cucurbitáceas resistentes al virus. En los cultivos

de sandía, la enfermedad provocada por las cepas de MNSV conocidas hasta el momento parecían estar controlada por el uso de plantas injertadas sobre calabaza, además de ser una medida adoptada también para prevenir otros problemas patológicos que se presentan en este cultivo (García-Jiménez y col., 2007).

En España aproximadamente un 95% de la sandía se cultiva injertada sobre un patrón (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*), totalmente afín con la sandía. En Almería, este patrón híbrido fue introducido en 1980 y actualmente casi la totalidad de la sandía cultivada es injertada. El método más utilizado es el injerto de aproximación, en el que durante la fase de unión, las dos plantas, patrón y variedad, conservan su sistema radicular. Este método permite que puedan llegar a unirse y obliga a tener que cortar el tallo de la variedad, antes de la plantación, para que su raíz no sea una puerta de entrada de los patógenos frente a los que del patrón es inmune. Otro método es el "adosado" (un cotiledón), que se practica en algunos semilleros de Almería y Murcia; este método necesita un control preciso

de las condiciones ambientales en la fase post-injerto, pero es muy rápido en su ejecución y la calidad de la unión que resulta es perfecta. Con este último sistema, en el momento de la soldadura del injerto, ni el patrón ni la variedad tienen raíz; simultáneamente se produce la soldadura de la unión y el crecimiento de una nueva raíz en el portainjerto.

Para comprobar la resistencia a la nueva cepa de MNSV, se evaluaron algunos de los portainjertos más utilizados en sandía como *C. moschata* Ancora F1 (Takii Seeds), y los siguientes híbridos (de *C. maxima* x *C. moschata*): RS-841 (Seminis), Routpower F1 (Sakata), Azman RZ F1 (Rijk Zwaan), Cobalt RZ F1 (Rijk Zwaan), Shintosa F90 F1 (Fito), Shintosa Camelforce F1 (Nunhems), Titan F1 (Ramiro Arnedo S.A.) y Routpower F1 (Sakata). Se evaluó la patogenicidad de MNSV-W-SP mediante la inoculación mecánica del virus en cinco plántulas de cada variedad y como control positivo del bioensayo se utilizaron cinco plantas de sandía (*Citrullus lanatus* (Thomb.) Mansf. 'Dulce maravilla'). Después de 14 días, las cinco plántulas de sandía utilizadas como control positivo

murieron, mientras que todas las plántulas de las variedades injertadas permanecieron vivas y sin síntomas. El análisis por RT-PCR con los cebadores MNPo11up/MNPo11low confirmó la ausencia de virus en los patrones inoculados y mostró su presencia en las plántulas de sandía muertas.

Incógnitas por resolver

Desconocemos si el virus se transmite por la semilla y el papel de *O. bornovanus* en la transmisión, pero su implicación-intervención no sería de extrañar dado su papel en el cribado de melón. Tampoco sabemos la distribución de MNSV-ES-W en España, ni por qué se expresaron los síntomas en el cultivo de sandía en 2014. Aunque queda por confirmar, se sospecha que aquellas plantas injertadas estaban franqueadas. El franqueamiento es la emisión de raíces de la variedad por encima o por medio del patrón, cosa que no suele ocurrir pero que no es imposible. Ante esta posibilidad, recomendamos el uso de injertos de sandía, fundamentales para desarrollar un buen cultivo, sobre calabaza.

BIBLIOGRAFÍA

- Campbell, R.N., Wipf-Scheibel, C., Lecoq, H. (1996) Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology*, 86:1294–1298.
- Cuadrado, I.M., Gómez, J., Moreno, P. (1993) El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería. I. Importancia del MNSV como causa de la muerte súbita del melón. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas*, 19: 93–106.
- García-Jiménez, J., López, M.M., Jordá, C. (2007) Enfermedades más importantes que previene el injerto. En: De Miguel, A., De la Torre, F., Baixauli, C., Maroto, J.V., Jordá, M.C., López, M.M., García-Jiménez, J., eds. *Injerto de Hortalizas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid:España, p. 39–53.
- Martínez de Salinas, J., Fraile, A., Solís, I., García-Arenal, F. (1987) Characterization of Spanish isolate of *Melon necrotic spot virus*. En: *Proceedings of VII Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. Granada: Spain, p. 142.
- Ohki, T., Sako I., Kanda, A., Mochizuki, T., Honda, Y., Tsuda, S. (2008) A new strain of *Melon necrotic spot virus* that is unable to systemically infect *Cucumis melo*. *Phytopathology* 98:1165-1170.
- Ruiz, L., Crespo, O., Simon, A., Gomez, J., Janssen, D. (2016) First report of a novel *Melon necrotic spot virus* watermelon strain in Spain. *Plant Disease*, 100: 1031.