

Implicaciones de los abejorros (*Bombus* spp.) en la dispersión del virus del mosaico del pepino dulce (Pepino Mosaic Virus) en cultivos de tomate

A. LACASA, M.M. GUERRERO, I. HITA, M.A. MARTÍNEZ, C. JORDÁ, P. BIELZA, J. CONTRERAS, A. ALCÁZAR, A. CANO

Desde 1999 el virus del mosaico del pepino dulce (Pepino Mosaic Virus, PepMV) afecta el cultivo del tomate en varios países europeos. Produce abullonado, mosaicos y filiformismo en las hojas jóvenes y jaspeado y pardeamiento en los frutos. Se transmite fácilmente por contacto entre plantas y mecánicamente por las manipulaciones de las labores culturales (desbrotado, entutorado, etc.).

Se han realizado ensayos para conocer las posibles implicaciones de los abejorros polinizadores en la dispersión del virus en los cultivos de invernadero, donde mayoritariamente se utilizan *Bombus terrestris* y *B. canariensis*. En primavera, a las 4 semanas de haber puesto plantas de tomate sanas en un invernadero comercial contaminado de PepMV y con abejorros, se contaminaron las primeras plantas y a las 7-8 semanas se habían contaminado todas, para niveles medios de 1'1 a 3'0 flores visitadas/plantas y semana. Mediante test ELISA con suero de PepMV se ha detectado el virus en las patas (con o sin polen), en la cabeza y en el abdomen de los abejorros, siendo en las patas y en el polen de las escopas donde más frecuentemente se ha detectado. Al inocular, en condiciones controladas, plantas de tomate con extractos del cuerpo (incluido el polen adherido) de los abejorros recolectados en invernaderos de tomate contaminados de PepMV, se obtuvieron infecciones y síntomas en más del 85% de los casos.

No se conocen con exactitud los mecanismos de la transmisión que intervienen en la dispersión del virus por *Bombus* spp., ya que tampoco se conoce con precisión el comportamiento etológico de los abejorros en el cultivo del tomate, habiéndose puesto de manifiesto que pueden transportar partículas infectivas del PepMV.

A. LACASA, M.M. GUERRERO, I. HITA, M.A. MARTÍNEZ, A. ALCÁZAR y A. CANO: Protección Vegetal, CIDA, Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, c/ Mayor s/n, 30.150 La Alberca. (Murcia).

C. JORDÁ: Dpto. Ecosistemas Agroforestales, E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Valencia. c/ Camino de Vera, 14. 46.022 Valencia.

P. BIELZA, J. CONTRERAS: Dpto. Producción Agraria, E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 24, 30.203 Cartagena (Murcia).

Palabras clave: *Bombus canariensis*, *Bombus terrestris*, Pepino Mosaic Virus, tomate

INTRODUCCIÓN

El virus del mosaico del pepino dulce (Pepino Mosaic Virus, PepMV) afecta al cultivo del tomate de varios países europeos desde principios de 1999, que se detectó en

Holanda (VAN DER VLUGT *et al.*, 2000; WRIGHT y MUMFORD, 1999; FLETCHER, 2000; JORDÁ *et al.*, 2000 a).

La manifestación de la virosis se muestra variable con las condiciones ambientales (JORDÁ *et al.*, 2000 b; LACASA *et al.*, 2000).



Figura 1. Mosaicos y abullonados en plantas jóvenes.



Figura 2. Mosaico amarillo en plantas adultas.

En las plantaciones de la Región de Murcia, el abullonado y un tenue mosaico amarillo en el limbo de las hojas jóvenes (Figura 1), son los síntomas más extendidos, presentándose a lo largo de todo el año. En plantas jóvenes las afecciones más agresivas comportan, además, el apuntado de los folíolos, que pueden llegar al filiformismo. Esta última manifestación puede ser confundida con las alteraciones producidas por el virus del mosaico del pepino (Cucumber Mosaic Virus, CMV) o por la aplicación de dosis elevadas de hormona. El desarrollo de las plantas jóvenes se reduce, aunque luego se recuperen y se diluyan los síntomas en las plantas adultas, pudiendo llegar a perder uno o varios frutos en los primeros racimos (LACASA *et al.*, 2000).

En la primavera y en plantas desarrolladas, se pueden presentar intensos mosaicos amarillos en las hojas maduras, con distribución irregular y tonalidades doradas (Figura 2). En ocasiones, los amarillos son menos intensos y se distribuyen en las zonas intermedias o formando bandas paralelas a las nervaduras (Figura 3), que toman tonalidades plateadas. En estas plantas aparecen bandas longitudinales claras en el tallo, en los peciolo y en los sépalos (JORDÁ *et al.*, 2000 a; LACASA *et al.* 2000).

En los periodos frescos o que siguen a días con falta de luminosidad, se presentan "jaspeados" en los frutos (Figura 4), con una distribución irregular de la coloración roja en la superficie, siendo éste el síntoma con mayores repercusiones comerciales (LACASA *et al.*, 2000; WRIGHT y MUMFORD, 1999;



Figura 3. Bandas amarillas brillantes junto a las nervaduras.

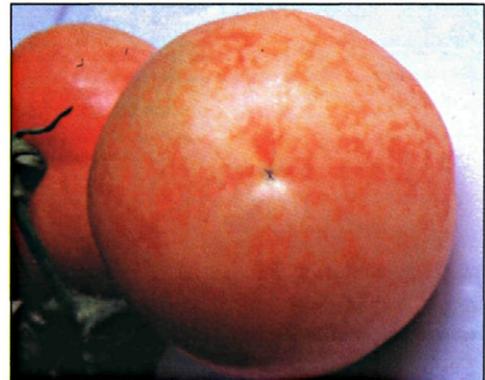


Figura 4. Jaspeado en frutos coloreados.

FLETCHER, 2000; JORDÁ *et al.*, 2000a). En los frutos de los primeros racimos es frecuente encontrar amplias zonas de color verde-marrón o rojo menos intenso, que contrasta con las partes correctamente coloreadas. Con el tiempo, las zonas con estos síntomas llegan a alcanzar el color rojo intenso, hasta homogeneizarse la coloración en toda la superficie del fruto.

El virus se transmite por contacto entre la parte aérea de la planta y por acciones mecánicas (manipulación de las plantas, roce con instrumentos y aparatos, e, incluso por el roce de la ropa de los operarios) (WRIGHT y MUMFORD, 1999; VAN DER VLUGHT *et al.* 2000; FLETCHER, 2000) propias de la ejecución de las prácticas culturales (Lacasa *et al.*, 2001). Durante un tiempo permanece el virus activo en los restos de plantas contaminadas, siendo ésta una vía de nuevas contaminaciones (WRIGHT y MUMFORD, 1999; FLETCHER, 2001). Las semillas deficientemente desinfectadas pueden actuar, aunque en pequeña proporción, como elementos de diseminación de la virosis (WRIGHT y MUMFORD, 1999; FLETCHER, 2000; JORDÁ *et al.*, 2000a).

No se tiene constancia de la transmisión de este virus por los insectos que habitualmente transmiten otras virosis que afectan al tomate. Sin embargo, no se ha descartado la posibilidad de que algún insecto estuviera implicado en la dispersión de la enfermedad (FLETCHER, 2000; LACASA *et al.*, 2000) por acción mecánica. OKADA *et al.* (2001) han encontrado que los abejorros actuaban como diseminadores del virus del mosaico del tabaco (Tobacco Mosaic Virus, TMV) en plantaciones de tomate en invernadero, al transportar el virus y facilitar la infección.

Al realizar los primeros seguimientos e indagaciones sobre la evolución epidemiológica del PepMV en las plantaciones de tomate de la Región de Murcia, observamos que la utilización de abejorros como polinizadores era un elemento común en todos los invernaderos donde la virosis afectaba a una elevada proporción de plantas, antes de que se hubiera iniciado la recolección. Por el contrario, en los invernaderos donde el cua-

jado de los frutos se favorecía por medios químicos, la incidencia de la virosis era baja.

En las dos últimas campañas se han realizado ensayos para tratar de averiguar las posibles implicaciones de los abejorros (*Bombus* spp.) en la diseminación del PepMV en cultivos de invernadero. En el presente trabajo se recogen los resultados de dos ensayos de campo, uno de ellos preliminar, llevados a cabo en plantaciones de primavera-verano.

MATERIAL Y MÉTODOS

ENSAYO PRELIMINAR. CAMPAÑA 1999/2000

Características del invernadero y del cultivo

El ensayo preliminar se realizó en un invernadero comercial situado en el término de Aguilas (Murcia), de tipo multicapilla, de unas 1'6 ha, con estructura metálica y cubierta de plástico, con malla de 4 x 6 hilos por centímetro en las aperturas de ventilación. Se cultivó la variedad Thomas, plantada a finales de febrero de 2000, en sustrato de grava y arena, regada y abonada por goteadores. Las líneas de plantas estaban dispuestas en la dirección Norte-Sur separadas entre sí 2'0 m, siendo 0'40 m la separación entre golpes de plantas dentro de cada fila. En cada golpe se pusieron dos plantas que fueron conducidas a dos tallos y entutoradas con hilos de rafia atados a un alambre de entutorado puesto junto a la base de las plantas y a otro puesto a 2 m de altura.

El invernadero estaba dividido en sectores de 25 m de anchura separadas por un pasillo de servicios de 2'5 m de anchura. Desde la apertura de las primeras flores se colocaron colonias de *Bombus terrestris*, a razón de 2 colonias por cada 3.000 m² de invernadero, en grupos de 4 colonias, situadas en lugares estratégicos del eje mayor del invernadero, sobre estructuras elevadas a 1'2-1'5 m del suelo.

En la parte central del segundo sector del Sur, se dejaron sin plantar los 12 m del extremo Sur de dos filas, donde luego se colocarían

las plantas libres de PepMV utilizadas como indicadores o trampas de la diseminación del virus por los abejorros.

Desde mediados de abril, la mayor parte de las plantas del invernadero presentaban síntomas de PepMV, predominando los abullonados y los mosaicos suaves en las hojas jóvenes. En amplios rodales del sector Sur se encontraban plantas con mosaicos amarillos intensos en las hojas, con bandas amarillas o plateadas paralelas a los nervios en las hojas desarrolladas, decoloraciones longitudinales en tallos, peciolos y sépalos y, ocasionalmente, intensos jaspeados en los frutos. Los días 17 y 24 de mayo se tomaron, al azar, muestras de 50 plantas en los dos sectores del Sur del invernadero. Las muestras se analizaron por el método ELISA con el suero de PepMV de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

Origen de las plantas libres de PepMV

Las plantas de tomate utilizadas como indicadores se obtuvieron en un invernadero experimental del CIDA en la finca Torre Blanca, situada en el término de Dolores de Pacheco (Murcia), fuera de las comarcas productoras de tomate.

A principios de marzo de 2000 se plantó la variedad Brillante en sacos de perlita de 1 m, situados en bancadas elevadas a 0'30 m del suelo. En cada saco se pusieron 6 plantas, en tres golpes, que fueron conducidas a un tallo. Se entutoraron con hilos de rafia y perchas colgadas en alambres dispuestos a 2 m de altura. El riego y el abonado se efectuó por goteadores. El invernadero disponía de mallas de 10 x 14 hilos por centímetro en las aperturas de ventilación, efectuándose control integrado de plagas.

A lo largo de todo el cultivo no se encontraron síntomas de PepMV en las plantas. Los días 3, 10, 17 y 24 de mayo se tomaron muestras de todas las plantas de una fila para analizarlas por el método ELISA con el suero de DSMZ. De esta fila se tomaron luego las plantas que se llevaron al inverna-

dero comercial de Aguilas, para utilizarlas como indicadoras.

Planteamiento del ensayo

El 24 de mayo se trasladaron las 6 plantas de un saco de sustrato, libres de PepMV, al invernadero comercial. Se instalaron en una de las líneas que no tenían plantas, sin que en el transporte tocaran el suelo. Se colgaron de los alambres de forma que quedaron totalmente separados entre sí. Se prolongó una terminal de riego poniendo un goteador en una piqueta para cada planta.

Las plantas fueron rodeadas por cintas coloreadas indicadoras para que no fueran manipuladas, ni tratadas ni rozadas por los operarios o las máquinas. A partir de la fecha de instalación las plantas fueron entutoradas, destalladas y la fruta recolectada de forma individual por el personal del equipo investigador, cada 7 días. Sólo los guantes estuvieron en contacto con las plantas en las manipulaciones, utilizando un par para cada planta. Los brotes se cortaron con tijeras de podar, que fueron sumergidas en una solución de hipoclorito sódico al 25% después de cada corte.

Controles realizados

Cada semana se contó el número de flores abiertas en cada planta, y el número de las que presentaban signos de haber sido visitadas. Para poder corroborar la actividad semanal de los polinizadores se contaron las flores abiertas y visitadas en 10 plantas de la variedad Thomas.

En cada fecha de control se tomaron muestras de cada planta para analizarlas por el método ELISA con el suero de PepMV de DSMZ. Se tomó un brote axilar y una hoja de la parte apical de cada planta. También se tomaron muestras de 20 plantas de la variedad Thomas en las filas próximas a donde se encontraban las plantas de la variedad Brillante, para corroborar la infección. Los

muestreos terminaron el 19/07/00, cuando finalizó el cultivo.

ENSAYO DE DISPERSIÓN. CAMPAÑA 2000/2001

Características del invernadero

Estaba situado en el término de Mazarrón, siendo las características constructivas, de orientación y cultivo similares a las del de Aguilas y de 1'2 ha de superficie. Se plantó la variedad Thomas a finales de octubre de 2000 en sistema de "intercropping" junto a la variedad 036 injertada sobre patrón He Man. En la primera decena de febrero de 2001 se cortaron las plantas de 036, se limpió el invernadero y se entutoraron, a un tallo, las plantas de la variedad Thomas.

Entre finales de octubre de 2000 y principios de febrero de 2001 se realizaron tres muestreos de 50 plantas de las dos variedades para analizarlas por el método ELISA con suero de PepMV de DSMZ. En el último muestreo, el 100% de las plantas analizadas de las dos variedades dieron positivo al análisis de PepMV, siendo muy pronunciados los síntomas sobre los brotes de las plantas de la variedad Thomas y en los frutos de la variedad 036.

En el invernadero hubieron permanentemente instaladas colonias de *B. terrestris* y a partir de mediados de febrero se introdujeron también *B. canariensis*.

Las prácticas culturales, incluidos los tratamientos fitosanitarios, fueron las habituales en la zona, manejando adecuadamente las colonias de *Bombus* para evitar los efectos de los plaguicidas.

Origen de las plantas libres de PepMV

Las plantas de tomate utilizadas como indicadores en este ensayo fueron de la variedad Rambo y se produjeron en el mismo invernadero experimental y en las mismas condiciones que en el ensayo anterior. Se pusieron en contenedores de poliestireno de

18 l con sustrato de fibra de coco y riego por goteadores de microtubo puesto en piquetas.

A lo largo del periodo de cultivo no se encontraron síntomas de PepMV. Los días 5, 12, 19 y 26 de febrero se tomaron muestras de todas las plantas y se analizaron por el método ELISA con suero de PepMV de DSMZ, siendo negativos los resultados de los análisis.

Planteamiento del ensayo

En el vértice Sureste del invernadero se cortaron las plantas en 15 m de dos filas. Se quitaron los restos de vegetales (plantas de tomate y malas hierbas), se desinfectaron las estructuras, se puso un plástico de 800 galgas cubriendo toda la superficie y se rodeó el perímetro con una malla de 4 x 6 hilos cm de 1'5 m de altura sujeta al suelo con tierra y a los hilos de entutorado con hilos (Figura 5), de forma que quedó un recinto cerrado para impedir el acceso a los operarios y a las máquinas utilizadas para los tratamientos plaguicidas, pudiendo los abejorros acceder a las plantas por encima del cerramiento.

El 1 de marzo de 2001 se pusieron 15 contenedores con una planta de la variedad Rambo (Figura 6) libres de virus en dos filas y se colgaron las plantas, con sus mismas perchas de entutorado, a los alambres superiores, quedando dispuestas de forma que no



Figura 5. Aislamiento de las plantas indicadoras.



Figura 6. Planta indicadora de la variedad Rambo.

se tocaban entre sí, ni rozaban las estructuras del invernadero. Para la fertirrigación se dispuso de una manguera independiente y los mismos goteadores que tenían en el invernadero donde se produjeron. En el momento del traslado las plantas tenían 6-7 ramilletes cuajados y se les quitaron los frutos de los 3 ramilletes basales.

La manipulación de las plantas se efectuó igual que en el ensayo de la campaña anterior, sin que recibieran ningún tratamiento químico durante el tiempo que duró el ensayo, dándolo por finalizado el 17 de mayo.

Controles realizados

Fueron los mismos que en el ensayo de la campaña precedente, tratando de evaluar la actividad visitadora y la frecuencia de las visitas tanto en la variedad Rambo como en la Thomas.

La infección de las plantas se determinó por análisis ELISA con el suero de PepMV de DSMZ, de muestras de cada planta tomadas todas las semanas hasta que se infectaron.

Detección del PepMV en los abejorros

Desde el 8 de marzo hasta el 19 de abril, en cada fecha de control, se capturaron entre 4 y 6 abejorros con y sin polen en las patas

en el invernadero donde se realizaban los ensayos de transmisión.

El día 15 de marzo y el 24 de abril se capturaron 4 *B. terrestris* en un invernadero de la variedad Daniella sin PepMV, cuando pecoreaban en las flores de tomate.

En todos los casos los abejorros eran transportados individualmente, en botes con aperturas de ventilación, metidos en recipientes refrigerados. Se descuartizaron para analizar por separado: la cabeza con el tórax, las patas y el polen que transportaban, y, el abdomen. El análisis se realizó por el método ELISA con suero de PepMV de DSMZ.

Infectividad del PepMV transportado por los abejorros

En un invernadero cultivado de la variedad Daniella cuyas plantas estaban mayoritariamente afectadas de PepMV se capturaron, el 24 de mayo de 2001, 4 *B. terrestris* que transportaban polen. El 13 de junio de 2001 se capturaron 3 *B. terrestris* que transportaban polen cuando pecoreaban en las flores de plantas de tomate de la variedad Boludo en un invernadero exento de PepMV.

Las patas con el polen de cada abejorro se trituraron en un medio tampón y se homogeneizó en PBS-PVP. Luego se inocularon mecánicamente 3 plantas de la variedad Marmande Claudia con el homogeneizado de las patas y polen de cada abejorro. Se utilizó carborundum y se realizó la inoculación en 2 hojas de cada planta, cuando éstas tenían entre 4 y 6 hojas. Las plantas inoculadas permanecieron en la misma cámara climatizada donde habían sido obtenidas, bajo las siguientes condiciones: $T^a = 23 \pm 1^\circ\text{C}$; HR del 45-60% durante el periodo iluminado de la jornada y del 85-100% durante el oscuro; Fotoperiodo 14h L: 10h O. Periódicamente se analizaron las plantas inoculadas por el método ELISA, con suero de PepMV de DSMZ y se anotaron todas las semanas los síntomas que presentaban.

Tabla 1. Proporción media de flores visitadas por *B. terrestris* y proporción de plantas portadoras de PepMV. Ensayo del 2000.

Fechas	% flores visitadas		% plantas infectadas de PepMV
	Var. Thomas	Var. Brillante	Var. Brillante
31 mayo	–	0'0	0'0
7 junio	24'3	5'7	0'0
14 junio	40'2	2'6	0'0
21 junio	9'2	21'2	16'6
28 junio	11'5	0'0	33'3
5 julio	15'7	2'2	66'6
12 julio	3'3	0'0	100'0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONTAMINACIÓN DE PLANTAS

Ensayo preliminar

La proporción media de flores visitadas fue significativamente menor en las plantas indicadoras de la variedad Brillante (6'1% de las emitidas durante el periodo de ensayo) que en las de la variedad Thomas (20%). Pese a ello, a la cuarta semana de exposición, una planta indicadora (Brillante) resultó ser portadora de PepMV, mostrando síntomas a la semana siguiente. A las siete semanas todas las plantas de la variedad Brillante eran portadoras de PepMV (Tabla 1).

La coloración roja de la cinta delimitadora pudo influir en el reducido número de flores visitadas de la variedad Brillante (21 flores visitadas de 347 flores generadas por las 6 plantas) en comparación a las de la variedad Thomas (86 flores visitadas de las 430 flores generadas por las 10 plantas controladas). Sin embargo, estos condicionantes no parece influyen en la eficacia de la dispersión de la virosis, ya que todas las plantas fueron visitadas en varias ocasiones, aunque en algún control, las flores de alguna planta no habían sido visitadas. Las altas temperaturas pueden ser el motivo de que la proporción de flores visitadas en las plantas de las dos variedades fuera tan reducida.

Ensayo de dispersión

En el ensayo de principios de primavera, no se encontraron diferencias significativas entre la proporción media de flores visitadas en las plantas de la variedad Thomas (35'2% de las emitidas durante el periodo del ensayo) y en las plantas indicadoras de la variedad Rambo (30'6%). Sin embargo, a partir de principios de abril, en muchas fechas de control la proporción de flores visitadas en las plantas indicadoras fue menor (Tabla 2). La frecuencia de visitas, como presencia media de flores visitadas por fecha y por planta, varió entre 1'1 y 3'0 flores/planta y fecha, siendo todas las plantas visitadas en una media de 6'3 fechas en la variedad Rambo y de 8'4 fechas en la variedad Thomas.

La cuarta semana se detectó la primera planta portadora de PepMV presentando síntomas en los brotes jóvenes y en los frutos dos semanas más tarde. Al cabo de 9 semanas todas las plantas eran portadoras del virus (Tabla 2) y a las 11 semanas todas manifestaban síntomas de abullonado y mosaico en las hojas jóvenes; dos plantas presentaban mosaicos amarillos intensos en las hojas desarrolladas. La presencia de jaspeados en los frutos varió con las fechas, por lo que no se presentaron en todas las plantas ni en todos los frutos de una planta.

Tabla 2. Evolución de la proporción media de flores visitadas por *B. canariensis* y *B. terrestris* y de la proporción de plantas infectadas por PepMV. Campaña 2001.

Fechas	% flores visitadas		% plantas infectadas de PepMV
	Var. Thomas	Var. Rambo	Var. Rambo
8 marzo	31'54	34'0	0'0
15 marzo	47'2	46'6	0'0
22 marzo	48'3	48'7	0'0
29 marzo	65'4	53'8	6'6
4 abril	75'8	38'7	6'6
11 abril	42'4	5'2	40'0
19 abril	36'7	27'2	73'3
26 abril	14'3	9'8	80'0
3 mayo	41'8	13'0	100'0
10 mayo	25'9	2'2	100'0
17 mayo	9'8	4'5	100'0

Tabla 3. Detección de PepMV en distintas partes del cuerpo de *Bombus* spp. capturados en invernaderos con y sin PepMV (número de abejorros en los que se detectó PepMV/número de abejorros analizados)
n. a. = no analizado

	Adultos con polen		Adultos sin polen		Invernadero sin PepMV
	<i>B. terrestris</i>	<i>B. canariensis</i>	<i>B. terrestris</i>	<i>B. canariensis</i>	<i>B. terrestris</i> con polen
Cabeza + tórax	1/10	5/22	0/2	0/9	0/8
Abdomen	0/10	2/24	0/2	0/9	0/8
Polen de las patas	1/2	5/5	n.a.	n.a.	n.a.
Patatas que tenían					
bolas de polen	2/2	15/24	n.a.	n.a.	0/8
Patatas sin bola de polen	n.a.	n.a.	2/14	2/14	0/8

Detección del PepMV en el cuerpo de los abejorros

Bombus canariensis fue la especie predominante en el invernadero comercial de Mazarrón donde se realizaron los ensayos en 2001, por lo que fue mayor el número de ejemplares de esta especie analizados. Más del 65% de los abejorros capturados pecoreando y transportando polen, portaban partículas virales en las patas (con o sin bola de polen) (Tabla 3). El 31% también transportaban partículas de PepMV en la cabeza

y/o tórax, y cerca del 6% también las portaban en el abdomen. Cuando se capturaban los abejorros a la salida de los nidales o cuando todavía no habían realizado visitas, sólo se detectaron partículas virales en las patas en el 1'2% de los adultos analizados, no detectándolo ni en la cabeza + tórax ni en el abdomen (Tabla 3).

Los análisis realizados a las distintas partes del cuerpo de los abejorros capturados en el invernadero sin presencia de PepMV, dieron resultados negativos.

Utilizando el método ELISA, OKADA *et al.* (2000) detectaron partículas del virus del mosaico del tabaco (TMV) en las patas y en el cuerpo de *B. terrestris* capturados en invernaderos contaminados del virus, aunque no llegaron a especificar si las partículas virales eran adquiridas en el polen de las plantas contaminadas o en otros órganos de la flor o de la planta.

Infektividad del PepMV transportado por los *Bombus*

No se obtuvo infección con el extracto de uno de los abejorros capturados el 19 de junio en ninguna de las plantas inoculadas (Tabla 4). Para el resto de los abejorros utilizados se produjo infección en al menos una de las tres plantas inoculadas. Sólo en un caso se obtuvo infección en las tres plantas inoculadas (Tabla 4).

Las variaciones en los resultados de la inoculación de los extractos de patas de abejorro con polen, pueden estar relacionadas con la cantidad de partículas virales transportadas por los abejorros o con la capacidad infectiva o viabilidad de tales partículas. Esto último estaría en función del tiempo transcurrido entre la adhesión de las partículas al cuerpo del insecto y el momento de realizar la inoculación y, al mismo tiempo,

de la temperatura. La cantidad de partículas virales transportadas por los adultos depende de la actividad del insecto y del título de virus en las plantas. Las epidemias más intensas de PepMV en los cultivos de tomate de invernaderos del área mediterránea se producen en el invierno y en la primavera (JORDÁ *et al.*, 2000a; LACASA *et al.*, 2000) por lo que en las capturas realizadas a principios del verano es probable que la contaminación de los adultos fuese menor que en las de mayo.

Estos resultados parciales indican que los abejorros son portadores de partículas de PepMV y que puedan contribuir a la dispersión de esta virosis, que encuentra en las prácticas culturales de desbrotado y entutorado una forma más rápida de diseminación, ya que en tan solo un destallado y desbrotado un operario puede llegar a contaminar 6 a 8 plantas (LACASA *et al.*, 2001).

No se conoce con exactitud el mecanismo de transmisión de Tobamovirus o Potexvirus por insectos polinizadores. OKADA *et al.* (2001) interpretan que la dispersión del virus del mosaico de tabaco en el tomate por *B. terrestris* se produciría por el mecanismo singular de visita de las flores. Al visitar las flores de plantas contaminadas de TMV las mandíbulas sirven de elemento de sujeción del insecto a las anteras (Figura 7), luego

Tabla 4. Infektividad del PepMV transportado por *Bombus terrestris*. Inoculación mecánica en condiciones controladas de plantas var. Marmande con triturado de las patas con polen

	% de plantas ELISA positivo a PepMV	Tiempo medio en dar ELISA positivo a PepMV el 50% de las plantas	Síntomas a las 8 semanas
24 mayo			
Bombus 1	66'6	3 semanas	Abullonado + mosaico
Bombus 2	66'6	3 semanas	Abullonado
Bombus 3	100'0	3 semanas	Abullonado + mosaico
Bombus 4	66'6	2 semanas	Abullonado + mosaico
19 junio			
Bombus 1	33'3	3 semanas	Abullonado
Bombus 2	0'0	—	—
Bombus 3	33'3	3 semanas	Abullonado



Figura 7. *Bombus terrestris* en visita a la flor.



Figura 8. *Bombus canariensis* visitando una flor.

agita la flor al mover el cuerpo y las alas por lo que el polen se desprende; después recoge el polen que ha quedado adherido al cuerpo y lo almacena en las escopas de los patas traseras para transportarlo a los nidales. Los autores consideran que cuando se reiteran las visitas a una misma flor –lo que ocurre cuando escasean las flores en el invernadero o la densidad de abejorros es elevada– se llegará a producir lesiones en el estigma y en ovario,

siendo a través de las heridas que se produciría la infección de la planta sana visitada.

Aunque quizás sea menos probable, la adquisición y la infección se podría producir por contacto de los adultos con otros órganos de la propia flor (Figura 8) o de otra parte de la planta. Para limpiar el cuerpo del polvo y los trozos de algodón, los abejorros se posan en las hojas y con los peines de fuertes sedas de las patas traseras peinan las sedas de todo el cuerpo. Para eliminar los restos que quedan en los peines los frotran contra la superficie de la hoja, rasgando células de la epidermis y rompiendo los tricomas. A través de las heridas se produciría la adquisición –adherencia– de las partículas del virus por el abejorro y por la misma vía se produciría la contaminación de tejidos de plantas sanas.

Queda, pues, por dilucidar los mecanismos precisos que intervienen en la transmisión, y por conocer el comportamiento etológico de los abejorros en los cultivos de tomate realizados en invernadero que permitan evaluar la incidencia que los polinizadores, en particular de *Bombus* spp., tienen en las epidemias del virus del mosaico del pepino dulce en el tomate. Ello permitirá arbitrar las medidas adecuadas para reducir o paliar la incidencia de la virosis.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo se encuadra en el ámbito de actuación del proyecto de investigación AGL 2000-1651-C03-02 financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología. Expresamos el agradecimiento a los productores de tomate, en particular a la empresa DURÁN H^{os} y a los asociados a las cooperativas COARA y COEXMA, por su colaboración.

ABSTRACT

LACASA A., M.M. GUERRERO, I. HITA, M.A. MARTÍNEZ, C. JORDÁ, P. BIELZA, J. CONTRERAS, A. ALCÁZAR, A. CANO. 2003. Implication of bumble bees (*Bombus* spp.) on Pepino Mosaic Virus (PepMV) spread on tomato crops. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 393-403

Since 1999, Pepino Mosaic Virus (PepMV) is a new virus disease for tomato crops of several European countries. It produces mosaics and deformations on the leaves and mottled and brown fruits on infected tomato plants. It is easily transmitted by plant contact and mechanically by plant manipulation from cultural practices (staking and pruning plants, etc.). Assays have been carried out to determine the potential implications of bumble bees on the spread of the disease on greenhouse tomato crop where *Bombus terrestris* and *B. canariensis* were used. In spring, healthy plants were transplanted in a commercial greenhouse with PepMV infested plants and bumble bees used as pollinators. The first plants with PepMV symptoms were observed four weeks after transplant and after seven to eight weeks all plants were infested. Bumble bees were recorded to visit flowers on each plant 1.3-3.0 times a week on average. PepMV was detected by ELISA using PepMV antisera on legs (with and without pollen), head and abdomen of bumble bees. PepMV was detected more frequently on legs. When healthy tomato plants were inoculated with body extract of PepMV contaminated bumble bees more infections and symptoms were observed in more than 85% of the cases.

The transmission processes implicated in virus spread by bumble bees are not well known, nor is it precisely bumble bees behaviour on tomato crops. In this work transmission of PepMV particles by bumble bees has been demonstrated.

Key words: *Bombus canariensis*, *Bombus terrestris*, Pepino Mosaic Virus, tomato.

REFERENCIAS

- FLETCHER J., 2000. Pepino mosaic a new disease of tomatoes. *Horticultural Development Council, Fact Sheet*, 12, 6 pp.
- JORDÁ C., LÁZARO A., FONT I., LACASA A., GUERRERO M.M., CANO A., 2000 a. Nueva enfermedad en el tomate. *Phytoma-España* 119: 23-28.
- JORDÁ C., LÁZARO A., MARTÍNEZ-CULEBRAS P., MEDINA V., LACASA A., GUERRERO M.M., CANO A., HITA I., 2000b. Avances en el conocimiento de un nuevo virus: el PepMV. *Phytoma - España* 121: 36-41.
- LACASA, A.; JORDÁ, C.; GUERRERO, M.M.; LÁZARO, A.; CANO, A.; FONT, I.; ALCÁZAR, A.; ONCINA, M. 2000. La nueva enfermedad del tomate, producida por el Virus del Mosaico del Pepino Dulce (Pepino Mosaic Virus, PepMV). *FECOAM. Informa*, 28: 34-40.
- LACASA, A.; GUERRERO, M.M.; HITA, I.; MARTÍNEZ, M.A.; HERNÁNDEZ, M.D. 2001. La diseminación del virus del mosaico del pepino dulce (Pepino Mosaic Virus) en las labores de entutorado y desbrotado de las plantas de tomate. *Bol. San. Veg. Plagas*. 27: 489-501.
- OKADA, K.; KUSAKARI, S.; KAWARATANI, M.; MEGORO, J.; OHKI, S.T.; OSAKI, T. 2000. Tobacco mosaic virus transmissible from tomato to tomato by pollinating bumblebees. *Journal of General Plant Pathology*, 66, 1:71-74.
- VAN DER VLUGT R.A.A., STIJGER C.C.M.M., VERHOEVEN J.Th J. LESEMANN D.E., 2000. Report of Pepino Mosaic Virus in Tomato. *Plant Disease*, 84 (1), 103.
- WRIGHT D., MUMFORD R., 1999. Pepino Mosaic Potyvirus (PepMV). First records in tomato in United Kingdom. *Plant Diseases*, 89. Central Sciences Laboratory, York, U.K.

(Recepción: 28 octubre 2002)

(Aceptación: 18 noviembre 2002)