

Estudios epidemiológicos sobre el virus del mosaico del pepino en diferentes cultivos y provincias españolas: identificación serológica de los subgrupos DTL y ToRS

C. DE BLAS, G. CARAZO, S. CASTRO y J. ROMERO

En prospecciones de muestras con síntomas de infección viral realizadas en diferentes regiones españolas y en distintos cultivos durante los años 1990 y 1991, mediante análisis por la técnica inmunoenzimática ELISA con anticuerpos policlonales, se encontraron infecciones de CMV del 28 % en ambos años. El virus está presente en altos porcentajes en las principales hortalizas españolas: melón, pimiento, tomate, calabacín, judía, y pepino. También se han detectado malas hierbas (*datura*, *nicotiana alba*, *bledo*) infectadas. Mediante anticuerpos monoclonales específicos se han identificado los dos subgrupos DTL y ToRS, distribuidos según zonas y época de recolección, encontrándose algunas plantas infectadas con ambos. Esta distribución parece estar correlacionada con las propiedades de termosensibilidad de los subgrupos.

C. DE BLAS, G. CARAZO, S. CASTRO y J. ROMERO. Dpto. de Protección Vegetal. CIT-INIA, Apartado 8111, 28080 Madrid.

Palabras clave: Virus vegetales, cucumovirus, epidemiología, ELISA.

INTRODUCCION

El virus del mosaico del pepino (Cucumber Mosaic Virus, CMV), miembro tipo del grupo de los cucumovirus, presenta una gama de huéspedes naturales muy amplia: afecta a más de 775 especies de 365 géneros pertenecientes a 85 familias de mono y dicotiledóneas (DOUINE *et al.*, 1979 b), principalmente a Crucíferas, Solanáceas, Compuestas, Papilionáceas y Cucurbitáceas, siendo a nivel mundial el primer causante de pérdidas económicas en hortalizas y ornamentales cultivadas al aire libre (TOMLINSON, 1987). El síntoma más común inducido por CMV es el mosaico; sin embargo, la gravedad de la enfermedad puede variar desde no mostrar síntomas en algunos cultivos, hasta la muerte de la planta huésped. CMV se transmite por numerosas especies de áfidos de forma no persistente, siendo los

más comunes *Aphis gossypii* y *Myzus persicae* (HAMILTON, 1985).

DEVERGNE y CARDIN (1973) dividieron los aislados de CMV en dos grandes subgrupos, DTL y ToRS, según su comportamiento en tests de inmunodifusión. Esta clasificación serológica se correlaciona con los grupos C y B definidos por sus reacciones sobre plantas huésped (MARROU *et al.*, 1975), así como con propiedades de hibridación de ácidos nucleicos (PIAZZOLLA *et al.*, 1979; OWEN y PALUKAITIS, 1988). Las diferencias entre los subgrupos están representadas en el Cuadro 1.

El serogrupo ToRS es más prevalente en las regiones templadas pues se multiplica mal a elevadas temperaturas. En cambio el serogrupo DTL, más termorresistente (MARCHOUX *et al.*, 1976), predomina en las zonas tropicales y subtropicales (HAASE *et al.*, 1989). Sin embargo, ambos subgrupos pue-

Cuadro 1.-Subgrupos de CMV

Grupos		Características diferenciales	Referencia
DTL	ToRS	serología	Devergne y Cardin, 1973
U	N	serología	Richter <i>et al.</i> , 1972
C	B	síntomas sobre huéspedes	Marrou <i>et al.</i> , 1975
Termorresistente	Termosensible	sensibilidad térmica	Marchoux <i>et al.</i> , 1976
B	L2	mapeado de péptidos	Edwards y Gonsalves, 1983
WT	S	hibridación ácidos nucleicos	Piazzolla <i>et al.</i> , 1979
Subgrupo I	Subgrupo II	hibridación ácidos nucleicos	Owen y Palakaitis, 1988

den convivir en el campo e incluso en el mismo individuo y se ha observado que durante los meses de verano puede producirse un cambio de predominio de cepas ToRS a DTL, debido a una selección de las cepas DTL, lo que ha sido comprobado en condiciones de invernadero (DOUINE *et al.*, 1979 a; QUIOT, 1980).

CMV ha sido descrito como un virus importante en los cultivos hortícolas en España (PEÑA-IGLESIAS *et al.*, 1979; GARCÍA-LUQUE *et al.*, 1983, 1984; LUIS-ARTEAGA *et al.*, 1988; LUIS-ARTEAGA, 1989; MURANT *et al.*, 1990; JORDA *et al.*, 1992), tanto sólo, como asociado a RNAs satélites (GARCÍA-LUQUE *et al.*, 1984; MURANT *et al.*, 1990; JORDA *et al.*, 1992), habiéndose detectado una mayoría de cepas DTL (LUIS-ARTEAGA, 1989; JORDA *et al.*, 1992), pero hasta ahora no se había realizado un estudio epidemiológico amplio, que incluyera la identificación de los subgrupos de CMV.

En este trabajo se recogieron muestras en diversas provincias españolas para estudiar la dispersión del virus en el campo, y la identificación de los subgrupos presentes en las diferentes zonas hortícolas mediante ELISA con anticuerpos monoclonales.

MATERIALES Y METODOS

Durante los años 1990 y 1991 se recogieron en diferentes regiones españolas muestras, en su mayoría hortícolas, con síntomas de virosis, y también algunas malas hierbas.

A fin de evitar contaminaciones, se recogieron en bolsas separadamente (directamente a través de la bolsa o con guantes), y se introdujeron inmediatamente en una nevera portátil con hielo hasta su conservación a 4° C, -20° C o desecación con gel de sílice.

Para la detección de CMV se utilizaron: a) anticuerpos policlonales polivalentes comerciales (Sanofi, Francia) que detectan los serotipos DTL y ToRS, b) anticuerpos policlonales de Agdia Inc. (USA) que detectan CMV-cr, y c) un kit (Sanofi) compuesto por anticuerpos monoclonales polivalentes, específicos del subgrupo ToRS y específicos del subgrupo DTL.

Las muestras fueron ensayadas por ELISA-DAS (CLARK y ADAMS, 1977) con los anticuerpos policlonales para determinar su posible infección con CMV, utilizando placas de poliestireno (Nunc), volúmenes de 0,1 ml, y en las condiciones sugeridas por las casas comerciales. Las muestras se procesaron en mortero, o en el caso de las hojas, en bolsa de plástico con la ayuda de un tubo de vidrio en tampón citrato 0,5 M pH 6,5 conteniendo Triton X-100 al 0,1 % y ácido mercaptoacético al 0,1 % en la proporción 1/10 (p/v). Como criterio para considerar una muestra positiva se eligió tres veces el fondo para los anticuerpos policlonales de Sanofi, y dos veces el fondo para los anticuerpos policlonales de Agdia (DE BLAS, 1992).

Para la identificación de los subgrupos de CMV se utilizaron anticuerpos monoclonales

les específicos (Sanofi) en ensayos de ELISA-TAS realizados según las instrucciones de la casa comercial. Se utilizó como criterio para incluir una muestra de CMV en un subgrupo el que presentara un valor de A_{405} dos veces mayor con el anticuerpo específico para dicho grupo que para el contrario (DE BLAS, 1992).

RESULTADOS

Durante los años 1990 y 1991 se recogieron en 18 provincias españolas, sobre todo en las zonas hortícolas del Mediterráneo, Valle del Ebro, Extremadura y Galicia, muestras de plantas con síntomas de infección viral (en general mosaicos más o menos severos, deformaciones de hojas o frutos, enanismo, amarilleamientos, etc.). Se hizo una especial incidencia en el cultivo del pimiento. Los síntomas de algunas plantas que resultaron estar infectadas por CMV se reflejan en la figura 1.

Las muestras fueron analizadas por ELISA-DAS con anticuerpos policlonales de Sanofi (años 1990 y 1991) y de Agdia (año 1990), y las que resultaron positivas en el año 1991 fueron analizadas con anticuerpos monoclonales en ensayos ELISA-TAS para identificar el subgrupo.

Se observó que las muestras, guardadas a 4° C ó -20° C, que no fueron procesadas pronto, perdían los epítomos rápidamente y los anticuerpos tanto policlonales polivalentes como monoclonales para subgrupo dejaban de reconocerlos.

En el año 1990 se recogieron 173 muestras, en las que se observó una presencia de CMV del 28,32 % (Fig. 2), considerando como positivas aquellas muestras que reaccionaron con al menos uno de los anticuerpos utilizados. Destaca un 44 % de incidencia en Madrid (zonas de Aranjuez y Villa del Prado), principalmente en pimiento, judía verde, calabacín y pepino. Por cultivos, en melón se detectó un 66 % de CMV, un 42 % en tomate, un 40 % en pepino, y un 24 % en pimiento.

Los anticuerpos policlonales polivalentes de Sanofi, aunque comercializados como capaces de detectar todas las cepas de CMV, pertenecientes a los subgrupos DTL y ToRS, no reaccionaron con 8 muestras que los anticuerpos de Agdia, que sólo reconocen un tipo cr, sí reconocían. Estas muestras suponen un 16 % del total de las muestras recolectadas en el año 1990 y positivas para CMV.

En el año 1991 se recogieron 468 muestras pertenecientes a las siguientes especies: pimiento, judía, tomate, garbanzo, borraja, *Brassica* sp., melón, pepino, maíz, haba y alfalfa. En estas muestras se detectó un 28,63 % de plantas infectadas por CMV (Fig. 3). Destaca un 92 % de incidencia en tomates de Almería, un 50 % de las malas hierbas muestreadas (*N. alba*, bledo y *Datura* sp.), y un 31 % en pimientos a nivel general.

En cuanto a los subgrupos de CMV, se detectaron 57 muestras infectadas con DTL (76 %) y 15 con ToRS (20 %), así como 3 muestras con una infección mixta (4 %), al parecer divididos por zonas (Fig. 4). ToRS se detectó en La Rioja (tanto en abril como en octubre) y Pontevedra (septiembre), y DTL en Navarra, Zaragoza, Madrid, y zona del Mediterráneo. Sólo en Badajoz se detectaron los dos subgrupos, con la presencia de una muestra de ToRS y 3 con infección mixta.

DISCUSION

Aunque el número de muestras analizadas de cada cultivo sea limitado y por tanto la incidencia de CMV no tenga significado estadístico, los porcentajes de infección del 28 % encontrados en 1990 y en 1991, indican una alta y constante presencia del virus en campo, así como un porcentaje de infección semejante al del 30 % encontrado por GARCÍA-LUQUE *et al.*, (1983) en una prospección realizada en varias regiones españolas durante 3 años (1979-1982), y analizando las muestras por síntomas sobre plantas indicadoras, microscopía electrónica y ensayos



A



B



C



D



Fig. 1.—Síntomas que presentaban algunas de las muestras de campo infectadas con CMV:

- A) Hojas de melón con enaciones y mosaico.
- B) Mosaico en hoja de tomate.
- C) Tomate con filimorfismo.
- D) Pimiento con arrugamiento de nervios y mosaico mate filiforme generalizado a toda la planta.
- E) Calabacín con mosaico y deformación de hoja.
- F) Idem, detalle de hoja.
- G) Mala hierba (*Nicotiana glauca*) con mosaico.

serológicos. El criterio que se ha utilizado para considerar una muestra como positiva por ELISA es bastante restrictivo, y parece posible que los anticuerpos utilizados no hayan sido capaces de reconocer todos los

aislados del virus por presentar éste una gran variabilidad serológica (RYBICKI y VON WECHMAR, 1985) por lo que es posible que el porcentaje de infección sea ligeramente más alto.

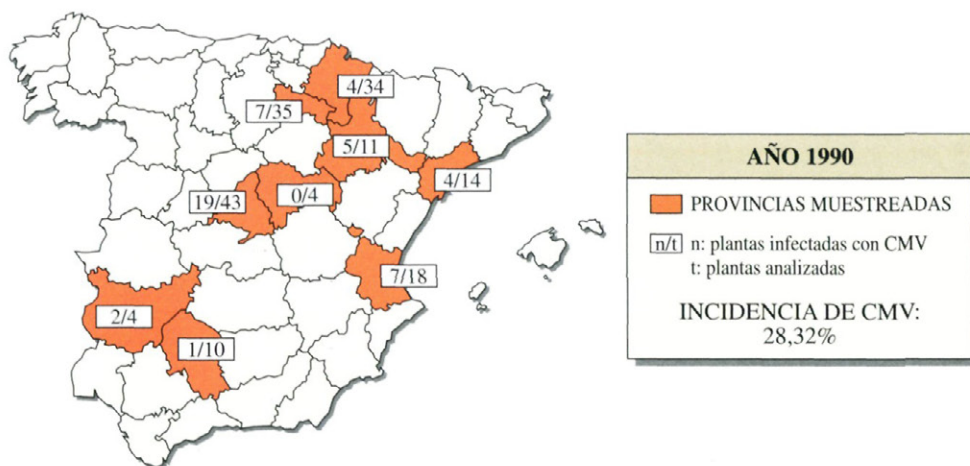


Fig. 2.—Presencia de CMV en muestras con síntomas procedentes de diferentes cultivos y provincias españolas durante la campaña agrícola de 1990.

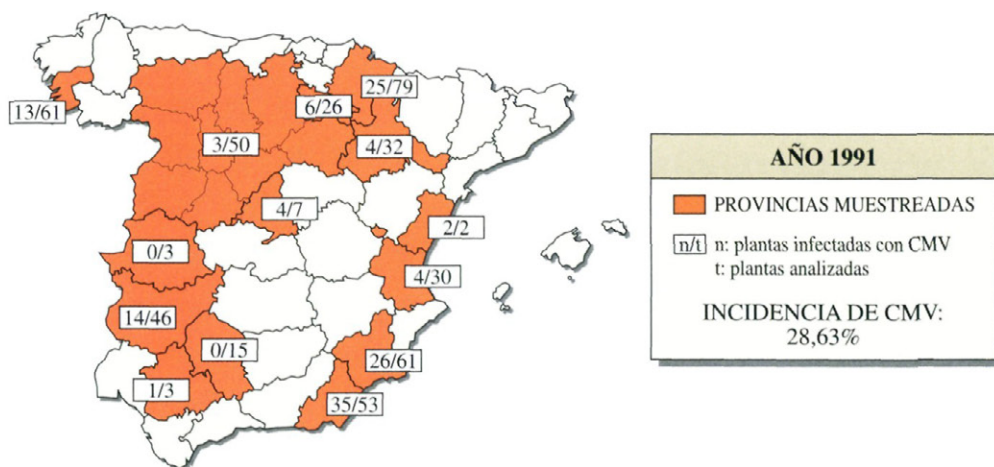


Fig. 3.—Presencia de CMV en muestras con síntomas procedentes de diferentes cultivos y provincias españolas durante la campaña agrícola de 1991.

Se han encontrado los dos subgrupos de CMV en España, distribuidos al parecer por zonas y por épocas del año. Es lógico que predomine el subgrupo DTL, ya que las cepas de ToRS son termosensibles (MARCHOUX *et al.*, 1976; DOUINE *et al.*, 1979 a), y España es un país en el que en verano se alcanzan temperaturas muy elevadas en general. Ahora bien, en este resultado parece haber influido notablemente la época en que se recogieron las muestras, ya que MURANT *et al.*, (1990) en sus prospecciones por la zona de Levante y Badajoz encontraron un 85 % de cepas tipo ToRS, pero estas muestras fueron recogidas a principios de junio en una época muy temprana de la campaña agrícola, y QUIOT (1980) ya observó en el sur de Francia que en los meses de verano cambia el predominio de cepas ToRS a DTL, por selección de las cepas más termorresistentes. En cambio, la mayoría de los análisis se realizan con muestras procedentes de cultivos que están más avanzados, y los síntomas de virosis son más evidentes, lo que explicaría un mayor predominio en esta época de CMV tipo DTL (este trabajo, LUIS-ARTEAGA, 1989; JORDA *et al.*, 1992). En Ga-

licia, con veranos más suaves, sólo se ha encontrado ToRS. En La Rioja se ha encontrado ToRS tanto en plantas de borraja recogidas en primavera como en pimientos recogidos en otoño, lo que parece indicar que es un subgrupo constante en la zona. Aunque esta región es semejante a la de Navarra, en la que se identificó exclusivamente DTL en la misma época, es posible que la proximidad del río Ebro a la zona en que se recogieron las muestras cree un microclima especial, en el que no se alcanzan temperaturas elevadas. En Badajoz se encontraron tanto muestras infectadas con CMV-DTL, como con ToRS, así como algunas infectadas con ambos. Estos resultados parecen estar relacionados con la época en que se recogieron las muestras, el mes de julio, y comparando con las observaciones de QUIOT (1980) y DOUINE *et al.*, (1979 a) parece que sería la época de transición de cepas termosensibles a termorresistentes. Estos datos de los subgrupos están en concordancia con la existencia de un gradiente en el que aumenta la presencia de DTL según aumenta la cercanía al ecuador: en Alemania, Inglaterra y Hungría se ha encontrado ToRS,

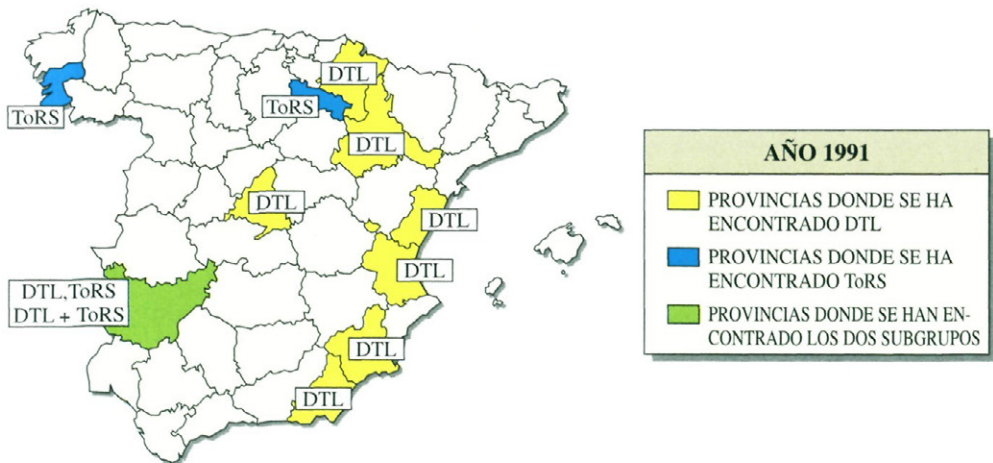


Fig. 4.—Presencia de los subgrupos de CMV en diferentes cultivos agrícolas de las diferentes provincias españolas muestreadas durante 1991.

en Francia, España, Argelia y Etiopía (clima mediterráneo o subtropical) se han encontrado las dos poblaciones, mientras que en Guadalupe, con un clima tropical, sólo se ha encontrado DTL (QUIOT *et al.*, 1979).

En nuestros experimentos hemos observado que el análisis de las muestras por ELISA-TAS debe hacerse rápidamente, pues en caso contrario los epítomos propios del subgrupo se pierden, aunque la muestra es reconocida por los anticuerpos policlonales. HAASE *et al.*, (1989) observaron que la diferenciación de los serotipos está basada en neotopos, solamente presentes en la partícula viral intacta, y por tanto en extractos vegetales las partículas virales, especialmente las del grupo DTL, se degradan rápidamente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este artículo quisieran agradecer la colaboración en los muestreos

de campo a: Carlos Fabregás y Mario Serdá, del Servicio de Protección de los Vegetales de Amposta (Tarragona); Miguel García Morató, del Servicio de Transferencia y Tecnología de Moncada (Valencia), y Vicente Félix, del Servicio de Extensión Agraria de Foios (Valencia); Elisa Sáez, del Servicio de Protección de Vegetales de Almería; Fernando Pérez, del Servicio de Extensión Agraria de San Martín de Valdeiglesias (Madrid); y Rafael Ortiz y Jose Manuel Barreiro, de Hispareco (Badajoz), y a nuestra compañera M.^a José Soto por cedernos sus muestras de campo para nuestros análisis. También agradecemos a J. Antonio García Uyarra la elaboración de los mapas epidemiológicos. Este trabajo fue parcialmente financiado por el INIA Proyecto n.º 8563, y por la CICYT Proyecto AGRO 89-0078.

ABSTRACT

DE BLAS, C., G. CARAZO, S. CASTRO y J. ROMERO (1993): Estudios epidemiológicos sobre el virus del mosaico del pepino en diferentes cultivos y provincias españolas: Identificación serológica de los sub-grupos DTL y ToRS. *Bol. San. Veg. Plagas*, **19**(3): 345-353.

A survey of samples showing symptoms of virus infection in vegetable crops from different Spanish regions during 1990 y 1991 has showed 28 % of CMV infected plants, as judged by ELISA. The virus was found in a high percentage in some of the main Spanish horticultural crops: melon, pepper, tomato, squash, French bean, and cucumber. Some infected weeds were also detected. Through the use of monoclonal antibodies we have identified the two subgroups of CMV: DTL and ToRS, whose distribution varied depending on the different zones and sampling time. Some mixed infections were also detected. A likely correlation of distributions with the different thermal sensitivity properties of CMV subgroups is proposed.

Key words: Plant viruses, cucumoviruses, epidemiology, ELISA.

REFERENCIAS

- CLARK, M. F. y ADAMS, A. N., 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, **34**: 475-483.
- DE BLAS, C., 1992: Estudios sobre técnicas de detección de virus y patógenos subvirales vegetales y búsqueda de resistencia al virus del mosaico del pepino (CMV) en germoplasma de pimiento. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense, Madrid.
- DEVERGNE, J. C. y CARDIN, L., 1973: Contribution a l'etude du virus dela mosaïque du concombre (CMV). IV- Essai de classification de plusieurs isolats sur la base de leur structure antigenique. *Ann. Phytopathol.*, **5**: 409-430.

- DOUINE, L., MARCHOUX, G., QUIOT, J. B., y CLÉMENT, M., 1979a: Phénomènes d'interférence entre souches du virus de la mosaïque du concombre (CMV). II.- Effet de la température d'incubation sur la multiplication de deux souches de sensibilités thermiques différentes, inoculées simultanément ou successivement à un hôte sensible *Nicotiana tabacum* var Xanthi nc. *Ann. Phytopathol.*, **11**: 421-430.
- DOUINE, L., QUIOT, J. B., MARCHOUX, G. y ARCHANGE, P., 1979b: Recensement des espèces végétales sensibles au virus de la Mosaïque du Concombre (CMV). Etude bibliographique. *Ann. Phytopathol.*, **11**: 439-475.
- EDWARDS, M. C. y GONSALVES, D., 1983: Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. *Phytopathol.*, **73**: 1.117-1.120.
- GARCÍA-LUQUE, I., DÍAZ-RUIZ, J. R., RUBIO-HUERTOS, M., y KAPER, J. M., 1983: Cucumovirus survey in Spanish economically important crops. *Phytopathol. Mediterr.*, **22**: 127-132.
- GARCÍA-LUQUE, I., KAPER, J. M., DÍAZ-RUIZ, J. R., y RUBIO-HUERTOS, M., 1984: Emergence and characterization of satellite RNAs associated with Spanish cucumber mosaic virus isolates. *J. Gen. Virol.*, **65**: 539-547.
- HAASE, A., RICHTER, J., y RABENSTEIN, F., 1989: Monoclonal antibodies for detection and serotyping of cucumber mosaic virus. *J. Phytopathology*, **127**: 129-136.
- HAMILTON, R. I., 1985: Virus transmission. En *The Plant Viruses*, vol I (R. I. B. Francki, ed.), Plenum Press: 245-267.
- JORDA, C., ALFARO, A., ARANDA, M. A., MORIONES, E., y GARCÍA-ARENAL, F., 1992: Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes in eastern Spain. *Plant Dis*, **76**: 363-366.
- LUIS-ARTEAGA, M., 1989: Virosis y micoplasmosis del pimiento cultivado al aire libre en España. Identificación de virus y caracterización de cepas. *Tesis Doctoral*. Universidad Politécnica, Madrid.
- LUIS-ARTEAGA, M., RODRÍGUEZ-CEREZO, E., MAESTRO, C. y GARCÍA-ARENAL, F., 1988: Detection and characterization of an isolate of cucumber mosaic virus (CMV) infecting borage (*Borago officinalis*) in Spain. *Plant Dis*, **72**: 265-267.
- MARCHOUX, G., DOUINE, L., y QUIOT, J. B., 1976: Comportement thermique différentiel de certaines souches du virus de la mosaïque du concombre. Hypothèse d'un mécanisme pleiotropique reliant plusieurs propriétés. *C. R. Acad. Sci. Paris Sér. D*, **283**: 1601-1604.
- MARROU, J., QUIOT, M. B., MARCHOUX, G., y DUTEIL, M., 1975: Caractérisation par la symptomatologie de quatorze souches du virus de la mosaïque du concombre et de deux autres cucumovirus, tentative de classification. *Meded. Fac. Landbouwwet Rijksuniv. Gent.*, **40**: 107-121.
- MURANT, E., PONZ, F., ROMERO, J. y HARRISON, B., 1990: Búsqueda del virus del mosaico del pepino y sus RNAs satélites en cultivos hortícolas de diferentes regiones españolas. *II Congreso Nacional de Virología*. Valladolid: 175.
- OWEN, J. y PALUKAITIS, P., 1988: Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology*, **166**: 495-502.
- PEÑA-IGLESIAS, A., FISAC, R., ROMERO, J., FRESNO, J., y CARAZO, G., 1979: El mosaico de la platanera canaria: I. Caracterización biológica, serológica, molecular y ultraestructural de una estirpe (de serotipo To) del virus del mosaico del pepino. *Anales INIA*, **12**: 155-179.
- PIAZZOLLA, P., DÍAZ-RUIZ, J. R. y KAPER, J. M., 1979: Nucleic acid homologies of eighteen cucumber mosaic virus isolates determined by competition hybridization. *J. Gen. Virol.*, **45**: 361-369.
- QUIOT, J. B., 1980: Ecology of cucumber mosaic virus in the Rhone valley of France. *Acta Hort.*, **88**: 9-21.
- QUIOT, J. B., DEVERGNE, J. C., MARCHOUX, G., CARDIN, L. y DOUINE, L., 1979: Ecologie et épidémiologie du virus de la mosaïque du concombre dans le Sud-Est de la France. VI.- Conservation de deux types de populations virales dans les plantes sauvages. *Ann. Phytopathol.*, **11**: 349-357.
- RYBICKI, E. P. y VON WECHMAR, M. B., 1985: Serology and immunochemistry. En *The Plant Viruses* vol I, (R. I. B. Francki, ed.), Plenum Press: 207-244.
- TOMLINSON, J. A., 1987: Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.*, **110**: 661-681.

(Aceptado para su publicación: 23 diciembre 1992)