



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR DE INGENIEROS  
AGRÓNOMOS

# TESIS DOCTORAL

**El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*) afectando al cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*): Caracterización y Epidemiología**

**Presentada por:**

**M<sup>a</sup> Carmen Córdoba Sellés**

**Directora:**

**Dra. Concepción Jordá Gutiérrez**

**Valencia, 2010**





**PATOLOGÍA VEGETAL**  
**(VIRUS FITOPATÓGENOS)**  
**DPTO. ECOSISTEMAS AGROFORESTALES**  
**E.T.S. LAGRÓNOMOS**  
**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**  
Camino de Vera, s.n. 46102- Valencia- ESPAÑA

Tel: 96 387 9255 Fax: 96 387 9269 E-mail: mjrsrbg@upv.es



**DOÑA CONCEPCIÓN JORDÁ GUTIÉRREZ**, Doctor Ingeniero Agrónomo, Catedrática de Patología Vegetal, en el Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Universidad Politécnica de Valencia.

HACE CONSTAR: que Dña. M<sup>a</sup> Carmen Córdoba Sellés ha realizado, bajo su dirección en dicho Departamento, el trabajo que con título “El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*) afectando al cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*): Caracterización y epidemiología”, presenta para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Valencia a 17 de noviembre de 2009.

Firmado: Concepción Jordá Gutiérrez.



*“¿Me podrías indicar, por favor, hacia donde tengo que ir desde aquí?”, preguntó Alicia.*

*“Eso depende de donde quieras llegar”, contestó el Gato.*

*“A mi no me importa demasiado a donde...”, empezó a explicar Alicia.*

*“En ese caso da igual hacia donde vayas”, interrumpió el Gato.*

*“...siempre que llegue a alguna parte”, terminó Alicia a modo de explicación.*

*“¡Oh! Siempre llegarás a alguna parte”, dijo el Gato, “si caminas lo bastante”.*

**(Lewis Carroll, Alicia en el país de las maravillas)**

**A mi Estrella del Norte,  
a mi madre.**



## Agradecimientos

Alguien dijo una vez que “el agradecimiento es la memoria del corazón...”, quiero pues recordar a aquellas personas que, de una manera u otra, me han transmitido su aliento durante esta larga travesía.

En primer lugar, a mi directora la Dra. Concepción Jordá Gutiérrez por darme la oportunidad de entrar a formar parte de su pequeño grupo, por despertarme en mí las ganas de conocer esa microscópica vida que pasa desapercibida para tantos y sobre todo por confiar en mí para llevar a cabo esta tarea, aunque en ocasiones no dudo que se haya desesperado, pero ya ves al final ya está terminado.

A Alfredo Lacasa y Miguel Juárez, gracias por hacer de los agotadores viajes a Murcia todo un placer, por enseñarme tanto y por mostrarme y contagiarme con vuestra pasión por la investigación.

A mis compañeros de laboratorio que han sido muchos y seguro que de alguno me olvido, perdonarme si ese es el caso. A Isabel, José Manuel, M<sup>a</sup> Carmen, gracias por vuestro apoyo y ayuda; a mis chicas que tanto me aguantan, gracias por soportar mis grititos y por estar siempre listas para ayudarme cuando os lo pido. Gracias Maika por la amistad que me has demostrado, y gracias Ana por tu amistad y por todos esos cables que me has lanzado, gracias por ser como sois. Incluido en el lote, que no me olvido de mi pesadilla...Angelito!!!...gracias por tu ayuda y tus consejos, por esos momentos buscando *Olpidium* que tanto nos han reportado y sobre todo por tu gran amistad, aunque pudo haber empezado con mal pie, solo espero que te lleves de mí a una gran amiga, gracias por ser tan Panameño!!!. A Víctor y Paco, las nuevas adquisiciones, o al menos eso espero, gracias por permitirme conocerlos. A la nota de color y positividad, Dani, he disfrutado mucho con esos cafetitos de la máquina aunque me hayas aromatizado por las mañanas con tus bacterias por las que tanto he renegado.

Gracias también a algunos de los que no están, pero que nunca olvido. Asun, mi primera amiga en el laboratorio, por su confianza y su amistad incondicional, por los grandes momentos de risas y de trabajo. A mi querido director, a Pedro, por ser tal genial, por haberme enseñado tanto y por haberme soportado durante el parto de nuestra pequeña bebé, la “Rhodo”. Tampoco me quiero olvidar de otras dos compis y amigas, Lluvia y Olga que pasaron por el laboratorio y me dejaron su amistad.

A los queridos vecinos de arriba. A Josep, porque nos comprendemos; a Paloma porque es imposible no reírse con sus historias; a la “hippy” Ana por sus informaciones y cables a última hora; a Maela por sus peticiones; a mi compi de Turín Mónica por las charretas nocturnas y por su apoyo; a la alegría fúngica que son David y Carlos. Gracias a todos.

A Toto, por aparecer, por seguirme, por escucharme, por acompañarme, por apoyarme, por aconsejarme y por demostrarme que los sueños se pueden hacer realidad...gracias por este sueño... realidad.

Bueno y por último a mi equipo, a mi padre, a mi madre y a mi hermana, por haberme aguantado en los buenos momentos y también en los malos, mis manías, mis defectos. Por haberme enseñado lo fundamental de la vida. Por haberme empujado cuando las fuerzas se habían agotado. Por haberme ayudado cuando las manos me han faltado. Pilon menos mal que te tengo cerca, no se que haría sin ti en muchos momentos, eres la luz que me ilumina durante la tormenta. Papi gracias por ser como eres, no podría haber deseado nada mejor. Por vuestro esfuerzo para que haya llegado a este punto del camino, porque sé lo mucho que os ha costado, ésta es también vuestra tesis. Gracias por quererme tal y como soy !!!!.







## Índice general

	<b>Página</b>
<b>Índice general</b> .....	<b>i</b>
<b>Índice figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice tablas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>xi</b>
<b>Resum</b> .....	<b>xv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xviii</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>xxi</b>
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>El <i>Pepino mosaic virus</i>: aspectos epidemiológicos, moleculares y estrategias de control</b> .....	
La aparición de un nuevo virus.....	<b>3</b>
Epidemiología .....	<b>5</b>
Distribución geográfica.....	<b>5</b>
Sintomatología.....	<b>7</b>
Rango de hospedantes.....	<b>13</b>
Propiedades biológicas del virus.....	<b>20</b>
Formas de transmisión y dispersión del patógeno..	<b>21</b>
<i>Transmisión mecánica</i> .....	<b>21</b>
<i>Transmisión por insectos vectores</i> .....	<b>22</b>
<i>Transmisión por semilla</i> .....	<b>23</b>
<i>Propagación vegetativa</i> .....	<b>25</b>
<i>Transmisión por hongos vectores y soluciones nutritivas</i> .....	<b>26</b>
Reservorios de la enfermedad.....	<b>26</b>
Un caso particular: El Marchitamiento del tomate.....	<b>30</b>

	<b>Página</b>
Características de la partícula viral.....	34
Encuadramiento taxonómico.....	34
Estructura y organización del genoma.....	38
Variabilidad molecular o diversidad genética.....	41
Estructura y composición de las poblaciones del virus.....	44
Diagnóstico de la enfermedad.....	47
Detección serológica.....	47
Técnicas moleculares.....	48
<i>RT-PCR</i> y análisis por <i>RFLPs</i> .....	48
<i>Multiplex-one step RT-PCR</i> .....	49
<i>Real time RT-PCR</i> .....	50
Medidas de control del PepMV.....	51
Medidas preventivas.....	51
Control de la dispersión.....	53
<i>Control biológico de la enfermedad</i> .....	56
Impacto económico de la enfermedad.....	58
<b>Capítulo 2</b> <b>Justificación y Objetivos.....</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo 3</b> <b>Dispersión.....</b>	<b>67</b>
<b>3a</b> Seed transmission of <i>Pepino mosaic virus</i> and efficacy of tomato seed disinfection treatments.....	<b>69</b>
Abstract.....	<b>69</b>
Introduction.....	<b>70</b>
Material and methods.....	<b>72</b>
<i>PepMV</i> detection in whole tomato seeds.....	<b>72</b>
<i>PepMV</i> seedlings infection test.....	<b>73</b>
Seed disinfection treatments.....	<b>73</b>
Statistical analysis.....	<b>74</b>
Results.....	<b>75</b>
<i>PepMV</i> infection of tomato seeds.....	<b>75</b>
Seed transmission of <i>PepMV</i> .....	<b>75</b>
Efficacy of seed disinfection treatments.....	<b>77</b>

	<b>Página</b>
<i>Effects of seed treatments on tomato seed germination</i> .....	79
Discussion.....	80
References.....	84
<b>3b</b> New natural hosts of <i>Pepino mosaic virus</i> in Spain....	87
Abstract.....	87
References.....	88
<b>Capítulo 4</b> <b>Estructura de las poblaciones virales españolas</b> .....	89
Genetic structure of the population of <i>Pepino mosaic virus</i> infecting tomato crops in Spain.....	
Abstract.....	91
Introduction.....	92
Material and methods.....	94
<i>Virus isolates, bioassays, and preparations</i> ....	94
<i>Nucleotide sequence determination</i> .....	95
Results.....	97
<i>Diversity of the Spanish PepMV population</i> ....	97
<i>Mixed infections and recombination among the strains occur in the PepMV population of Murcia</i> .....	104
Discussion.....	106
References.....	109
<b>Capítulo 5</b> <b>Marchitamiento súbito</b> .....	115
<i>Pepino mosaic virus</i> and <i>Olpidium virulentus</i> : agents associated with the occurrence of tomato <i>Collapse</i> ....	
Abstract.....	117
Introduction.....	118
Material and methods.....	121
<i>Surveys and sample collections</i> .....	121
<i>Surveys directed to collect symptomatic plants</i> .....	121

	<b>Página</b>
<i>Random surveys</i> .....	122
<i>Electron microscopy</i> .....	123
<i>Determination of viral presence in simples obtained in 2000</i> .....	123
<i>Determination of viral presence in simples obtained since 2001</i> .....	123
<i>Monitoring Olpidium infection</i> .....	125
<i>Pathogenicity studies</i> .....	125
<i>PepMV isolates</i> .....	125
<i>Olpidium virulentus isolates</i> .....	126
<i>Plant material</i> .....	127
<i>Inoculative procedures</i> .....	128
<i>Disease evaluation</i> .....	129
<i>Statistical analyses</i> .....	129
<i>Molecular variability of selected isolates</i> .....	130
Results.....	131
<i>Surveys, symptoms and field diagnostic</i> .....	131
Random surveys.....	131
Directed surveys.....	133
<i>Pathogenicity studies</i> .....	135
<i>Summer trial</i> .....	135
<i>Winter trial</i> .....	137
<i>Molecular variability</i> .....	140
Discussion.....	145
References.....	149
<b>Capítulo 6</b>	
<b>Necrosis</b> .....	153
Characterisation of distinct Spanish isolates of <i>Pepino mosaic virus</i> causing necrosis in tomato.....	
Abstract.....	155
Introduction.....	156
Material and methods.....	158
<i>Field surveys and sample collection</i> .....	158
<i>Virus detection by ELISA</i> .....	158

		<b>Página</b>
	<i>Virus detection by molecular assays.....</i>	<b>159</b>
	<i>Electron microscopy.....</i>	<b>161</b>
	<i>Experimental host range.....</i>	<b>161</b>
	<i>Genetic characterisation of necrotic isolates...</i>	<b>162</b>
	<i>Phylogenetic analysis.....</i>	<b>163</b>
	Results.....	<b>164</b>
	<i>Origin of the samples and disease symptoms...</i>	<b>164</b>
	<i>Virus detected during the surveys.....</i>	<b>164</b>
	<i>Electron microscopy.....</i>	<b>168</b>
	<i>Host range and symptoms.....</i>	<b>169</b>
	<i>Genetic diversity and phylogenetic analysis...</i>	<b>170</b>
	Discussion.....	<b>177</b>
	References.....	<b>179</b>
<b>Capítulo 7</b>	<b>Discusión general.....</b>	<b>183</b>
<b>Capítulo 8</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>197</b>
<b>Capítulo 9</b>	<b>Bibliografía general.....</b>	<b>203</b>





## Índice de Figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.1</b>	Primeros síntomas asociados a PepMV..... 4
<b>Figura 1.2</b>	Presencia del <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV) en las áreas productoras españolas..... 7
<b>Figura 1.3</b>	Diferentes mosaicos en hojas causados por PepMV.... 8
<b>Figura 1.4</b>	Estrías longitudinales de color amarillo..... 9
<b>Figura 1.5</b>	Deformaciones en hojas causadas por PepMV..... 10
<b>Figura 1.6</b>	Síntomas en frutos de tomate relacionados con la infección por PepMV..... 12
<b>Figura 1.7</b>	Síntomas ocasionados por PepMV en la flora arvense.. 27
<b>Figura 1.8</b>	Aparición en campo de plantas menos desarrolladas que presentan marchitez en la parte apical..... 32
<b>Figura 1.9</b>	Esporas de resistencia de <i>O. brassicae</i> sl. observadas al M.O. en raíces de tomate..... 32
<b>Figura 1.10</b>	Fotografías de M.E. cortes y extractos de tejido infectados..... 35
<b>Figura 1.11</b>	Árbol sin raíz de distancias génicas de las secuencias de aminoácidos completas de la CP de varios <i>Potexvirus</i> disponibles en la base de datos del GenBank..... 37
<b>Figura 1.12</b>	Representación esquemática de la organización del genoma del PepMV..... 38
<b>Figura 1.13</b>	Árboles filogenéticos de las secuencias de aa de las distintas regiones del genoma del PepMV (RdRp, CP, TGBp1, TGBp2 y TGBp3)..... 43
<b>Figura 4.1</b>	Neighbor-joining phylogenetic trees for three genomic regions of Spanish isolates of <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV): RdRp, TGB, and CP gene. Twenty-nine isolates representing all Spanish regions sampled were analyzed..... 99

	<b>Página</b>
<b>Figura 4.2</b> Distribution of phylogenetically incompatible positions along the concatenated partial sequences of the TGB and the CP gene.....	<b>106</b>
<b>Figura 5.1</b> Geographical origin of the tomato samples with symptoms of wilting or collapse used in this study.....	<b>122</b>
<b>Figura 5.2</b> Recordings of maximum and minimum daily temperatures inside the greenhouse in the Summer trial when plants suffered collapse.....	<b>136</b>
<b>Figura 5.3</b> Recordings of maximum and minimum daily temperatures inside the greenhouse in the Winter trial when plants suffered collapse.....	<b>138</b>
<b>Figura 5.4</b> Collapse incidence during the Winter trial expressed as the number of collapsed plants detected in each subplot.....	<b>139</b>
<b>Figura 5.5</b> Phylogenetic tree analyses of the <i>Pepino mosaic virus</i> isolates based on the nucleotide sequences of three genomic regions (a) RdRp, (b) TGB, and (c) CP.....	<b>142</b>
<b>Figura 6.1</b> Map of Spain showing the location of Regions where field-grown tomato crops were surveyed for necrotic symptoms in the growing seasons from 2005 to 2008..	<b>159</b>
<b>Figura 6.2</b> Characteristic necrotic symptomatology caused by PepMV on tomato.....	<b>165</b>
<b>Figura 6.3</b> Electron micrographs of aggregated particles of <i>Pepino mosaic virus</i> in crude sap extracts of infected <i>S. lycopersicum</i> .....	<b>168</b>
<b>Figura 6.4</b> Unrooted neighbor-joining tree obtained with MEGA from the nucleotide sequences of 28 PepMV isolates, coding for: (a), a fragment of the RdRp region; (b), the TGB region; (c), the CP region.....	<b>172</b>

## Índice de Tablas

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.1</b> Síntomas observados tras la inoculación artificial de distintos aislados de PepMV en diferentes especies hospedantes.....	16
<b>Tabla 1.2</b> Especies que forman parte de la flora arvense y que al ser hospedantes naturales de PepMV pueden actuar como reservorios del virus.....	28
<b>Tabla 1.3</b> Especies asignadas al género Potexvirus en el 7º ICTV report (Adams <i>et al.</i> , 2004).....	36
<b>Tabla 1.4</b> Porcentajes de similitud entre las secuencias de aa de la replicasa, <i>TGBp1</i> , <i>TGBp2</i> , <i>TGBp3</i> y la proteína de cubierta ( <i>CP</i> ) del aislado francés descrito por Cotillon y las homólogas de otros <i>Potexvirus</i> .....	40
<b>Tabla 3.1</b> Efficacy of seven disinfection seed treatments for eradication of <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV) from infected tomato seed, emergence rates (%) obtained after each seed treatment, and probability of seedling infection in seed lot-04.....	76
<b>Tabla 3.2</b> Absorbance values for seed and seedlings submitted to seven disinfection treatments and for no-treated lots, assayed for <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV) using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based seed health test.....	78
<b>Tabla 3.3</b> Effect of seed treatments on tomato seed germination rates from both seed batches.....	79
<b>Tabla 4.1</b> Primers used for reverse-transcription polymerase chain reaction amplification of different regions in the genome of <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV).....	96

	<b>Página</b>
<b>Tabla 4.2</b> Nucleotide diversity at nonsynonymous (dNS) and synonymous (dS) positions in three genomic regions of <i>Pepino mosaic virus</i> of the European tomato strain.....	102
<b>Tabla 4.3</b> Nucleotide diversity of <i>Pepino mosaic virus</i> populations within and between different epidemic outbreaks in southeastern Spain.....	103
<b>Tabla 5.1</b> The primers used for identification and characterisation.	124
<b>Tabla 5.2</b> Characteristics of the <i>Pepino mosaic virus</i> isolates used in this paper.....	126
<b>Tabla 5.3</b> Characteristics of the <i>Olpidium virulentus</i> isolates used in this paper.....	127
<b>Tabla 5.4</b> Pathogen incidence in sampled plants from random surveys.....	132
<b>Tabla 5.5</b> Results of the directed surveys to collect symptomatic plants in 2000-05.....	134
<b>Tabla 5.6</b> Symptomatology detected in the plots during the Summer and Winter trials.....	137
<b>Tabla 6.1</b> The primers used for identification and characterisation..	160
<b>Tabla 6.2</b> Characteristics of directed surveys to collect symptomatic plants in 2005-2008.....	167
<b>Tabla 6.3</b> Host range and symptoms caused by Spanish necrotic isolates of PepMV on different plant species.....	169
<b>Tabla 6.4</b> Isolates of PepMV analysed in this work.....	171
<b>Tabla 6.5</b> Comparison of amino acid sequences of the five proteins of both necrotic isolates used in the host range study with selected isolates deposited in the NCBI database.....	176

## RESUMEN

El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) es uno de los principales virus que afectan al cultivo del tomate en la actualidad. En escasos 10 años desde su aparición en Holanda se ha extendido rápidamente y de forma simultánea por las diferentes zonas productoras del mundo, donde a menudo provoca importantes pérdidas económicas. La gran variabilidad sintomatológica unida a una gran diversidad molecular, dificultan su diagnóstico, mientras que la eficaz transmisión mecánica del PepMV entre plantas debida al empleo de herramientas contaminadas, manos, ropa y por el contacto directo entre plantas dificulta su control y erradicación de las zonas afectadas. El contacto entre plantas sanas e infectadas que se produce normalmente durante las labores rutinarias de cultivo constituye la principal causa de transmisión dentro de la parcela. Sin embargo, el mecanismo de disseminación a larga distancia del virus podría ser debido al uso de semillas contaminadas o al comercio de frutos infectados.

Debido al elevado riesgo que supondría la posibilidad de transmisión del virus mediante semilla de tomate, nos planteamos en primer lugar la constatación de esta posibilidad. Se procedió al cálculo de la tasa de transmisión por semilla del PepMV en plántulas crecidas a partir de las semillas de frutos sintomáticos recolectados de plantas infectadas naturalmente con el virus. Se estimó, mediante el análisis serológico por técnica ELISA de muestras agrupadas de semillas, que la proporción de semillas infectadas con el PepMV era como mínimo del 25% de las semillas analizadas. Las semillas extraídas de frutos sintomáticos se sembraron y las plántulas emergidas se analizaron por ELISA en tamaño de cotiledón y 4 hojas. Tres de las 168 plántulas crecidas de las semillas infectadas resultaron ser positivas a PepMV, lo que se corresponde con una tasa de transmisión de semilla a plántula del 1,84%. Además se evaluó la eficacia desinfectante de varios tratamientos de semillas de tomate, como método preventivo frente a la transmisión. El virus fue erradicado de las semillas mediante su inmersión en una solución de fosfato trisódico al 10% durante 3 h.

Sin embargo tratamientos térmicos de 24 h a 80°C y 48 h a 74°C aunque eliminaron el PepMV en las plántulas, no lo erradicaron en las semillas enteras tratadas. Los tres tratamientos no afectan negativamente a la germinación. Estos resultados sugieren que el fosfato trisódico puede ser utilizado para eliminar el virus de la semilla de tomate sin perjudicar la germinación.

Por otro lado, en los países afectados por esta virosis se desconocía la composición genética de las poblaciones del virus, por lo que se procedió a analizar la estructura genética de la población de PepMV, que había provocado las epidemias severas en tomate desde el año 2000 en España. Los aislados fueron caracterizados por la secuencia nucleotídica completa del triple gene block (TGB) y de la proteína de la cápside (CP). Además, de un grupo de aislados también se caracterizó una parte de la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) y se determinó la secuencia completa del RNA genómico de un aislado de PepMV obtenido de *Solanum muricatum* de Perú. A pesar de la gran diversidad sintomatológica, la población española de PepMV estaba formada principalmente por aislados muy similares pertenecientes a la cepa descrita en Europa (cepa Europea tomate), que resultó ser el genotipo prevalente en España. La población española de PepMV no se encontraba estructurada ni espacial ni temporalmente. Además, también se detectaron aislados muy similares a los aislados peruanos obtenidos en hospedantes distintos al tomate (cepa peruana) o al aislado US2 procedente de Estados Unidos (cepa US2). Estas dos cepas se detectaron en la zona peninsular solo en 2004, pero la peruana ya había sido detectada en las Islas Canarias en el año 2000. Estos resultados sugieren que el PepMV se ha introducido en España en varias ocasiones. Los aislados de la cepa peruana y US2 siempre se han detectado en infecciones mixtas con la cepa europea de tomate, y también se detectaron aislados recombinantes. Estos resultados deben ser considerados en la elaboración de estrategias de control basadas en resistencia genética.

Simultáneamente con la detección de los primeros brotes de PepMV en España, apareció un nuevo desorden en tomate. Las plantas afectadas sufrían un marchitamiento repentino tras producirse un brusco cambio en las condiciones de temperatura e iluminación ambientales que en ocasiones de gran severidad

provocaba el colapso total de la planta. Entre 2000 y 2005 se llevaron a cabo amplios muestreos en las principales zonas productoras españolas para obtener información sobre la incidencia y los agentes causantes del “Colapso”. Los análisis a las muestras marchitas revelaron que el desorden estaba causado por la infección conjunta de PepMV y *Olpidium virulentus*. El PepMV se detectó en el 85% de las plantas analizadas y el *O. virulentus* en el 88% de las raicillas secundarias examinadas. Ambos patógenos se detectaron en el 86% de las plantas en las que tanto raíces como hojas pudieron ser analizadas. Otros patógenos fueron detectados en muy pocas ocasiones en las plantas colapsadas. Para verificar las implicaciones que tienen ambos patógenos en el colapso del tomate, se realizaron dos ensayos de invernadero en los que se consiguió reproducir el desorden mediante la inoculación simultánea de las plantas sanas con cuatro aislados de PepMV y dos de *O. virulentus*, al producirse un cambio brusco en las condiciones ambientales del invernadero. La incidencia del colapso varió desde el 6,25% en el cultivo de verano al 56,25% obtenido durante el cultivo invernal. No se detectaron cambios significativos entre las secuencias génicas de los aislados de PepMV obtenidos de plantas con los síntomas típicos del virus y los caracterizados en plantas con marchitamiento. Los aislados de colapso no se agruparon en un único taxón genético. Los resultados obtenidos indican que el colapso está bien establecido en las zonas productoras de tomate y que tanto PepMV como *O. virulentus* suponen un riesgo muy serio para la producción de tomate.

En los últimos años se ha venido observando en los invernaderos dedicados al cultivo de tomate, la aparición de una sintomatología muy severa que llamó nuestra atención. El nuevo desorden está caracterizado por la aparición de áreas necróticas que se expanden en tallos, hojas y frutos verdes o por manchas necróticas en hojas de plantas con una clorosis generalizada. Así pues, para finalizar esta tesis se planteó identificar y caracterizar al agente causal de estos síntomas, logrando identificar en las plantas afectadas, dos cepas de PepMV. Estas cepas han sido caracterizadas en base a la distinta sintomatología que producen en tomate y al rango de hospedantes. La caracterización biológica fue confirmada mediante análisis filogenéticos basados en dos regiones

completas del genoma, el TGB y la CP, y una parte del gen de la RdRp. Los resultados de este estudio revelan que los aislados necróticos españoles muestran una elevada identidad de secuencia nucleotídica con los aislados de las cepas europea y CH2.



## RESUM

El virus del mosaic del cogombre dolç (*Pepino mosaic virus*, PepMV) és un dels principals virus que afecten al cultiu de la tomaca en l'actualitat. En escassos 10 anys des de la seua aparició a Holanda s'ha estés ràpidament i de forma simultània per les diferents zones productores del món, on sovint provoca importants pèrdues econòmiques. La gran variabilitat simptomatològica afegida a una gran diversitat molecular, dificulten el seu diagnòstic, mentres que l'eficaz transmissió mecànica del PepMV entre plantes deguda a l'ús de ferramentes contaminades, mans, roba i pel contacte directe entre plantes dificulta el seu control i eradicació de les zones afectades. El contacte entre plantes sanes i infectades que es produïx normalment durant les labors rutinàries de cultiu constitueix la principal causa de transmissió dins de la parcel·la. No obstant, el mecanisme de disseminació a llarga distància del virus podria ser a causa de l'ús de llavors contaminades o al comerç de fruits infectats.

A causa de l'elevat risc que suposaria la possibilitat de transmissió del virus per mitjà de llavor de tomaca, ens vam plantejar en primer lloc la constatació d'aquesta possibilitat. Es va procedir al càlcul de la taxa de transmissió per llavor del PepMV en plantes crescudes a partir de les llavors de fruits simptomàtics recol·lectats de plantes infectades naturalment amb el virus. Es va estimar, per mitjà de l'anàlisi serològic per tècnica ELISA de mostres agrupades de llavors, que la proporció de llavors infectades amb el PepMV era com a mínim del 25% de les llavors analitzades. Les llavors extretes de fruits simptomàtics es van sembrar i les plantes aparegudes es van analitzar per ELISA en tamany de cotiledó i 4 fulles. Tres de les 168 plàntulas crescudes de les llavors infectades van resultar ser positives a PepMV, el que es correspon amb una taxa de transmissió de llavor a plàntula de l'1,84%. A més es va avaluar l'eficàcia desinfectant de diversos tractaments de llavors de tomaca, com a mètode preventiu enfront de la transmissió. El virus va ser eradicat de les llavors per mitjà de la seua immersió en una solució de fosfat trisòdic al 10% durant 3 h. No obstant tractaments tèrmics de 24 h a 80°C i 48 h a 74°C encara que van eliminar

el PepMV en les plantes, no el van eradicar en les llavors senceres tractades. Els tres tractaments no afecten negativament a la germinació. Aquests resultats suggerixen que el fosfat trisòdic pot ser utilitzat per a eliminar el virus de la llavor de tomaca sense perjudicar la germinació.

D'altra banda, en els països afectats per aquesta virosi es desconeixia la composició genètica de les poblacions del virus, per el que es va procedir a analitzar l'estructura genètica de la població de PepMV, que havia provocat les epidèmies severes en tomaca des de l'any 2000 a Espanya. Els aïllats van ser caracteritzats per la seqüència nucleotídica completa del triple gene block (TGB) i de la proteïna de la càpside (CP). A més, d'un grup d'aïllats també es va caracteritzar una part de la RNA polimerasa RNA dependent i es va determinar la seqüència completa del RNA genòmic d'un aïllat de PepMV obtingut de *Solanum muricatum* de Perú. A pesar de la gran diversitat simptomatològica, la població espanyola de PepMV estava formada principalment per aïllats molt semblants pertanyents al genotip descrit a Europa (genotip Europeu tomaca), que va resultar ser el genotip prevalent a Espanya. La població espanyola de PepMV no es trobava estructurada ni espacial ni temporalment. A més, també es van detectar aïllats molt semblants als aïllats perunans obtinguts en hospedants diferents a la tomaca (genotip peruà) o a l'aïllat US2 procedent dels Estats Units (genotip US2). Aquests dos genotips es van detectar en la zona peninsular només en 2004, però el peruà ja havia sigut detectat en les Illes Canàries l'any 2000. Aquests resultats suggerixen que el PepMV s'ha introduït a Espanya en diverses ocasions. Els aïllats dels genotips perunans i US2 sempre s'han detectat en infeccions mixtes amb el genotip europeu de tomaca, i també es van detectar aïllats recombinants. Aquests resultats han de ser considerats en l'elaboració d'estratègies de control basades en resistència genètica.

Simultàniament amb la detecció dels primers brots de PepMV a Espanya, va aparèixer un nou desorde en tomaca. Les plantes afectades sofrien un marciment repentí després de produir-se un brusc canvi en les condicions de temperatura i il·luminació ambientals que en ocasions de gran severitat provocava el col·lapse total de la planta. Entre 2000 i 2005 es van portar a terme amplis mostratges en les principals zones productores espanyoles per a obtenir

informació sobre la incidència i els agents causants del “Col·lapse”. Les anàlisis a les mostres marcides van revelar que el desorde estava causat per la infecció conjunta de PepMV i *Olpidium virulentus*. El PepMV es va detectar en el 85% de les plantes analitzades i l'*O. virulentus* en el 88% de les arrels secundàries examinades. Aquests dos patògens es van detectar en el 86% de les plantes en què tant arrels com fulles van poder ser analitzades. Altres patògens van ser detectats en molt poques ocasions en les plantes col·lapsades. Per a verificar les implicacions que tenen aquests dos patògens en el col·lapse de la tomaca, es van realitzar dos assajos d'hivernacle en què es va aconseguir reproduir el desorde per mitjà de la inoculació simultània de les plantes sanes amb quatre aïllats de PepMV i dos d'*O. virulentus*, al produir-se un canvi brusc en les condicions ambientals de l'hivernacle. La incidència del col·lapse va variar des dels aproximadament 6,25% en el cultiu d'estiu als 56,25% obtinguts durant el cultiu hivernal. No es van detectar canvis significatius entre les seqüències gèniques dels aïllats de PepMV obtinguts de plantes amb els símptomes típics del virus i els caracteritzats en plantes amb marciment. Els aïllats de col·lapse no s'agrupen en un determinat taxón genètic. Els resultats obtinguts indiquen que el col·lapse esta ben establert en les zones productores de tomaca i que tant PepMV com *O. virulentus* suposen un risc molt seriós per a la producció de tomaca.

En els últims anys s'ha vingut observant en els hivernacles dedicats al cultiu de tomaca, l'aparició d'una simptomatologia molt severa que va cridar la nostra atenció. El nou desorde està caracteritzat per l'aparició d'àrees necròtiques que s'expandixen en tiges, fulles i fruits verds o per taques necròtiques en fulles de plantes amb una clorosi generalitzada. Així doncs, per a finalitzar aquesta tesi es va plantejar identificar i caracteritzar l'agent causal d'aquests símptomes, aconseguint identificar en les plantes afectades, dos genotips de PepMV. Aquests han sigut caracteritzats en base a la distinta simptomatologia que produïxen en tomaca i rang d'hostes. La caracterització biològica va ser confirmada per mitjà de les pertinents anàlisis filogenètiques basades en dos regions completes del genoma, el TGB i la CP, i una part del gen de la RdRp. Els resultats d'aquest estudi revelen que els aïllats necròtics espanyols mostren una elevada identitat de seqüència nucleotídica amb els aïllats dels genotips europeus i CH2.

## ABSTRACT

Nowadays *Pepino mosaic virus* (PepMV) is an important tomato-infecting virus. Ten years after be discovered in the Netherlands, PepMV is widely and rapidly spread throughout the tomato crops worldwide, where sometimes produces important economical losses. The high variability in symptom expression and large genetic diversity of this virus complicates the diagnosis, but the effective mechanical transmission of PepMV between plants with contaminated tools, hands, clothing, and by direct plant-to-plant contact, complicates the control and eradication in the affected areas. Contact between healthy and infected plants as a result of routine handling during cultivation of the crop constitutes the main cause for transmission within a plot. However, the mechanism for long-distance dissemination of this virus may be the contaminated seeds, or fruits.

Due to the high risk of the seed transmission of PepMV for the world tomato trade, we considered in first place to check the possibility of seed transmission. Rates of seed transmission for PepMV were estimated in seedlings grown from seeds obtained from symptomatic tomato fruits of plants naturally infected with the virus. The proportion of seeds infected with PepMV was at least 25% as estimated from enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis of grouped seeds. The seeds from symptomatic fruits were planted, and seedlings at the cotyledon and transplant stage were assayed for PepMV by ELISA. Three of 168 seedlings grown from infected seeds were PepMV-positive, corresponding to a seed-to-seedling transmission rate of 1.84%. Various tomato seed treatments were evaluated for their ability to prevent seed transmission of PepMV. This virus was largely eradicated by immersing the seeds in 10% trisodium phosphate for 3 h. Although heat treatments of 24 h at 80°C and 48 h at 74°C eliminated PepMV in seedlings, these treatments did not eradicate the virus in whole seeds. The three treatments did not adversely affect seed germination. The results suggest that trisodium phosphate can be used to eradicate PepMV in tomato seed without hindering germination.

On the other hand, the population structure of PepMV was not determined in any country where the virus was present. We analyzed the genetic

diversity of the Spanish population of PepMV, which has caused severe epidemics in tomato in Spain since 2000. Isolates were characterized by the nucleotide sequence of the triple gene block (TGB) and coat protein gene (CP) and, for a subset of isolates, a part of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene. The full-length sequence of the genomic RNA of a *Solanum muricatum* isolate from Peru also was determined. In spite of high symptom diversity, the Spanish population of PepMV mostly comprised highly similar isolates belonging to the strain reported in Europe (European tomato strain), which has been the most prevalent genotype in Spain. The Spanish PepMV population was not structured spatially or temporally. Also, isolates highly similar to those from nontomato hosts from Peru (Peruvian strain) or to isolate US2 from the United States (US2 strain) were detected at lower frequency relative to the European strain. These two strains were detected in peninsular Spain only in 2004, but the Peruvian strain has been detected in the Canary Islands since 2000. These results suggest that PepMV was introduced into Spain more than once. Isolates from the Peruvian and US2 strains always were found in mixed infections with the European tomato strain, and interstrain recombinants were detected. The presence of different strains of the virus, and of recombinant isolates, should be considered for the development of control strategies based on genetic resistance.

Simultaneously with the first outbreaks of PepMV, a new tomato disorder was appeared in Spain. In the affected tomato plants, a sudden wilt was observed after a sudden change in temperature and light intensity. When the disorder is severe, the total plant “Collapse” occurs. Statewide surveys of commercial tomato crops were conducted in Spain from 2000 to 2005 to obtain information on the incidence and the causative agents of “Collapse”. Laboratory assays of wilted plants revealed that wilting was caused by a dual infection of PepMV and *Olpidium virulentus*. PepMV was detected in 85% of the plants analysed and *O. virulentus* was found in 88% of the feeder roots examined. Both pathogens were found in 86% of completely examined plants and occurred together in all the fields surveyed. Other pathogens were detected very rarely in collapsed tomatoes. To verify the implications of both pathogens in the tomato “Collapse”, two greenhouse trials were performed. We reproduced the disorder by simultaneous plant inoculation with four PepMV and two *O. virulentus* isolates, but a sudden change in the temperature regime took place. The collapse

incidence varied from approximately 6.25% in the summer growing season to 56.25% in the winter growing season, both under controlled conditions. No significant changes in the genomic sequences were found between the PepMV isolates showing typical PepMV symptoms and those isolated from wilted plants. Collapse PepMV isolates did not cluster together in a specific genotype group. The results indicate that Collapse is well-established in tomato production areas, and that PepMV and *O. virulentus* pose a very serious challenge to tomato producers.

More recently, a severe disease of greenhouse-grown tomato in Spain was observed. The new disorder is characterised by expanding necrotic patches on stems, leaves and green fruits or by expanding necrotic spots on the leaves of chlorotic tomato plants. Thus in order to finish the present work, we try to identify and characterize the causal agent of this necrosis. Two strains of PepMV were identified and described as the causal agents of necrosis on the basis of host range and symptomatology. Phylogenetic analysis, based on two complete regions of the genomes; the TGB and the CP gene; and a portion of the RdRp gene, revealed that Spanish necrotic isolates share high nucleotide sequence identity with isolates of the EU and CH2 genotypes.

# Abreviaturas

## Virus

<b>ACDV:</b> Artichoke curly dwarf virus	<b>ParV-3:</b> Parsnip virus 3
<b>AltMV:</b> <i>Alternanthera mosaic virus</i>	<b>ParV-5:</b> Parsnip virus 5
<b>AMV:</b> <i>Alfalfa mosaic virus</i>	<b>PatVX:</b> Patchouli virus X
<b>AV-3:</b> <i>Asparagus virus 3</i>	<b>PaV-5:</b> Parsley virus 5
<b>BaMV:</b> <i>Bamboo mosaic virus</i>	<b>PepMV:</b> <i>Pepino mosaic virus</i>
<b>BarV-BI:</b> Barley virus BI	<b>PIVX:</b> <i>Plantain virus X</i>
<b>BBWV-I:</b> <i>Broad bean wilt virus 1</i>	<b>PIAMV:</b> <i>Plantago asiatica mosaic virus</i>
<b>BoIVX:</b> Boletus virus X	<b>PISMoV:</b> <i>Plantago severe mottle virus</i>
<b>BSMV:</b> <i>Barley stripe mosaic virus</i>	<b>PMoV:</b> Parietaria mottle virus
<b>BYMV:</b> <i>Bean yellow mosaic virus</i>	<b>PRSV:</b> <i>Papaya ringspot virus</i>
<b>CentMV:</b> <i>Centrosema mosaic virus</i>	<b>PSbMV:</b> <i>Pea seedborne mosaic virus</i>
<b>CIYMV:</b> <i>Clover yellow mosaic virus</i>	<b>PVX:</b> <i>Potato virus X</i>
<b>CMV:</b> <i>Cucumber mosaic virus</i>	<b>PVY:</b> <i>Potato virus Y</i>
<b>ComVX:</b> <i>Commelina virus X</i>	<b>RoNRSV:</b> <i>Rhododendron necrotic ringspot virus</i>
<b>CsCMV:</b> <i>Cassava common mosaic virus</i>	<b>RV-1:</b> <i>Rhubarb virus 1</i>
<b>CsVX:</b> <i>Cassava virus X</i>	<b>ScaVX:</b> <i>Scallion virus X</i>
<b>CVX:</b> <i>Cactus virus X</i>	<b>SmiLV:</b> <i>Smithiantha latent virus</i>
<b>CymMV:</b> <i>Cymbidium mosaic virus</i>	<b>SMYEV:</b> <i>Strawberry mild yellow edge virus</i>
<b>DLV:</b> <i>Dioscorea latent virus</i>	<b>TBSV:</b> <i>Tomato bushy stunt virus</i>
<b>DVX:</b> <i>Daphne virus X</i>	<b>TICV:</b> <i>Tomato infectious chlorosis virus</i>
<b>FoMV:</b> <i>Foxtail mosaic virus</i>	<b>TMV:</b> <i>Tobacco mosaic virus</i>
<b>HdRSV:</b> <i>Hydrangea ringspot virus</i>	<b>TNV:</b> <i>Tobacco necrosis virus</i>
<b>HVX:</b> <i>Hosta virus X</i>	<b>ToCV:</b> <i>Tomato chlorosis virus</i>
<b>LBBV:</b> <i>Lettuce big-vein virus</i>	<b>ToMV:</b> <i>Tomato mosaic virus</i>
<b>LMV:</b> <i>Lettuce mosaic virus</i>	<b>ToTV:</b> <i>Tomato torrado virus</i>
<b>LVX:</b> <i>Lily virus X</i>	<b>TRMV:</b> <i>Tamus red mosaic virus</i>
<b>LycSLV:</b> <i>Lychnis symptomless virus</i>	<b>TSWV:</b> <i>Tomato spotted wilt virus</i>
<b>MNSV:</b> <i>Melon necrotic spot virus</i>	<b>TVX:</b> <i>Tulip virus X</i>
<b>MVNV:</b> <i>Malva vein necrosis virus</i>	<b>TYLCV:</b> <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
<b>NaMV:</b> <i>Nandina mosaic virus</i>	<b>VmoV:</b> <i>Viola mottle virus</i>
<b>NeCMV:</b> <i>Negro coffee mosaic virus</i>	<b>WCIMV:</b> <i>White clover mosaic virus</i>
<b>NMV:</b> <i>Narcissus mosaic virus</i>	<b>ZSLV:</b> <i>Zygocactus symptomless virus</i>
<b>NVX:</b> <i>Nerine virus X</i>	<b>ZYMV:</b> <i>Zucchini yellow mosaic virus</i>
<b>PAMV:</b> <i>Potato aucuba mosaic virus</i>	
<b>PapMV:</b> <i>Papaya mosaic virus</i>	

## Otras abreviaturas

A: absorbance (Absorbancia)

aa: amino acid (aminoácido)

BLAST: basic local alignments search tool

bp: base pairs (pb, pares de bases)

°C: degree centigrade (grados centígrados)

ca.: “circa” (alrededor de)

cDNA: complementary DNA (DNA complementario)

*Ch*: cloroplasto

CH1: chilean 1 genotype/strain (genotipo/cepa chilena 1)

CH2: chilean 2 genotype/strain (genotipo/cepa chilena 2)

CIP: Centro Internacional de la Papa

cm: centimetre (centímetro)

CP: coat protein (proteína de cubierta o proteína de la cápside)

CSL: Central Science Laboratory

cv: cultivar

Da: Dalton

DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution.

DAS-ELISA: double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay

DIECA: diethyldithiocarbamic acid (ácido dietil ditiocarbámico)

DNA: deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico ADN)

$d_{NS}$  : nonsynonymous substitutions (sustituciones no sinónimas)

dNTPs: deoxyribonucleotides triphosphate

DPI: days post inoculation (días post inoculación)

$d_S$  : synonymous substitutions (sustituciones sinónimas)

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

e.g.: “*exempli gratia*” (por ejemplo)

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

EM: Electron Microscopy (microscopía electrónica)

EMBL: European Molecular Biology Laboratory

EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization

EtBr: etidium bromide (bromuro de etidio)

EU: European genotype/strain (genotipo/cepa europeo)



EU: European Union (UE, Unión Europea)

EZNA: EaZy Nucleic Acid Isolation

fg: femtogram (femtogramo)

g: gram (gramo)

g/l: gram per litre (gramo por litro)

gRNA: genomic RNA (ARN genómico) guide RNA (ARN guía)

h: hour (hora)

ha: hectárea

HCl: ácido clorhídrico

IAM: Instituto Agroforestal Mediterráneo

IBMCP-UPV: Instituto de Biología Molecular y Celular de las Plantas- Universidad Politécnica de Valencia

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité Internacional de Taxonomía de Virus)

i.e.: “*id est*” (es decir)

IMIDA: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario

IR: intergenic region (región intergénica)

ISHI: International Seed Health Iniziative

ITS: Internal transcribed spacer (espacio interno transcrito)

kb: kilobase

kDa: kilodalton

l: litre (litro)

LM: Light microscopy (MO, Microscopía óptica)

LSD: least significance difference (menor diferencia significativa)

M: molaridad

MatGAT: Matrix Global Alignment Tool

ME: Microscopía Electrónica

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

mg: milligram (miligramo)

mg/ml: milligram per millilitre (miligramo por mililitro)

MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de Magnesio

min: minuto

ml: millilitre (mililitro)  
mm: millimetre (milímetro)  
mM: millimolar (milimolar)  
mRNA: messenger RNA (ARN mensajero, ARNm)  
μl: microlitre (microlitro)  
μm: micrometre (micrometro)  
μM: micromolar

N: Núcleo  
NCBI: National Center of Biotechnology Information.  
NJ: neighbor-joining method (método de union de vecinos)  
nm: nanometre (nanómetro)  
no: number (número)  
nos: numbers (números)  
nt: nucleotide (nucleótido)  
NT: tratamiento control (no desinfectado)

ORF: open reading frame (marco de lectura abierto)

P: probability (probabilidad)  
P: tratamiento por inmersión durante 24 h en una solución de 3 g/l de pectinasa  
pb: pares de bases  
PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)  
PE: peruvian genotype/strain (genotipo/raza peruano)  
PH: tratamiento por inmersión durante 24 h en una solución a base de 3g/l de pectinasa y 2% de HCl  
PHB: tratamiento por inmersión durante 24 h en una solución a base de 3g/l de pectinasa, 2% de HCl y 30% de lejía  
poly(A): poly-adenilate (poli (A), poliadenilato)  
psi: pounds per square inch (libras por pulgada cuadrada)  
PVP-40: Polyvinylpirrolidone- 40

rDNA: ribosomic-DNA (ADN ribosómico)  
RdRp: RNA dependent RNA polimerase (ARN polimerasa dependiente de ARN)  
fragmentos de restricción)  
RFLP: Restriction fragment lenght polymorphism (polimorfismos en la longitud de los  
RNA: ribonucleic acid (ácido ribonucleico, ARN)  
rpm: revolutions per minute (revoluciones por minuto)

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction (transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa)

s: second (segundo)

SE: southeastern (sureste)

sgRNA: subgenomic RNA (ARN subgenómico)

sl: *sensu lato*

sp.: especie (especie)

spp.: species (especies)

ssRNA: single-stranded RNA (ARN monocatenario)

SW: southwestern (suroeste)

T70: tratamiento térmico a 70°C durante 96 h

T74: tratamiento térmico a 74°C durante 48 h

T80: tratamiento térmico a 80°C durante 24 h

TAE: Tris-acetate-EDTA (tris acetato EDTA)

TGB: Triple gene block (triple bloque de genes)

TGBp: triple gene block protein (proteína del bloque triple de genes)

TP: tratamiento por inmersión en una solución de fosfato trisódico al 10% durante 3 h

UK: United Kingdom (Reino Unido)

US1: genotipo/cepa 1 del PepMV identificada en Estados Unidos

US2: genotipo/cepa 2 del PepMV identificada en Estados Unidos

USA: United States of America (Estados Unidos de América)

UTR: untranslated region (región no traducida)

UV: ultraviolet (ultravioleta)

v: viroplasma

w.v: weight per volume (peso por volumen)



# Capítulo 1

---

## Introducción



# Capítulo 1

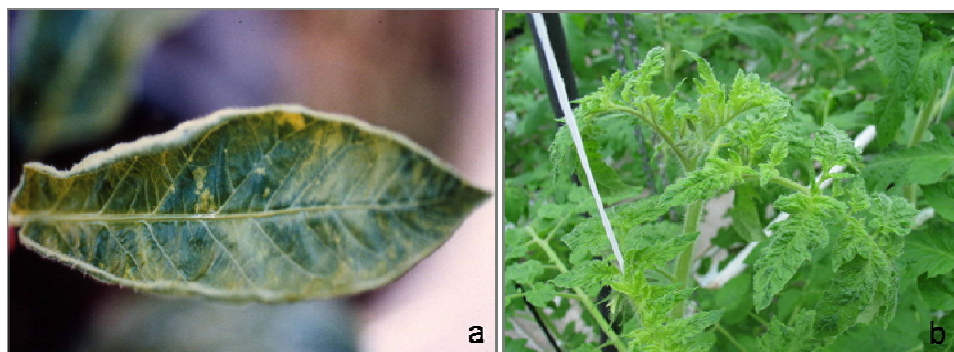
## **El *Pepino mosaic virus*: aspectos epidemiológicos, moleculares y estrategias de control**

### ***LA APARICIÓN DE UN NUEVO VIRUS***

En el año 1980, Jones y colaboradores dan a conocer la descripción de un nuevo virus que habían detectado en Perú 6 años antes, mientras realizaban muestreos en busca de nuevas especies que pudieran actuar como hospedantes naturales alternativas de las virosis de la patata. En la localidad de Imperial, situada en el valle costero de Cañete, cerca de los campos de patata, los agricultores cultivan de manera tradicional una solanácea rústica muy apreciada por los habitantes de la zona, el pepino dulce o pera melón (*Solanum muricatum* Ait.). Al examinar dos pequeños campos detectan la presencia en algunas plantas de pepino un fuerte mosaico amarillo en las hojas de las nuevas brotaciones (Fig. 1.1a) y en algunos casos de enaciones de color verde oscuro en el envés de las hojas. El causante de esta sintomatología resultó ser un virus del género *Potexvirus* no descrito hasta ese momento y la primera especie viral descrita en *S. muricatum*, que por otro lado parecía ser su único hospedante natural (Koenig *et al.*, 1989). Es por esto que se le denominó como ***Pepino mosaic virus* (PepMV)** o **virus del mosaico del pepino dulce**. Jones en aquel momento lo describe

como uno de los varios virus que afectan a especies del género *Solanum* en la región Andina, que solo están presentes en esa zona del planeta y por tanto no representaba ningún peligro para la agricultura en otras partes del mundo.

Durante los primeros meses del año 1999, en más de 50 invernaderos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Holanda, se detectó la aparición de plantas con un fuerte filiformismo en la parte alta (Fig 1.1b), manchas amarillas aisladas y fuerte mosaico en las hojas (van der Vlugt *et al.*, 2000). En enero de ese mismo año, síntomas similares pero más agresivos, habían aparecido en invernaderos de tomate del SE de Inglaterra y en septiembre nuevos brotes se detectan en cultivos de tomate injertado en el SW del Reino Unido (Wright y Mumford, 1999). En ambos casos la semilla tenía procedencia holandesa. Los síntomas son tan graves en este país que obligan a levantar totalmente los cultivos. En Enero del 2000 se logra identificar al agente causal de esta nueva enfermedad del tomate en Europa, que sorprendentemente resulta ser una nueva cepa del ***Pepino mosaic virus*** (van der Vlugt *et al.*, 2000).



**Figura 1.1:** Primeros síntomas asociados a PepMV. **a)** Mosaico amarillo detectado en hojas de *Solanum muricatum*; **b)** Ligeros mosaicos, abullonados y apuntamiento de las hojas apicales de tomate.

Desde 2005, nuevas cepas del virus han ido apareciendo y el PepMV se ha extendido muy rápidamente por las áreas productoras de tomate de casi todo el mundo, llegando a causar daños económicos muy significativos.



Como, cuando y por que, un virus cuyo único hospedante natural sólo es cultivado en la zona Andina para el consumo local, haya podido llegar a infectar de forma natural y agresiva al tomate en Europa es algo, como en tantas otras ocasiones, todavía sorprendente y desconocido, pero que desde el momento de su detección se ha convertido en una realidad alarmante.

## ***EPIDEMIOLOGIA***

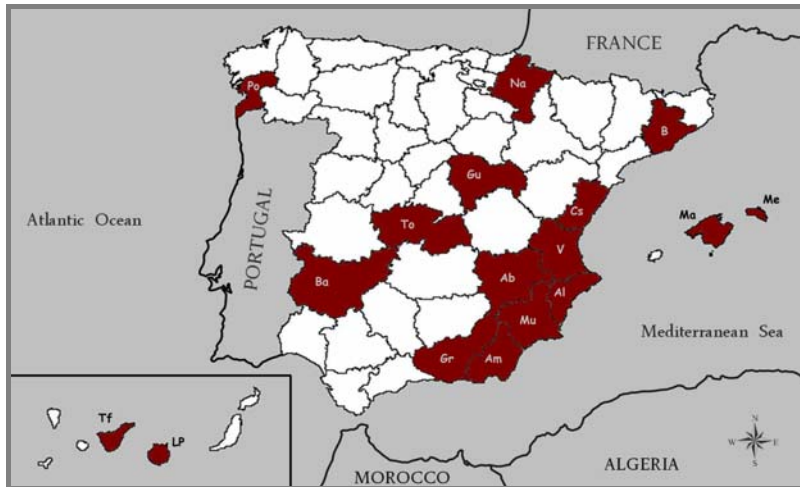
### **Distribución geográfica**

Tras las primeras detecciones del virus en 1999, durante el año 2000, se denuncian nuevos brotes de la enfermedad en Holanda y Reino Unido, así como en Francia (Anónimo, 2000), Alemania (Lesemann *et al.*, 2000), España (Jordá *et al.*, 2001a) e Italia (Roggero *et al.*, 2001). Durante el invierno de ese mismo año, el virus se detecta en varios invernaderos de tomate en Canadá y Estados Unidos (French *et al.*, 2001). En el año 2001, el PepMV entra a formar parte de la EPPO Alert list como organismo con riesgo fitopatológico para los cultivos (EPPO, 2003b).

Basándonos en los datos oficiales proporcionados por la EPPO, la detección en alguna ocasión del virus se ha denunciado en los siguientes países: en 2000 en Alemania; en Austria, aunque la primera detección oficial se produce en el 2006 (EPPO, 2007) ya en 2003 se habla de un aislado austriaco del virus (Verhoeven *et al.*, 2003); en Bélgica está presente desde el 2001 (Mumford y Metcalfe, 2001; EPPO, 2003c; Hanssen *et al.*, 2008); en Bulgaria, se encontró en una sola ocasión en 2004 (EPPO, 2004b); en Dinamarca, se detecta en semilleros de tomate durante 2001 y 2002 (EPPO, 2003c); en Eslovaquia, el único brote del 2004 fue erradicado (EPPO, 2004a); en Finlandia se detectó por vez primera en 2001 y reapareció en 2003 (EPPO, 2003b; EPPO, 2009); en Francia se han citado distintos brotes entre los años 2000 y 2003 (Anónimo, 2000; Cotillon *et al.*, 2002; EPPO, 2003c); en Hungría, se detectó en 2004 en un invernadero de tomate y se dió como erradicado ese mismo año (Forray *et al.*, 2004; EPPO, 2004d); en Holanda, está presente desde 1999 (van der Vlugt *et al.*, 2000); en Irlanda, solo se detectó en el 2002 (EPPO, 2003c); en Italia, se cita por primera

vez en Cerdeña en el 2001 (Roggero *et al.*, 2001) y en el 2005 reaparece en Sicilia (Davino *et al.*, 2006); en Lituania, en 2002 se interceptan plantas de tomate infectadas procedentes de Holanda (EPPO, 2003a); en Noruega, se detecta en el 2001 y se logra su erradicación (EPPO, 2003c); mientras que en Polonia, la primera detección tuvo lugar en 2001 y se erradicó, pero en 2005 reaparece en distintas localidades del país (EPPO, 2003c; Pospiezny y Borodynko, 2006); en Reino Unido está presente desde el año 1999 (Wright y Mumford, 1999; EPPO, 2004c); en la República Checa se detectó en 2008 (EPPO, 2008); en Suecia, la primera detección fue en 2001 (EPPO, 2001); y en Suiza, se han citado varios brotes del virus desde el año 2004 (Stäubli, 2005; Ramel *et al.*, 2007). En Norte América está presente desde el 2000 tanto en Canadá como en Estados Unidos donde se han identificado los síntomas en invernaderos comerciales de tomate en los estados de Arizona, California, Colorado, Florida, Maryland, Minnesota, Nevada, Nueva York, Ohio, Oklahoma, Tejas y Virginia (French *et al.*, 2001; Maroon-Lango *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2008), mientras que en Sudamérica está presente en Perú, Chile desde la campaña 2001/02 (Ramírez y Bustamante, 2001), en Ecuador (Soler *et al.*, 2005) y en Centroamérica se ha detectado en Guatemala (EPPO, 2009). Sin embargo, estos datos oficiales pueden ser una subestimación de la incidencia real del virus, ya que son frecuentes las infecciones latentes en tomate y además se ha detectado, aunque no oficialmente, en China afectando a pepino dulce (Zhang *et al.*, 2003), mientras que infecciones en tomate se han citado en Ucrania (Verhoeven *et al.*, 2003), Marruecos (Córdoba *et al.*, 2007) y más recientemente en Chipre y Siria.

En España las primeras muestras infectadas se recogen en Murcia en octubre de 1998 y en Canarias en noviembre de 1999. En once años el virus se ha extendiendo por prácticamente la totalidad de las zonas productoras de tomate (Fig. 1.2), aunque con distinta incidencia y afectando tanto a cultivos intensivos de invernadero como a cultivos al aire libre. El PepMV se ha convertido en estos pocos años en uno de los virus más importantes que afectan al cultivo de tomate en las principales zonas productoras de Murcia y Canarias, donde se ha convertido en una virosis endémica de este cultivo.



**Figura 1.2.** Provincias españolas en las que al menos en una ocasión se ha detectado la presencia del *Pepino mosaic virus* (PepMV) en los cultivos de tomate (datos actualizados a julio 2009). Ab: Albacete, Al: Alicante, Am: Almería, B: Barcelona, Ba: Badajoz, Cs: Castellón, Gr: Granada, Gu: Guadalajara, LP: Las Palmas, Ma: Mallorca, Me: Menorca, Mu: Murcia, Na: Navarra, Po: Pontevedra, Tf: Tenerife, To: Toledo, V: Valencia.

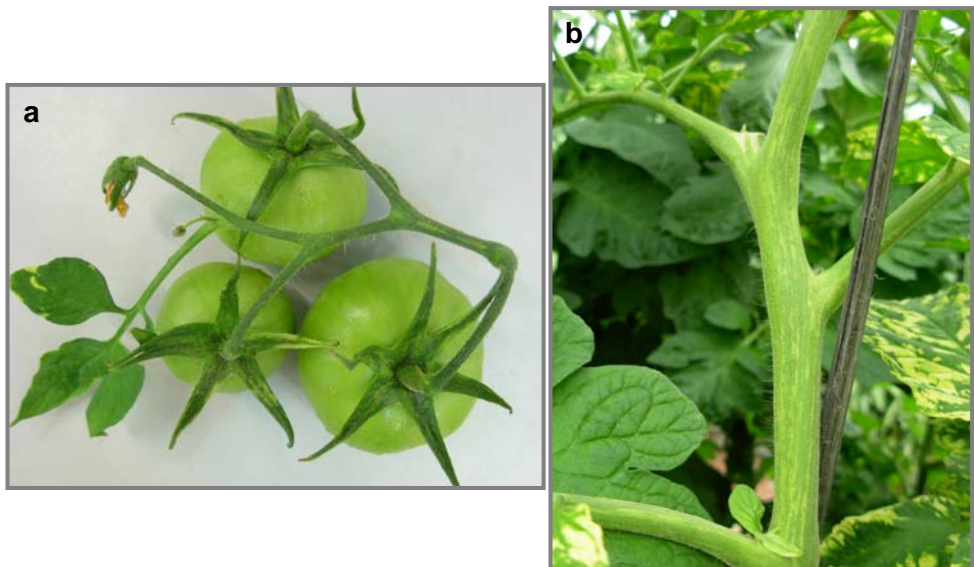
## Sintomatología

El aislado original de PepMV que recoge Jones en Perú de plantas de pepino dulce, provoca infección sistémica asintomática cuando es inoculado tanto a tomate como a distintas especies del género *Lycopersicum*, que sólo se vuelve aparente cuando se reinocula a plantas indicadoras susceptibles como *Nicotiana glutinosa* (Jones *et al.*, 1980). En cambio, las cepas que se han aislado en tomate provocan una gran diversidad de síntomas en este cultivo hortícola. Síntomas que pueden depender de la cepa del virus, de la variedad de tomate, de la edad a la que la planta se infectó y de las condiciones ambientales. La sintomatología que se presenta en una misma planta infectada con el virus varía a lo largo de todo el ciclo de cultivo en función de los cambios que se producen tanto en las condiciones ambientales como de crecimiento de la planta. Especialmente, los periodos de estrés o las situaciones que provocan estrés a la planta durante el cultivo, parecen ser incitadoras de la expresión de los síntomas.

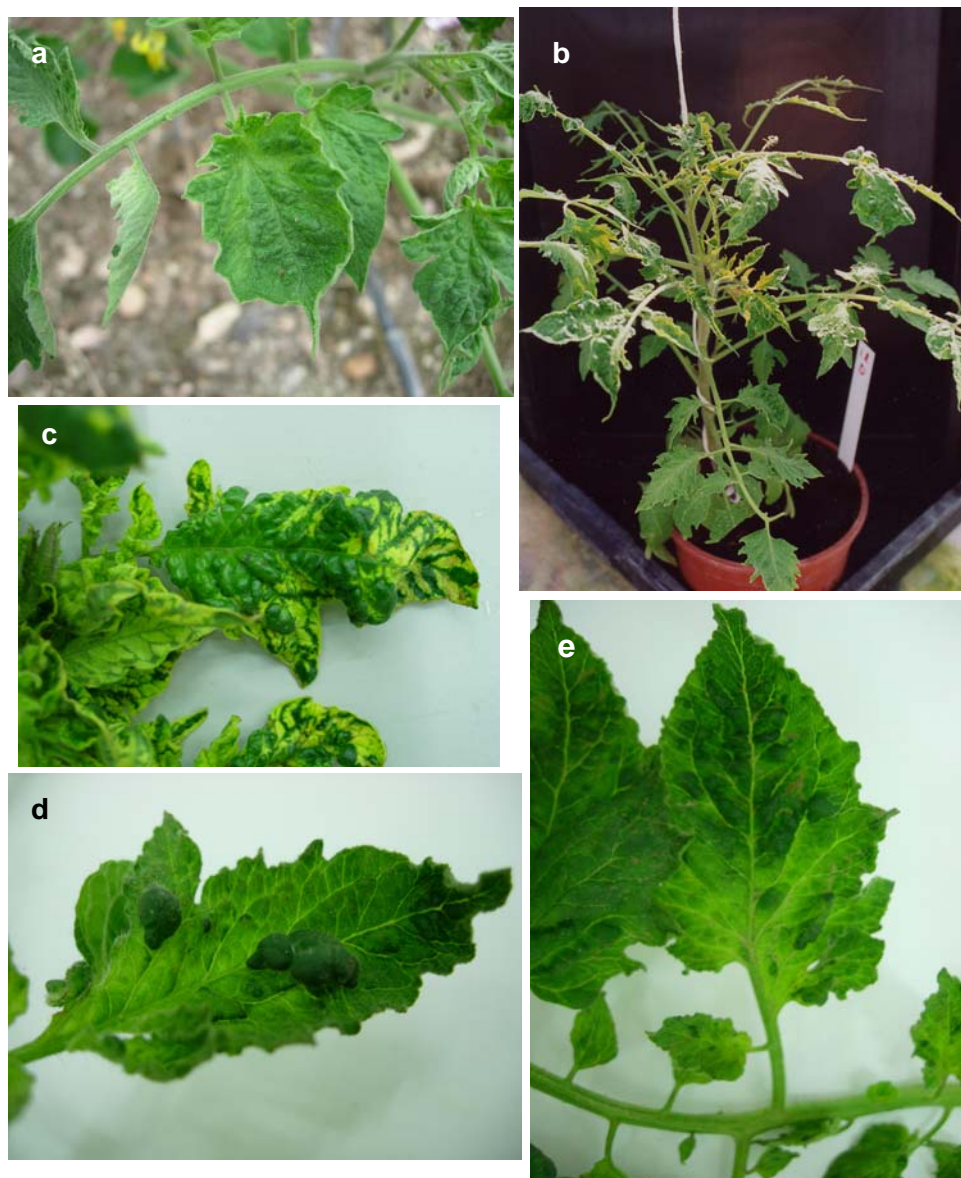


**Figura 1.3:** Diferentes mosaicos en hojas causados por PepMV: **a)** mosaico dorado brillante, **b)** fuerte mosaico verde-amarillo hasta quedar solo los nervios en verde, **c)** aparición del mosaico amarillo en bandas en las hojas, **d)** distintos grados de mosaico, **e)** amarilleo irregular en el foliolo, **f)** manchas amarillas aisladas dispersas por el foliolo.

En cultivos de primavera, los primeros síntomas aparecen cuando las temperaturas descienden. En plantas adultas aisladas o en grupos de tres o cuatro en la misma fila, se aprecian intensos mosaicos amarillos en los folíolos de las hojas maduras, con una distribución irregular y tonalidades doradas (Fig. 1.3a), o localizados en diferentes partes del folíolo (Fig. 1.3b). En ocasiones, los amarillos son muy intensos, afectando a las zonas internerviales (Fig. 1.3c) o están distribuidos en una banda transversal del folíolo (Fig. 1.3d). En otros casos, pequeñas manchas aisladas de color amarillo intenso son los únicos síntomas visibles de la infección (Fig. 1.3e). Ciertos aislados pueden causar severas necrosis de hojas y tallos que llegan a provocar la seca y posterior muerte de la planta. En los casos en que se presentan mosaicos dorados en el follaje, tanto en el tallo como en los pecíolos de las hojas, pedúnculos y sépalos de flores y frutos, pueden aparecer estrías longitudinales de color verde claro o amarillo que en la mayor parte de las ocasiones pasan desapercibidas (Fig. 1.4).



**Figura 1.4:** Estrías longitudinales de color amarillo en: **a)** sépalos y pedúnculos de los frutos; **b)** tallos de las plantas.



**Figura 1.5:** Deformaciones en hojas causadas por PepMV: **a)** ligero apuntamiento del apice del foliolo; **b)** alargamiento y estrechamiento muy fuerte de los foliolos de las hojas de la zona apical conocido como “nettle-like head”; **c)** abullonados o ampollas en la superficie del limbo foliar de color verde oscuro en hojas con fuerte amarilleo internervial; **d)** y **e)** fuertes ampollas en el limbo foliar.

Cuando la virosis se manifiesta en planta joven, los primeros síntomas que aparecen son llamativas distorsiones de diferente intensidad en los folíolos, en forma de ampollas en el haz de las hojas, con una coloración verde más oscura que la del resto del limbo (Fig. 1.5c ,d, e). El folíolo se estrecha, su margen es menos dentado y toda la hoja se alarga pudiendo llegar a presentar filiformismos muy acentuados (Fig. 1.5a). Estas deformaciones, que se localizan en la zona apical de la planta a la que dan un aspecto general similar al de una ortiga o “nettle-like head” (Fig. 1.5b), pueden confundirse con los efectos fitotóxicos de algunos herbicidas o de dosis elevadas de hormonas (Wright y Mumford, 1999).

Muy a menudo estas distorsiones son tan ligeras que pueden pasar desapercibidas. Con frecuencia, el tallo de las nuevas brotaciones se ahueca, apareciendo la médula en forma de láminas laterales. Las plantas infectadas pueden crecer casi normalmente, diluyéndose los síntomas a medida que las plantas crecen y las hojas se endurecen, pero en muchos casos las plantas afectadas quedan raquílicas (Wright y Mumford, 1999; Fletcher, 2000). Poco después de la infección, se puede producir el marchitamiento ligero de las plantas, especialmente en condiciones de elevada iluminación y en las horas del mediodía, la parte apical y las nuevas brotaciones adquieren un color verde grisáceo, que con el tiempo se oscurece (Fletcher, 2000).

Los frutos de las plantas infectadas con PepMV, en general son de menor calibre y de baja calidad comercial (Spence *et al.*, 2006), pero además pueden presentar diferentes síntomas que son la causa de los mayores daños económicos que provoca el PepMV en el cultivo de tomate. En ocasiones, los frutos inmaduros presentan una alteración del color a modo de jaspeado conocida como “marbling” (Cooke, 2000; Roggero *et al.*, 2001), y que es consecuencia de una distribución irregular del licopeno, pigmento que proporciona la coloración roja al tomate (Fig. 1.6c y d). Esta alteración podría estar relacionada con variaciones en las condiciones ambientales y nutricionales de la planta, ya que su intensidad y la proporción de frutos que resultan afectados, varía en el transcurso de pocas semanas. Curiosamente, las plantas en las que aparecen estos frutos, puede que no presenten síntomas ni en hojas ni en tallos. El “marbling” no es un síntoma generalizado en la planta sino que puede afectar solo a ciertos ramilletes y a ciertos frutos en cada ramillete (Cooke, 2000). Otras alteraciones en la coloración de los frutos como el “flaming” o maduración irregular (Fig. 1.6b y d), y la

aparición de manchas necróticas (Fig. 1.6d) son también frecuentes en las plantaciones de tomate (Hanssen *et al.*, 2009a).



**Figura 1.6:** Síntomas que se presentan en frutos de tomate relacionados con la infección por PepMV. **a)** Manchado de fruto maduro; **b)** maduración irregular; **c)** marbling; **d)** frutos de una misma planta infectada con PepMV que presentan distintos síntomas: marbling, maduración irregular y manchado necrótico.

Tanto las condiciones nutricionales como las ambientales tienen una influencia directa en la aparición y desaparición de los síntomas, así como en la intensidad con que se manifiestan. Concretamente la iluminación, es el factor que más parece influir en la expresión de los síntomas, más incluso que la temperatura (Cooke, 2000). Las condiciones de bajas temperaturas y escasa iluminación son favorecedoras para la aparición de síntomas mucho más pronunciados. Así, bajo estas condiciones, son más frecuentes las plantas con



“nettle-like head” y deformaciones en los folíolos, mientras que cuando las temperaturas e iluminación son elevadas en el cultivo, los amarillos y los mosaicos en hojas son mucho más evidentes (Fletcher, 2000). Es por ello que en Reino Unido, se describen como primeros signos de la infección el apuntamiento y abullonado de las hojas, “nettle-like head” y coloración verde clara de la parte apical, mosaico y manchas angulares amarillas en las hojas de la parte baja y un menor desarrollo general de la planta, pero no se citan síntomas en los frutos (Wright y Mumford, 1999). Sin embargo, en Holanda, durante los primeros estadios del cultivo únicamente se observa abullonado en las plantas infectadas y posteriormente la aparición de manchas cloróticas en las hojas, de unos 2 mm de diámetro, mientras que en los frutos ya con coloración naranja, aparece “marbling”. En cambio, la primera aparición del virus en Alemania, se caracterizó por no presentar ningún síntoma en hoja, sólo los frutos aparecían manchados (Lesemann *et al.*, 2000), mientras que en Canadá, las primeras plantas infectadas presentaban un brillante mosaico amarillo en las hojas (French *et al.*, 2001) al igual que sucedía en Cerdeña, donde además el mosaico en hojas jóvenes iba acompañado por manchas necróticas aisladas en hojas, mosaico suave en tallos y alteraciones de la coloración en los frutos aún verdes, que se traducían en una maduración irregular del fruto (Roggero *et al.*, 2001). En España, se han detectado todos los síntomas citados en el resto de países pero son más evidentes en las plantaciones de otoño e invierno, difuminándose conforme avanza la primavera, al aumentar la temperatura y luminosidad (Jordá *et al.*, 2000b), aunque con el paso de los años, el periodo de aparición de los síntomas en campo se ha ampliado.

### **Rango de hospedantes**

El PepMV tiene un escaso rango de hospedadores que principalmente está restringido a especies de la familia *Solanaceae*, muchas de las cuales se infectan sistémicamente. Sin embargo, no todos los aislados de PepMV producen los mismos síntomas en cada una de las especies susceptibles. El aislado original de pepino ha sido detectado en tubérculos salvajes y comerciales de *Solanum tuberosum*, causando en la mayoría de los casos infecciones sistémicas asintomáticas o suaves mosaicos. Sin embargo, en dos cultivares peruanos de *S.*

*tuberosum* y en *S. stoloniferum* PI 230557, el virus causaba una necrosis sistémica severa (Jones *et al.*, 1980; Tabla 1.1).

En un principio se pensó que las diferentes cepas del virus inducían diferentes síntomas en tomate, pero se ha comprobado que aislados que pertenecen a la misma cepa pueden variar considerablemente en la severidad de los síntomas que provocan en tomate, desde solo unas pocas manchas amarillas en hojas hasta severos síntomas en frutos. En diferentes ocasiones se han corroborado estas diferencias entre aislados del virus al tratar de caracterizarlos biológicamente (Jones *et al.* 1980; Wright y Mumford 1999; Jordá *et al.*, 2000b; French *et al.*, 2001; Salomone y Roggero 2002; Verhoeven *et al.*, 2003; Pospieszny *et al.*, 2008; Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2009), mediante la inoculación de extractos vegetales infectados, en un extenso rango de especies indicadoras (Tabla 1.1). Como resultado, se han identificado hospedantes diferenciadores entre aislados de la misma cepa viral, como la *Nicotiana glutinosa*. Esta especie al ser inoculada con el aislado SW presenta severos mosaicos en hojas mientras que no es susceptible a la infección con otros aislados de la misma cepa viral como el aislado español 1907.

En otras *Solanáceas* de importancia agrícola como son el pimiento o la berenjena, y a pesar de no haberse estudiado con tanta profundidad como otras especies de la misma familia, se han podido encontrar interesantes conclusiones. Determinadas variedades de pimiento pueden ser consideradas como hospedantes diferenciadores entre cepas virales al mostrarse únicamente susceptibles a la infección con los aislados de la cepa peruana. Por otro lado, en berenjena el virus provoca en general síntomas suaves que desaparecen con el paso del tiempo (Cooke, 2000). Esta especie es susceptible a todas las cepas de PepMV, que en la mayoría de los casos producen infecciones sistémicas asintomáticas, pero determinados aislados de la cepa “europea” provocan la aparición de mosaicos severos y abullonados en hojas (Tabla 1.1).

Aunque por el momento el PepMV solo infecta de forma natural a *S. muricatum* y *S. lycopersicum*, (Jones *et al.*, 1980; van der Vlugt *et al.*, 2000), en los principales países productores de patata y pimiento, se teme por la posibilidad de que se produzca un nuevo salto de hospedante, con los elevados costes económicos que esto puede significar para los cultivos susceptibles. En Perú, se ha detectado la infección del PepMV tanto en campos de patata como en las

accesiones de patata que están mantenidas en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Aunque la importación de patata en la Comunidad Europea procedente de Sudamérica está prohibida, si se permite la importación de accesiones de patata con motivo de investigación o mejora genética que deben ser controladas (Anónimo, 2005).

**B:** abullonado; **D:** muerte de la planta; **Df:** deformación de las hojas jóvenes o nettle head; **Dw:** enanismo; **GM:** mosaico amarillo dorado; **Lc:** curvado de hojas hacia el haz; **LCL:** lesiones cloróticas locales; **LN:** punteaduras necróticas locales que se expanden irregularmente, parches y/o anillos que se pueden llegar a unir para causar necrosis generalizada en las hojas inoculadas; **LNR:** anillos necróticos locales; **LNS:** punteaduras necróticas en hojas inoculadas; **MM:** mosaico y/o mosaico suave; **Mo:** moteado; **NS:** no se detecta infección sistémica; **P:** fruncimiento de nervios; **RS:** manchas rojizas; **SC:** clorosis generalizada; **SCB:** parches cloróticos sistémicos; **SCL:** lesiones cloróticas sistémicas; **SCR:** anillos y/o líneas cloróticas sistémicas; **SI:** infección asintomática en hojas inoculadas; **SM:** mosaico severo; **SN:** punteados, parches y/o anillos que se expanden en hojas inferiores y pueden llegar a unirse para provocar una necrosis sistémica generalizada de la hoja; **SNP:** manchado necrótico sistémico; **SNR:** anillos y/o líneas necróticas sistémicas; **SNS:** punteado y/o moteado necrótico sistémico; **SNSS:** estrías necróticas en tallos; **SS:** infección sistémica asintomática; **STN:** necrosis del ápice; **SVC:** clareado de venas sistémico; **SVN:** necrosis de venas sistémica; **YS:** manchas amarillas aisladas; ( ): los síntomas aparecen sólo ocasionalmente, **na:** datos no disponibles.

<sup>1</sup> Jones *et al.* (1980) con el aislado “peruano” procedente de Perú

<sup>2</sup> Anónimo (2005) con el aislado “europeo” procedente de UK

<sup>3</sup> Jordá *et al.* (2000b) con el aislado “europeo” 1907 de Murcia

<sup>4</sup> French *et al.* (2001) con aislados “europeos” obtenidos en: <sup>a</sup> Canadá, <sup>b</sup> Reino Unido, <sup>c</sup> Holanda.

<sup>5</sup> Salomone y Roggero (2002) con el aislado obtenido en Cerdeña

<sup>6</sup> Verhoeven *et al.* (2003) usando el aislado tipo: <sup>a</sup> “peruano” BBA1137 obtenido en Perú, y los tipo “europeo”: <sup>b</sup> BBA99-550 de Alemania, <sup>c</sup> PD99901066 de Holanda, <sup>d</sup> PD99903244 de Reino Unido, <sup>e</sup> PD99910242 de Holanda, <sup>f</sup> PD99912968 de Arizona (EEUU), <sup>g</sup> PD99913775 de Austria, <sup>h</sup> PD99913776 de Murcia (España), <sup>i</sup> PD20000790 de Bretaña (Francia), <sup>j</sup> PD20001003 de Bélgica, <sup>k</sup> PD20001287 de Canarias (España), <sup>l</sup> PD20001809 de Alemania, <sup>m</sup> PD20005574 de Texas (EEUU), <sup>n</sup> PD20006266 de Ucrania, <sup>o</sup> PD20007805 de Holanda y <sup>p</sup> PD21001936 de Canadá.

<sup>7</sup> Pospieszny *et al.* (2008) con aislados polacos: <sup>a</sup>SW de la cepa “europea”, <sup>b</sup>PK de la cepa CH2.

<sup>8</sup> Hasiów-Jaroszewska *et al.* (2009) con los aislados polacos Pa, Ku, Ros del genotipo CH2

**Tabla 1.1:** Síntomas observados tras la inoculación artificial de distintos aislados de PepMV en diferentes especies hospedantes

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b>Reacción Local</b>	<b>Reacción Sistémica</b>
<b>Aizoaceae</b>	<i>Tetragonia expansa</i>	SI <sup>1</sup>	NS <sup>1</sup>
<b>Amaranthaceae</b>	<i>Amaranthus caudatus</i>	na	NS <sup>1</sup>
	<i>A. edulis</i>	na	NS <sup>1</sup>
	<i>A. retroflexus</i>	SI <sup>5</sup>	NS <sup>5</sup>
	<i>Gomphrena globosa</i>	na	RS <sup>3</sup> ; NS <sup>1,5</sup>
<b>Chenopodiaceae</b>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LCL <sup>5</sup>	NS <sup>1,3,5</sup>
	<i>C. murale</i>	na	NS <sup>1</sup>
	<i>C. quinoa</i>	LCL <sup>5,7a,7b</sup>	NS <sup>1,3,5,6</sup>
<b>Cruciferae</b>	<i>Brassica pekinensis</i>	na	NS <sup>1</sup>
<b>Cucurbitaceae</b>	<i>Cucumis sativus</i>	SI <sup>1,2</sup>	NS <sup>1,2,3,5</sup>
	<i>Cucurbita pepo</i>	na	NS <sup>5</sup>
<b>Labiatae</b>	<i>Ocimum basilicum</i>	na	NS <sup>5</sup>
<b>Leguminosae</b>	<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	na	NS <sup>1</sup>
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	na	NS <sup>1,3</sup>
	<i>Vigna unguiculata</i> ssp. <i>cylindrica</i>	na	NS <sup>1</sup>
	<i>V. unguiculata</i> ssp. <i>unguiculata</i>	na	NS <sup>1</sup> ; MM, B <sup>3</sup>
<b>Portulacaceae</b>	<i>Montia perfoliata</i>	na	NS <sup>1</sup>
<b>Solanaceae</b>	<i>Capsicum sinense</i> cv. Mono Rojo	na	NS <sup>1</sup>
	<i>C. annuum</i>	na	NS <sup>3,7</sup>

**Tabla 1.1** (Continuación)

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b>Reacción Local</b>	<b>Reacción Sistémica</b>
<b>Solanaceae</b>	<i>C. annuum</i> cv. Quadrato d'Asti	na	NS <sup>5</sup>
	<i>C. annuum</i> cv. W.G. Zoete	na	(MM) <sup>6a</sup> ; NS <sup>6b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, o, p</sup>
	<i>Datura metel</i>	SI <sup>6b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m</sup> ; LN <sup>1</sup> ; LNS <sup>6a, p</sup>	SM, SNS, SNP <sup>1</sup> ; SS <sup>6a</sup> ; MM <sup>6b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, m</sup> ; SN <sup>1, 6p</sup> ; SCL <sup>6f, l</sup>
	<i>D. innoxia</i>	(LCL) <sup>7a</sup> ; LN <sup>7b</sup> ; LNS <sup>8</sup>	MM <sup>7</sup> ; SS <sup>7b, 8</sup>
	<i>D. stramonium</i>	LN <sup>1</sup> ; SI <sup>2</sup> ; LCL <sup>5</sup> ; LNS <sup>6a, o</sup>	SNS <sup>1, 6a</sup> ; SNP, SN <sup>1</sup> ; SC, MM <sup>6b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p</sup> ; SM <sup>1, 2, 3, 5</sup> ; B <sup>2, 3</sup>
	<i>Lycopersicon chilense</i>	na	SS <sup>1</sup>
	<i>L. peruvianum</i>	na	SS <sup>1</sup>
	<i>L. pimpinellifolium</i>	na	SS <sup>1</sup> ; GM <sup>4a</sup> ; P <sup>4b</sup> ; SS <sup>4c</sup>
	<i>Nicandra physaloides</i>	LN <sup>1</sup> ; LCL <sup>7a</sup>	SM, SVC, SNS, SNR <sup>1</sup> ; B <sup>3</sup> ; MM <sup>7</sup> ; SS <sup>7b</sup>
	<i>Nicotiana affinis</i>	LCL <sup>7a</sup>	MM <sup>7a</sup> ; (SS) <sup>7b</sup> ; NS <sup>8</sup>
	<i>N. benthamiana</i>	LCL <sup>2, 5, 7, 8</sup>	SM <sup>2, 7a</sup> ; B <sup>2</sup> ; MM <sup>3, 5, 7b</sup> ; SS <sup>8</sup>
	<i>N. bigelovii</i>	LN <sup>1</sup>	SM, SN <sup>1</sup>
	<i>N. clevelandii</i>	LNR, LN <sup>1</sup> ; LCS <sup>2</sup> ; LCL <sup>5, 7</sup>	SM <sup>1, 3, 7</sup> ; SVC <sup>1, 2</sup> ; SNS <sup>1</sup> ; Mo <sup>2</sup> ; NS <sup>5</sup> ; MM <sup>7</sup>
	<i>N. debneyi</i>	LN <sup>1</sup> ; LCL <sup>2, 7</sup>	SM <sup>1, 2</sup> ; SNS, SNR, SN <sup>1</sup> ; B, SVC <sup>2</sup> ; MM <sup>7</sup> ; SS <sup>9</sup>
	<i>N. glutinosa</i>	LN <sup>1</sup> ; SI <sup>2</sup> ; LCL <sup>7a</sup>	SM <sup>1, 7</sup> ; SN <sup>1</sup> ; NS <sup>2, 3, 5</sup> ; MM <sup>8</sup>
	<i>N. glutinosa-CSL</i>	LNS, LN <sup>6a</sup> ; (LCL) <sup>6b, c</sup>	NS <sup>6d, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o</sup> ; SCL, SCR, SVC <sup>6a</sup> ; (SCL, SVC) <sup>6b, c</sup>
	<i>N. glutinosa-PPS</i>	LNS, LN <sup>6a</sup> ; (LCL) <sup>6b</sup>	SCL, SVC <sup>6a, (6b, 6c)</sup> ; NS <sup>6d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p</sup> ; SCR <sup>6a</sup>
	<i>N. megalosiphon</i>	LCL, LNS <sup>5</sup>	SM, SN <sup>5</sup>

**Tabla 1.1 (Continuación)**

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b>Reacción Local</b>	<b>Reacción Sistémica</b>
<b>Solanaceae</b>	<i>N. occidentalis</i>	LN <sup>1</sup> ; LCL <sup>2,6</sup> ; LNS <sup>6</sup>	MM, SCR, SNS, SNR <sup>1</sup> ; Df, SN <sup>2</sup> ; SCL, Dw, SNS <sup>6</sup>
	<i>N. rusitica</i>	LN <sup>1</sup> ; SI <sup>2</sup> ; LCL <sup>5</sup>	MM, SCB, SCR <sup>1</sup> ; NS <sup>2,5</sup>
	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	LN <sup>1</sup> ; (LCL) <sup>7a</sup>	SN <sup>1</sup> ; MM <sup>1,7a</sup> ; (SS) <sup>7b</sup>
	<i>N. tabacum</i> cv. White Burley	LN <sup>1</sup> ; SI <sup>2,5</sup> ; LCL <sup>6b,(7a)</sup>	SM, SCR, SN <sup>1</sup> ; MM <sup>2</sup> ; SVC <sup>2,(6a),6b</sup> ; SCL <sup>2,6b</sup> ; SC <sup>7</sup> ; NS <sup>5,6c,6d,6e,6f,6g,6h,6i,6j,6k,6l,6m,6n,6o,6p,8</sup>
	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi	SI <sup>2</sup> ; (LCL) <sup>7a</sup>	SVC, SCL <sup>2</sup> ; NS <sup>3,8</sup> ; MM <sup>2,7a</sup> ; (SS) <sup>7b</sup>
	<i>Petunia hybrida</i>	na	NS <sup>1,3,5</sup>
	<i>Physalis floridana</i>	LCL <sup>7a</sup>	NS <sup>3,6b,6c,6d,6e,6f,6g,6h,6i,6j,6k,6l,6m,6n,6o,6p,7b</sup> ; SS <sup>1</sup> ; MM, SM, (Df) <sup>7a</sup> ; (SCL, MM, SNS) <sup>6a</sup>
	<i>P. peruviana</i>	na	SS <sup>1</sup>
	<i>Solanum brachycarpum</i> PI* 275180	na	SS <sup>1</sup>
	<i>S. brevifolium</i> PI 245764	na	SS <sup>1</sup>
	<i>S. cardiophyllum</i> PI 275215	na	MM <sup>1</sup>
	<i>S. chancayense</i> PI 338615	na	SS <sup>1</sup>
	<i>S. curtilobum</i> PI 186181	na	SS <sup>1</sup>
	<i>S. demissum</i> "A", "Y" y PI 175405	na	SS <sup>1</sup>
	<i>S. demissum</i> x <i>S. tuberosum</i> "A6"	SI <sup>1</sup>	na
	<i>S. lycopersicum</i>	SI <sup>7</sup>	SNSS, SN <sup>6p</sup> ; MM <sup>7</sup> ; (B) <sup>7a</sup> ; SN <sup>8</sup>
	<i>S. lycopersicum</i> cv. Espero	SI <sup>2</sup>	B, Dw, Df, YS <sup>2</sup>
	<i>S. lycopersicum</i> cvs. Kondine, Rutgers	na	SS <sup>1</sup>

**Tabla 1.1 (Continuación)**

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b>Reacción Local</b>	<b>Reacción Sistémica</b>
<b>Solanaceae</b>	<i>S. lycopersicum</i> cv. Marmande	LCL <sup>5</sup>	MM <sup>5</sup>
	<i>S. lycopersicum</i> cv. Rapsodie	na	GM <sup>4a</sup> ; MM, P <sup>4b, 4c</sup> SS <sup>6a, b, d, i, k, n, 7b</sup> ; MM <sup>2, 5, (6b), 6c, (6d), 6e, 6g, 6h, 6j, 6m, 6o, 6p, 7, 8</sup> SC <sup>6c</sup> ; SCL <sup>6f, i, o</sup> ; SM <sup>6f, i</sup> ; B <sup>9p</sup>
	<i>S. melongena</i>	MM <sup>2</sup> ; LCL <sup>5, 7a</sup>	SS <sup>1</sup>
	<i>S. megistactolobum</i> PI 275147	na	MM <sup>1</sup>
	<i>S. microdontum</i> PI OKA 4820	na	MM, SCB <sup>1</sup>
	<i>S. mochicense</i> PI 283114	na	SM <sup>1</sup> ; GM, Lc <sup>3</sup> ; SS <sup>5</sup>
	<i>S. muricatum</i>	SI <sup>5</sup>	SS <sup>1</sup>
	<i>S. raphanifolium</i> PI 210048	na	MM <sup>1</sup>
	<i>S. stenotomum</i> PI 230512	na	SNS, SVN, Df, SN, D <sup>1</sup>
	<i>S. stoloniferum</i> PI 230557	LNS, LNR, LN <sup>1</sup>	NS <sup>7</sup>
	<i>S. tuberosum</i>	na	MM <sup>2</sup>
	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> cv. Charlotte	MM <sup>2</sup>	SS <sup>1</sup> ; MM <sup>2</sup>
	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> cvs. Maris Peer, Pentland Dell	MM <sup>2</sup>	SS <sup>2</sup>
	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> cv. Maris Piper	na	SS <sup>1</sup>
	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> cv. Pentland Ivory y clone USDA 41956	na	NS <sup>5</sup>
	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> cv. Spunta	na	

## Propiedades biológicas del virus

El PepMV es un virus considerado como bastante estable. Los extractos vegetales infectados retienen la infectividad durante al menos 3 meses cuando se almacenan a 20°C, mientras que hojas infectadas de *N. glutinosa* dejadas a secar sobre silicagel, todavía son infecciosas pasados los 6 meses con la particularidad de que el virus se mantiene infectivo durante más tiempo a bajas temperaturas (van der Vlugt, 2009). Los extractos vegetales con concentraciones virales de hasta  $10^{-5}$  siguen siendo infectivos. Deben ser sometidos a temperaturas de al menos 70°C durante periodos de 10 minutos para que dejen de ser infectivos, valor que se corresponde con el punto de inactivación térmica del PepMV (Jones *et al.*, 1980).

El PepMV infecta al tomate de forma sistémica. Una vez en la planta, el virus se extiende por todos los órganos rápidamente, siendo los órganos sumidero a los que primero llega el virus. En ensayos realizados en Alemania con plantas infectadas en sistemas hidropónicos con recirculación de la solución nutritiva, se comprobó que la infección a partir de plantas inoculadas se detectaba en las plantas no inoculadas en primer lugar en las raíces, desde donde el virus era inmediatamente transportado hacia las partes en crecimiento, inflorescencias y frutos en desarrollo. A los 7 días, el virus ya había alcanzado las hojas jóvenes de los brotes, siendo las hojas más viejas las últimas en infectarse, dos semanas después de que la infección afectara a las raíces (Fakhro *et al.*, 2005). En inoculaciones a hojas adultas de plantas de 5 meses de edad, el virus se detecta en los ápices a los tres días de la inoculación (Spence *et al.*, 2006).

Estas características biológicas del virus, tienen importantes repercusiones epidemiológicas. Bajo condiciones naturales de cultivo, el virus puede permanecer infectivo en la savia de las plantas infectadas, una vez han sido arrancadas del suelo, durante al menos 3 meses, constituyendo un foco de infección secundaria importante si las plantas no son destruidas (Cooke, 2000). El PepMV puede sobrevivir en las raíces húmedas, al menos 3 semanas tras el arranque de la planta, momento en que la pudrición de los tejidos impide su conservación, en cambio, si las raíces se dejan secar, el virus puede sobrevivir en los tejidos hasta al menos 4 semanas por lo que no es de extrañar que el virus se haya detectado por técnica serológica ELISA en rastrojos infectados tras un mes



de ser incorporados al suelo (Yantén *et al.*, 2005). Una vez el cultivo ha sido arrancado, el virus puede sobrevivir en muchas superficies que han estado en contacto con hojas y frutos infectados como son las herramientas, los pasillos de hormigón, las cubiertas de polietileno que recubren el suelo, en los carritos de recogida de la fruta, en los contenedores de residuos, en las líneas de riego, estacas de los goteros, en los contenedores de aluminio para el riego y en las aguas de escorrentía (Anónimo, 2005).

### **Formas de transmisión y dispersión del patógeno**

Al tratarse de parásitos obligados de plantas, los virus vegetales en condiciones naturales, se ven forzados cada cierto tiempo a pasar de una especie vegetal susceptible a otra para poder sobrevivir. Cuando hablamos de virus que infectan plantas anuales como el tomate, la frecuencia con que se ven forzados a transmitirse, aumenta si la comparamos con la de otros virus que infectan especies leñosas de larga vida. Varios son los mecanismos o formas de transmisión que utilizan estos agentes patógenos para lograr perpetuarse en los cultivos.

#### ***Transmisión Mecánica***

La principal forma de transmisión y dispersión natural del PepMV en campo es la transmisión mecánica. Según la bibliografía, se transmite muy fácilmente de esta forma, más rápidamente que el virus X de la patata [*Potato virus X* (PVX); Género *Potexvirus*] pudiendo igualar o superar al virus del mosaico del tomate [*Tomato mosaic virus* (ToMV); Género: *Tobamovirus*] (Wright y Mumford, 1999). Esta facilidad de transmisión mecánica es característica de virus de gran estabilidad, que se multiplican en grandes cantidades en las células de las plantas hospederas. El virus puede pasar de una planta infectada a la contigua sana mediante el roce entre ellas y de esta manera, en el invernadero la enfermedad avanza a lo largo de las filas, en el mismo sentido que el paso de los operarios, ya que cuando la ropa de estos entra en contacto con una planta infectada, se contamina y puede transferir el virus al rozarse con una nueva planta (Wright y Mumford, 1999). Sin embargo, los resultados obtenidos en experiencias de invernadero señalan que la tasa de

transmisión del virus debida a los roces con la ropa contaminada es menos relevante que la transmisión debida al propio operario al manipular las plantas, principalmente durante las labores de entutorado y desbrotado, en las que se pueden llegar a contaminar entre 6 y 8 plantas en tan sólo una operación (Lacasa *et al.*, 2001) y, siendo el tomate una especie hortícola que necesita de constantes manipulaciones para lograr conducir el cultivo, la enfermedad puede diseminarse rápidamente en el invernadero (Cooke, 2000).

### **Transmisión por insectos vectores**

Los insectos son con diferencia, el grupo de vectores de virus vegetales más importante tanto en número de virus transmitidos como en importancia económica de las enfermedades que provocan dichos virus. De las 381 especies de organismos con capacidad vectora, aproximadamente el 94% pertenece al phylum *Arthropoda*, de los cuales el 99% son insectos y solo el 1% serían ácaros (Harris, 1981).

Los insectos vectores de otros virus, que normalmente afectan al tomate como los áfidos [*Myzus persicae* (Sulzer)] y las moscas blancas [*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)] no han demostrado ser transmisores del PepMV (Jones *et al.*, 1980; Loomans *et al.*, 2000). Sin embargo, el virus se ha detectado en poblaciones salvajes de distintas especies del género *Lycopersicon* que se han mantenido aisladas en Perú y no sometidas a la manipulación humana, por lo que cabe la posibilidad de que la dispersión del PepMV en estas poblaciones se deba a algún vector todavía desconocido (Soler *et al.*, 2002).

Varias especies de abejorros utilizados como polinizadores [*Bombus terrestris* L., *B. canariensis* (Pérez) y *B. impatiens* (Cresson)] han mostrado ser experimentalmente dispersores del virus entre las plantas de tomate tanto en invernaderos españoles (Lacasa *et al.*, 2003) como en canadienses (Shipp *et al.*, 2008). La infección se inicia en las flores que han sido polinizadas por los abejorros y desde los frutos cuajados a partir de esas flores, la infección se transloca a las distintas partes de la planta (Shipp *et al.*, 2008). La dispersión del virus por *Bombus* se produciría durante sus visitas a las flores. El insecto se sujeta a las anteras con las mandíbulas y agita la flor moviendo el cuerpo y las alas, para que el polen se desprenda. El abejorro recoge el polen que ha quedado

adherido al cuerpo y lo almacena en las escopas de las patas traseras para transportarlo a los nidales, pero en las flores infectadas por el PepMV también recoge partículas del virus que quedan adheridas en su cuerpo, principalmente en patas, cabeza y abdomen (Lacasa *et al.*, 2003). Existirían dos rutas posibles para la transmisión: la primera sería al fertilizar las flores con polen infectado y la segunda se produciría a través de las heridas que se producen en las flores que han sido visitadas (Shipp *et al.*, 2008). Cuando se reiteran las visitas de los abejorros a una misma flor, bien por escasez de flores o por una elevada densidad de abejorros en el invernadero, se llegan a producir lesiones en el estigma y en el ovario, lesiones por donde se produciría la entrada del virus en la planta sana visitada (Lacasa *et al.*, 2003). Así mismo, la adquisición y posterior infección de otras plantas también se produciría al entrar en contacto los insectos con otros órganos de la planta como por ejemplo, cuando se posan sobre las hojas para limpiarse. Los abejorros utilizan los peines de sus patas traseras para limpiarse el cuerpo del polvo y para eliminar los restos que quedan adheridos en los peines, los frotan contra la superficie de la hoja, rasgando las células epidérmicas y rompiendo los tricomas que contienen elevadas concentraciones de partículas virales (Lacasa *et al.*, 2003; Shipp, *et al.*, 2008), que podrían adherirse al cuerpo del insecto que las transportaría hasta otras plantas sanas donde por la misma vía podría producirse la contaminación de los tejidos (Lacasa *et al.*, 2003). Con la información que se posee en estos momentos es imposible saber cual es el mecanismo de infección, ya que se ha detectado la presencia del PepMV tanto en el polen transportado por los abejorros, que haría pensar en una infección vía polinización con polen infectado, como en el cuerpo de los individuos con o sin polen en sus patas, de manera que lo que se produciría sería una transmisión mecánica (Lacasa *et al.*, 2003).

### ***Transmisión por semilla***

La infección de las semillas juega un papel fundamental tanto en la transmisión como en la supervivencia de un importante número de enfermedades virales. La transmisión por semilla es un punto de partida idóneo para el establecimiento de una enfermedad en campo. Primero, permite que la infección se produzca en las primeras etapas del desarrollo de la plántula, factor que será decisivo en la severidad que alcanzará la infección viral, y en segundo lugar, la

infección de la semilla permitirá la aparición en campo, de plántulas infectadas distribuidas al azar, que constituirán reservorios del virus y focos de dispersión secundaria de la enfermedad bien sea mecánicamente o por vectores. Por otro lado, la transmisión por semilla es un modo ideal de supervivencia para un virus durante periodos desfavorables, y si además la semilla es de especies arvenses, esta sería una forma extraordinariamente eficaz de persistencia a largo plazo durante los periodos en los que no hay cultivo en el campo. Esta forma de transmisión es importantísima en la transmisión de virus vegetales a largas distancias, favorecida por el comercio internacional de semillas. En la actualidad gran parte de la semilla sembrada en la Unión Europea (UE) se produce en países terceros (China, Tailandia, India, Chile, etc.) donde clima y sistemas productivos son más favorables para la producción de semilla a gran escala que llevan a cabo grandes empresas multinacionales. El movimiento internacional de semilla infectada puede suponer la entrada, dispersión y distribución por amplias áreas geográficas de nuevas virosis.

Durante la decena de años en que se vienen padeciendo las epidemias de PepMV en tomate, se han realizado numerosos trabajos para comprobar su transmisión mediante la semilla infectada. Los resultados han sido tan dispares que han generado una gran controversia a nivel mundial en la que se han visto implicados productores, investigadores y empresas productoras de semillas.

En los primeros brotes de la enfermedad en Reino Unido, el virus fue detectado en una pequeña proporción de plantas en 9 semilleros comerciales. En 8 de ellos se producían plántulas a partir de semilla holandesa. La aparición del virus en este país se relacionó con el uso de semilla de tomate contaminada, sin embargo no se logró detectar el virus en varios cientos de plántulas obtenidas de semillas extraídas de frutos infectados, mediante tratamientos ácidos (Anónimo, 2005b). Holanda por su parte, negaba cualquier relación entre semilla, semillero y vivero de propagación y apuntaba la posibilidad de que la infección se hubiera producido tras la plantación, durante las semanas 4ª a 12ª de desarrollo, periodo en que el tomate presenta una mayor susceptibilidad a las infecciones virales (Cooke, 2000). Sin embargo, el Servicio holandés de Protección de las Plantas, en colaboración con distintas empresas productoras de semillas de tomate habían detectado la infección de PepMV en plántulas obtenidas a partir de semillas procedentes de tomates infectados, aunque en muy bajo porcentaje (del 0.03 al

0.06%), cuando las semillas no estaban limpias o lo estaban escasamente. En un primer experimento, utilizando 10.000 semillas de tomate infectadas con PepMV de manera natural y sin limpiar, no se observó transmisión del virus a plántula, pero en un segundo experimento con 13.400 semillas parcialmente limpias, 5 plántulas resultaron estar infectadas con el virus (Krinkels, 2001).

En Italia, el PepMV también fue detectado en semillas extraídas de frutos de tomate recolectados de plantas infectadas naturalmente. Sin embargo, tras lavar, secar y sembrar dichas semillas, ninguna de las 52 plántulas obtenidas resultó ser positiva al virus (Salomone y Roggero, 2002). Un año más tarde en Reino Unido, el virus se detecta mediante RT-PCR cuantitativa en semilla comercial procedente de un paquete de tomate holandés que ya se había utilizado en campo, por lo que para valorar el riesgo real que constituía el uso de semilla infectada, en el Central Science Laboratory (CSL) se procedió a la siembra de varios centenares de semillas contaminadas con PepMV. Ninguna de las plántulas obtenidas de dichas semillas resultó estar infectada (Anónimo, 2005). Hemos de señalar en este punto, que el análisis Taqman PepMV-específico, no permite diferenciar si el virus es o no infectivo lo que puede dar lugar a falsos resultados positivos.

En el año 2007 la detección de dos nuevas variantes del virus (CH1 y CH2) en semilla comercial procedente de Chile (Ling, 2007) y su posterior identificación en plantas de tomate en distintos invernaderos de Estados Unidos volvía a poner sobre la mesa el papel que juega la semilla de tomate en la dispersión del virus a larga distancia (Ling *et al.*, 2008).

### ***Propagación vegetativa***

Es un hecho muy comprobado que el PepMV se transmite mediante propagación vegetativa a partir de tubérculos infectados con el virus en distintas accesiones de patata (van der Vlugt, 2009). En el caso del tomate, el empleo generalizado de plántula injertada sobre patrones resistentes a patógenos del suelo supone un alto riesgo de transmisión de virosis en general, y muy en especial de virus con una altísima tasa de transmisión mecánica, como es el caso del PepMV. A este respecto, en Holanda el Servicio de Protección de las Plantas, ha venido realizando análisis sistemáticos a plantas de tomate procedentes de

semilleros de propagación desde el año 1999. Hasta el 2005, más de 400.000 plantas habían sido analizadas, detectándose el año 2003 la infección con PepMV en una muestra compuesta por 300 plantas (Anónimo, 2005), que supuso la confirmación sobre el riesgo que comporta este tipo de propagación.

### ***Transmisión por hongos vectores y soluciones nutritivas***

Aunque el virus se ha detectado fácilmente en las raíces de las plantas, no se ha podido detectar ni en el agua de los sistemas hidropónicos (Cooke, 2000), ni en las soluciones nutritivas, aunque sea capaz de distribuirse con ellas (Fakhro *et al.*, 2005), tal vez mediante el arrastre de pequeñas raicillas o trozos de hojas de plantas infectadas (Stijger, 2007). Muy recientemente se ha comprobado que el PepMV puede transmitirse a plantas de tomate regadas con las aguas de drenaje procedentes de plantas infectadas con el virus en presencia del hongo vector *Olpidium virulentus*, estimándose una tasa de transmisión por esta vía del 8%. Sin embargo, el virus no fue detectado en las aguas de drenaje de plantas infectadas con PepMV en ausencia del hongo. Se ha observado además, la posible existencia de cierta especificidad entre virus y aislado de *Olpidium*, en la transmisión (Alfaro-Fernández *et al.*, 2009b).

### **Reservorios de la enfermedad**

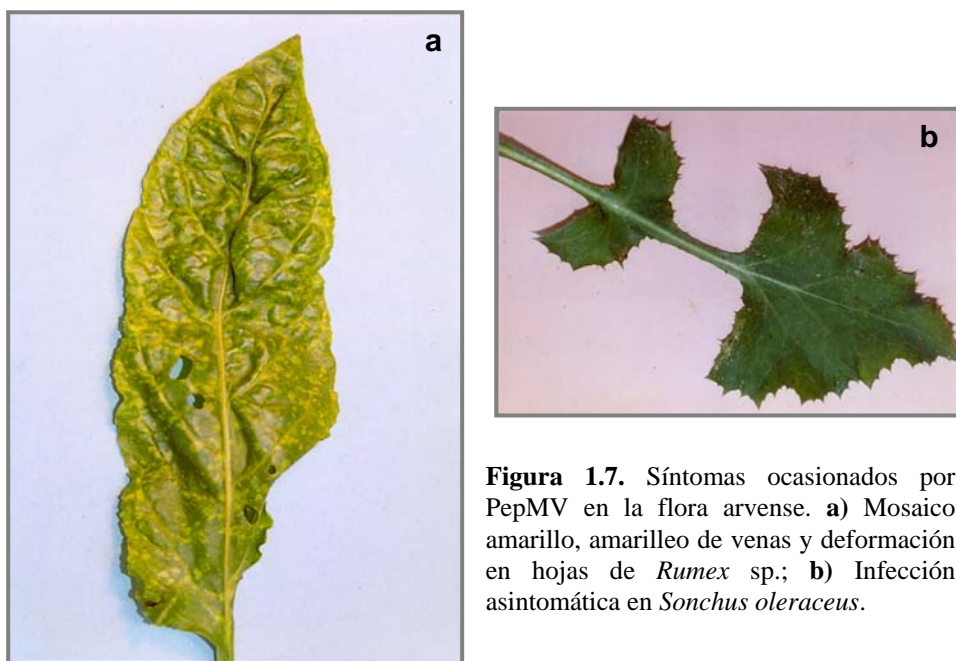
A la hora de considerar las medidas que se deben establecer para el control de los patógenos virales, es importante identificar las fuentes iniciales de infección a partir de las cuales, estos agentes pueden propagarse en los cultivos. En campo, principalmente podemos tener tres posibles fuentes de infección (Thresh, 1981):

- ✓ La flora arvense presente en el cultivo, en el interior de los invernaderos, en las zonas de entrelíneas o los rebrotes de un cultivo anterior, que pueden estar infectados y desde los cuales, insectos, abejorros, hongos o el propio hombre pueden extender la enfermedad a los cultivos.
- ✓ La flora arvense que crece alrededor de los cultivos, en caminos, lindes..., y que pueden ser el único foco de infección para el cultivo o la

fuente primaria de virus desde la que se infecta a otras plantas que son las que realmente propagan la infección en el cultivo

- ✓ Plantas hospedantes infectadas que entran en las zonas de cultivo procedentes de otras zonas alejadas.

En Perú, el PepMV ha sido detectado en *D. stramonium*, *N. physaloides* y *L. peruvianum*, especies que actuarían como reservorios naturales de la enfermedad. En España se han identificado posibles reservorios del virus en la flora arvense asociada al tomate, tanto de la Península como de las Islas Canarias (Jordá *et al.*, 2001b; Córdoba *et al.*, 2004a). Un número considerable de especies resultó presentar infección con el virus (Tabla 1.2), tratándose en la mayor parte de los casos de infecciones asintomáticas (Fig. 1.7). En estas plantas, el virus puede pasar desapercibido hasta que la infección aparece en el siguiente cultivo de tomate, dificultándose la detección y control precoz de la enfermedad.



**Figura 1.7.** Síntomas ocasionados por PepMV en la flora arvense. **a)** Mosaico amarillo, amarilleo de venas y deformación en hojas de *Rumex* sp.; **b)** Infección asintomática en *Sonchus oleraceus*.

Tabla 1.2: Especies que forman parte de la flora arvense y son hospedantes naturales de PepMV.

Familia	Especie	Origen <sup>a</sup>	Síntomas <sup>b</sup>
<b>Amaranthaceae</b>	<i>Amaranthus</i> sp	Canarias <sup>1</sup> , Chile <sup>4</sup>	SS <sup>1</sup> , na <sup>4</sup>
<b>Boraginaceae</b>	<i>Echium creticum</i> L., <i>E. humile</i> Desf	Murcia <sup>3</sup>	SS
	<i>Heliotropium europaeum</i> L.	Alicante <sup>3</sup>	SNS
<b>Brassicaceae</b>	<i>Brassica</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
	<i>Coronopus</i> sp.	Alicante <sup>3</sup>	SS
	<i>Sisymbrium irio</i> L.	Alicante <sup>3</sup>	SS
<b>Cariophyllaceae</b>	<i>Silene</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
<b>Chenopodiaceae</b>	<i>Bassia scoparia</i> (L.) Voss.	Alicante <sup>3</sup>	SS
	<i>Chenopodium</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
<b>Compositae</b>	<i>C. murale</i> L.	Alicante <sup>3</sup>	P, B
	<i>Bidens</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
	<i>Conyza albida</i> Willd. Ex Spreng.	Alicante <sup>3</sup>	B
	<i>Onopordum</i> sp.	Alicante <sup>3</sup>	SS
	<i>Senecio</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
	<i>Sonchus</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
	<i>S. oleraceus</i> L., <i>S. tenerrimus</i> L.	Murcia <sup>1</sup> , Alicante <sup>3</sup>	SS
	<i>Taraxacum</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
<b>Convolvulaceae</b>	<i>T. vulgare</i> (Lam.) Schrank.	Alicante, Murcia <sup>3</sup>	SS
	<i>Calystegia sepium</i> (L) R. Br.	Alicante <sup>3</sup>	SS
	<i>Convolvulus</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
	<i>C. althaeoides</i> L.	Alicante <sup>3</sup>	SS
	<i>C. arvensis</i> L.	Murcia <sup>3</sup>	SC
<b>Cruciferae</b>	<i>Diplotaxis eruroides</i> (L) DC	Alicante <sup>3</sup>	P, SC
	<i>Moricandia arvensis</i> (L) DC.	Alicante <sup>3</sup>	SS
<b>Euphorbiaceae</b>	<i>Euphorbia</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
<b>Gramineae</b>	<i>Piptatherum multiflorum</i> (Cav.) Beauv.	Murcia <sup>3</sup>	SS
<b>Lamiaceae</b>	<i>Mentha</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
<b>Malvaceae</b>	<i>Malva</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
	<i>M. parviflora</i> L.	Murcia <sup>1</sup>	SNS
<b>Plantaginaceae</b>	<i>Plantago</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
	<i>P. afra</i> L.	Alicante <sup>3</sup>	SS
<b>Polygonaceae</b>	<i>Rumex</i> sp.	Alicante <sup>3</sup>	GM, SVC, RS
<b>Solanaceae</b>	<i>Lycopersicon chilense</i> , <i>L. Chmielewskii</i> , <i>L. parviflorum</i>	Perú <sup>2</sup>	SS
	<i>L. peruvianum</i>	Perú <sup>2</sup>	SS, M
	<i>L. pimpinellifolium</i>	Ecuador <sup>5</sup>	SS
	<i>Nicotiana</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
	<i>N. glauca</i> Grah.	Canarias <sup>1</sup>	M
	<i>Solanum</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na
	<i>S. dulcamara</i>	Reino Unido <sup>6</sup>	na
	<i>S. nigrum</i> L.	Reino Unido <sup>6</sup> ;	na <sup>6</sup> ; SS, M, SN <sup>1</sup>
<b>Urticaceae</b>		Canarias, Alicante <sup>1</sup>	
	<i>Urtica</i> sp.	Chile <sup>4</sup>	na



<sup>a</sup> Referencia: <sup>1</sup> Jordá *et al.*, 2001b; <sup>2</sup> Soler *et al.*, 2002; <sup>3</sup> Córdoba *et al.*, 2004a; <sup>4</sup> Yantén *et al.*, 2005; <sup>5</sup> Soler *et al.*, 2005; <sup>6</sup> Anónimo 2005

<sup>b</sup> **B:** abullonado en hojas; **GM:** mosaico dorado; **M:** mosaico verde; **P:** fruncimiento de nervios, **RS:** punteaduras rojas en hojas; **SC:** amarilleo; **SN:** punteados, parches y/o anillos necróticos que se expanden en hojas y pueden provocar una necrosis generalizada de la hoja; **SNS:** punteaduras necróticas; **SS:** infección sistémica asintomática; **SVC:** clareado de venas, **na:** datos no disponibles.

Al igual que en España, en el año 2000 en Holanda se analizó la flora arvense cercana a una explotación de tomate que había estado afectada por PepMV durante dos años consecutivos, con resultados negativos, si bien es cierto que ninguna de las especies analizadas ha sido citada como hospedante del virus (Anónimo, 2005). En el Reino Unido, se ha citado la infección por inoculación artificial de PepMV en *Solanum dulcamara* y *S. nigrum*, dos plantas arvenses muy comunes del entorno de los invernaderos y ampliamente distribuidas por toda Europa (Anónimo, 2005).

En 2002, en distintas áreas de Perú se detecta la infección natural con PepMV en otras especies solanáceas originarias de esta zona andina. Se trata de poblaciones salvajes y aisladas de *Lycopersicon chilense*, *L. chwielewskii*, *L. parviflorum* y *L. peruvianum* (Soler *et al.*, 2002). Tres años más tarde, se detecta la infección natural de *L. pimpinellifolium* en Ecuador (Soler *et al.*, 2005). Por esas mismas fechas (campana 2004/05) en Chile se procede al análisis de la flora arvense asociada al cultivo de tomate protegido en la principal zona productora del país, la zona central de Chile que comprende las regiones V, VI, VII y Metropolitana (Yantén *et al.*, 2005). Un total de 48 muestras con y sin síntomas virales fueron analizadas, de las que 15 resultaron positivas al virus (Tabla 1.2).

Muy recientemente, se ha encontrado el virus en infección natural en plantas de albahaca (*Ocinum basilicum*) cultivadas en las inmediaciones de campos de tomate infectados con el virus en la zona de Sicilia. Este hecho tiene importantes repercusiones ya que aunque los daños que ocasiona el virus en esta especie aromática no son graves, esta planta constituye un importante reservorio del virus para los posteriores cultivos de tomate que se realizan en los mismos campos (Davino *et al.*, 2009).

La única referencia bibliográfica sobre la realización de análisis a otras plantas distintas del tomate procedentes de otros países y con objeto de detectar el PepMV, son los resultados obtenidos de un amplio programa de análisis realizado en Holanda durante el año 2002 por el Servicio de Protección de las Plantas. En este programa se analizaron numerosas plantas de *Petunia* y *Calibrachoa* procedentes de varios países europeos e Israel, en los que siempre se obtuvieron resultados negativos (Anónimo, 2005).

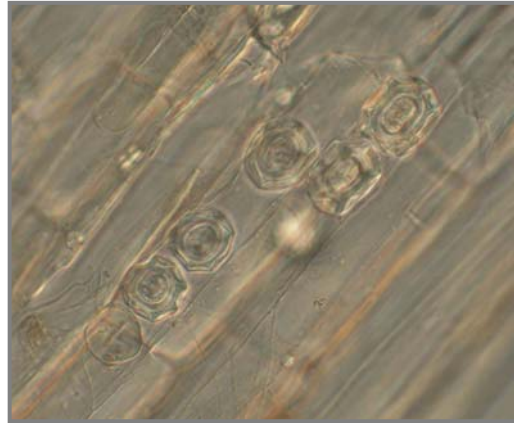
### **Un caso particular: El Marchitamiento del tomate**

Durante los meses de otoño e invierno de la campaña de 1998/99, en invernaderos de tomate en avanzado estado de crecimiento de la zona de Mazarrón y Águilas (Murcia) y coincidiendo con la aparición de los primeros brotes de PepMV en España, se observó la aparición de rodales de plantas con un ligero decaimiento de la parte apical (Fig. 1.8), más evidente durante las horas centrales del día, cuando la temperatura en el interior del recinto alcanzaba los valores máximos diurnos y la humedad relativa descendía hasta el valor más bajo. Al final del día, cuando las temperaturas descendían, las plantas parecían recuperarse, sin embargo, el marchitamiento volvía a aparecer a los pocos días, con síntomas más graves que conducían en la mayoría de los casos, al colapso de las plantas afectadas. Al examinar el aparato radicular de las plantas marchitas, las raíces mostraban una coloración marrón muy notable indicadora del estado de degradación que sufrían los tejidos y la mayoría de las raicillas secundarias había desaparecido, y con ellas la capacidad de absorción de nutrientes, además de necrosis de vasos y desintegración de la médula. La escasez de carbohidratos junto con un déficit en la absorción de agua y nutrientes minerales en los momentos de alta demanda energética y elevada transpiración, provocaban en la planta la seca de los ramilletes florales, pérdida de turgencia en los frutos ya formados, y un descenso en la floración posterior. En los casos en que el marchitamiento había sido menos agudo, las plantas lograban emitir raicillas y de esta forma continuar su ciclo productivo. Si bien es cierto que, las plantas recuperadas quedaban retrasadas, de menor altura, con tallos de menor grosor,

huecos y con los vasos necrosados, por lo que la productividad del cultivo quedaba seriamente comprometida.

El marchitamiento súbito y colapso es un síndrome estrechamente ligado a las condiciones ambientales del cultivo. Aparece tras periodos cortos de tiempo con cielos cubiertos durante los que se producen brucas bajadas térmicas, seguidos de fuertes incrementos en las temperaturas y máximas insolaciones, cuando las plantas se encuentran en el cuajado o engorde de los frutos, fases del ciclo vegetativo de máxima demanda hídrica y energética. A lo largo de los años, se han observado importantes fluctuaciones en cuanto a incidencia y severidad de los síntomas, en sincronía con las particulares incidencias climatológicas que se registraron cada año. Al inicio, el síndrome solo se detectó en cultivo protegido y durante los meses de otoño y primavera, pero últimamente se ha detectado marchitamiento durante todo el año, en cultivo al aire libre y en las principales zonas productoras del país (Córdoba *et al.*, 2004b).

Sólo en Murcia, durante la campaña 1998/99 aproximadamente unos 3.5 millones de plantas sufrieron marchitamiento súbito, viéndose afectadas unas 600 ha. de invernaderos. En la campaña siguiente, el colapso apareció más pronto y tuvo mayor repercusión al afectar a plantas en estadios tempranos de desarrollo. La agresividad del síndrome y la cuantía de pérdidas económicas que provocó durante los primeros años, alertó al sector tomatero que impulsó la puesta en marcha en 2000 del proyecto de investigación multidisciplinar titulado “Etiología del colapso de las plantas de tomate: agentes implicados y su control” (OT00-039-C7-5), en el que participaron distintos grupos de investigación pertenecientes a las Universidades Politécnica de Valencia, Cartagena y Madrid, y el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario (IMIDA). Con este proyecto se pretendía la identificación del agente causal del síndrome para lo cual se contemplaron los distintos aspectos del cultivo que podían provocar esta sintomatología, desde el manejo hídrico del cultivo, fertilización, sustratos y desinfección del suelo, climatología, fisiología de la planta, búsqueda de resistencias varietales, hasta la implicación de organismos patógenos de naturaleza fúngica, vírica o bacteriana.



**Figura 1.9:** Esporas de resistencia de *O. brassicae* si observadas al M.O. en raicillas de una planta de tomate con marchitez. (Fotografía cedida por el Dr. J.A. Herrera Vásquez).

**Figura 1.8:** Aparición en campo de plantas menos desarrolladas que presentan marchitez en la parte apical y seca de las hojas de la parte inferior. En los casos severos la planta entera colapsa, se seca y muere.

Los síntomas en la parte basal y radicular de las plantas colapsadas, así como la forma en que aparecen en el campo, indican la presencia de un agente de naturaleza fúngica o bacteriana. Sin embargo, sólo de un reducido número de plantas se logró aislar la bacteria *Clavibacter michiganensis*, y siempre en muestras que presentaban unos síntomas muy determinados de marchitez aguda y presencia de necrosis oscuras en folíolos alternos de las hojas. Ninguna otra especie bacteriana patógena fue aislada de plantas con distinto grado de colapso (IMIDA, 2001). En análisis de raíces y tallos de plantas colapsadas, se logró el aislamiento de distintas especies fúngicas: *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* sp., *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, *F. roseum*, *F. solani*, *Macrophomina* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Phoma lycopersici*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphyllium* sp. Ninguno de estos

hongos fue detectado en el 100% de los casos analizados, sino que aparecían de forma esporádica en las muestras analizadas y con ninguno se logró reproducir el síndrome cuando se inoculaban a tomate. En cambio cuando las raíces de las plantas marchitas se observaban al microscopio óptico, siempre aparecían colonizadas por esporas de *Olpidium brassicae* (Woronin) P.A. Dang sensu lato (sl). (Fig. 1.9). Este hongo también estaba presente en las raíces de muchas plantas no colapsadas, sin embargo, fue muy raro detectarlo en las raíces de los patrones cuando se utilizaban plantas injertadas, aunque cuando se producía el franqueo de la variedad, las nuevas raíces emitidas por la variedad también aparecían colonizadas por el hongo. Curiosamente, estas plantas franqueadas sufrían distinto grado de marchitamiento a diferencia de las no franqueadas.

Síntomas similares de marchitamiento en tomate, se habían ya observado en Reino Unido, en plantas infectadas con PepMV al final del cultivo. El marchitamiento se producía durante los días cálidos y luminosos posteriores a periodos nublados (Fletcher, 2000; Spence *et al.*, 2006). En España en todos los análisis realizados a plantas con síntomas, se detectó PepMV en la zona radicular y basal del tallo, observándose que aquellas plantas infectadas por el virus y que habían franqueado, sufrían síntomas acentuados de marchitez, en tanto que las no franqueadas, a pesar de estar infectadas con PepMV, sólo presentaban marchitez atenuada y reversible (IMIDA, 2001). Sin embargo, no siempre que se detectaba PepMV se presentaban síntomas de colapso (IMIDA, 2001).

El síndrome de “Colapso” se ha intentado relacionar con una mayor acumulación del PepMV en la parte basal del tallo que provocaría la necrosis del sistema vascular y en consecuencia el marchitamiento súbito en la parte alta de la planta (Soler-Aleixandre *et al.*, 2005b). Al no lograr reproducir la enfermedad bajo condiciones controladas, los autores concluyen que el virus sería un agente necesario, aunque no suficiente, para el desarrollo de la enfermedad, y dejando en el aire la posibilidad de que también pudiera estar implicada alguna especie fúngica presente en las raíces (*Verticillium*, *Olpidium*), hipótesis que no corroboran en el estudio.

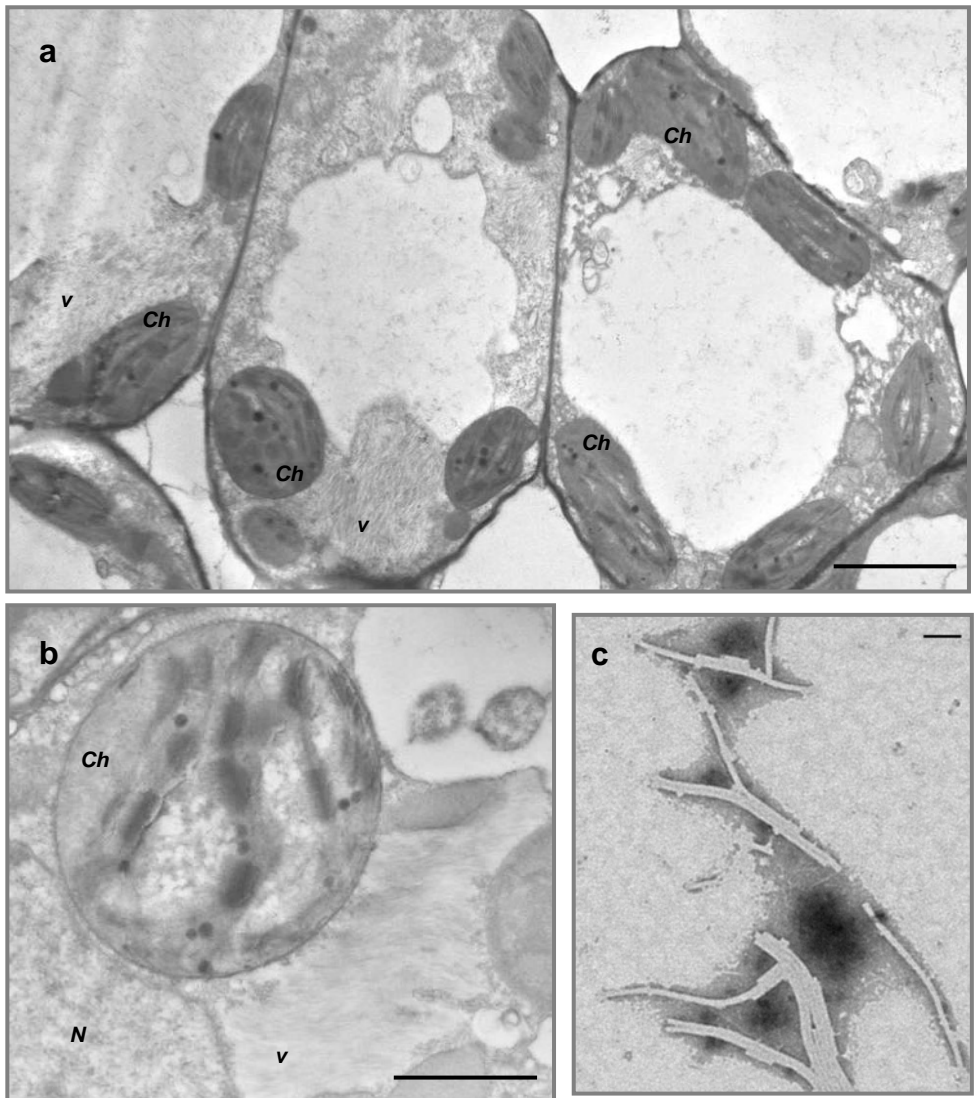
## ***CARACTERÍSTICAS DE LA PARTÍCULA VIRAL***

Preparaciones de tejidos infectados con PepMV para el Microscopio electrónico de transmisión revelan la presencia de partículas filamentosas flexuosas de unos 510 nm de longitud y 12.5 nm de diámetro correspondientes a las nucleocápsides del virus (Fig. 1.10.c). Cuando se hacen inclusiones del tejido de hojas infectadas en resina Spurr y posteriormente se observan los cortes ultrafinos, se detectan numerosas inclusiones en el citoplasma del parénquima del mesófilo formadas por grandes masas de partículas virales o viroplasmias (v) (Fig. 1.10.a, b), típicas de los *Potexvirus* (Jorda *et al.*, 2000a).

En estas inclusiones, las partículas se disponen formando bandas, en paralelo (Fig. 1.10.a, b) o formando una espiral (Koenig *et al.*, 1989). Aunque es raro encontrar partículas virales dispersas en el citoplasma, son frecuentes los pequeños agregados de partículas, lo que es indicativo de su gran tendencia a la agregación. En las células de tejidos infectados, aunque las mitocondrias no sufren hipertrofia, si se detecta la presencia de mitocondrias fragmentadas que tienen una matriz inusualmente densa a los electrones (Jones *et al.*, 1980) y en mayor número que en las células de tejidos sanos debido a la propia infección. Aparecen vesiculaciones citoplasmáticas en las células de compañía y en las células parenquimáticas del floema, así como la hipertrofia de los cloroplastos (Ch) que aparecen como hinchados y presentan cuerpos osmiófilos en su interior (Fig. 1.10.a, b).

### **Encuadramiento taxonómico**

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) aprobó en el año 2000 la creación de la nueva familia *Flexiviridae*, para agrupar a los virus RNA flexuosos incluidos en los géneros *Allexivirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* y el nuevo género *Mandarivirus* junto con otros virus relacionados no asignados a ningún género (Adams *et al.*, 2004). Dentro de esta familia, el género *Potexvirus* engloba a virus filamentosos y flexibles de entre 470 y 580 nm de longitud y 13 nm de diámetro, con simetría helicoidal y genoma RNA de simple cadena (ssRNA) (Adams *et al.*, 2004).



**Figura 1.10:** Fotografías de secciones ultrafinas del mesófilo, obtenidas al ME de inclusiones en resina Spurr de hojas de tomate infectadas con PepMV. **a)** Las células del mesófilo presentan grandes masas de partículas virales o viroplasmas (*v*) en los que los viriones se disponen formando bandas en paralelo y los cloroplastos (*Ch*) aparecen hinchados y con cuerpos osmiofilos en su interior. Barra: 3,63  $\mu\text{m}$ ; **b)** Detalle de un cloroplasto localizado cercano al núcleo de la célula (*N*) y a un viroplasma Barra: 1,45  $\mu\text{m}$ ; **c)** Partículas flexuosas observadas en extractos vegetales infectados por tinción negativa con la sal sódica del ácido fosfotúngstico al 2%. Barra: 100 $\mu\text{m}$ ; (Fotografías realizadas por el Dr. V. Medina y por la Dra. C. Jordá).

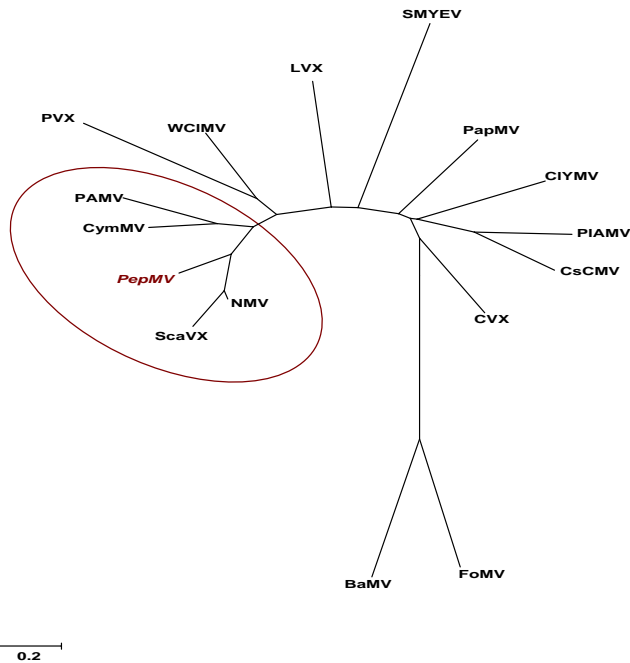
El PepMV es una de las especies virales incluidas en el género *Potexvirus* (Tabla 1.3). La partícula viral, presenta una cápside sin envoltura formada por entre 1000-1500 moléculas de una única especie de proteína de cubierta de 26.000 Da., que encierra el material genético viral formado por una molécula de RNA de cadena única (ssRNA) y sentido positivo, capaz de funcionar como un RNA mensajero (mRNA). Los viriones de PepMV están muy hidratados y poseen una estructura cuaternaria bastante relajada.

**Tabla 1.3:** Especies asignadas al género *Potexvirus* en el 7º ICTV report (Adams *et al.*, 2004)

<i>Especies en el género</i>		<b>Tentativa de especies</b>	
<i>Nombre</i>	<i>Acrónimo</i>	<b>Nombre</b>	<b>Acrónimo</b>
<i>Alternanthera mosaic virus</i>	AltMV	Artichoke curly dwarf virus	ACDV
<i>Asparagus virus 3</i>	AV-3	Barley virus B1	BarV-B1
<i>Bamboo mosaic virus</i>	BaMV	Boletus virus X	BolVX
<i>Cactus virus X</i>	CVX	Centrosema mosaic virus	CenMV
<i>Cassava common mosaic virus</i>	CsCMV	Dioscorea latent virus	DLV
<i>Cassava virus X</i>	CsVX	Lychnis symptomless virus	LycSLV
<i>Clover yellow mosaic virus</i>	CIYMV	Malva vein necrosis virus	MVNV
<i>Commelina virus X</i>	ComVX	Nandina mosaic virus	NaMV
<i>Cymbidium mosaic virus</i>	CymMV	Negro coffee mosaic virus	NeCMV
<i>Daphne virus X</i>	DVX	Parsley virus 5	PaV-5
<i>Foxtail mosaic virus</i>	FoMV	Parsnip virus 3	ParV-3
<i>Hosta virus X</i>	HVX	Parsnip virus 5	ParV-5
<i>Hydrangea ringspot virus</i>	HdRSV	Patchouli virus X	PatVX
<i>Lily virus X</i>	LVX	Rhododendron necrotic ringspot virus	RoNRSV
<i>Narcissus mosaic virus</i>	NMV	Rhubarb virus 1	RV-1
<i>Nerine virus X</i>	NVX	Smithiantha latent virus	SmiLV
<i>Papaya mosaic virus</i>	PapMV	Viola mottle virus	VmoV
<b><i>Pepino mosaic virus</i></b>	<b>PepMV</b>	Zygocactus symptomless virus	ZSLV
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	PIAMV		
<i>Plantago severe mottle virus</i>	PISMov		
<i>Plantain virus X</i>	PIVX		
<i>Potato aucuba mosaic virus</i>	PAMV		
<i>Potato virus X</i>	PVX		
<i>Scallion virus X</i>	ScaVX		
<i>Strawberry mild yellow edge virus</i>	SMYEV		
<i>Tamus red mosaic virus</i>	TRMV		
<i>Tulip virus X</i>	TVX		
<i>White clover mosaic virus</i>	WCIMV		



El PepMV carece de relación serológica con otros miembros del mismo género que afectan a Solanáceas como el PVX o el *Potato aucuba mosaic virus* (PAMV). Sin embargo, está relacionado serológicamente con el *Narcissus mosaic virus* (NMV), propiedad que fue utilizada para realizar los primeros diagnósticos serológicos (Jordá *et al.*, 2000a), o con el *Cactus virus X* (CVX) (Koenig *et al.*, 1989).

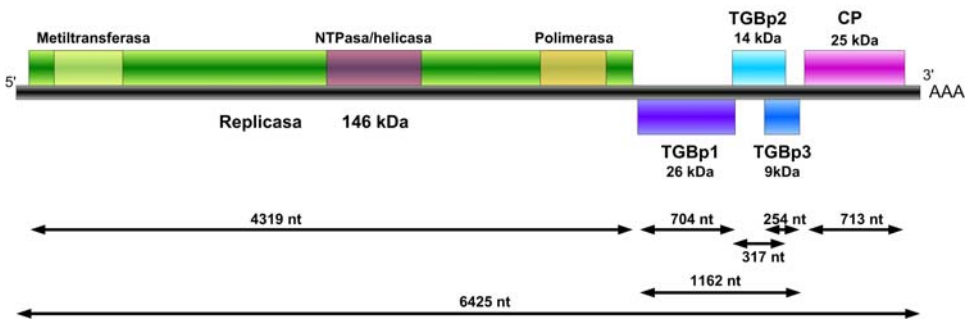


**Figura 1.11:** Árbol sin raíz de distancias génicas de las secuencias de aa completas de la CP de varios *Potexvirus* disponibles en la base de datos del GenBank [nº accesión: D00244 (PVX), U62963 (CymMV), AF308158 (CVX), D13747 (NMV), D13957 (PapMV), M62730 (FoMV), X16636 (WCIMV), Z21647 (PIAMV), S73580 (PAMV), NC001753 (CIYMV), NC007192 (LVX), D26017 (BaMV), U23414 (CsCMV), D12517 (SMYEV), AJ316085 (ScaVX) y AJ438767 (PepMV)]. Los alineamientos se han realizado con el programa CLUSTALW. El paquete MEGA versión 4 se utilizó en el análisis filogenético: en el cálculo de las distancias genéticas se empleó la matriz Dayhoff PAM y el árbol se construyó usando el algoritmo de Neighbor-joining con un bootstrap de 100 replicaciones. Se han rodeado en rojo las especies que presentan mayor identidad con el PepMV en esta zona del genoma.

Aunque las proteínas de cubierta (CP) de los *Potexvirus* exhiben una limitada reacción inmunológica cruzada, su relación determinada por comparación de sus secuencias aminoacídicas varía de 40 a 65% de identidad (Fig. 1.11). De hecho, solo hay 10 aminoácidos (aa) absolutamente conservados en una media de 230 residuos, en las proteínas de cubierta de los *Potexvirus* conocidos, un grado de diversidad remarcable para macromoléculas homologas funcionalmente (Adams *et al.*, 2004).

### Estructura y organización del genoma

El genoma completo de varios aislados del PepMV ha sido totalmente secuenciado (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillon *et al.*, 2002; Maroon-Lango *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2005; Pagan *et al.*, 2006; Ling, 2007; Hanssen *et al.*, 2008; Hasiów *et al.*, 2008a). Sus aproximadamente 6.500 nucleótidos (nt) están organizados en cinco pautas de lectura abierta (Open Reading Frames, ORF) o genes (Fig. 1.12).



**Figura 1.12:** Representación esquemática de la organización del genoma del PepMV.

La ORF1 (nt 87- 4406) es la de mayor tamaño (1.439 aa) y codifica la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp). Esta proteína de 164 kDa contiene tres dominios muy conservados que se localizan en otros *Potexvirus* y que están implicados en la replicación viral: el dominio metiltransferasa (aa 59 a 224) específico del supergrupo de virus “Sindbis-like” (Rozanov *et al.*, 1992), el

dominio NTPasa/helicasa (aa 708-934) que presenta los motivos NTP-binding GCGGSGKS y VVIFDD (Kadaré y Haenni, 1997), y el dominio de la RNA polimerasa RNA dependiente (aa 1217-1374) caracterizado por el motivo SGEPTFDANT-X22-GDD (Kamer y Argos, 1984). Además de estas zonas fuertemente conservadas, existe una región hipervariable localizada antes del dominio NTPasa/helicasa (aa 407-593) (Cotillon *et al.*, 2002).

El codon de parada de la primera ORF va seguido por una corta región intergénica (IR1) de 25 nt tras la que se localizan, parcialmente solapadas, las ORF 2, 3 y 4 que constituyen el triple bloque génico (Triple Gene Block, TGB) que presenta una organización similar a la de otros *Potexvirus* (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillon *et al.*, 2002). Esta zona del genoma está implicada en el movimiento del virus célula a célula y los productos que codifica son necesarios para la infectividad del virus en la planta hospedera, en particular la ORF 2 (nt 4432 – 5136), que codifica la primera proteína del TGB (TGBp1) de 234 aa (26 kDa) en la que esta presente el dominio NPTasa/helicasa. La TGBp1 pertenece a la superfamilia I de las RNA helicasas.

La ORF3 (nt 5117–5488) se solapa en los 19 nt iniciales con el extremo 3' de la ORF2 y se extiende 148 nt tras el codon de inicio de la ORF4. Esta zona del genoma codifica la segunda proteína del TGB (TGBp2) de 14 kDa. La ORF4 (nt 5340–5594) codifica la tercera proteína del TGB (TGBp3) de 84 aa y 9 kDa. La presencia de segmentos hidrófobos en las TGBp2 y TGBp3, sugieren su asociación con estructuras membranosas de las células del hospedero. La secuencia de aa de la TGBp3 del PepMV presenta un porcentaje de similitud con la misma región de otros *Potexvirus* de entre el 40.9 al 67.2% (Tabla 1.4) y resulta ser la proteína mas variable en los *Potexvirus* (Cotillon *et al.*, 2002).

Tras una segunda región intergénica (IR2) de 38 nt de longitud (nt 5595–5632) de alta variabilidad entre las distintas cepas, se localiza la quinta ORF (nt 5633–6346) que codifica la proteína de cubierta del virus (CP) de 238 aa (25 kDa) esencial para la infección de las plantas y que cuenta con un núcleo anfipático KFAAFDFFDGVT, que también se localiza en las CP de otros *Potexvirus* (Wong *et al.*, 1997) que podría ser el responsable de la unión de la CP al RNA viral mediante interacciones hidrofóbicas (Cotillon *et al.* 2002). Las ORF1 y ORF5 son las zonas mas conservadas del genoma del PepMV (Tabla 1.4), mientras que las ORF2 y 4 se presentan como las zonas menos conservadas

del mismo (Mumford y Metcalfe, 2001; Aguilar *et al.*, 2002; Cotillon *et al.*, 2002).

**Table 1.4.** Porcentajes de similitud entre las secuencias de aa de la replicasa, *TGBp1*, *TGBp2*, *TGBp3* y la proteína de cubierta (*CP*) del aislado francés descrito por Cotillon (número de accesoión AJ438767) y las homólogas de otros *Potexvirus*. Se han subrayado y marcado en rojo los porcentajes máximos de similitud obtenidos en cada una de las proteínas. El símbolo – indica que no existen secuencias disponibles con las que poder comparar. (Modificado de Cotillon *et al.*, 2002)

Potexvirus	Acrónimo	Replicasa	TGBp1	TGBp2	TGBp3	CP
<i>Bamboo mosaic virus</i>	BaMV	62,1	46,4	50,5	50	41,9
<i>Cactus virus X</i>	CVX	64,2	52,8	54,5	61,7	49,8
<i>Cassava common mosaic virus</i>	CsCMV	65,4	53,5	43,5	58,4	52
<i>Clover yellow mosaic virus</i>	CIYMV	65,5	55	46,4	57,9	56
<i>Cymbidium mosaic virus</i>	CymMV	71,9	57,1	<b>66,3</b>	59,5	74,7
<i>Foxtail mosaic virus</i>	FoMV	60,1	50	51,6	60	46,4
<i>Lily virus X</i>	LVX	-	53	48,1	-	54,2
<i>Narcissus mosaic virus</i>	NMV	<b>75,3</b>	54,6	56,2	60	<b>79,3</b>
<i>Papaya mosaic virus</i>	PapMV	65,8	51,5	49,1	52,3	51,2
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	PIAMV	65,2	50,5	50	57,3	51,5
<i>Potato aucuba mosaic virus</i>	PAMV	70,6	<b>57,8</b>	58,7	50	66
<i>Potato virus X</i>	PVX	64,5	54,4	53,7	<b>67,2</b>	55,7
<i>Scallion virus X</i>	ScaVX	<b>75,3</b>	51,6	56,5	62,5	77
<i>Strawberry mild yellow edge virus</i>	SMYEV	68,7	50,7	56,3	40,9	55,9
<i>White clover mosaic virus</i>	WCIMV	70,4	52,7	59,4	53,1	66,7

Las cinco zonas codificantes están flanqueadas por dos regiones que no se transcriben (UnTranslated Regions, UTR). En el extremo 5' del genoma se sitúa la 5'UTR, zona rica en adenina y citosina (A+C) de 86 nt de longitud y que precede a las 5 ORFs. Como ocurre en otros *Potexvirus*, la 5'UTR se inicia con el pentámero 5'GAAAA, que podría ser importante en la replicación del RNA o en la transcripción a proteína y además contiene varios motivos CAAA que permitirían la unión de los ribosomas (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillon *et al.*, 2002). En el extremo 3' del genoma se localiza la 3'UTR que consiste en 63 nt situados

a continuación de la quinta ORF y que separan a esta última zona codificante de la cola poliadenilada o Poly-(A) situada en el extremo 3'. En los extremos 5' de las ORF2 y ORF5 podrían localizarse las secuencias promotoras para la síntesis de los RNAs subgenómicos (sgRNA) del PepMV (Cotillon *et al.* 2002).

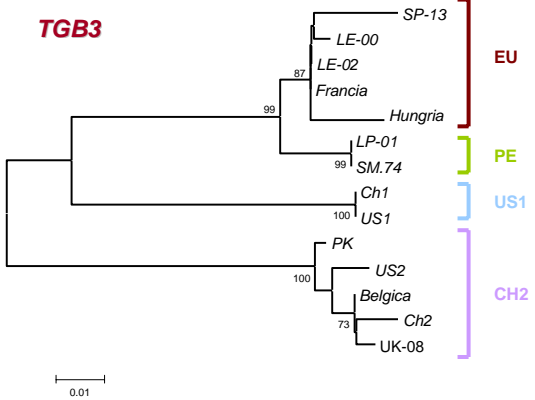
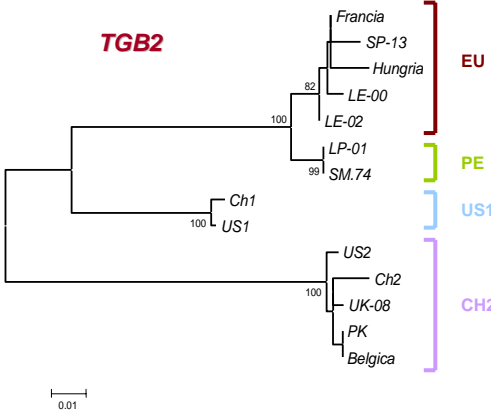
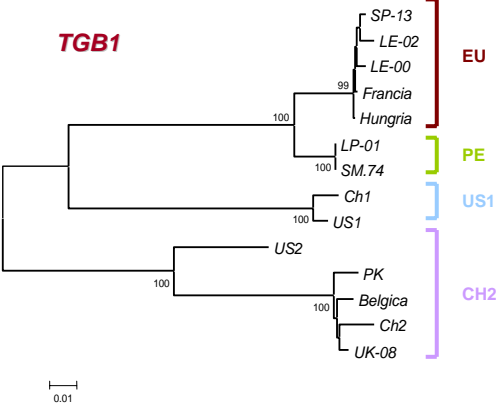
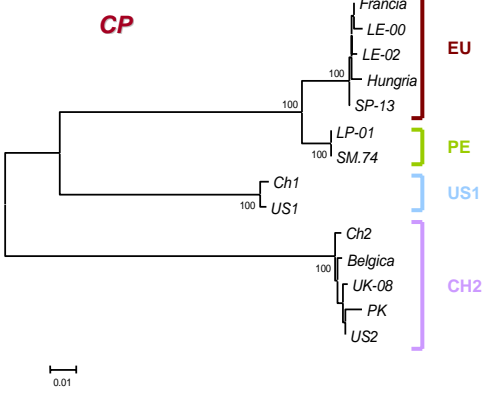
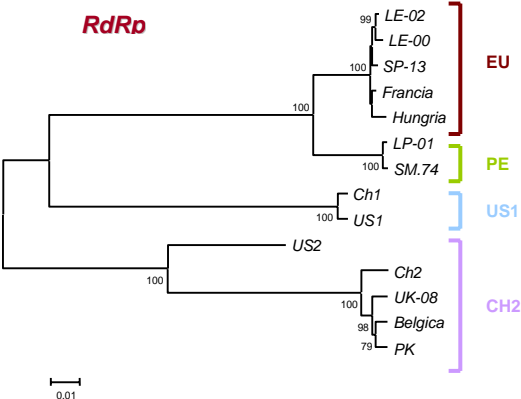
## Variabilidad molecular o Diversidad genética

El PepMV se caracteriza por tener un alto nivel de diversidad genética (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2009). El primer aislado descrito de PepMV se obtuvo de pepino en Perú y hoy está considerado como aislado tipo de la cepa Peruana (PE) del virus. Cuando el PepMV aparece en Europa en tomate, todos los aislados detectados eran molecularmente muy similares entre sí (99% de homología nucleotídica) y presentaban un comportamiento biológico muy semejante. Sin embargo, las diferencias en ambos aspectos con el aislado original peruano eran significativas. A nivel biológico el aislado PE se mostraba asintomático en las infecciones a tomate, mientras que los aislados de tomate mostraban síntomas muy diferentes, y además ambos tipos de aislados podían diferenciarse por la diferente reacción que provocaba su inoculación en *N. glutinosa* y *D. stramonium* (Verhoeven *et al.*, 2003). Por otro lado, entre aislados europeos y peruano la homología no superaba el 96-97%. Debido a estas diferencias fueron consideradas como dos cepas distintas del mismo virus (Mumford y Metcalfe, 2001; van der Vlugt *et al.*, 2002; Verhoeven *et al.*, 2003). Desde entonces, diferentes nomenclaturas se han utilizado para designar a las cepas de PepMV. Para referirse a los aislados similares al original descrito por Jones, términos como aislados tipo “pepino”, “peruano” o cepa “pepino-peruana” (PE) han sido utilizados indistintamente, mientras que para los aislados similares al detectado de tomate en Holanda se han empleado términos como aislados tipo “tomate”, “europeo” o cepa “tomate-europea” (EU) (Mumford y Metcalfe, 2001; van der Vlugt *et al.*, 2002; Verhoeven *et al.*, 2003; López *et al.*, 2005).

En el año 2005, se publica la completa caracterización de dos aislados de PepMV obtenidos en el año 2000 de tomate en Arizona y denominados US1 (nº accesión: AY509926) y US2 (nº accesión: AY509927). Los análisis filogenéticos realizados con ambos aislados “americanos” indicaban que se

trataba de dos aislados muy distintos a los hasta entonces conocidos (Maroon-Lango *et al.*, 2005). Entre sí, los aislados “*americanos*” mostraban una identidad nucleotídica de tan sólo el 86%, y del 79-82% con los aislados de la cepa EU, mientras que entre aislados de esta cepa EU la identidad rondaba el 99%, siendo TGBp1 y TGBp3, las proteínas que presentaban la mayor variabilidad entre las cepas. Basándose en los niveles de homología entre ellas, US1 y US2 fueron consideradas como dos nuevas cepas distintas de PepMV.

Dos años más tarde, se caracterizan completamente dos nuevas variantes denominadas CH1 (n° accesión: DQ000984) y CH2 (n° accesión: DQ000985), obtenidas en Estados Unidos de semilla de tomate procedente de Chile (Ling, 2007). Estas dos variantes se presentaban tanto en infecciones simples como mixtas en las semillas de tomate. Ambas mostraban la mayor identidad de secuencias nucleotídicas con los dos aislados “*americanos*”, 98.7% entre CH1 y US1 y 90.7% entre CH2 y US2. Al igual que ocurría con los aislados “*americanos*”, las mayores divergencias se presentaban entre los dos aislados “*chilenos*” (78% de identidad), mientras que con los aislados “*europesos*” la homología nucleotídica rondaba entre el 78-86%. Basándose en estos datos el aislado CH1 fue incluido dentro del grupo US1 mientras que el aislado CH2 se lo consideró como un aislado del grupo US2. Sin embargo, posteriores alineamientos entre las secuencias de CH2 y US2 en varias zonas del genoma muestran la existencia de un posible punto de recombinación en la secuencia de la ORF1 del US2. A partir del nt 2305, la secuencia del US2 es muy similar a la del CH2, sin embargo, entre los nt 2306 y 4742 la secuencia del US2 es casi idéntica a la del US1, mientras que desde el nt 4742 hasta la cola poly(A) las secuencias de US2 y CH2 vuelven a ser similares. Esto podría ser el resultado de un evento de recombinación o un artefacto durante el ensamblaje de la secuencia. Desgraciadamente ya no se dispone del material americano original para poder ratificarlo.



◀ **Figura 1.13:** Árboles filogenéticos de las secuencias aminoacídicas completas de las distintas regiones del genoma del PepMV (RdRp, CP, TGBp1, TGBp2 y TGBp3). Los alineamientos se han realizado con el programa CLUSTALW. El paquete MEGA versión 4 se utilizó en el análisis filogenético mediante el método de Neighbour-joining empleando el modelo de Kimura con dos parámetros. Los datos se sometieron a 1000 repeticiones. Se han utilizado las secuencias completas de los aislados de PepMV disponibles en la base de datos del NCBI [nº accesión: AJ606361 (LP-01), AM109896 (SM.74), AJ606359 (LE-00), AJ606360 (LE-02), AF484251 (Sp-13), AM491606 (Hungría), DQ000984 (CH1), AY509926 (US1), DQ000985 (CH2), AY509927 (US2), EF408821 (PK), EF599605 (Bélgica), FJ212288 (UK-08) y AJ438767 (Francia)]. Se han señalado las cuatro cepas en que se agrupan los 5 genotipos, en cada una de las zonas del genoma viral.

A finales del 2005 en Polonia se caracteriza el aislado PK (nº accesión: EF408821), que mostraba un comportamiento biológico diferente al observado hasta ese momento en los aislados EU (Pospieszny y Borodynko, 2006). En los análisis filogenéticos con la secuencia completa de este aislado se observa que es un aislado muy semejante al aislado CH2 con el que comparte una identidad nucleotídica de entre el 98-99% según la región analizada del genoma. El hallazgo en Europa de este aislado de la cepa CH2 identificada por vez primera en el continente americano es indicativo de la existencia de una fuente infectiva u origen común para ambos (Hasiów *et al.*, 2008a).

Los análisis filogenéticos realizados con las secuencias completas disponibles en la base de datos del NCBI muestran la tendencia a formarse 4 clades que se corresponden con las 4 cepas del virus (Fig. 1.13) en las que se agrupan los 5 genotipos descritos hasta el momento: Peruana (PE), Europea (EU), US1 (CH1 y US1 se consideran el mismo genotipo), y CH2 (van der Vlugt, 2009).

## **Estructura y composición de las poblaciones del virus**

La zona originaria del PepMV se localiza en Sudamérica, donde el virus parece que se encuentra distribuido ampliamente en las especies salvajes del género *Lycopersicon* en Perú (Soler *et al.*, 2002), lo que sugiere que sea este país el centro de origen del virus. Además, el hecho de que la mayoría de estas



especies no muestren síntomas de la enfermedad podría sugerir un largo periodo de convivencia con el virus.

Desde la detección del PepMV en España se han realizado diferentes estudios detallados para la caracterización genética de las poblaciones españolas del virus (Martínez-Culebras *et al.*, 2002; Pagán *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2009) que han demostrado que el virus ha entrado en varias ocasiones en el país. Hasta el año 2004 la mayoría de las infecciones, más del 80%, estaban ocasionadas por infecciones simples de aislados de la cepa “EU”. Hasta el año 2002 el 2,8% de la población viral correspondía a aislados de la cepa “PE” y curiosamente el 1.9% de la población pertenecía a la cepa “CH2” no descrita hasta el año 2005 en Estados Unidos. El 14% de la población estaba compuesto por tipos mixtos, de los cuales el 80% eran infecciones mixtas “EU+PE” y el 20% “EU+CH2”. En el año 2004 en la península aparecen aislados muy similares al “CH2” en la región del genoma correspondiente a la CP, así como varios aislados que solo en el TGB se agrupaban en la cepa “PE”, cepa ya presente en las Islas Canarias desde el año 2000. Además se detectan varios aislados recombinantes entre los tipos “EU” y “CH2”, que habrían surgido por intercambio de fragmentos del TGB y de la CP entre ambos genotipos. Recientemente, el genotipo “US1” ha sido detectado en infecciones simples y mixtas en cultivos de tomate de las Islas Canarias (Alfaro-Fernández *et al.*, 2008). Desde el año 2006, el porcentaje de infecciones mixtas “EU+CH2” y simples de aislados tipo “CH2” ha ido variando en la población de PepMV de la Península. En el año 2008 ambos tipos de infecciones llegaron a igualarse y a representar el 96% de la población mientras que el restante 4% lo constituían infecciones simples de aislados del tipo “EU” (Gómez *et al.*, 2009).

En 2008 se conoce la composición de la población belga del PepMV (Hanssen *et al.*, 2008), que en el año 2006 pertenecía mayoritariamente al genotipo “CH2” y aunque también se detectó la presencia en los invernaderos del tipo “EU”, se observó que los aislados de la cepa “CH2” presentaban una ventaja biológica frente al tipo “EU”, ya que se dispersaban más rápidamente en los invernaderos que los aislados “EU”. Al igual que en España, en este país también se detectan tipos recombinantes entre “EU” y “CH2” lo suficientemente estables como para transmitirse de una planta a otra. En este caso, se trata de recombinaciones unidireccionales, localizadas en la zona de la RdRp, que

presentan el extremo 5' similar al tipo "CH2" mientras que el extremo 3' tiene una mayor homología con el tipo "EU". No se encontró ninguna asociación entre genotipo y variabilidad sintomatológica del virus, a excepción de que la coinfección de las plantas con dos genotipos parecía generar una mayor severidad en los síntomas observados.

En 2008 también se conoce la composición genética de la población de PepMV de Estados Unidos (Ling *et al.*, 2008). El estudio americano se realiza con muestras procedentes de los cuatro Estados que son los mayores productores de tomate en Estados Unidos (Arizona, California, Colorado y Tejas). Sorprendentemente, el genotipo "EU" fue identificado en todas las muestras y resultó ser el predominante en el país, mientras que los genotipos "americanos" sólo se detectaron en infecciones mixtas en dos Estados, Arizona y Colorado, e infecciones mixtas de los genotipos "EU" y "CH2" sólo se detectaron en Tejas.

Las cepas "EU" y "CH2" muestran una mayor virulencia y adaptación al cultivo de tomate, motivo por el cual se habrían extendido rápidamente por las áreas productoras de tomate. En cambio se desconoce hasta que punto la aparición de infecciones mixtas y de recombinantes hayan podido contribuir a la severidad de la sintomatología o a la extensión de la enfermedad.

Dada la ausencia de síntomas, la introducción inicial del PepMV en las áreas productoras de tomate, pudo haber pasado inadvertida durante mucho tiempo. Conocer la composición genética de las poblaciones del PepMV en la zona de origen del virus, supondría un importante avance hacia el esclarecimiento de importantes cuestiones como la identidad de las fuentes de inóculo originales de las distintas cepas virales, de los reservorios y de los mecanismos concretos que permiten la evolución génica del virus y su adaptación a nuevos hospedantes, aspectos que continúan siendo motivo de especulación y que permitirían el planteamiento de medidas preventivas frente a futuras epidemias con nuevas cepas del PepMV.

## **DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD**

El diagnóstico y detección del virus tanto en la planta como en semillas, se basa en la realización de diferentes pruebas serológicas y moleculares que parten directamente del extracto vegetal de la muestra o tras un proceso de extracción del RNA viral de las mismas, con alguno de los kits de extracción disponibles en el mercado.

### **Detección serológica**

En cuanto a la detección serológica de PepMV la técnica DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) es la que utiliza rutinariamente en los laboratorios por su rapidez y posibilidad de automatización en el procesado de un elevado número de muestras. A principios del año 2000, no se disponía de antisuero comercial específico para este virus, por lo que las primeras identificaciones del PepMV en España se realizan utilizando el antisuero del *Narcissus mosaic virus* (NMV), virus con el que el PepMV guarda relación serológica como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, el reconocimiento del antígeno viral se producía a partir de una determinada concentración de partículas virales en la muestra, escapando de su detección en los análisis serológicos un gran número de muestras positivas que obligaba a la comprobación de los resultados negativos mediante el empleo de otras técnicas como la Microscopía electrónica (Jordá *et al.*, 2000a). Cuando en alguna de las preparaciones se observaba la presencia de partículas de tipo flexuoso similares a las de los *Potexvirus*, se pasaba al análisis serológico de la muestra con sueros específicos de virus del mismo género que también infectan al tomate como el **PVX** o el **PAMV** y que podrían confundir en la determinación.

En la actualidad existen en el mercado diferentes antisueros policlonales específicos para el análisis de este virus. La técnica serológica ELISA-DAS se ha convertido en la mejor técnica de diagnóstico rápido, económico y fiable, sobre todo cuando se trata de analizar un elevado número de muestras, como en el caso de certificaciones de semillas o en muestreos de campo y es la técnica

recomendada por la Internacional Seed Health Initiative for Vegetables (ISHI\_Veg) en los análisis de certificación de semillas para garantizar su sanidad ([http://www.worldseed.org/en-us/international\\_seed/ishi\\_vegetable.html](http://www.worldseed.org/en-us/international_seed/ishi_vegetable.html)).

Otra técnica serológica también disponible para el análisis de muestras vegetales es la inmunopresión-ELISA, que consiste en la realización de una impresión de la muestra sobre una membrana de nitrocelulosa seguida de un análisis serológico con anticuerpos comerciales específicos del virus. Esta técnica tiene las ventajas de que no es necesaria la preparación de extractos, ya que el material fresco se inmoviliza directamente en las membranas de nitrocelulosa, permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras, y que además, se pueden almacenar hasta su revelado. Sin embargo, en el caso del PepMV es una técnica muy poco empleada, recomendándose su uso sólo en plantas sintomáticas y como confirmación del diagnóstico, ya que pueden aparecer interferencias con el color que presentan las impresiones de algunos tipos de material vegetal.

### **Técnicas moleculares**

Los procedimientos moleculares que se utilizan para la identificación del PepMV en muestras vegetales y en estudios de variabilidad molecular son muy numerosos, aunque los más utilizados están basados en la transcripción reversa y posterior amplificación de un fragmento del genoma utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR). Es por ello que vamos a citar sólo algunos de los más novedosos y representativos.

Un problema que presenta cualquier técnica de RT-PCR está relacionado con la presencia de compuestos inhibidores de la polimerasa en el material vegetal, por lo que es necesaria la extracción previa del RNA de las muestras para su posterior análisis. Además, cabe señalar el hecho de que estas técnicas pueden amplificar secuencias de RNA procedentes de partículas virales no infectivas o degradadas.

- **RT-PCR y análisis por RFLPs (Martínez-Culebras *et al.*, 2002)**

Este método es capaz de detectar e identificar el tipo de aislado de PepMV en los extractos de RNA total obtenidos de muestras vegetales. Consiste en la

amplificación de un fragmento de 750 pb de la región de la RdRp mediante el uso de una RT-PCR en dos pasos con una pareja de cebadores específicos P1 y P2 de esta zona del genoma, y posterior digestión del producto obtenido con el enzima de restricción *Sau3A*. De esta forma se obtienen tres patrones de restricción que corresponden a cada uno de los tipos, P1 o tipo “*EU*”; P2 o tipo “*PE*”; y tipo P3 o “*CH2*”. Este método permite la detección de infecciones mixtas en las muestras, pero no la de las nuevas razas de PepMV aparecidas con posterioridad a su publicación, por lo que ha quedado en pocos años obsoleto. Además, al amplificar solo un 12% de la secuencia del genoma completo del virus no se detectarían las variaciones de secuencia producidas en la mayor parte del mismo, por lo que carece de utilidad en estudios de variabilidad genética de las poblaciones.

▪ **Multiplex one-step RT-PCR (Alfaro-Fernández *et al.*, 2009a)**

Recientemente se ha desarrollado y patentado en el Laboratorio de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM) un método molecular que permite la detección simultánea e identificación de tres grupos de genotipos de PepMV: *EU-PE*, *CH1-US1* y *CH2-US2*. La reacción de RT-PCR se realiza en un solo paso utilizándose una mezcla de 6 cebadores: 3 cebadores directos específicos de cada uno de los grupos en una porción del gen de la RdRp del virus, y un cebador reverso común para los tres grupos, mas una pareja de cebadores que servirían como un control interno. Las amplificaciones resultarían en 3 productos de distinta longitud característicos de cada uno de los grupos. Para identificar el genotipo concreto del aislado dentro de los grupos *EU-PE* y *CH2-US2*, los amplicones anteriormente obtenidos son digeridos con el enzima de restricción *SacI*. Este método presenta una mayor sensibilidad para detectar la cepa *CH1-US1* en muestras de campo que otros métodos publicados anteriormente y además reduce considerablemente el proceso de análisis ya que con una sola amplificación se pueden discriminar 3 grupos de genotipos, requiriendo únicamente la digestión con una única enzima para llegar a conocer el genotipo del aislado. Su límite de detección es igual al de una RT-PCR normal y 3.25 veces mayor que el del ELISA o la hibridación molecular. Además, la incorporación de un control interno evita la identificación de falsos negativos. Sin embargo, debido a la alta homología entre los genotipos *US1* y *CH1* (98.7%) no es posible la diferenciación entre ambos mediante este método.

▪ **Real time- RT-PCR**

En los últimos años han visto la luz varios métodos basados en el empleo de la RT-PCR “en tiempo real” (Ling *et al.*, 2007; Delic *et al.*, 2008; Hasiów *et al.*, 2008b, Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2009). La PCR en tiempo real o real-time PCR es una técnica basada en la PCR convencional que permite la cuantificación del DNA amplificado, al ser proporcional a la cantidad de fluorescencia que se emite en cada ciclo de PCR. Para la detección de PepMV se han desarrollado dos variantes de la real-time PCR:

- ✓ Sistema Taqman<sup>™</sup> (Ling *et al.*, 2007): Se emplea una sonda molecular específica marcada con un fluorocromo en su extremo 5', y con otro fluorocromo “quencher” (inhibidor de la fluorescencia) en su extremo 3', que hibrida con todos los genotipos de PepMV en la zona del TGB2 y dos parejas de cebadores específicos que amplifican esta zona del genoma. Previamente se realiza la inmunocaptura de los viriones con un antisuero específico de PepMV, de forma que estos quedan absorbidos en un tubo en el que se lleva a cabo todo el proceso.
- ✓ Sistema SYBR Green (Hasiów *et al.*, 2008b): Se basa en el empleo de fluorocromos no específicos. Únicamente se requiere el uso de cebadores específicos que amplifican una zona de la CP conservada en todos los genotipos. La emisión de fluorescencia se produce cuando dicho fluorocromo SYBR Green se acopla en la secuencia de DNA.

Esta metodología presenta varias ventajas como son la gran rapidez, pues se obtienen los resultados al mismo tiempo que ocurre la amplificación sin necesidad de electroforesis; se elimina el procesamiento posterior de los productos de PCR necesario en la PCR convencional con lo que se reducen las contaminaciones y se eliminan fuentes potenciales de error. Además, bajo condiciones óptimas es la técnica de mayor sensibilidad al ser capaz de detectar menos de 100 fg de RNA viral en planta infectada, es rápida y fiable. Por todas estas ventajas puede ser utilizada como una excelente técnica de diagnóstico, así como para la detección y confirmación de PepMV en semilla. Su mayor inconveniente es el elevado coste del equipo necesario.

## **MEDIDAS DE CONTROL DEL PepMV**

A pesar de los esfuerzos realizados en los países afectados, el PepMV es un virus muy difícil de erradicar totalmente en cultivos semi-protegidos o al aire libre, especialmente cuando las plantas son asintomáticas o presentan síntomas tan ligeros que pasan desapercibidos y si además la flora arvense asintomática actúa como reservorio de la enfermedad entre cultivos. Los programas de erradicación en los principales países productores como España y Holanda tendrían un elevadísimo coste y sin garantías de éxito. El virus continúa produciendo epidemias anuales y todos los años se conocen nuevas detecciones en países en los que todavía no se había detectado el problema. Para un control eficaz del PepMV, deben plantearse medidas encaminadas no sólo a reducir el inóculo inicial, sino también a evitar el establecimiento y la dispersión del patógeno, así como a disminuir la susceptibilidad de los hospedantes a la infección.

### **Medidas Preventivas**

La mayoría de estrategias de control se han dirigido hacia la prevención de la infección, a evitar la entrada y el establecimiento de la virosis en una nueva zona. La Comisión Europea autorizó en el año 2003 a los países miembros a adoptar medidas temporales para evitar la introducción del PepMV con semilla y plántula procedente de terceros países (Comisión Europea, 28 Enero 2003, DOCE 29/Enero/2003). Se estableció que la semilla debía haberse producido en una zona libre de PepMV, en un semillero donde no se hubieran observado los síntomas o donde las plantas hubieran sido analizadas por un organismo oficial autorizado. Como procedimiento estándar, la extracción de la semilla debía realizarse mediante un tratamiento ácido o equivalente. Así mismo, se estableció que las plantas destinadas a plantación y originarias de países terceros debían proceder de zonas libres de PepMV, o donde no se hubieran detectado síntomas del virus o donde se hubieran adoptado con éxito medidas para la erradicación del mismo. Un año más tarde, en la Decisión de la Comisión Europea

2004/200/EC, se eliminaron los controles establecidos para el movimiento de las plántulas debido a que en ese estadio, no muestran síntomas y por tanto las plántulas infectadas no podrían ser identificadas visualmente en los viveros (Anónimo, 2005). Además, el número de análisis necesarios para certificar la sanidad de las plántulas en los viveros sería inabordable y la experiencia holandesa al respecto raramente había dado resultados positivos (Anónimo, 2005). Sin embargo, no se introdujo ninguna medida relacionada con la erradicación del virus en los lugares de producción al suponerse que con el uso de semilla y plántula sanas, se estaba asegurando que las zonas de producción se mantuvieran libres del virus. En esta decisión tampoco se impusieron restricciones al movimiento internacional de fruta al estimarse que el riesgo de infección que supone es bajo y puesto que implicaría costosas e innumerables analíticas. De esta forma, en la actualidad fruta infectada puede entrar o moverse libremente en el territorio de la UE, y de hecho frutos infectados con PepMV continúan siendo interceptados en los puntos de control aduaneros (Anónimo, 2005). Sólo en algunos países como el Reino Unido y Holanda los productores han adoptado medidas preventivas en sus explotaciones, como la de prohibir la introducción de tomates en las instalaciones. La fruta que llega a estos países para su venta, se empaqueta en instalaciones distantes de las zonas de producción o en las mismas zonas de producción solo si se han tomado medidas que eviten la contaminación cruzada (Anónimo, 2005).

Las medidas adoptadas y vigentes en la UE para prevenir el movimiento o entrada del virus desde países terceros en estos momentos, solo se aplicarían a la semilla de tomate, pues el virus se considera como organismo de cuarentena en este estadio y por tanto, la semilla debe ser inspeccionada y garantizada su sanidad. En caso de que exista algún riesgo de contaminación tanto en las variedades como en los patrones utilizados en el injerto, se pueden realizar tratamientos desinfectantes a la semilla a base de calor seco durante 4 días a 70°C (Fletcher, 2000).

El uso de variedades resistentes o tolerantes al virus es una medida preventiva de carácter agronómico que se ha adoptado con éxito en otras enfermedades virales. En el caso del PepMV, se han observado diferencias en la intensidad de los síntomas y en la magnitud de las infecciones de unas variedades a otras, pero en general todas las variedades cultivadas en la actualidad presentan



en mayor o menor medida susceptibilidad a la enfermedad (Fletcher, 2000; Ling y Scott, 2007), aunque probablemente, las condiciones ambientales del periodo de cultivo de dichas variedades pueden haber influido en la manifestación o no de síntomas en las plantas.

No hay mucha información publicada sobre la existencia de fuentes de resistencia a PepMV. Se sabe de la existencia de resistencia parcial frente a aislados españoles, en dos accesiones de *S. peruvianum* y varias accesiones de *S. chilense* susceptibles a infecciones mixtas “CH1+CH2” (Pico *et al.*, 2002; Soler-Aleixandre *et al.*, 2005a; Ling y Scott, 2007) y recientemente, se han identificado tres fuentes de resistencia al PepMV en *S. habrochaites*. En particular, la accesión LA-1731-sib de esta especie resulta tener el mayor nivel de resistencia a la infección tanto con aislados de la cepa “EU” como con aislados mixtos “CH1+CH2”. Los niveles de acumulación viral detectados en la progenie de esta accesión varían mucho entre plantas aparentemente asintomáticas por lo que la resistencia a la replicación del PepMV podría estar controlada por otro u otros genes aparte de los implicados en la supresión de la expresión de los síntomas (Ling y Scott, 2007).

## Control de la dispersión

En las zonas en las que el PepMV se ha convertido en un virus endémico, resulta necesaria la aplicación de medidas que permitan a los agricultores la convivencia con el patógeno y que en último término, debido a la extremada capacidad de transmisión mecánica del virus, han supuesto la transformación de los sistemas de manejo del cultivo y la adopción de una serie de medidas higiénicas en los lugares de producción que pasamos a detallar:

- ✓ Los operarios deben lavarse las manos en una solución de agua jabonosa caliente y mojarse los zapatos en una solución desinfectante antes de entrar en el invernadero (Fletcher, 2000), siendo imprescindible el uso de protecciones desechables en cabeza, cuerpo, manos y pies al haberse detectado el virus en la ropa de los operarios, 14 días después de haber entrado en contacto con las plantas infectadas (Lacasa y Jordá, 2002).
- ✓ Adopción de una estricta disciplina de trabajo en la parcela. Si alguna planta pudiera estar contaminada de forma asintomática, conviene realizar todas las

operaciones de cultivo habituales siempre en la misma dirección, en el mismo sentido y en el mismo orden, dejando la zona sospechosa para el final de la jornada. En caso de confirmarse la infección de una única planta adulta en el invernadero, se procederá a marcar la zona para evitar el acceso de los operarios a dicha planta y las plantas próximas al foco contaminado deberán observarse para actuar de igual forma al detectar una nueva infección. La planta infectada y las de alrededor que estén en contacto con ella se arrancarán y se sacarán del invernadero en bolsas de plástico, de manera que no rocen con las vecinas, para su incineración. A continuación los operarios se cambiarán de ropa y guantes antes de continuar con otras labores en el invernadero y se designará a un único operario para que trabaje en la zona infectada. Este operario procederá a realizar las labores en sentido contrario del que se venía realizando en el invernadero, dejando las plantas próximas a la infectada para manipularlas en último lugar. De esta forma se consigue frenar la diseminación de la enfermedad durante las labores de entutorado y desbrotado (Lacasa *et al.*, 2001). En caso de detectarse más de una planta infectada, se deberán eliminar todas las infectadas y al menos 10 plantas sanas alrededor de cada una de las infectadas. Si no se hubieran tomado las medidas higiénicas antes citadas, se estima que se deberán arrancar al menos 20 plantas a partir de la afectada en el sentido que se recorre la línea durante las manipulaciones, optándose por la eliminación de toda la línea afectada y de las dos líneas vecinas en el caso de que el número de plantas afectadas sea considerable (Fletcher, 2000). En los semilleros las medidas de higiene y prevención descritas deberán extremarse y en caso de detectarse la presencia de una planta contaminada en un vivero, todas las plantas en contacto con la planta infectada y una segunda línea de plantas alrededor deberán ser eliminadas (Fletcher, 2000).

- ✓ Eliminación de los posibles reservorios naturales del virus en el interior del invernadero: frutos caídos al suelo, restos de cultivos anteriores y control de la flora arvense.
- ✓ Control de la dispersión y presencia en substratos y soluciones hidropónicas del hongo *Olpidium virulentus* mediante tratamientos desinfectantes de dichas soluciones de riego con el surfactante agral (Tomlinson y Thomas,

1986), tratamientos con luz ultravioleta (Campbell, 1996) o a temperaturas superiores a los 70°C para lograr matar las esporas de resistencia del hongo.

- ✓ Utilización de sustancias inhibidoras o destructoras de las partículas virales para mojar las herramientas, y los guantes durante la manipulación de las plantas (Fletcher, 2000; Lacasa *et al.*, 2001). Está demostrado que la inmersión de las manos cubiertas con guantes en un desinfectante tras manipular una planta contaminada evita la contaminación de las plantas que se trabajan a continuación, lo que no sucede cuando se pulveriza la planta con el mismo producto antes de manipularla (Lacasa *et al.*, 2001). Al finalizar las tareas en plantaciones infectadas, no se debe acceder a plantaciones sanas con la misma ropa y herramientas, si previamente no han sido desinfectadas. Las visitas de personal no autorizado al invernadero deben restringirse al máximo.
- ✓ Desinfección de sustratos de cultivo: Cuando el cultivo se realiza en el suelo, es muy importante arrancar las raíces de las plantas infectadas, para minimizar la presencia del inóculo viral en el suelo. La biosolarización, o cierre de los invernaderos durante un cierto tiempo en verano con objeto de elevar la temperatura en el interior del recinto, puede ser una buena medida para eliminar las partículas del virus (O'Neill *et al.*, 2003) mientras que la esterilización del suelo con vapor se recomienda en países como Reino Unido (Anónimo, 2005). En caso de cultivo en sustrato artificial, se recomienda evitar el contacto del sustrato infectado con el suelo del invernadero y la destrucción de los sacos o mangas infectadas.
- ✓ En los invernaderos donde se han detectado plantas enfermas tras la eliminación de los restos del cultivo anterior, y al menos 3 semanas antes de la plantación, todas las estructuras del invernadero, herramientas y pasillos, deberán lavarse con agua y a continuación tratarse con soluciones desinfectantes. Los plásticos de cubierta acolchado del suelo, los sacos o mangas de lana de roca u otros sustratos artificiales, así como los tutores, anillas, tirantes, goteros e hilos deberán ser reemplazados o desinfectados. Los sistemas hidropónicos deben ser vaciados y lavados, mientras que el agua deberá someterse a un tratamiento a alta temperatura (Fletcher, 2000). La desinfección debe extenderse a las zonas de clasificación, embalaje, comedores y vestuarios de los trabajadores y a todo el material empleado

como son cajas, embalajes, carritos, herramientas y ropa de los operarios. Han resultado efectivos los tratamientos durante 1 hora con productos a base de: glutaraldehído (1% Horticide®), soluciones de peróxido de hidrógeno y ácido peracético (0.8% Jet 5®), ácido benzoico (4% Menno Florades®), soluciones de diclorofenol e hidróxido sódico (0.125% Panacide M®), hipoclorito sódico al 0.01%, fosfato trisódico al 10% o compuestos con ácidos orgánicos (1% Virkon S®). Este último producto junto con el glutaraldehído (4% Unifect G®) son los que resultaron mas efectivos tras periodos de contacto con el virus de menos de 30 minutos (O'Neill *et al.*, 2003). Otras sustancias también empleadas como eficaces desinfectantes son el alquil-diazapentano y alquil-triazaheptano (Tego 51), la leche descremada líquida o en polvo con un 3.5% ó 35% de proteína respectivamente, así como los lavados de las estructuras con agua caliente a 50°C durante sólo 3 s y a alta presión (1300 psi) o de 3 minutos con agua a 60°C (O'Neill *et al.*, 2003).

- ✓ Se aconseja el uso de planta sana y acreditada por el correspondiente pasaporte fitosanitario, ya que las plántulas infectadas actúan como foco primario de dispersión desde el mismo momento del trasplante. Al recibir las plántulas del semillero, éstas se deberían mantener en las mismas bandejas el máximo tiempo posible y alejadas del invernadero en que se vayan a plantar, para poder eliminar todo el lote en caso de detectarse la infección (Fletcher, 2000).

Todas estas medidas higiénicas, aplicadas de forma rigurosa y disciplinada han sido fundamentales para que en Alemania, Holanda y Reino Unido se haya logrado reducir la incidencia de la virosis en los últimos años, disminuyendo el número de explotaciones afectadas y el de plantas infectadas en los invernaderos contaminados (Lacasa y Jordá, 2002).

### **Control biológico de la enfermedad**

En Holanda está muy extendida la infección precoz intencionada de las plántulas con cepas avirulentas del virus con objeto de protegerlas frente a las infecciones tardías que se suponen más dañinas o con cepas virulentas del virus (Spence *et al.*, 2006). Esta práctica está basada en el principio de la preinmunización o protección cruzada que consiste en la inoculación de las

plantas con aislados virales poco agresivos encontrados en la naturaleza, u obtenidos por mutagénesis, que producen infecciones sistémicas tempranas que inhiben la posterior replicación de cepas virales más agresivas o la retrasan (Dodds, 1982; Matthews, 1991). Esta práctica ha sido empleada con éxito variable con el *Tobacco mosaic virus* (TMV) y el *Cucumber mosaic virus* (CMV) en tomate (Cassells y Herrick, 1977; Dodds, 1982), *Papaya ring spot virus* (PRSV) en papaya (Yeh *et al.*, 1988), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en calabaza, melón o pepino (Cho *et al.*, 1992; Perring *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1991). Sin embargo, en distintas ocasiones se ha citado la pérdida de la protección cruzada, debido en parte a un aumento en la presión de la enfermedad (Lecoq *et al.*, 1991; Walkey *et al.*, 1992) que podría explicar los resultados tan poco prometedores que está teniendo la aplicación de esta técnica en el caso del PepMV en Holanda (comunicación personal del Dr. van der Vlugt).

En Alemania, el control biológico de la enfermedad se ha encaminado hacia la protección de las plantas mediante la pre-infección con hongos endofíticos antagonistas. Los resultados parecían ser prometedores pues infecciones previas de las plantas cultivadas en hidroponía con *Phytium aphanidermatum* (Edson) Fitzp, retrasaban significativamente tanto la infección de las plantas como la dispersión del virus, ya que las raíces no llegaban a infectarse hasta 8 semanas tras la pre-infección y no se veían afectadas ni la producción ni la calidad de la cosecha (Schwarz *et al.*, 2009). Con estos resultados previos, se evaluó la respuesta de *Piriformospora indica*, *Phytium oligandrum* y *P. aphanidermatum*, especies ya citadas como promotoras del crecimiento, mejoradoras de la tolerancia al stress, con actividad antifúngica y/o eficaces agentes de control biológico en otras enfermedades. Sin embargo, las 3 especies favorecen la dispersión del virus, la concentración viral en hojas es mayor al tratarlas con *P. indica* ya a los 12 días del tratamiento. Los tratamientos con *Pythium* son totalmente ineficaces pues durante los primeros dos meses se mantiene la concentración del virus en las plantas al mismo nivel que en plantas solo infectadas con el virus, para posteriormente aumentar en los lotes pre-infectados con el hongo (Fakhro *et al.*, 2009).

## ***IMPACTO ECONÓMICO DE LA ENFERMEDAD***

En la actualidad la virosis está presente en los principales países productores de tomate, que es por el momento el cultivo hortícola con más riesgo de infección por el PepMV seguido de la patata. El daño más importante que supone el virus para el cultivo de tomate es el que se produce en los frutos (Spence *et al.*, 2006). La maduración irregular junto con la aparición de jaspeados en la superficie del fruto supone la degradación y devaluación de la fruta en el mercado. La reducción en la calidad del fruto puede ocasionar pérdidas económicas de diferente cuantía en función de diferencias en el precio y en el sistema de mercado. En Holanda, en los muestreos anuales para la detección del virus, generalmente se encuentran plantas infectadas con PepMV pero con síntomas muy suaves de la enfermedad. En 2001, se evaluaron las pérdidas ocasionadas por el virus sólo o en combinación con *Verticillium* en 6 variedades de tomate. La calidad de la fruta se expresó como fracción para exportación (alta calidad) y fracción para mercado interior (baja calidad). En ningún caso el volumen de fruta recolectado se vió afectado por lo que se estima que en Holanda el efecto en la producción y comercialización es mínimo, siempre y cuando las condiciones del cultivo sean óptimas (de Buck y Stijger, 2002). Esta misma situación se produce en Irlanda y Alemania (EPPO, 2003c; Pfeilstetter, 2002 y 2003), aunque en estos países no se han realizado ningún experimento con validez estadística suficiente como para determinar si se producen pérdidas reales significativas en el cultivo. En Canadá, a pesar de que el impacto económico no ha sido documentado todavía, se cree que las pérdidas ocasionadas en el cultivo son del orden del 5 al 15% (Anónimo, 2005). Sin embargo en Reino Unido, las pérdidas estimadas pueden superar el 15% de la producción. A pesar de no disminuir la producción mensual total de fruta, si se produce una reducción significativa en la calidad del fruto recolectado en plantas infectadas. Del volumen total recolectado durante 6 meses en invernaderos que habían sido infectados con el virus a las 3 semanas de la emergencia de las plántulas, el 32.2% de la fruta pasó de 1ª Clase a la 2ª Clase por presentar síntomas de infección viral. En similares condiciones, pero en invernaderos en los que la

infección se había producido en plantas de 6 meses de edad, el 43.4% de la fruta recolectada pasó de 1ª a 2ª Clase por el mismo motivo. Sólo el 55% de la fruta recolectada fue clasificada como 1ª Clase en invernaderos infectados frente al 88.7% obtenido en invernaderos sanos durante el mismo periodo (Spence *et al.*, 2006). En el mercado británico no hay lugar para la fruta de 2ª clase, solo es aprovechable la fruta de primera clase, y por tanto la reducción en calidad puede representar la pérdida total del cultivo (Anónimo, 2005). Esta situación no se repite en otros países productores donde la fruta de peor calidad puede ser comercializada aunque con un menor precio. Si el tomate pasa de primera a segunda clase, un agricultor holandés puede percibir aproximadamente un 6% menos en la venta del producto, de manera que si el 15% de los frutos presentaran síntomas, esto sólo significaría una reducción económica del 0,9% (Anónimo, 2005).

En España, los daños producidos en las plantaciones de tomate han tenido una incidencia y repercusión variable desde el punto de vista productivo y comercial. Las repercusiones económicas son más acentuadas cuando la infección se produce en plantas jóvenes, que cuando tiene lugar en plantas ya maduras o desarrolladas, a diferencia de lo que ocurre en el norte de Europa, donde se estiman como más problemáticas las infecciones tardías a los cultivos, salvo cuando aparece el “marbling” en los frutos (Lacasa *et al.*, 2000). La aparición de síntomas diversos en fruto, ha tenido repercusiones directas muy importantes para la exportación. El descenso de los rendimientos, tanto en calidad como en calibre de los frutos, ha sido notable en las plantaciones donde la infección fue precoz, teniendo mayor repercusión en invierno que en otra época del año y las pérdidas han llegado a representar en algunos casos el 80% de la producción (Jordá *et al.*, 2001a). Por otro lado, la aparición del síndrome del “colapso” del tomate ha producido importantísimas pérdidas en los cultivos españoles, principalmente en la zona de Murcia. En esta Comunidad en la campaña de 1999/2000, más del 90% de los invernaderos se vieron afectados por el colapso con una incidencia variable de entre el 15-90% de plantas afectadas dentro del mismo invernadero (Soler-Aleixandre *et al.*, 2005b).

Es muy posible que las distintas experiencias y opiniones sobre el impacto económico del PepMV en tomate, sean resultado de las diferentes condiciones climáticas y ambientales que ocurren en la interacción planta-

patógeno. Como ya hemos dicho, la sintomatología del PepMV está muy influenciada por la iluminación y un poco menos por la temperatura, aunque los cambios bruscos de temperatura influyen notablemente en la aparición del marchitamiento. Los síntomas se ven más fácilmente durante las épocas del año en que los niveles de luz y temperatura son bajos, que durante los periodos cálidos y luminosos en los que las plantas pueden padecer el virus y sin embargo no mostrar síntomas. Esto podría explicar las diferencias en la cantidad de fruta con síntomas que se detecta en Reino Unido, frente a lo que sucede en el resto de países europeos, especialmente en países cálidos. Sin embargo, la aparición de síndromes tan graves como el colapso en España ligados a la presencia de PepMV, hace pensar todo lo contrario, que el PepMV tiene efectos muy dañinos aún en condiciones cálidas y luminosas (Anónimo, 2005). En la actualidad, la rápida dispersión del virus, la aparición de nuevas cepas más agresivas, solas o en infecciones mixtas con las cepas ya establecidas o con otras virosis, han jugado un importante papel en el incremento de la importancia que ha adquirido esta enfermedad viral, que se ha situado entre los principales problemas fitopatológicos que afectan al cultivo de tomate en el mundo.



## Capítulo 2

---

### Justificación y Objetivos.



# Capítulo 2

## Justificación y Objetivos

La historia de la aparición y rápida dispersión del PepMV en los países productores de tomate no solo de Europa, sino de casi todos los continentes, está plagada de interrogantes.

¿Cómo un virus que infecta a una especie vegetal solo cultivada en los Andes ha llegado a Europa?, ¿cómo ha pasado de infectar una especie rústica como el pepino dulce a infectar a una de las especies hortícolas de mayor importancia económica mundial como es el tomate, y causando síntomas que en un principio no producía?, ¿cuál es su mecanismo de transmisión a larga distancia?, ¿está implicada la semilla?. La producción de semilla de tomate a gran escala está en manos de grandes empresas multinacionales con sede en Europa o Estados Unidos. Sin embargo, la producción se lleva a cabo en países como Chile, India, Tailandia o China, desde donde la semilla es distribuida al resto del mundo. Cada empresa utiliza protocolos propios de extracción, desinfección y limpieza, y en muchos casos, son las mismas empresas las que se encargan de certificar la sanidad de las semillas, como ocurre en el caso de Holanda. La forma en la que aparece el PepMV en Europa, casi simultáneamente en varios países, y la rapidez con que se extiende por distintas áreas incluso de Norte América hacen pensar en que la semilla pueda estar implicada en la dispersión del virus. A la hora de establecer las medidas de control oportunas, es fundamental conocer cuales son las vías de dispersión del virus y constatar si

existe alguna posibilidad de que se produzca transmisión por semilla. De ser así la Comunidad Internacional debería adoptar medidas urgentes en las zonas de producción para lograr la erradicación del virus, así como el establecimiento de sistemas de control y certificación sanitaria eficaces. Además, para controlar el avance y dispersión del virus, y optimizar las estrategias de control, resulta de máxima importancia conocer la denominada “vida oculta” del patógeno, es decir, la posible existencia de reservorios naturales asintomáticos desconocidos y/o vías de diseminación no consideradas hasta el momento.

En España, la aparición en las zonas productoras de tomate de síndromes agresivos desconocidos con anterioridad a la fecha en que aparece el PepMV, nos abren nuevos interrogantes. ¿Existe alguna relación entre la presencia de PepMV y la aparición en España del marchitamiento súbito y colapso o de la agresiva necrosis que afecta por completo a las plantas afectadas?, ¿cuál es el origen de estos síndromes?, ¿son estos síndromes, nuevos síntomas ocasionados por el mismo virus?, y de ser así ¿cuáles son las causas de que el PepMV provoque una sintomatología tan variada?, ¿existe alguna relación entre genotipo y sintomatología?. La continua aparición de focos de PepMV en España desde su primera detección en el año 1999, lo han convertido en un virus ya endémico de nuestras zonas productoras de tomate. En ocasiones, las infecciones son latentes y no causan síntomas ni en la planta ni en los frutos, por lo que las pérdidas que ocasiona son mínimas y se puede llegar a convivir con la enfermedad. En otros casos, la aparición de frutos manchados o la senescencia precoz de estos pueden significar la pérdida total del cultivo. El estudio epidemiológico de cada uno de los nuevos aspectos de este virus aparecido en tomate, permitiría conocer en profundidad las causas y los agentes implicados.

Por otra parte, el estudio de la estructura poblacional y variación genética del virus, así como de los mecanismos evolutivos implicados, nos permiten reconstruir la historia epidemiológica del virus, concretamente el origen y sus vías de dispersión, así como los factores que promueven la emergencia de nuevas virosis. Este tipo de estudios constituyen un paso fundamental en la obtención de métodos que permitan la detección rápida y fiable de las distintas cepas virales, y que sean capaces de discriminar aislados divergentes en las poblaciones virales presentes en el país. Son por tanto, estudios necesarios para poder abordar el diseño de estrategias de control más eficaces y duraderas.

Por todo lo anterior, en este trabajo de investigación nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Estudiar la transmisión del virus por semilla, evaluando la eficacia desinfectante que presentan los tratamientos habituales recomendados para el tomate.
2. Analizar la implicación de la flora arvense asociada al cultivo del tomate, en la supervivencia del virus en campo, y por tanto de la posibilidad de que estas especies constituyan reservorios naturales del mismo.
3. Estudiar la composición genética de las poblaciones de PepMV en España que dieron origen a los distintos brotes epidémicos registrados desde el mismo momento en que el virus aparece en 1998 hasta la campaña del 2004, tanto en la Península como en las Islas Canarias.
4. Determinar los agentes causales del síndrome conocido como “marchitamiento súbito” o “colapso” del tomate, estableciendo la implicación del PepMV y del hongo vector *Olpidium virulentus* en dicho síndrome.
5. Caracterizar tanto a nivel biológico como molecular, los nuevos aislados de PepMV aparecidos en España y que han provocado la aparición de sintomatologías nuevas y más agresivas, así como determinar su distribución en las distintas zonas productoras del país.

Los objetivos planteados en este trabajo de investigación han sido abordados individualmente en cada uno de los capítulos que componen la presente tesis doctoral. Dichos capítulos son presentados en formato de artículo ya que constituyen artículos ya publicados en revistas internacionales de impacto, o han sido enviados y en estos momentos se encuentran en proceso de revisión para su publicación.



## Capítulo 3

---

**Dispersión.**





# Capítulo 3a

## Seed transmission of *Pepino mosaic virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments

M.C. Córdoba-Sellés, A. García-Rández,  
A. Alfaro-Fernández and C. Jordá-Gutiérrez

*Plant Disease* **91**, 1250–1254 (2007)

### ABSTRACT

Rates of seed transmission for *Pepino mosaic virus* (PepMV) were estimated in seedlings grown from seeds obtained from symptomatic tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits of plants naturally infected with the virus. The proportion of seeds infected with PepMV was at least 25% as estimated from enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis of grouped seeds. The seeds from symptomatic fruits were planted, and seedlings at the cotyledon and transplant stage were assayed for PepMV by ELISA. Three of 168 seedlings grown from infected seeds were PepMV-positive, corresponding to a seed-to-seedling transmission rate of 1.84%. Various tomato seed treatments were evaluated for their ability to prevent seed transmission of PepMV. This virus was largely eradicated by immersing the seeds in 10% trisodium phosphate for 3 h. Although heat treatments of 24 h at 80°C and 48 h at 74°C eliminated PepMV in seedlings, these treatments did not eradicate the virus in whole seeds. The three treatments did not adversely affect seed germination. The results suggest that trisodium phosphate can be used to eradicate PepMV in tomato seed without hindering germination.

*Keywords:* pectinase, potexvirus, thermic treatment

## INTRODUCTION

*Pepino mosaic virus* (PepMV) was first reported and characterized in *Solanum muricatum* Aiton from Peru in 1980 (Jones *et al.*, 1980), and it is believed to have originated in South America. For many years, it was thought that the presence of PepMV was restricted to Peru and that the virus infected *S. muricatum* but no other solanaceous crops grown in the region, such as tomato, potato, or eggplant (Koenig *et al.*, 1989). In 1999, PepMV was reported in greenhouse and field-grown tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in the Netherlands (van der Vlugt *et al.*, 2000). This potexvirus produced a very complex symptomatology, as symptom development depended on virus isolate, tomato cultivar, temperature, and light intensity. Symptoms generally include a yellow mosaic of varying intensity on the leaves, single yellow spots between veins, green mosaic, leaf bubbling, and other leaf malformations that may be confused with other symptoms resulting from the improper use of growth regulators or *Cucumber mosaic virus* (CMV) infection. However, the most problematic symptom for growers is fruit marbling, that is, the yellowish or greenish spots that appear on ripe fruits after harvest due to an abnormal lycopene distribution or uneven maturation (Salomone & Roggero, 2002), considerably reducing market value.

It is not clear how PepMV was introduced into Europe from South America, but it may have been transported on either pepino plants imported for trial purposes or tomato plants or seeds imported from the Andes for genetic studies. Pepino is grown on a small scale in Spain and experimentally in a few European countries; however, tomato is grown everywhere, and it is an extremely valuable crop. When PepMV was introduced into Europe and North America is not clear either, although since the 1999 growing season, the virus has rapidly spread throughout the principal tomato production zones in Germany (Lesemann *et al.*, 2000), Belgium, the United Kingdom (Mumford & Metcalfe, 2001), Spain (Jordá *et al.*, 2001a), Italy (Roggero *et al.*, 2001), the United States and Canada (French *et al.*, 2001), France (Cotillon *et al.*, 2002), and Austria (Verhoeven *et al.*, 2003). The mechanical transmission of PepMV is easy and effective, being spread between plants with contaminated tools, hands, clothing,

and by direct plant-to-plant contact. Contact between healthy and infected plants as a result of routine handling during cultivation of the crop is enough to transmit the virus to six plants in a row from a single infected plant, and contact constitutes the main cause for transmission within a plot. In addition, bumble bees used to pollinate tomatoes in plastic houses have been implicated in the spread of PepMV between plants in Spain (Lacasa *et al.*, 2003). On the other hand, the mechanism for long-distance dissemination of this virus may be the transfer of infected young plants from the nursery to the grower as well as contaminated seeds, infected grafts, cuttings, or fruit. In previous studies (unpublished results), our research team has demonstrated PepMV seed transmission in growth chamber trials, although seed transmission has not been proven under field conditions.

Infected seeds may be a source of primary inoculum for PepMV infections, and combined with routine international distribution of tomato seeds and fruits, this might account for the recent detection of PepMV in Morocco, Finland, Sweden, Slovakia, Bulgaria, Norway, Denmark, Ukraine, Poland, Hungary, Chile (EPPO, 2005), and Ecuador (Soler *et al.*, 2005). Obviously, seed transmission of PepMV is a major concern to the tomato industry. Most tomato seeds sown in the European Union (EU) are produced in third-world countries (China, Thailand, India, Chile, etc.) and shipped to the EU in bulk. Seeds imported by an EU country are tested for quality and pathogens, treated with pesticides, and packaged by the corresponding Official Inspection Service or by accredited seed companies. However, since 1999, PepMV has been found in several consignments of European seeds, and different EU Member States have also discovered PepMV in tomato fruits produced in the EU. On 2 March 2004, the European Committee decreed measures to control the entry and circulation within the EU of tomato seeds infected with PepMV, establishing the inspection and analysis of seeds proceeding from non-EU countries, to detect the presence of the virus before distribution of the seeds within the EU. Member States are therefore obliged to carry out official inspections to detect PepMV in nurseries and seed production stations. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based seed health test can be used to estimate relatively low levels of PepMV in infected seeds. If the proportion of infected seeds is properly estimated from seed health tests, the risk of introducing PepMV can be assessed once precise rates of seed-to-seedling transmission are known.

Different chemical and physical treatments have been reported to eradicate or significantly reduce the incidence of a number of viruses without affecting seed quality. Although some seed companies currently utilize pretreatments for tomato seeds, the details of these seed treatment protocols are proprietary. The objectives of this study were (i) to estimate the rate of seed-to-seedling transmission of PepMV, (ii) to test the efficacy of different chemical and physical seed treatments in eradicating PepMV from tomato seeds, and (iii) to determine the effect of these treatments on tomato seed germination.

## MATERIALS AND METHODS

The tomato seeds used in this study were from a seed mix of unknown cultivars, originating from tomato plants that were naturally infected under field conditions and identified by the presence of fruit marbling. These are referred to as “infected seeds”. The infected seeds were provided by horticultural cooperatives from the Almeria, Murcia, and Alicante regions of Spain. Two seed batches were used: one harvested in 2001 (lot-01) and another in 2004 (lot-04). Seeds were cleaned by rinsing in water followed by drying at room temperature on clean muslin.

### **PepMV detection in whole tomato seeds**

To detect the level of virus in the two seed batches, totals of 115 seeds from seed lot-01 and 340 seeds from seed lot-04 were tested using double-antibody sandwich (DAS)-ELISA. Samples of four seeds were soaked for 90 min in 1 ml of sample extraction buffer, and they were ground with a pestle to obtain the seed extract. DAS-ELISA was carried out in paired wells following the manufacturer’s instructions for the PepMV-specific antiserum supplied by DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) using 100 µl of the extracts obtained. Healthy tomato seed extracts and virus-infected tomato leaf samples were included in each ELISA plate to serve as the negative and positive controls, respectively. Absorbance values ( $A_{405\text{nm}}$ ) were measured in a Titertek Multiskan immunoplate reader (Flow Laboratories, Finland). Values more than twice those for healthy seed extract controls were recorded as infected samples (DAS-

ELISA-positive). Otherwise, samples were considered to be noninfected (DAS-ELISA-negative).

### **PepMV seedlings infection test**

To determine seed transmission rates to tomato seedlings, approximately 500 infected seeds per lot were sown in sterile, 24-well trays containing sterilized substrate (2:1 peat:sand) with a single seed per well. Trays were placed inside a growth chamber at 25°C, 16-h daylight, and 60% relative humidity. Stringent sanitary measures, including isolation, confinement, careful handling, and insect control, were used to prevent any spurious virus spread. Fourteen days after sowing, one cotyledon from every four plants was pooled (ca. 0.15 g) and homogenized in a plastic bag with 3 ml of the sample extraction buffer. The homogenates were filtered through muslin, and 100- $\mu$ l aliquots were assayed for PepMV by DAS-ELISA as described above. Healthy tomato leaf extracts were included in each ELISA plate to serve as negative controls in the assays of leaf samples. This screening procedure was repeated when the seedlings reached the four-leaf stage. In this case, a portion of the youngest emerged leaf was harvested from each plant in a row. The four leaves sampled per row were pooled and pulverized with a pestle in 1:20 (w:v) of extraction buffer as described previously.

Percent incidence from grouped samples was estimated using the formula of Gibbs and Gower (Gibbs & Gower, 1960),  $p = 1 - (1 - y/n)^{1/k}$ , where  $p$  = probability of transmission by a single PepMV-infected seed,  $y$  = number of positive samples,  $n$  = total number of samples assayed, and  $k$  = number of seeds or seedlings per sample ( $k = 4$ ).

### **Seed disinfection treatments**

To determine the efficacy of seed disinfection treatments in eradicating PepMV from tomato seeds, two replications were made of the following seven treatments, one replication per seed batch. To evaluate the effect of high temperatures to eradicate PepMV, three seed treatments were assayed in which three temperatures were tested: (i) seeds were heated for 24 h at 80°C (T80); (ii)

seeds were heated for 48 h at 74°C (T74); and (iii) seeds were heated for 96 h at 70°C (T70). Four disinfectant solutions, proven effective with other viruses, were also tested: (iv) seeds were submerged in a 10% trisodium phosphate solution for 3 h (TP); (v) seeds were submerged in a 3 g/l pectinase solution (from *Rhizopus* sp., SIGMA-ALDRICH, Germany) in distilled water for 24 h (P); (vi) seeds were submerged in a 3 g/l pectinase solution supplemented with 2% HCl in distilled water for 24 h (PH); and (vii) seeds were submerged in a 3 g/l pectinase solution supplemented with 2% HCl and 30% commercial bleach in distilled water for 24 h (PHB). For each chemical treatment, a mesh tea strainer with the seeds was immersed in 100 ml of the disinfectant solution in a 250-ml glass beaker. The mouth of the beaker was covered with Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA), and the beaker was placed on an orbital shaker at 220 rpm for the specified duration at room temperature. Then the seeds were immediately triple-rinsed in the tea strainer using sterile deionized water, dried on sterile paper towels, and placed in a sterile petri plate. For each seed lot, approximately 200 tomato seeds per treatment were used, and for the control group (no treatment [NT]), the same number of seeds per lot was triple-rinsed in sterile deionized water and dried. Half of the treated seeds were assayed for PepMV as whole seeds as described above, and the other half was sown and tested for PepMV in the same manner as in the seedling infection test.

For each physical or chemical treatment, the germination rate was calculated by counting seedlings about 25 days after sowing and comparing with the germination values obtained from untreated tomato seeds for both seed batches.

### **Statistical analysis**

In all experiments, absorbance data from samples of each ELISA plate were analyzed using the multifactorial ANOVA procedure in STATGRAPHICS Plus for Windows (Version 5.1; Manugistics Inc., Rockville, MD, USA). The “growth stage at the time of analysis” and “seed treatment” were considered fixed effects. Fisher’s protected least significance difference (LSD;  $P < 0.05$ ) procedure was used to determine which means were significantly different from the others. The same statistical procedure was conducted with the germination data obtained. In this case, “seed treatment” and “seed lot assayed” were considered fixed effects.

## **RESULTS**

### **PepMV infection of tomato seeds from infected fruit**

As the results obtained in the first trial (lot-01) (data not shown) were essentially identical to those of the second (lot-04), only results for serological analysis of the second trial are shown (Table 3.1). Eighty-five groups of four untreated seeds tested, corresponding to 340 untreated seeds, gave positive results for PepMV by ELISA in the whole seed assay. If only one seed per group of four was infected, the seed infection rate was 25%. No obvious symptom or defect was observed in the tomato seeds.

### **Seed transmission of PepMV**

A total of 217 untreated seeds from lot-04 were planted, and 168 produced seedlings (Table 3.1). Only three samples, each comprised of tissue from four seedlings, tested positive for PepMV by ELISA. These data indicate that PepMV is seed-transmitted, the rate of transmission being nearly 2% as calculated using the formula of Gibbs and Gower (Gibbs & Gower, 1960). None of the ELISA-positive tomato seedlings had obvious symptoms of PepMV infection.

The stage of plant growth at the time of ELISA analysis significantly ( $P = 0.0000$ ) affected the PepMV infection rate (measured as absorbance obtained in ELISA) of the untreated tomato lots. Absorbance values for duplicate samples of 42 negative controls ranged from -0.016 to 0.039, with a mean value of 0.007. Absorbance values of duplicate samples of 42 positive controls ranged from 0.11 to 0.72, with a mean value of 0.362. The average absorbance value for whole seed samples was 28 times higher than that obtained with cotyledon or leaf samples (Table 3.2). The mean absorbance of untreated seed samples was  $0.252 \pm 0.004$ , and for cotyledons and leaves,  $0.014 \pm 0.008$  and  $0.01 \pm 0.007$ , respectively. There were no significant differences in absorbance between the analysis performed at the cotyledon or at the transplant stage. For this reason, results of cotyledon analysis were not used in later statistical analyses.

**Table 3.1** Efficacy of seven disinfection seed treatments for eradication of *Pepino mosaic virus* (PepMV) from infected tomato seed, emergence rates (%) obtained after each seed treatment, and probability of seedling infection in seed lot-04

Treatment <sup>a</sup>	Seeds			Seedlings				Probability of infection <sup>d</sup>
	Tested <sup>b</sup>	Positive samples <sup>c</sup>	Range of seed infection (%)	Emergence (%)	Tested <sup>b</sup>	Positive samples <sup>c</sup>	Probability of infection <sup>d</sup>	
NT	340	85	25–100	77.38	168	3	<b>0.018</b>	
T80	100	25	25–100	81.25	148	0	0.000	
T74	88	22	25–100	80.90	44	0	0.000	
T70	100	23	23–92	75.00	64	1	<b>0.016</b>	
TP	100	0	0	85.00	100	0	0.000	
P	100	25	25–100	84.38	84	0	0.000	
PH	108	0	0	67.86	76	0	0.000	
PHB	124	0	0	0.00	0	0	0.000	

<sup>a</sup> Disinfection treatments used: NT, no treatment; T80, heat treatment at 80°C for 24 h; T74, heat treatment at 74°C for 48 h; T70, heat treatment at 70°C for 96 h; TP, immersion in a 10% trisodium phosphate solution for 3 h; P, immersion in a 3 g/l pectinase solution for 24 h; PH, immersion in a 3 g/l pectinase and 2% HCl solution for 24 h; PHB, immersion in a 3 g/l pectinase, 2% HCl, and 30% commercial bleach solution for 24 h.

<sup>b</sup> Number of whole seeds/seedlings tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after each disinfection treatment.

<sup>c</sup> Number of PepMV-positive grouped seed/leaf samples. A sample corresponds to a group of four whole seeds/leaves from four seedlings.

<sup>d</sup> Probability of infected seedlings grown from infected seeds (i.e., rate of seed-to-seedling PepMV transmission) calculated using the formula of Gibbs and Gower (Gibbs & Gower, 1960) to estimate proportions from group samples.



### **Efficacy of seed disinfection treatments**

The incidence of seed infection after various disinfection treatments in addition to the transmission rates of PepMV from treated seeds to seedlings are provided in Table 3.1. Only TP, PH, and PHB totally reduced PepMV detection of the whole seed assay. The seed infection detected after subjecting infected seed to the other treatments remained in the same range as the nontreated seed lots. By contrast, reduction in the incidence of PepMV in seedlings obtained with all seed treatments was significant except with T70.

Treating seeds with T80 or T74 did not affect the percentage of infected seeds that remained in the same range as the nontreated seeds. However, T80 reduced background ELISA absorbance values by 60% compared with untreated seeds (Table 3.2), and no infection was found in seedlings grown from these seeds (Table 3.1). T74 led to an absorbance decrease of about 14% compared with untreated seed samples (Table 3.2). As with T80, no infected seedlings resulted from these treated seeds (Table 3.1). Treating seeds with T70 led to a slight reduction in infection at the whole seed stage, between 23 and 92% of the seeds being infected (Table 3.1). Moreover, this treatment resulted in a 42.5% reduction in treated-seed absorbance ( $0.144 \pm 0.008$ ) compared with that of the untreated seed (Table 3.2); nevertheless, the probability of detecting an infected seedling with this treatment remained at 0.016 (Table 3.1).

TP treated seeds tested negative for PepMV (absorbance reduction of 98.2%), and no infected seedlings were detected (Table 3.1). The absorbance value of the seed samples subjected to P was only reduced by 3.08% ( $0.244 \pm 0.008$ ) compared with the untreated seeds (Table 3.2), and the infection level remained between 25 and 100% of the analyzed seeds (Table 3.1). Nonetheless, seedlings were not infected from treated seeds. When pectinase treatment was supplemented with HCl (PH), infection was eliminated in the whole-seed stage (Table 3.1), and there were no infected seedlings from the treated seeds. On the other hand, when bleach was added to PH (PHB), no whole seed sample tested positive by ELISA (absorbance value of  $0.004 \pm 0.008$ ) (Table 3.2). This treatment reduced absorbance values by 98.2% relative to untreated seeds, exactly the same as TP. However, no seeds germinated after this treatment, so it was rejected even though PepMV was not detected in the whole seeds.

Disinfection treatment main effect and plant growth stage at the ELISA analysis  $\times$  disinfection treatment interactions significantly affected ( $P = 0.0000$ ) the PepMV infection (measured as absorbance obtained in ELISA) of the treated seeds of seed lot-04.

**Table 3.2** Absorbance values for seed and seedlings submitted to seven disinfection treatments and for no-treated lots, assayed for *Pepino mosaic virus* (PepMV) using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based seed health test

Growth stage <sup>b</sup>	Treatment <sup>c</sup>	n <sup>d</sup>	Absorbance values <sup>a</sup>		
			Mean	Standard deviation	Range
Whole seed	NT	84	0.252	0.004	0.243–0.261
	T80	25	0.098	0.008	0.082–0.115
	T74	22	0.218	0.009	0.200–0.235
	T70	25	0.144	0.008	0.128–0.161
	TP	23	0.004	0.008	–0.013–0.022
	P	25	0.244	0.008	0.227–0.261
	PH	27	0.013	0.008	–0.003–0.029
	PHB	31	0.004	0.008	–0.011–0.032
4 leaves	NT	35	0.010	0.007	–0.003–0.024
	T80	31	0.013	0.007	–0.002–0.027
	T74	12	0.010	0.012	–0.013–0.034
	T70	16	0.012	0.010	–0.008–0.033
	TP	24	0.005	0.008	–0.011–0.022
	P	21	0.010	0.009	–0.007–0.028
	PH	19	0.009	0.009	–0.009–0.028

<sup>a</sup> Absorbance at 405 nm.

<sup>b</sup> Growth stage at time of ELISA: whole seed or four fully developed leaves.

<sup>c</sup> Disinfection treatments used: NT, no treatment; T80, heat treatment at 80°C for 24 h; T74, heat treatment at 74°C for 48 h; T70, heat treatment at 70°C for 96 h; TP, immersion in a 10% trisodium phosphate solution for 3 h; P, immersion in a 3 g/l pectinase solution for 24 h; PH, immersion in a 3 g/l pectinase and 2% HCl solution for 24 h; PHB, immersion in a 3 g/l pectinase, 2% HCl, and 30% commercial bleach solution for 24 h.

<sup>d</sup> Number of samples tested by ELISA. A sample comprised four tomato seed in case of testing whole seed or four leaves in case of testing tomato seedlings by ELISA.

### Effects of seed treatments on tomato seed germination

Germination percentage of lot-04 was greater with all treatments than that obtained from lot-01 (Table 3.3), but the difference had no statistical significance ( $P = 0.0714$ ); the germination rate of both seed lots was significantly ( $P = 0.0001$ ) affected by disinfection treatment only.

In all the seeds subjected to these treatments, P, PH, and PHB caused seed pregermination during the treatment period. For both seed lots, four seed treatments (T80, T74, TP, and P) increased the germination rate (Table 3.3). TP had the most favorable effect in seed germination, which increased by 18.7% (lot-01) and 7.62% (lot-04), respectively, compared with untreated seed lots (Table 3.3). The second best germination rate resulted from P, which increased germination around 7% in both seed lots (Table 3.3). By contrast, T70, PH, and PHB reduced germination rates (Table 3.3). PHB led to the greatest reduction recorded. PHB proved to be extremely harmful to the tomato seeds, since no seed disinfected with it germinated successfully.

**Table 3.3** Effect of seed treatments on tomato seed germination rates from both seed batches

Treatment <sup>a</sup>	Lot-01		Lot-04	
	Germination <sup>b</sup>	Variation rate <sup>c</sup>	Germination <sup>b</sup>	Variation rate <sup>c</sup>
NT	60.00	...	77.38	...
T80	65.06	5.06	81.25	3.87
T74	70.75	10.75	80.90	3.52
T70	52.59	-7.41	75.00	-2.38
TP	78.70	18.70	85.00	7.62
P	67.74	7.74	84.38	7.00
PH	54.60	5.40	67.86	-9.52
PHB	0.00	-60.00	0.00	-77.38

<sup>a</sup> Disinfection treatments used: **NT**, no treatment; **T80**, heat treatment at 80°C for 24 h; **T74**, heat treatment at 74°C for 48 h; **T70**, heat treatment at 70°C for 96 h; **TP**, immersion in a 10% trisodium phosphate solution for 3 h; **P**, immersion in a 3 g/l pectinase solution for 24 h; **PH**, immersion in a 3 g/l pectinase and 2% HCl solution for 24 h; **PHB**, immersion in a 3 g/l pectinase, 2% HCl, and 30% commercial bleach solution for 24 h.

<sup>b</sup> Germination rates were recorded 25 days after sowing.

<sup>c</sup> Variation in the germination rate obtained with seed treated related to the germination rate of the untreated seed group.

## DISCUSSION

To the authors' knowledge, this is the first report to be published on seed transmission of PepMV. Previous studies indicated that certain PepMV isolates could not be seed-transmitted in tomato cv. Camone (Salomone & Roggero, 2002). The small size of the sample previously tested, 52 seedlings, might account for the very low transmission rate in the host. These authors suggested the possibility of seed transmission among other tomato cultivars and other *Lycopersicon* species used for grafting to *L. esculentum*. It is not uncommon with viruses to have different seed transmission rates among different plant host species or cultivars, e.g., *Pea seedborne mosaic virus* (PSbMV) or *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) (Wang *et al.*, 1993; Edwards, 1995). We detected PepMV in at least 25% of the tested tomato seeds, but only 2% of the progeny derived from the same seed batch. Similarly, previous studies determined that the viral transmission by seed does not necessarily correlate with the rate of infected progeny seedlings (Mink, 1993; Johansen *et al.*, 1994). The rate of seed transmission is not necessarily a sound indicator of epidemiological significance. Even low rates of seed transmission, in conjunction with secondary spread by insect vectors or mechanical transmission, can lead to the introduction of viruses into new areas, producing viral disease epidemics (Dinant & Lot, 1992). Lettuce production is severely affected by *Lettuce mosaic virus* (LMV) at a 0.001% incidence of seed transmission given subsequent virus spread by aphid vectors (Ryder, 1973). Similarly low rates of seed transmission are also sufficient for epidemics of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) in subterranean clover pastures (Jones, 1994). Thus, even extremely low rates of seed transmission can facilitate the introduction of viruses into previously noninfected crop production areas (Johansen *et al.*, 1994).

Our tests with PepMV demonstrated low levels of seed transmission; nevertheless, PepMV is an extremely stable and persistent virus, with relatively high rates of unintentional mechanical transmission, quite similar to *Tobacco mosaic virus* (TMV). Growers reported PepMV to spread much faster than another potexvirus, *Potato virus X* (PVX), in glasshouses, and just as fast as *Tomato mosaic virus* (ToMV). Like TMV, ToMV remains viable when carried in

contaminants on the seed surface, and seedling infection occurs primarily by mechanical transmission, especially during handling of the seedlings (Taylor *et al.*, 1961; Broadbent, 1965).

Based on the results of this study, we can conclude that the seedborne nature of PepMV in tomato has contributed both to its introduction into previously unaffected tomato production areas and to its rapid spread in tomato greenhouses around the world. It is possible that the virus was introduced to greenhouses with contaminated tomato seeds, infected seedlings/plants, and perhaps infected fruits sent for packing in tomato nurseries. PepMV can easily be transmitted mechanically to tomato seedlings from a contaminated seed source, and thus the infected seed is considered a potential source of initial virus inoculum. Contaminated trays or tools used in greenhouses and human contact may be other avenues of introduction. Under certain environmental conditions, PepMV will spread rapidly through planting material from a few primary infection sites, due to its transmission by contact, if initial infections are symptomless and no precautions are taken (Lacasa *et al.*, 2003) and if emergency controls currently in place in EU Member States are not maintained. Although the eradication of PepMV has been reported in many EU countries, the virus persists in others since visual symptoms on tomato are often absent, and PepMV is easily spread by mechanical and other means if the proper precautions are not taken.

There are only limited options to combat this highly contagious disease. The current disease management strategy to prevent PepMV transmission in greenhouse tomato production is by cultural practices. These practices include the use of certified PepMV-free tomato seeds and the elimination of any symptomatic plants. For several viruses, resistant cultivars have been used to successfully control them. Unfortunately, current tomato cultivars have no resistance to PepMV infection. Ideally, PepMV could be controlled by preventing the causal agent from entering the field. Infected seeds are a potential risk for introducing the virus at production sites, as well as infected transplants, contaminated implements, and possibly, infected weeds (Jordá *et al.*, 2001b; Córdoba *et al.*, 2004). To prevent viral transmission, precautions must be taken to identify contaminated batches of seeds and fruits. As testing of all seedlings is impractical, regulations should mandate testing to ensure the seeds are PepMV-

free. If PepMV is detected in consignments of tomato seeds from European Member States, this indicates that the current seed testing regime is not detecting all seed batches that pose a threat. Based on the findings of this study, PepMV is seed-transmitted in seeds harvested from fruits with the typical marbling symptom. It is both essential and feasible to eliminate symptomatic fruits as well as selected tomato seedlings from between field rows, which have germinated from fruit that fell to the ground. There is no way at this time to detect and cull the fruits that are symptomless carriers of PepMV. Therefore, we recommend not harvesting seeds from fruits in the vicinity of symptomatic tomato plants. The safest approach is clearly to harvest seeds only from fields that have no PepMV infection.

Experiments conducted for this study showed that seedlings grown from infected tomato seeds might become infected at low rates (<2%) if the seeds were not cleaned or if they were cleaned poorly. To prevent seed-transmission and considering the difficulty in guaranteeing that harvested seeds are not contaminated with PepMV, regulations for an additional seed treatment should be implemented.

Our results suggest that thermic seed treatments are ineffective in eliminating PepMV. No thermic treatment assayed reduced the fraction of whole seeds that were ELISA positive for PepMV, but the number of infected seedlings was reduced. T80 and T74 reduced virus incidence in seedlings, but we were not able to rule out seed transmission given the small number of seedlings tested, 148 and 44 seedlings, respectively. The transmission rates were apparently reduced since no infected plants were obtained after seed treatment, but a higher number of seedlings should be tested to confirm the absence of transmission. The high stability of PepMV is the reason why T70 was truly ineffective. The virus was not eradicated from all seeds; there was still a low level of seed transmission (1.6%), while germination was clearly affected with this thermic treatment.

Results of the chemical seed treatment trials indicate that a PepMV-infected tomato seed lot could be treated by immersion in a 10% trisodium phosphate solution for 3 h, not only to eradicate PepMV from the seed but also to prevent transmission to seedlings while favoring seed germination. Trisodium phosphate pretreatment has been used to eliminate other viruses such as TMV from infected tomato seeds. It does not affect seed germination rates yet

contributes to healthy tomato plants (Green *et al.*, 1987). All the chemical treatments, except P, removed the virus from the seed. These data indicate that PepMV is transmitted via seeds, perhaps as a result of contaminants and debris on the seed surface. It is not known where PepMV is located in the seed, but the elimination of the virus from seed batches using a trisodium phosphate treatment suggests the virus is carried predominantly on the seed surface. Presumably tomato seeds acquire PepMV particles during their development on the infected plant. It is possible that the germinating seedlings are inoculated with virus located on the seed coat as it emerges from the seed. This is similar to TMV transmission from infected tomato seeds, where the embryo is not infected and the virus is transmitted to seedlings from the seed coat through small wounds (Mathews, 1991). This mechanism might also account for the low rates of PepMV seed transmission, even though the level of seed infection is quite high.

Pectinase was unable to remove virus on its own from the whole seed infected; HCl was needed to remove the virus completely, but emergence was reduced by this treatment. In fact, when bleach was added to this disinfectant solution (PHB), no seed disinfected with this treatment germinated. By contrast, we found P to be as effective as TP in the transplant stage, with no infected seedlings and with a positive effect on germination rates. As with T80 and T74, the transmission rate after treating seeds with pectinase was apparently reduced, since no plants were infected. However, only 84 seedlings were tested, and a higher number may need to be studied to confirm this result.

The most interesting of the seven disinfection treatments tested was TP, because it had the most favorable effect on seed disinfection and cleaning as well as on the germination rate of treated seeds. Using accurately controlled parameters, trisodium phosphate can be used to eradicate PepMV in tomato seeds without hindering germination. Moreover, TP is the easiest and most rapid of all the treatments assayed, only 3 h being sufficient to completely eliminate PepMV in whole seeds.

Research is needed to evaluate specific temperatures and durations of thermic treatments with effectiveness to eradicate PepMV in whole tomato seeds. In addition, the disinfection treatments studied here must be evaluated using a broader range of tomato cultivars infected with different PepMV isolates. Such studies are needed to determine the optimum conditions to avoid seed injury

while maximizing the control of this seedborne virus. Adequately tested seed plus hygiene measures could be used to declare propagation sites free of PepMV. We believe that a legislated protocol for seed treatment and testing is desirable. There are insufficient data on the factors influencing the efficacy of seed treatments, and precise requirements for testing seeds for PepMV would need to be decided and formalized so that the effectiveness of the seed testing would not be called into question by any organization or country. More research may need to be undertaken to optimize seed testing protocols against PepMV infection so as to control and eradicate the disease.

## REFERENCES

- Broadbent L., 1965. The epidemiology of tomato mosaic. XI. Seed-transmission of TMV. *Annals of Applied Biology* **56**, 177–205.
- Córdoba M.C., Martínez-Priego L., Jordá C., 2004. New natural hosts of *Pepino mosaic virus* in Spain. *Plant Disease* **88**, 906.
- Cotillon A.C., Girard M., Ducouret S., 2002. Complete nucleotide sequence of genomic RNA of a French isolate of *Pepino mosaic virus* (PepMV). *Archives of Virology* **147**, 2231–8.
- Dinant S., Lot H., 1992. Lettuce mosaic virus: A review. *Plant Pathology* **41**, 528–42.
- Edwards M.C., 1995. Mapping of the seed transmission determinants of Barley stripe mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 906–15.
- EPPO, 2005. EPPO Alert list-Viruses. Pepino mosaic potexvirus: a New Virus of Tomato Introduced into Europe.  
<http://www.eppo.org/quarantine/alert.list/viruses/pepmvo.htm>
- French C.J., Bouthillier M., Bernardy M., Ferguson G., Sabourin M., Johnson R.C., Masters C., Godkin S., Mumford R., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. *Plant Disease* **85**, 1121.



- Gibbs A.J., Gower J.C., 1960. The use of a multiple-transfer method in plant virus transmission studies: Some statistical points arising in the analysis of results. *Annals of Applied Biology* **48**, 75–83.
- Green S.K., Hwang L.L., Kuo Y.K., 1987. Epidemiology of tomato mosaic virus in Taiwan and identification of strains. *Journal of Plant Diseases and Protection* **94**, 386–7.
- Johansen E., Edwards M.C., Hampton R.O., 1994. Seed transmission of viruses: Current perspectives. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 363–86.
- Jones R.A.C., 1994. Infection of subterranean clover with bean yellow mosaic potyvirus: Losses in herbage and seed yields caused and patterns of virus spread. *Australian Journal of Agricultural Research* **45**, 1395–412.
- Jones R.A.C., Koenig R., Lesemann D.E., 1980. *Pepino mosaic virus*, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology* **94**, 61–8.
- Jordá C., Lázaro-Pérez A., Martínez-Culebras P., Abad P., Lacasa A., Guerrero M.M., 200a. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato in Spain. *Plant Disease* **85**, 1292.
- Jordá C., Lázaro-Pérez A., Martínez-Culebras P.V., Lacasa A., 2001b. First report of *Pepino mosaic virus* on natural hosts. *Plant Disease* **85**, 1292.
- Koenig R., Lesemann D.E., Jones R.A.C., eds, 1989. *Pepino mosaic virus*. AAB Descriptions of Plant Viruses No. 350, Warwick, UK.
- Lacasa A., Guerrero M.M., Hita I., Martínez M.A., Jordá C., Bielza P., Contreras J., Alcazar A., Cano A., 2003. Implication of bumble bees (*Bombus* spp.) on *Pepino mosaic virus* (PepMV) spread on tomato crops. *Plagas* **29**, 393–403.
- Lesemann D.E., Dalchow J., Winter S., Pfeilstetter E., 2000. Occurrence of *Pepino mosaic virus* in European tomato crops: Identification, etiology and epidemiology. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*. **376**, 323.
- Mathews R.E.F., 1991. *Plant Virology*. 3rd ed. Academic Press, New York.

- Mink G.I., 1993. Pollen- and seed-transmitted viruses and viroids. *Annual Review of Phytopathology* **31**, 375–402.
- Mumford R.A., Metcalfe E.J., 2001. The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology* **146**, 2455–60.
- Roggero P., Masenga V., Lenzi R., Coghe F., Ena S., Winter S., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* in tomato in Italy. *Plant Pathology* **50**, 798.
- Ryder E.J., 1973. Seed transmission of lettuce mosaic virus in mosaic resistant lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **98**, 610–4.
- Salomone A., Roggero P., 2002. Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Plant Pathology* **84**, 65–8.
- Soler S., López C., Nuez F., 2005. Natural occurrence of viruses in *Lycopersicon* spp. in Ecuador. *Plant Disease* **89**, 1244.
- Taylor R.H., Grogan R.G., Kimble K.A., 1961. Transmission of tobacco mosaic virus in tomato seed. *Phytopathology* **51**, 837–42.
- Verhoeven J.Th.J., van der Vlugt R.A.A., Roenhorst J.W., 2003. High similarity between tomato isolates of *Pepino mosaic virus* suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 419–25.
- van der Vlugt R.A.A., Stijger C.C.M.M., Verhoeven J.Th.J., Lesemann D.E., 2000. First report of *Pepino mosaic virus* in tomato. *Plant Disease* **84**, 103.
- Wang D., Woods R.D., Cockbain A.J., Maule A.J., Biddle A.J., 1993. The susceptibility of pea cultivars to pea seed borne mosaic virus infection and virus seed transmission in the UK. *Plant Pathology* **42**, 42–7.

# Capítulo 3b

## New Natural Hosts of *Pepino mosaic virus* in Spain

M.C. Córdoba-Sellés, Ll. Martínez-Priego and C. Jordá

*Plant Disease* **88**, 906 (2004)

*Pepino mosaic virus* (PepMV) was first detected in Spain in 2000 (Jordá *et al.*, 2001). The virus infects tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) crops and causes a variety of symptoms including leaf distortion, chlorosis, mosaic, blistering of the leaf surface, green striations on the stem and sepals, and fruit discoloration. PepMV is present along the southern and eastern regions of Spain (provinces of Granada, Almeria, Murcia, Alicante, Valencia, and Barcelona), Balearic, and the Canary Islands. In the summer and autumn of 2001 and 2002, virus-like symptoms were observed in native plants growing in or around tomato fields in Murcia and Almeria provinces. To study the alternate hosts that may serve as virus reservoirs, 62 samples of 42 common weed species, including asymptomatic plants, were collected and analyzed for PepMV using double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay with a commercial antiserum (DSMZ As-0554; Biologische Bundesanstalt, Braunschweig, Germany). The following weed hosts tested positive for PepMV: *Bassia scoparia* (L.) Voss., *Calystegia sepium* (L.) R.Br., *Chenopodium murale* L., *Convolvulus althaeoides* L., *Convolvulus arvensis* L., *Conyza albida* Willd. ex Spreng., *Coronopus* sp., *Diplotaxis eruroides* (L.) DC, *Echium creticum* L., *E. humile* Desf., *Heliotropium europaeum* L., *Moricandia arvensis* (L.) DC., *Onopordum* sp., *Piptatherum multiflorum* (Cav.) Beauv., *Plantago afra* L., *Rumex* sp., *Sisymbrium irio* L., *Sonchus tenerrimus* L., and *Taraxacum vulgare* (Lam.)

Schrank. The presence of PepMV in these weed species was confirmed using reverse transcription-polymerase chain reaction with primers specific for PepMV (Martínez-Culebras *et al.*, 2002). Although the number of samples examined may be insufficient to assess precisely the role of weed reservoirs in outbreaks of PepMV, these findings reveal potential virus sources and contribute to further understanding of PepMV epidemiology in Spain.

### REFERENCES

- Jordá C., Lázaro-Pérez A., Martínez-Culebras P.V., Abad P., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato in Spain. *Plant Disease* **85**, 1292.
- Martínez-Culebras P.V., Lázaro A., Abad-Campos P., Jordá C., 2002. A RT-PCR assay combined with RFLP analysis for detection and differentiation of isolates of *Pepino mosaic virus* (PepMV) from tomato. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 887–92.

## **Capítulo 4**

---

### **Estructura de las poblaciones virales españolas**



# Capítulo 4

## **Genetic Structure of the Population of *Pepino mosaic virus* Infecting Tomato Crops in Spain**

**I. Pagán, M.C. Córdoba-Sellés, L. Martínez-Priego, A. Fraile, J.M. Malpica, C. Jordá and F. García-Arenal**

*Phytopathology* **96**, 274–279 (2006)

### **ABSTRACT**

The population structure of *Pepino mosaic virus* (PepMV), which has caused severe epidemics in tomato in Spain since 2000, was analyzed. Isolates were characterized by the nucleotide sequence of the triple gene block and coat protein gene and, for a subset of isolates, a part of the RNA-dependent RNA polymerase gene. The full-length sequence of the genomic RNA of a *Solanum muricatum* isolate from Peru also was determined. In spite of high symptom diversity, the Spanish population of PepMV mostly comprised highly similar isolates belonging to the strain reported in Europe (European tomato strain), which has been the most prevalent genotype in Spain. The Spanish PepMV population was not structured spatially or temporally. Also, isolates highly similar to those from nontomato hosts from Peru (Peruvian strain) or to isolate US2 from the United States (US2 strain) were detected at lower frequency relative to the European strain. These two strains were detected in peninsular Spain only in 2004, but the Peruvian strain has been detected in the Canary Islands since 2000. These results suggest that PepMV was introduced into Spain more than once. Isolates from the

Peruvian and US2 strains always were found in mixed infections with the European tomato strain, and interstrain recombinants were detected. The presence of different strains of the virus, and of recombinant isolates, should be considered for the development of control strategies based on genetic resistance.

## INTRODUCTION

A new viral disease of tomato plants, characterized by a yellow mosaic of the leaves, was described in The Netherlands in 1999. Shortly after, it was shown that the disease was caused by *Pepino mosaic virus* (PepMV, genus *Potexvirus*) (van der Vlugt *et al.*, 2000). Tomato infection by PepMV soon was reported from other countries in Europe (Wright & Mumford, 1999; Lesemann *et al.*, 2000; Mumford & Metcalfe, 2001; Roggero *et al.*, 2001; Cotillon *et al.*, 2002) and North America (French *et al.*, 2001). In Spain, the virus was first identified in 2000 (Jordá *et al.*, 2001a), when the initial outbreak occurred in the geographically isolated tomato-growing areas of the province of Murcia (southeastern [SE] Spain), where tomato is grown throughout the year in open fields, greenhouses, or screen houses. In SE Spain, PepMV-infected tomato plants showed symptoms only from autumn through spring. Symptoms disappeared with warm temperatures in late spring, suggesting that symptom expression is highly dependent on temperature or light conditions, which was confirmed experimentally (*unpublished data*). PepMV infection of tomato plants in SE Spain was associated with a wide variety of leaf symptoms of different severity, including mild and severe mosaics, yellow mosaic and spots on the leaves, and leaf lamina distortion. Fruit showed mosaics, particularly when ripe, and fruit symptoms occurred with or without leaf symptoms. Infected plants often senesced prematurely and stem pith tissues were disorganized. PepMV infection also was found in asymptomatic tomato plants.

The initial localization of PepMV suggested a single introduction in Murcia. In recent years, PepMV has caused severe epidemics in tomato crops in SE Spain and in all tomato-growing areas in the eastern coastal plains of Spain along the Mediterranean Sea. By 2000, PepMV also was detected in the Canary



Islands, with infected tomato plants showing symptoms similar to those in peninsular Spain. Geographic isolation of the Canary Islands suggested a separate introduction.

PepMV infection in tomato had not been reported prior to the recent epidemic in Europe. PepMV was described in 1974 infecting pepino in Peru (Jones *et al.*, 1980). Pepino (*Solanum muricatum* Ait.) is a traditional Andean crop grown for its fruits which are consumed as fresh fruit or in salads. Only recently has pepino been introduced as a crop in Europe, Australia, and the United States. Pepino was the only known natural host of PepMV, which induced a characteristic yellow mosaic and distortion of the leaves. Experimentally, tomato was an asymptomatic host of the virus (Jones *et al.*, 1980). Previously, only the amino acid sequence for the coat protein and a partial nucleotide sequence for the RNA-dependent RNA polymerase gene have been reported for the original pepino isolates of PepMV (Mumford & Metcalfe, 2001; Verhoeven *et al.*, 2003). More recently, PepMV was isolated in Peru from different wild species of the genus *Lycopersicon* (Soler *et al.*, 2002). A Peruvian isolate from *Lycopersicon peruvianum* Mill., which infected tomato asymptotically, was characterized and the complete nucleotide sequence determined (López *et al.*, 2005). Nucleotide sequences reported for PepMV isolates from tomato crops in various European countries were  $\approx 99\%$  similar (Mumford & Metcalfe, 2001; Aguilar *et al.*, 2002; Cotillon *et al.*, 2002; Verhoeven *et al.*, 2003), and are clearly different ( $\approx 96\%$  identity) from the Peruvian *L. peruvianum* isolate. More recently, distinct nucleotide sequences were reported for PepMV isolated from diseased tomato plants in North America (Maroon-Lango *et al.*, 2005). Hence, different strains of PepMV exist, possibly associated with specific hosts or geographic origins.

RNA viruses have a high potential for genetic variation, due to high mutation and recombination rates, which has been suggested to increase the ability to adapt to new environments (Domingo & Holland, 1997; Domingo, 2000). However, high genetic conservation is the rule for natural populations of most plant viruses (García-Arenal *et al.*, 2001), even when confronted with strong selection pressures, such as those imposed by widespread deployment of resistant cultivars (García-Arenal & MacDonald, 2003). High genetic conservation of RNA plant virus populations could be explained by strong

functional constraints on multifunctional proteins encoded by viral genomes and by a high frequency of deleterious or lethal mutations, among other reasons (Malpica *et al.*, 2002; Sanjuán *et al.*, 2004).

The ongoing epidemic of PepMV in Spain presented the opportunity to analyze genetic variability and population structure of a virus during demographic expansion following recent introduction to a new niche (i.e., domestic tomato crops). Our results show that European PepMV isolates pathogenic for tomato belong to a single clade sharing a common ancestor with the Peruvian isolates that are asymptomatic in this host plant. In spite of symptom diversity, the epidemic of PepMV in SE Spain was largely due to the demographic expansion of a single genetic type. The presence of other genotypes did not correlate with phenotype. Furthermore, it appears that recombination among different strains is contributing to the generation of increased genetic variability.

## MATERIALS AND METHODS

### Virus isolates, bioassays, and preparations

We define here a virus isolate as the virus preparation obtained from one field infected plant. Field surveys were conducted in the tomato growing areas affected by the PepMV epidemic since it was first declared in 2000 through February 2004. Tomato plants, symptomatic or asymptomatic, were sampled randomly in affected tomato fields in all provinces where PepMV outbreaks were reported. Sampling locations included open fields, greenhouses, and screen houses. PepMV infection was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial antiserum (DSMZ As-0554; Biologische Bundesanstalt, Braunschweig, Germany). In addition, an isolate was obtained from freeze-dried material from an infected tomato plant sampled in Murcia during 1998. A Peruvian PepMV isolate from *Solanum muricatum* Ait., collected in 1974 and multiplied in *Nicotiana glutinosa* L., was generously provided by R. Mumford (Central Science Laboratory, York, UK).

To determine whether different symptoms shown by tomato plants in the field could be reproduced, isolates from tomato plants were sap inoculated onto three tomato plants each of cvs. Rutgers or Marmande Cuarenteno germinated from heat-treated seeds (24 h at 80°C, dry heat). The inoculated plants were maintained in a growth chamber (27 and 22°C, day and night, respectively; 14 h of light; and 64% relative humidity) in Valencia or in a greenhouse (25 and 15°C, 16 h of light) in Madrid. Symptoms were recorded over a 4-week period, and the presence of PepMV was verified by ELISA.

Virion or RNA preparations were obtained directly from field infected material or from tomato plants used for symptom assays. Virus particles were purified as described by Aguilar *et al* (2002). Virions were disrupted in 4% sodium dodecyl sulfate, 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0, with bentonite at 1 mg/ml and virion RNA extracted with phenol-chloroform. Total RNA from infected plants was obtained using the RNAwiz kit (AMBION; Austin, TX) according to the manufacturer's instructions.

### **Nucleotide sequence determination and analyses**

Genetic characterization of PepMV isolates was done by determination of the nucleotide (nt) sequence for three genomic regions: a part of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, the triple gene block (TGB), and the capsid protein (CP) gene. Virion RNA, or total RNA preparations from leaves, was reverse transcribed and polymerase chain reaction (PCR) amplified using the Superscript III One-Step reverse-transcription (RT)-PCR with Platinum Taq kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and appropriate primers. A 624-nt region in the RdRp gene (open reading frame [ORF]1) was amplified using primers Pep3 and Pep4; a 1,317-nt region encompassing the complete TGB was amplified using primers PepTGB-D and PepTGB-R; and an 845-nt region, including the complete CP gene, was amplified using primers PepCP-D and PepCP-R. PepTGB-D and PepTGB-R did not amplify the American-type isolates. Therefore, primers PepUSTGB-D1 and PepUSTGB-R were used to amplify the TGB region of these isolates. Primers PepRecB-D and PepRec-R were used to amplify a 1,028-nt region, including the 3' half of the TGB and the 5' half of the CP ORF. The sequences of these primers and their positions relative to PepMV Sp-13 isolate

(accession no. AF484251) and US2 isolate (accession no. AY509927) are listed in Table 4.1.

**Table 4.1** Primers used for reverse-transcription polymerase chain reaction amplification of different regions in the genome of *Pepino mosaic virus* (PepMV)

Primer name	Primer sequence 5' → 3'	Position
<b>Pep3<sup>a</sup></b>	ATG AGG TTG TCT GGT GAA	3,897–3,914
<b>Pep4<sup>a</sup></b>	AAT TCC GTG CAC AAC TAT	4,504–4,521
<b>PepTGB-D<sup>a</sup></b>	GGA GAA GCA ATG AGA CTT	4,356–4,376
<b>PepTGB-R<sup>a</sup></b>	GGT GCA CTT GAA GTG GCA G	5,655–5,673
<b>PepCP-D<sup>a,b</sup></b>	CAC ACC AGA AGT GCT TAA AGC A	5,522–5,543
<b>PepCP-R<sup>a,b</sup></b>	CTC TGA TTA AGT TTC GAG TG	6,348–6,367
<b>PepUSTGB-D1<sup>c</sup></b>	TCA CAA ACT CCA TCA AGG	4,335–4,356
<b>PepUSTGB-R<sup>c</sup></b>	TTA GAA GCT GTA GGT TGG TTT T	5,632–5,653
<b>PepRecB-D<sup>a</sup></b>	GAA CTA AAT GCC AGG TCT	5,110–5,127
<b>PepRec-R<sup>a</sup></b>	GTG ACT CCA TCG AAG AAG T	6,120–6,138
<b>RecRepl-R<sup>a</sup></b>	TGA GTT CTG AAG GAA GTG TA	4,774–4,793

<sup>a</sup> Positions numbered as in the sequence of PepMV Sp-13 (accession no. AF484251).

<sup>b</sup> Primers PepCP-D and PepCP-R are primers PepMV TGB F and PepMV UTR R, respectively, as described by Mumford & Metcalfe (2001).

<sup>c</sup> Positions numbered as in the sequence of PepMV US2 (accession no. AY509927).

Genomic RNA of the *S. muricatum* isolate was extracted from virions and used as template. TGB and CP genes were RT-PCR amplified using Superscript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq kit (Invitrogen) with PepTGB-D and PepTGB-R (TGB), and PepCP-D and PepCP-R (CP). The RdRp gene was amplified using SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech, Mountain View, CA) with primer Pep4. RT-PCR-amplified fragments were gel purified using QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Valencia, CA). Nucleotide

sequences of the PCR products were determined using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences determined in this work can be found in the EMBL database under accession nos. AM042564 to AM042592, AM041929 to AM041992, AM040183 to AM040192, AM113787 to AM113850, AM042007 to AM042012, and AM109896.

Multiple sequence alignments were done using CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) with the default parameters. The alignments were used to calculate pairwise genetic distances by Kimura's two-parameter method (Kimura, 1980). Phylogenetic analyses were done by the neighborjoining (Saitou & Nei, 1987) and parsimony (Fitch, 1977) methods implemented with CLUSTAL X and DAMBE (Xia & Xie, 2001) and displayed by TreeView (Page, 1996). Robustness of inferred evolutionary relationships was assessed by 1,000 bootstrap replicates. Pairwise synonymous and nonsynonymous substitutions were calculated according to the method of Nei & Gojobori (1986). Within and between population diversities were estimated according to Nei (1987) using MEGA version 3.0 (Kumar *et al.*, 2004). Putative recombination events were identified by two complementary methods. The method described by Jacobsen & Eastel (1996) is based on the analysis of phylogenetic incompatibility between pairs of informative positions within a set of aligned nucleotide sequences, scored against a randomized data set. The method described by Sawyer (1989) analyzes the probability that sequence fragments between polymorphic sites come from the same parent sequence.

## **RESULTS**

### **Diversity of the Spanish PepMV population**

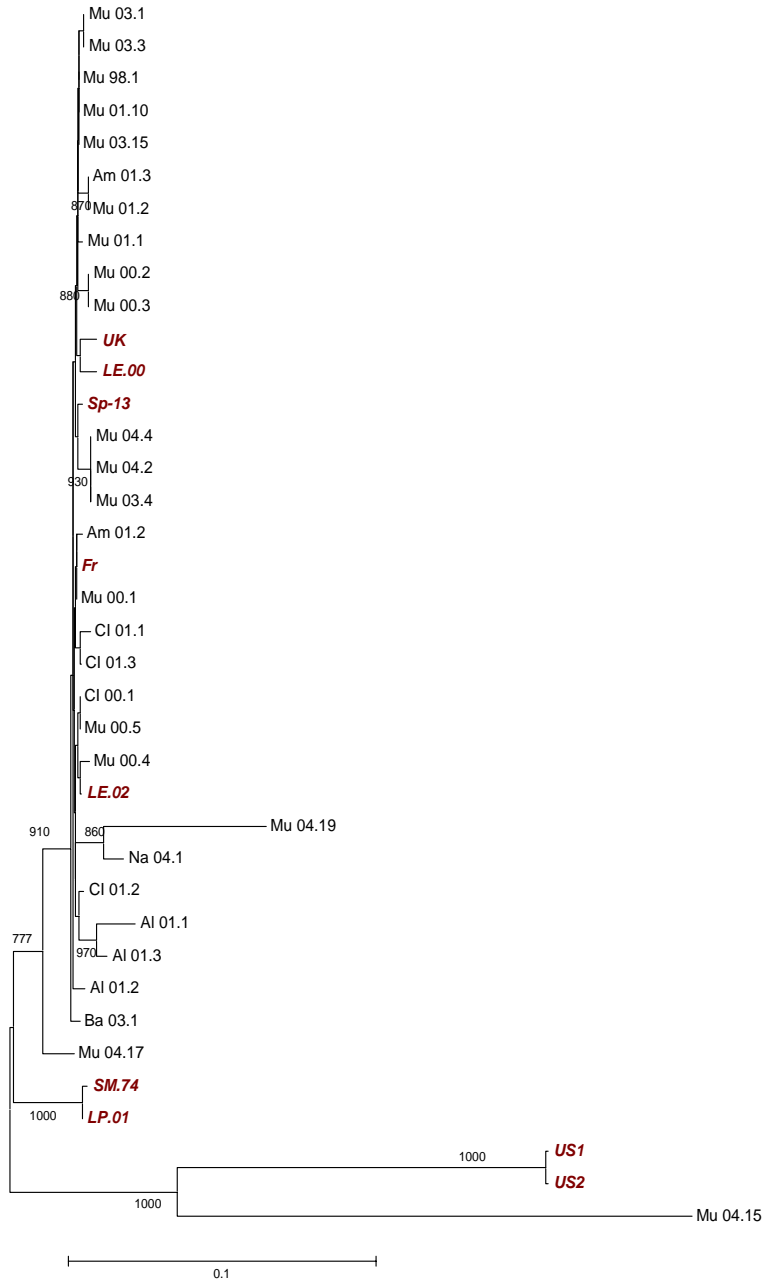
The nucleotide sequence for the RdRp (624 nt), TGB (1,317 nt), and CP (845 nt) genes was determined for a set of 28 isolates (sampled between 2000 and 2004) from all regions in Spain where PepMV has been reported, and for the 1998 Murcia isolate collected before the virus was first identified in Spain. These

genomic regions were chosen to represent viral genes encoding proteins with distinct functions. The sequences of the TGB and CP genes also were determined for another 36 isolates from Murcia sampled between 2000 and 2004. In all, four epidemic episodes in Murcia (2000, 2001, 2003, and 2004) were represented by 5, 10, 15, and 19 isolates, respectively. Hence, two overlapping data sets were analyzed: one sampled the whole Spanish population of PepMV and another sampled successive epidemic outbreaks in the tomato growing area where PepMV was first reported in Spain. It is important to note that analyses of both sets were highly congruent (described below).

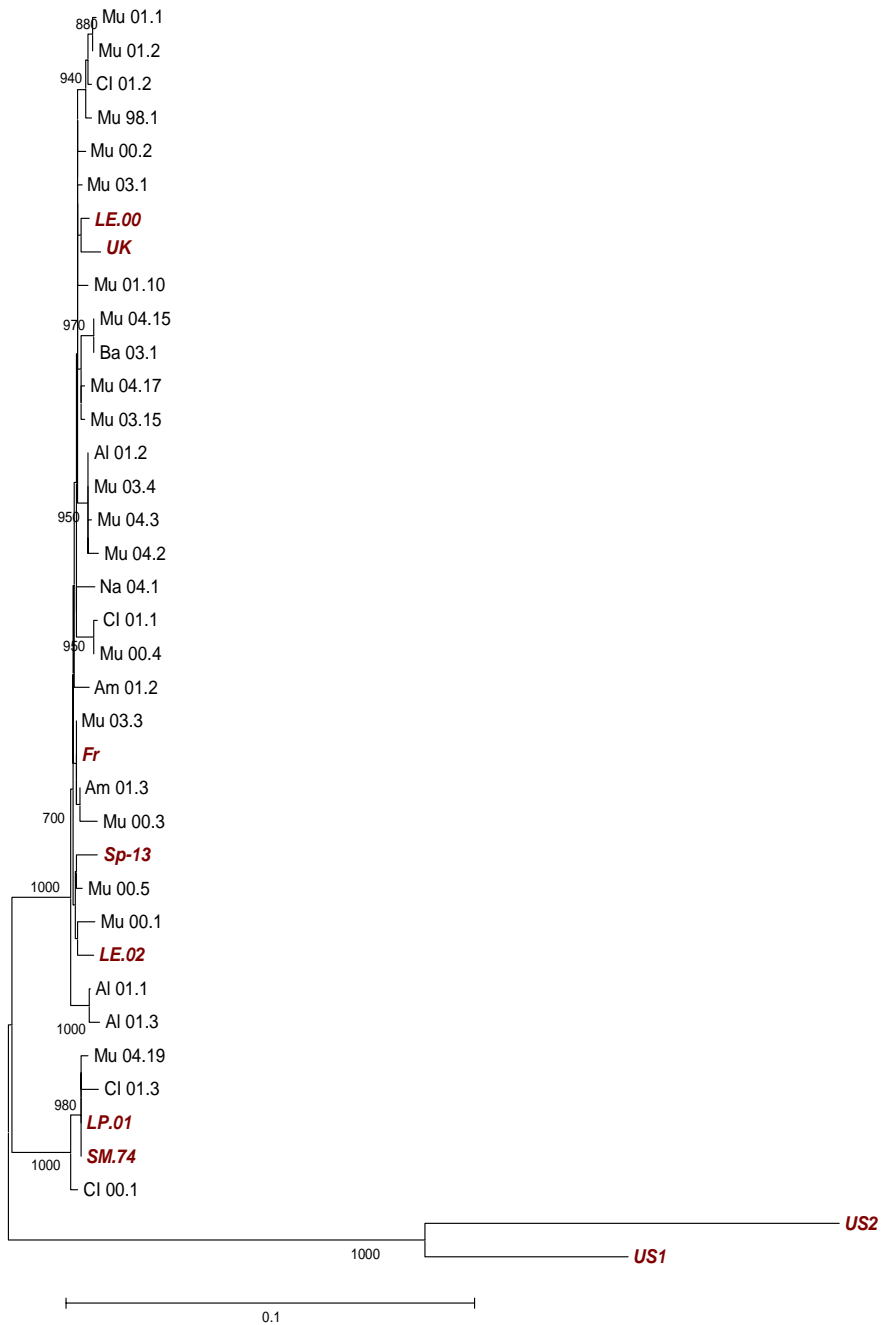
Analyses based on the RdRp, TGB, or CP genes yielded similar results. Most Spanish isolates of PepMV were highly similar and belonged to a single phylogenetic cluster (Fig. 4.1). Within this cluster, isolates did not group according to geographical origin in peninsular Spain or the Canary Islands, or to symptoms on field infected or experimentally infected plants (Fig. 4.1; data not shown). This cluster included the 1998 Murcia isolate and all Spanish isolates collected between 2000 and 2003 in peninsular Spain (Fig. 4.1; data not shown). This same cluster also included the PepMV isolates from tomato isolated in 2000–01 in other European countries (i.e., from the United Kingdom, accession no. AF340024, and France, accession no. AJ438767) (Fig. 4.1). We refer to this cluster as the European tomato strain of PepMV.

**Figure 4.1.** Neighbor-joining phylogenetic trees for three genomic regions of Spanish isolates of *Pepino mosaic virus* (PepMV): RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp), triple-gene block (TGB), and coat protein (CP) gene. Twenty-nine isolates representing all Spanish regions sampled were analyzed. Isolates are identified by a two-letter code indicative of geographic origin (Al: Alicante, Am: Almeria, Ba: Barcelona, CI: Canary Islands, Mu: Murcia, Na: Navarra) followed by the year of collection and an ordinal. SM74; isolate from *Solanum muricatum*, 1974, sequenced in this work. Sequences for other PepMV isolates obtained from public data bases (shown in italics and marked in red) were included. Tomato isolates were from France (Fr, AJ438767), United Kingdom (UK, AF340024), Spain (Sp-13, AF484251; LE.00, AJ606359; LE.02, AJ606360), and the United States (US1, AY509926; US2, AY509927), or from *Lycopersicon peruvianum* from Peru (LP.01, AJ606361). Similar results were obtained with maximum parsimony analyses.

**RdRp**

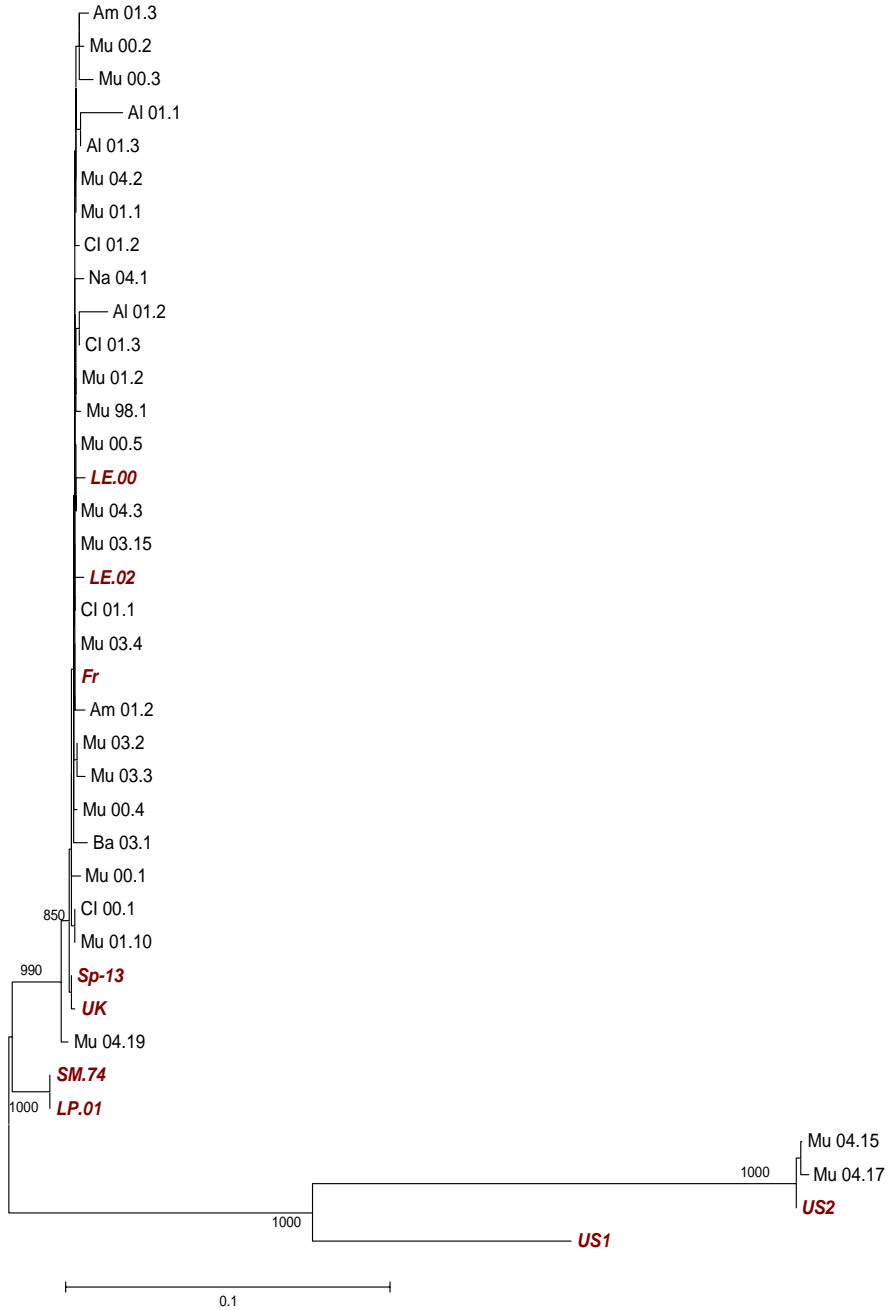


TGB





CP



Genetic distance among isolates within the European tomato strain was unrelated to location or year of collection. For all three genomic regions some haplotypes occurred more than once, often in isolates collected in different years or from different geographic origins. For the CP gene, the two most frequent haplotypes accounted for 7 and 2 of the isolates collected between 2000 and 2004 out of 29 isolates analyzed (31%) (Fig. 4.1). Genetic diversity for the European tomato strain was very low, with a total within-population nucleotide diversity of  $0.0076 \pm 0.0018$ ,  $0.0075 \pm 0.0011$ , and  $0.0057 \pm 0.0009$  for the RdRp, TGB, and CP genes, respectively. Functional constraints on the evolution of the represented portion of the RdRp, the nonoverlapping portions of the TGB, and the entire CP, were analyzed by the ratio of genetic diversity at nonsynonymous and synonymous sites (Table 4.2). RdRp was the most constrained protein, as shown by the  $d_{NS}/d_S$  ratios and by the significantly lower diversity at nonsynonymous sites compared with the two other genomic regions. The least constrained protein was the CP, due to a significantly lower diversity at synonymous sites than for the other two regions. In the absence of recombination, genetic drift should be the same for all genes and mutation rates may be assumed to be similar over stretches as long as those considered here; therefore, these results indicate a stronger selection at synonymous sites of the CP gene compared with synonymous sites elsewhere in the genome.

**Table 4.2** Nucleotide diversity at nonsynonymous ( $d_{NS}$ ) and synonymous ( $d_S$ ) positions in three genomic regions of *Pepino mosaic virus* of the European tomato strain

	$d_{NS}$	$d_S$	$d_{NS/S}$
<b>RNA-dependent RNA polymerase</b>	$0.0019 \pm 0.0012$	$0.0281 \pm 0.0080$	0.0676
<b>Triple gene block<sup>a</sup></b>	$0.0035 \pm 0.0008$	$0.0206 \pm 0.0041$	0.1699
<b>Coat protein</b>	$0.0034 \pm 0.0009$	$0.0125 \pm 0.0027$	0.2720

<sup>a</sup> Only nonoverlapping regions were considered.

Within- and between-population diversity for the populations representing the epidemic episodes of 2000, 2001, and 2003 in Murcia had values

that were similar to those found for the set of the European tomato strain isolates from all regions. For both genomic regions analyzed (TGB and the CP), diversity values were similar (Table 4.3). This indicates a single population, undifferentiated with respect to yearly epidemic outbreaks. However, the within-population diversity for the 2004 population was more than an order of magnitude (between 12 and 30 times) greater, which also was the case for diversity between the 2004 population and those of 2000, 2001, and 2003 (Table 4.3). These results indicate that new genotypes were present in the 2004 population. Phylogenetic analyses showed that, in the 2004 population from Murcia, two new genetic types of PepMV were present (Fig. 4.1). One type was represented by 8 of 19 isolates for the CP gene, which were broadly divergent from the European tomato strain (77% nucleotide sequence identity), and most similar (99% nucleotide sequence identity) to US2 (accession no. AY509927). We refer to this second genetic type as the US2 strain. The RdRp gene region determined for two isolates with a US2 strain-like CP differed broadly from RdRps of both the US2 strain (isolate Mu 04.15) (Fig. 4.1) and the European tomato strain (isolate Mu 04.17) (Fig. 4.1).

**Table 4.3** Nucleotide diversity of *Pepino mosaic virus* populations within and between different epidemic outbreaks in southeastern Spain

	2000	2001	2003	2004
2000	0.0085 ± 0.0020	0.0090 ± 0.0015	0.0064 ± 0.0012	0.0692 ± 0.0050
2001	...	0.0070 ± 0.0014	0.0072 ± 0.0015	0.0691 ± 0.0050
2003	...	...	0.0040 ± 0.0011	0.0678 ± 0.0049
2004	...	...	...	0.1017 ± 0.0075

The third genotype of PepMV was represented by 2 of 19 isolates from Murcia collected in 2004. This novel genotype had TGB sequences that clustered with that reported for the *L. peruvianum* isolate (accession no. AJ606361). These sequences also clustered with the sequence of the *S. muricatum* isolate from Peru, which was nearly identical to that from *L. peruvianum* (Fig. 4.1). Although isolates of this type were found in Murcia only in 2004, they were in the Canary

Islands since 2000 (e.g., isolate CI 00.1) (Fig. 4.1). Sequences from this type defined a third strain, here named the Peruvian strain. The European tomato and Peruvian strains formed a single clade with a high bootstrap support under all the analyses (Fig. 4.1; data not shown).

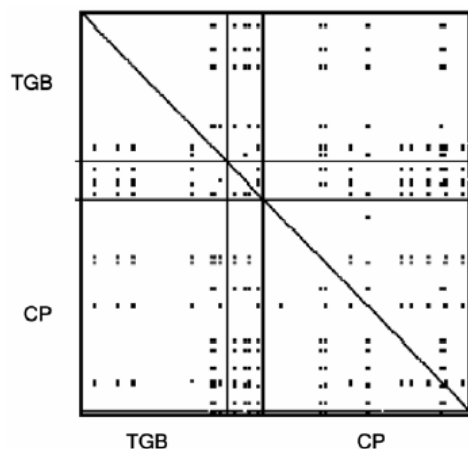
Because symptom induction by PepMV in tomato is highly dependent on environmental conditions, tomato plants showing PepMV-like symptoms, as well as asymptomatic plants, were screened for PepMV infection. PepMV was detected in a considerable fraction of asymptomatic plants (11 of 20 analyzed), but detection in symptomatic plants was much higher (42 of 46 analyzed). There was a significant association ( $P = 0.001$ ) between symptom expression and PepMV infection as detected by ELISA. Isolates from tomato plants exhibiting different symptoms in the field, including isolates from ELISA-positive asymptomatic plants, were assayed for symptom induction at two locations. In Valencia, assays were done in a growth chamber with temperature and light conditions similar to those in the production greenhouses of Murcia at the time of symptom expression (winter). In Madrid, with much colder winters, these conditions were met in an experimental greenhouse. In all, 45 isolates, 41 from peninsular Spain and 4 from the Canary Islands, were assayed. Field symptoms were reproduced for 24 of 34 isolates from plants showing the most frequent symptom of leaf lamina reduction, distortion, and mosaic; 2 of 4 isolates from plants showing yellow mosaic; and 1 of 4 isolates from plants showing leaf yellows. One of three isolates from asymptomatic plants was asymptomatic. Hence, the capacity to induce different symptoms seems to be a property of the isolate. This is indicative of biological diversity within the Spanish population of PepMV. Isolates of the European tomato strain were found to be asymptomatic or to induce leaf lamina reduction, distortion, and mosaic, as well as all the other different symptoms (data not shown). Hence, the observed biological diversity of PepMV isolates does not correlate with different genotypes.

### **Mixed infections and recombination among the strains occur in the PepMV population of Murcia**

Sequences belonging to the Peruvian strain initially were identified in analyses of the TGB fragment of isolates CI 00.1, CI 01.3, Mu 04.12, and Mu 04.19. However, the sequences of the RdRp and CP genes for these isolates clustered

within the European tomato strain (Fig. 4.1; data not shown). Because the sequences for these three genomic regions were derived from three independent RT-PCR events, this could be due to these isolates being recombinants between the European tomato and Peruvian strains or because the original field plants were infected with both strains. To discriminate between these two possibilities, a third fragment was RT-PCR amplified from these samples using primers Pep3 and RecRepl-R (Table 4.1), so that an 896-nt fragment overlapping the TGB and RdRp ORFs was obtained. The nucleotide sequences of these fragments showed no evidence of recombination (data not shown). On the contrary, the TGB and RdRp were of the European tomato strain, indicating mixed infection in these plants.

Similarly, sequences belonging to the US2 strain were identified for the CP RT-PCR-amplified fragment of isolates Mu 04.7, Mu 04.8, Mu 04.9, Mu 04.10, Mu 04.12, Mu 04.15, Mu 04.17, and Mu 04.18, whereas the TGB amplified from the same samples was either of the European tomato strain or of the Peruvian strain (isolate Mu 04.12). Because the European tomato and U.S. strains differ considerably at this region, new primers were designed based on the US2 sequence to amplify the TGB of these isolates (primers PepUSTGB-D1 and PepUSTGB-R) (Table 4.1): The amplified fragments showed sequences of the US2 strain (data not shown; accession no. AM042007-AM042012). Again, this could indicate mixed infections or recombination. A third genomic fragment, overlapping the TGB and CP, was RT-PCR amplified using primers PepRecB-D and PepRec-R. Both Sawyer (1989) and Jacobsen & Eastel (1996) tests for recombination showed a significant departure ( $P = 0.05$ ) from the respective null hypotheses of random distribution of the length of fragments defined by polymorphisms, or of compatible informative sites. The distribution of pairs of incompatible informative sites along the analyzed genomic region is shown by black dots in the matrix of Figure 4.2. The pairs of phylogenetically incompatible sites were not distributed randomly along the sequence, which provided evidence for gene conversion. The pairs of incompatible sites did not cluster according to the different genes represented in the analyzed genomic region. When isolates Mu 04.8 and Mu 04.9 were removed from the analyzed set of isolates, the analyses no longer provided evidence for recombination, indicating that these two isolates were the only recombinant isolates (data not shown).



**Figure 4.2** Distribution of phylogenetically incompatible positions along the concatenated partial sequences of the triple-gene block (TGB) and the coat protein (CP) gene. Sequences were determined from reverse-transcription polymerase chain reaction products amplified using primers PepRecB-D and PepRec-R. Phylogenetically incompatible positions according to Jacobsen and Eastel are represented by black dots. Limits among the TGB and CP genes are indicated.

## DISCUSSION

Knowledge of the epidemiology and evolution of pathogen populations is essential for understanding the emergence of new diseases. With these two goals in mind, we characterized the population structure of PepMV infecting tomato crops in Spain. PepMV is a typical instance of an emergent plant pathogen. Prior to 1999, PepMV was described only as a pathogen of *S. muricatum* (pepino) in Peru, and Peruvian isolates from pepino and other solanaceous hosts were asymptomatic in tomato (Jones *et al.*, 1980; Koenig *et al.*, 1989; Soler *et al.*, 2002).

The population structure of PepMV in Spain showed that a single genetic type, the European tomato strain, was highly prevalent (more than 80% of the

population). Isolates of this strain were found even before the first epidemic outbreak in Murcia and since the first outbreak in the Canary Islands. Hence, isolates of the European tomato strain are at the origin of the current epidemic. Molecular characterization based on the analysis of a 547-nt fragment from the RNA polymerase gene or an 844-nt fragment in the CP gene of tomato-infecting PepMV isolates from Europe and North America (Mumford & Metcalfe, 2001; Verhoeven *et al.*, 2003) showed a high nucleotide sequence identity (above 99%) among all isolates. Collectively, molecular analyses of PepMV from tomato indicate that demographic expansion of a single strain is the cause of the PepMV epidemic in Europe and North America, as had been suggested previously (Verhoeven *et al.*, 2003).

The highly conserved, undifferentiated population of the European tomato strain in Spain is compatible with demographic expansion during the epidemic. In an expanding population, selection for the fittest genotype would result in fixation as a single clone (Fraile *et al.*, 1997; Moya *et al.*, 2004). Year-round availability of the tomato host, as well as seed transmission and high survival potential of PepMV in plant debris in the soil (C. Jordá, *unpublished data*), would contribute to the high population numbers needed for selection to operate. In agreement with this interpretation, most polymorphism occurred at silent positions in the three analyzed genes.

Isolates of the European tomato strain clustered together with the Peruvian isolates from other solanaceous hosts. The near identity of the genomic RNAs of an isolate obtained from pepino in 1974 (Jones *et al.*, 1980; sequence from this work) and another isolate sampled from *L. peruvianum* in 2002 (López *et al.*, 2005) could suggest that the Peruvian population of nontomato isolates of PepMV also could be highly conserved. The widespread occurrence of PepMV in wild *Lycopersicon* spp. in Peru, as well as in tomato (Soler *et al.*, 2002), suggests that Peru is the origin of both the European tomato strain and the Peruvian strain. It has been shown that isolates asymptomatic on tomato from wild *Lycopersicon* spp. or from *S. muricatum* accumulated in tomato less efficiently than virulent isolates (Soler *et al.*, 2002). Although these comparisons included a limited number of PepMV isolates from tomato, they suggest an increased fitness in this host linked to virulence. This could explain the demographic expansion of the European tomato strain. Interestingly, some isolates from *L. peruvianum*

accumulated in tomato to the same levels as those from tomato and caused similarly severe symptoms (Soler *et al.*, 2002), supporting the hypothesis of a Peruvian origin of the European tomato strain. Unfortunately, no sequence data for those isolates are available. An extended host range of Spanish isolates from tomato compared with the original isolate from pepino (Jones *et al.*, 1980; Jordá *et al.*, 2001b; Martínez-Culebras *et al.*, 2002) also could facilitate demographic expansion. We have not attempted to identify the mutation or mutations leading to virulence in tomato, but changes in host range or in virulence to a particular host may be due to relatively few mutations (Maule *et al.*, 2002; Whitham & Wang, 2004). All of the various symptoms associated with PepMV infection in the field were reproduced in the greenhouse by infection with isolates of the European tomato strain. Thus, no association between genotype and phenotype was found.

Two other genotypes, the Peruvian and US2 strains, were detected in Murcia only in 2004. Detection of the Peruvian strain in the Canary Islands in 2000 suggests an independent introduction of PepMV in the Canary Islands and in peninsular Spain. Isolate 3253 of Martínez-Culebras *et al.* (2002), collected in the Canary Islands in 1999, had an RdRp region 98% identical to those of isolates US1 and US2 (Maroon-Lango *et al.*, 2005). This suggests an early presence of the US2 strain in Spain. Restriction-endonuclease analyses of 107 PepMV isolates in the same RdRp region analyzed here yielded three different restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles, (P1, P2, and P3) which seemed to correspond to the European tomato, Peruvian, and US2 strains, respectively (Martínez-Culebras *et al.*, 2002). Isolates with P2 or P3 RFLP profiles were collected both in Murcia and in the Canary Islands since 2000. Hence, if the correspondence between the RFLP profiles of Martínez-Culebras *et al.* (2002) and our strains were concordant, it would indicate the presence of all three PepMV strains in peninsular Spain and in the Canary Islands since the first important epidemic outbreaks in tomato in 2000. If true, our data would indicate an increase of the US2 strain in the population in 2004.

Isolates of the Peruvian and U.S. strains always were found in mixed infection with the European tomato strain. Recombinant isolates between the European tomato and the U.S. strains occurred in the population, which exchanged portions of the TGB and CP genes. For other RNA plant virus



populations analyzed at the local scale (Moreno *et al.*, 2004; Bonnet *et al.*, 2005), recombinants within a gene seem not to be favoured in the virus population. Future analyses of the PepMV population in Murcia should show if this is also the case for PepMV.

The genetic structure of the tomato population of PepMV has not been analyzed in other countries and it is not known if the Peruvian and U.S. strains also are present in other regions experiencing PepMV epidemics in tomato. If this were not the case, our data would suggest that PepMV has been introduced into Spain from different sources. This possibility is highly relevant for PepMV control, indicating that sanitary measures implemented to minimize dispersal through plant material should be extreme, and should not be terminated simply because PepMV is already present in a region. As shown in this work, the introduction of new strains and the appearance of new genetic types by interstrain recombination represent a high potential risk, and should be considered in the design of efficient control strategies.

## REFERENCES

- Aguilar J.M., Hernández-Gallardo D.M., Cenis J.L., Lacasa A., Aranda M.A., 2002. Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome. *Archives of Virology* **147**, 2009–15.
- Bonnet J., Fraile A., Sacristán S., Malpica J.M., García-Arenal F., 2005. Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus. *Virology* **332**, 359–68.
- Cotillon A.C., Girard M., Ducouret S., 2002. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of *Pepino mosaic virus* (PepMV). *Archives of Virology* **147**, 2225–30.
- Domingo E., 2000. Viruses at the edge of adaptation. *Virology* **270**, 251–3.
- Domingo E., Holland J.J., 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* **51**, 151–78.

- Fitch W.M., 1977. Problem of discovering most parsimonious tree. *American Naturalist* **111**, 223–57.
- Fraile A., Escriu F., Aranda M.A., Malpica J.M., Gibbs A., García-Arenal F., 1997. A century of Tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *Journal of Virology* **71**, 8316–20.
- French C.J., Bouthillier M., Bernardy M., Ferguson G., Sabourin M., Johnson R.C., Masters C., Godkin S., Mumford R., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. *Plant Disease* **85**, 1121.
- García-Arenal F., Fraile A., Malpica J.M., 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* **39**, 157–86.
- García-Arenal F., McDonald B.A., 2003. An analysis of the durability of the resistance to plant viruses. *Phytopathology* **93**, 941–52.
- Jacobsen I.B., Eastel S.A., 1996. A program for calculating and displaying compatibility matrices as an aid in determining reticulate evolution in molecular sequences. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 291–5.
- Jones R.A.C., Koenig R., Lesemann D.E., 1980. *Pepino mosaic virus*, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology* **94**, 61–8.
- Jordá C., Lázaro-Pérez A., Martínez-Culebras P.V., Abad P., 2001a. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato in Spain. *Plant Disease* **85**, 1292.
- Jordá C., Lázaro-Pérez A., Martínez-Culebras P.V., Lacasa A., 2001b. First report of *Pepino mosaic virus* on natural hosts. *Plant Disease* **85**, 1292.
- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111–20.
- Koenig R., Lesemann D.E., Jones R.A.C., 1989. *Pepino mosaic virus*. AAB Descriptions of Plant Viruses No. 350, Warwick, U.K.
- Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150–63.

- Lesemann D.E., Dalchow J., Winter S., Pfeilstetter E., 2000. Occurrence of *Pepino mosaic virus* in European tomato crops: Identification, etiology and epidemiology. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land Forstwirtsch. Berlin-Dahlem.* **376**, 323.
- López C., Soler S., Nuez F., 2005. Comparison of the complete sequences of three different isolates of *Pepino mosaic virus*: Size variability of TGBp3 protein between tomato and *L. peruvianum* isolates. *Archives of Virology* **150**, 619–27.
- Malpica J.M., Fraile A., Moreno I.M., Obies C.I., Drake J.W., García-Arenal F., 2002. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics* **162**, 1505–11.
- Maroon-Lango C.J., Guaragna M.A., Jordan R.L., Hammond J., Bandla M., Marquardt S.K., 2005. Two unique isolates of *Pepino mosaic virus* from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate. *Archives of Virology* **150**, 1187–201.
- Martínez-Culebras P.V., Lázaro A., Abad-Campos P., Jordá C., 2002. A RT-PCR assay combined with RFLP analysis for detection and differentiation of isolates of *Pepino mosaic virus* (PepMV) from tomato. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 887–92.
- Maule A., Leh V., Lederer C., 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 279–84.
- Moreno I.M., Malpica J.M., Díaz-Pendón J.A., Moriones E., Fraile A., García-Arenal F., 2004. Variability and genetic structure of the population of *Watermelon mosaic virus* infecting melon in Spain. *Virology* **318**, 451–60.
- Moya A., Holmes E.C., González-Candelas F., 2004. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 279–88.
- Mumford R.A., Metcalfe E.J., 2001. The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology* **146**, 2455–60.

- Nei M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei M., Gojobori T., 1986. Simple methods to estimate the number of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* **3**, 418–26.
- Page R.D.M., 1996. Treeview. An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **124**, 357–8.
- Roggero P., Masenga V., Lenzi R., Coghe F., Ena S., Winter S., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* in tomato in Italy. *Plant Pathology* **50**, 798.
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406–25.
- Sanjuán R., Moya A., Elena S.F., 2004. The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8396–401.
- Sawyer S., 1989. Statistical test for detecting gene conversion. *Molecular Biology and Evolution* **6**, 526–38.
- Soler S., Prohens J., Díez M.J., Nuez F., 2002. Natural occurrence of *Pepino mosaic virus* in *Lycopersicon* species in central and southern Peru. *Journal of Phytopathology* **150**, 49–53.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876–82.
- Verhoeven J.T.J., van der Vlugt R.A.A., Roenhorst J.W., 2003. High similarity between tomato isolates of *Pepino mosaic virus* suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 419–25.

- van der Vlugt R.A.A., Stijger C.C.M.M, Verhoeven J.T.J., Lesemann, D. E. 2000. First Report of *Pepino mosaic virus* on tomato. *Plant Disease* **84**, 103.
- Whitham S.A., Wang Y.Z., 2004. Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 365–72.
- Wright D., Mumford R., 1999. Pepino mosaic virus (PepMV). First records in tomato in the United Kingdom. Plant Disease Notice 89. Central Science Laboratory, York, UK.
- Xia X., Xie Z., 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* **92**, 371–3.



## **Capítulo 5**

---

### **Marchitamiento súbito.**





# Capítulo 5

## ***Pepino mosaic virus and Olpidium virulentus: agents associated with the occurrence of tomato Collapse***

M.C. Córdoba-Sellés, P.Saval, J.A. Herrera-Vásquez and C. Jordá

Submitted to *European Journal of Plant Pathology* (2009)

### ABSTRACT

Statewide surveys of commercial tomato crops were conducted in Spain from 2000 to 2005 to obtain information on the incidence and the causative agents of “Collapse”, a new tomato disorder. Laboratory assays of wilted plants revealed that wilting was caused by a dual infection of *Pepino mosaic virus* (PepMV) and *Olpidium virulentus*. PepMV was detected in 85% of the plants obtained during directed surveys to collect symptomatic plants and *O. virulentus* was found in 88% of the feeder roots examined. Both pathogens were found in 86% of completely examined plants and occurred together in all the fields surveyed. Other pathogens were detected very rarely in collapsed tomatoes. We reproduced the disorder by simultaneous plant inoculation with four PepMV and two *O. virulentus* isolates, triggered by a sudden change in the temperature regime. The collapse incidence varied from approximately 6.25% in the summer growing season to 56.25% in the winter growing season, both under controlled conditions. Collapse PepMV isolates did not cluster together in a specific genotype group. The results indicate that Collapse is well-established in tomato production areas, and that PepMV and *O. virulentus* pose a very serious challenge to tomato producers.

## INTRODUCTION

Since Autumn 1998, a new disorder of tomato, *Solanum lycopersicum* L., characterised by sudden wilt, has been noted in the Murcia Region (East Spain). This disorder, referred to as “Sudden wilt or Collapse”, was first detected as patches of shrivelled plants in greenhouses at the final stages of plant development. All the commercial tomato cultivars grown in the area were susceptible to what appeared to be a fungal disorder. In the season of 1999/2000, collapsed plants were detected from October to August. During this time, more than 90% of greenhouses were affected by Collapse, but the incidence of collapsed plants varied among farms, ranging from 15.0% to 90.0% (Soler-Alexandre *et al.*, 2005). The first symptoms appear suddenly; a slight wilt during the warm part of the day that progresses along the plant until it finally collapses, and dies. Occasionally, wilting was not severe and plants could recover quickly, produce new rootlets and survive. However, plant productivity is seriously compromised because in addition to plant delay, the recovered plants suffer stem damage (necrotic areas in the vascular system, hollow stem, shorter internodes) and root damage (discolouration, brownish lesions, and necrosis) in taproot and secondary roots, which results in a loss of their water uptake capacity. The deteriorated radical system leads to sudden yellowing and decay which, despite being sometimes reversible, often results in total plant collapse and root system disintegration (Córdoba *et al.*, 2004b). This syndrome can affect tomato plants at any growth stage, but sudden wilt mainly occurs prior to harvest, when the plant has the highest nutrient and water requirements.

Different bacterial and fungal pathogens have been identified to cause symptoms similar to this new disorder. Two distinct forms of the fungus *Fusarium oxysporum* Schltld can cause either a vascular wilt (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* W. C. Snyder & H. N. Hans.), or crown and root rot (*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* W. R. Jarvis & Shoemaker) (Larkin & Fravel, 1998), as well as *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berth and *V. Dahliae* Klebahn, which are described to cause tomato wilt (Kim *et al.*, 2001). Additionally, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* or *Pseudomonas*

*corrugata* (Black *et al.*, 1999) are described as bacteria that produce severe tomato wilt. Specialised research groups have attempted to detect and identify the causal agent of collapse. During their research however, the aforementioned organisms were isolated from stem or root segments with a very low frequency, and only from those plants showing symptoms that were intrinsic to these organisms (IMIDA, 2001). The only organisms identified with the highest frequencies from collapsed plants were *Pepino mosaic virus* (PepMV, genus *Potexvirus*, family *Flexiviridae*), first detected in Spain at the same time as tomato collapse, plus the well-established fungus, *Olpidium brassicae* (Woronin) P.A. Dang sensu lato (sl). The research groups detected both organisms in 100% of the root samples from the wilted plants. Previous works (Soler-Alexandre *et al.*, 2005) relate the collapse disorder with necrosis observed in the vascular system, attributed to PepMV accumulation.

PepMV was first identified in 1974 as the agent responsible for distinct yellow mosaic symptoms of leaves of pepino crops (*Solanum muricatum* Aiton) in Peru (Jones *et al.*, 1980). For many years it was thought that the presence of PepMV was restricted to Peru and *S. muricatum* was the only natural host. In the beginning of 1999, however, PepMV was identified as the cause of a new disease in protected tomato crops in the Netherlands and UK (Wright & Mumford, 1999; van der Vlugt *et al.*, 2000). Since 1999, rapid spread of the virus occurred throughout tomato production areas in Europe and North America, causing epidemics and severe economic losses (EPPO, 2009). PepMV is currently considered a dangerous pathogen and is included in the European Plant Protection Organization alert list (EPPO, 2009) as one of the most important tomato viruses worldwide. The PepMV host range is limited mainly to the *Solanaceae* and is easily transmitted from plant to plant by contact (Jones *et al.*, 1980), vectored by bumblebees (Lacasa *et al.*, 2003), seed-borne-transmitted (Córdoba *et al.*, 2007) and infect asymptotically several weed species that grow in the tomato greenhouses (Córdoba *et al.*, 2004a). PepMV infects currently tomato plants worldwide with a very complex symptomatology. The original pepino isolate from Peru does not cause symptoms on tomato (Jones *et al.*, 1980), whereas the tomato isolates first described in Europe cause more distinct symptoms on tomato. Leaf symptoms such as mild or severe mosaics, yellow spots, bubbling, laminal distortions, nettle-heads, and stunting have been associated with PepMV infection (Pagan *et al.*, 2006). Fruit symptoms occur with

or without leaf symptoms. Fruit marbling is considered the most problematic symptom for growers by the impact on fruit quality, and consists on the yellowish or greenish spots that appear on ripe fruits after harvest due to an abnormal lycopene distribution or uneven maturation (Spence *et al.*, 2006). Symptoms may depend on the PepMV strain (van der Vlugt *et al.*, 2002), the tomato cultivar (Villemson *et al.*, 2003), the age of the plant when first infected and the environmental conditions (Spence *et al.*, 2006). Symptoms are also reported to change during the growing season when environmental or growing conditions change, with low temperatures and low light conditions favouring the appearance of more a pronounced symptomatology (Jorda *et al.*, 2001).

*O. brassicae* sl, a member of the Chytridiales order, is a root-infecting plant parasite fungus involved in the transmission of several plant viruses, for example, Lettuce big-vein virus (LBVV; genus *Varicosavirus*) (Campbell, 1996). This fungus has three developmental stages during its life cycle: zoospores, zoosporangia and resting spores. The fungus survives from crop to crop as resting spores that produce zoospores. A zoospore encysts on the epidermal cells of host roots. The thallus becomes embedded in the host cytoplasm and later develops into either a thin-walled zoosporangium or a thick-walled stellate resting spore. When mature, zoosporangia release zoospores through exit tube, and the life cycle is repeated (Campbell, 1996). Host specialization is an important characteristic of *O. brassicae* sl, and different strains of the fungus have been described, such as the crucifer strain, which requires zoospore mating to develop resting spores, or the non-crucifer strain, which does not require sexual mating for resting spores formation (Koganezawa *et al.*, 2005). Given these differences and the molecular analysis of the complete rDNA-ITS regions of the fungus, both strains of *O. brassicae* sl are now considered different species (Sasaya & Koganezawa, 2006). A new species named *Olpidium virulentus* (Sahtiyanci) Karling was proposed for the non-crucifer strain (Koganezawa *et al.*, 2005) that has been recently cited associated with lettuce and tomato crops (Herrera-Vásquez *et al.*, 2009). Therefore, this new nomenclature of *Olpidium* species will be used in the current study.

In this paper, we present the results of a large-scale survey conducted in Spanish greenhouses in order to investigate the aetiology and incidence of tomato collapse. Experimental evidence of the close association between the co-infection

of PepMV and *O. virulentus*, and the environmental conditions and their effect on the development of tomato collapse, are presented. The information obtained is the first step towards the search for strategies to control the “Collapse” disorder.

## MATERIALS AND METHODS

### **Surveys and sample collection**

Surveys were conducted in tomato crops at major growing locations in south-eastern Spain and Canary Islands. Each collected plant constituted a sample, and the symptoms observed in leaves, fruits or roots were recorded. All samples were kept at 4°C and were either mechanically inoculated as soon as possible to tomato plants, prepared to be examined by optical and/or electron microscopy, or tested by either double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) or molecular analysis in 2–5 days, while stock material was stored at –80°C.

### ***Surveys directed to collect symptomatic plants***

From 2000 to 2005, leaves and roots from plants displaying symptoms similar to this new disorder were collected at different stages of development from 62 greenhouses in a sampling region that covered three major Spanish tomato-growing areas: the Murcia Region, Alicante, and the Canary Islands (Tenerife and Las Palmas); greenhouses in Almería and Granada (South Spain) were also inspected (Fig. 5.1). Our directed surveys included material collected while we were guided by agronomists or growers who were asked to show us plants or crops with sudden wilt symptoms. We also included all the tomato samples with the same symptomatology received at the National Plant Protection Service Laboratory from the Regional Plant Protection Service Laboratories.

Symptom severity was scored on a scale of 1 to 4, where 1= recovered plants (reversible wilting), 2= moderate wilting, 3= severe wilting, and 4= collapse and plant death.



**Figure 5.1.** Geographical origin of the tomato samples with symptoms of wilting or collapse used in this study. Mu: Murcia; Al: Alicante; Tf: Tenerife (Canary Islands); LP: Las Palmas (Canary Islands); Am: Almería; Gr: Granada.

### ***Random surveys***

In addition to the directed surveys, random surveys were made in 30 greenhouses in 2000 and 2001 constituting three main tomato production areas (Alicante, Murcia and Tenerife). The purpose of the random surveys was to perform a comparative analysis of symptomatic and asymptomatic plants in outbreaks to have a better indication about the correlation of symptoms and the presence of phytopathogenic organisms found in tomato crops during the directed surveys. In 2000 random samples from approximately 5 plants per greenhouse were collected to analyse the presence of known viruses. In 2001, 112 samples were collected at a rate of 3 or 8 plant samples per greenhouse in Alicante or Tenerife respectively (see Table 5.4). Symptoms were recorded from approximately 56% of plants in 2000 from Murcia and from 41% of plants regularly distributed in each crop in 2001 (69% of plants in Alicante and 33% of plants in Tenerife).

### ***Electron Microscopy***

Leaf extracts from tomato plants collected in 2000, were prepared for examination with the electron microscope by grinding in 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, at a ratio of approximately 1 part tissue to 5 parts buffer. A 0.4% Formvar-coated copper grid was placed on a drop of leaf extract for 1 min, followed by 1 min on a drop of 2% potassium phosphotungstate (pH 7.2), and finally on a drop of water during 1 min. When dried, the stained grids were observed under an electron microscope Philips EM 201 (Philips Company). The length of the viral particles observed was measured.

### ***Determination of viral presence in samples obtained in 2000***

The first year of surveys, all the samples were analysed individually for *Narcissus mosaic virus* (NMV) and *Potato virus X* (PVX) presence by ELISA employing commercially available antisera (Adgen Phytodiagnosics, and Loewe Biochemica GmbH) according to the supplier's instructions in order to detect in the samples the presence of *Potexvirus*. Samples with characteristic disease symptoms were analysed for *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tobacco necrosis virus* (TNV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), *Potato virus Y* (PVY), and/or *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Loewe Biochemica GmbH). Absorbance at 405 nm was measured with a Multiskan EX microplate reader (Labsystems). A sample was considered positive if its absorbance reading was at least double the absorbance value of the healthy control sample. Otherwise, samples were considered non-infected.

### ***Determination of viral presence in samples obtained since 2001***

Samples obtained since 2001 were ever analysed individually by ELISA for PepMV (DSMZ GmbH). Samples with characteristic disease symptoms were also analysed for *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Broad bean wilt virus-I* (BBWV-I), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus X* (PVX), *Tobacco necrosis virus* (TNV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Loewe Biochemica GmbH).

Nucleic acids for PCR or RT-PCR tests were extracted from 0.1 g of plant tissue either with the EZNA™ Plant Miniprep Kit (Omega Bio-Tek) or the RNAwiz™ kit (Ambion), respectively, following the manufacturers' instructions.

In symptomatic plants, amplifications were conducted as previously described in the literature for *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) [Accotto *et al.*, 2000], *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) [Vaira *et al.*, 2002], *Tomato chlorosis virus* (ToCV) [Louro *et al.*, 2000] and *Tomato torrado virus* (ToTV) [Pospieszny *et al.*, 2007]. The serological results against PepMV in all the samples were confirmed by RT-PCR, as previously described by Martínez *et al.* (2002). Reactions were performed in a Mastercycler Personal 5332 thermocycler (Eppendorf) using the primers described in Table 5.1.

**Table 5.1.** The primers used for identification and characterisation

Virus	Primers	Nucleotide sequence (5'→3') <sup>c</sup>	Amplicon size (nt)	Reference
TYLCV	TY1 <sup>a</sup>	GCCCATGTAYCGRAAGCC	580	Accotto <i>et al.</i> (2000)
	TY2 <sup>b</sup>	GGRTTAGARGCATGMGTAC		
TICV	TICV32 <sup>a</sup>	TCAGTGCCTACGTTAATGGG	501	Vaira <i>et al.</i> (2002)
	TICV532 <sup>b</sup>	CACAGTATACAGCAGCGGCA		
ToCV	ToCV172 <sup>a</sup>	GCTTCCGAAACTCCGTCTTG	439	Louro <i>et al.</i> (2000)
	ToCV610 <sup>b</sup>	TGTCGAAAGTACCGCCACC		
ToTV	TR1F <sup>a</sup>	CAATGTGCCAAAGATGAGCG	573	Pospieszny <i>et al.</i> (2007)
	TR1R <sup>b</sup>	ACTCCCGTGTCTATGTTTTTC		
PepMV	Pep1 <sup>a</sup>	CWGTKGAYTTYGAGCCAAGAAC	575	Martinez <i>et al.</i> (2002)
	Pep2 <sup>b</sup>	AGCHGTTCKRTTAAARTTCCAACC		
	PepTGB-D <sup>a</sup>	GATGAAGCTGARCAACAYTTC	1434	Alfaro-Fernández <i>et al.</i> (2008)
	PepTGB-R <sup>b</sup>	GGAGCTGTATTRGGATTGGA		
	PepCP-D <sup>a</sup>	CACACCAGAAGTGCTTAAAGCA	845	Pagán <i>et al.</i> (2006)
	PepCP-R <sup>b</sup>	CTCTGATTAAGTTTCGAGTG		
	Pep3 <sup>a</sup>	ATGAGGTTGTCTGGTGAA	624	Pagán <i>et al.</i> (2006)
	Pep4 <sup>b</sup>	AATCCCGTGCACAACAT		

<sup>a</sup> Specific forward primer

<sup>b</sup> Specific reverse primer

<sup>c</sup>H=A, C, or T; K= G or T; M= A or C; R= A or G; W= A or T; Y= C or T



The amplified cDNA products were electrophoresed in 1.5% agarose gels in TAE buffer (40 mM Tris-acetate and 1 mM EDTA at pH 8.0) and visualised on a UV-transilluminator by ethidium bromide staining. Fragment sizes were determined by comparing with a 1-kb DNA ladder (GeneRuler™ ladder, MBI Fermentas).

### **Monitoring *Olpidium* infection**

*Olpidium* infection was verified in 49 out of the 131 plants collected during the directed surveys as it was impossible to obtain feeder roots in the rest, and in 56 out of 110 plants collected during the random surveys. The feeder root samples from each plant were washed with distilled water to remove soil, dried on paper towels and transferred to plastic bags to be clarified by following the method described by Jordá *et al.* (2002) and observed using a Nikon-YS-100 light microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Fungal infection was monitored by detection of stellate resting spores and/or zoosporangia of *O. virulentus* in these feeder roots samples. Approximately five 1 cm-long slices of feeder roots per plant were randomly visualized and scored as “*Olpidium* present” or “*Olpidium* absent”.

### **Pathogenicity studies**

The ability of several isolates of PepMV and *O. virulentus* to cause wilting and collapse was tested in a pathogenicity experiment which was repeated twice in the greenhouse facilities at the Polytechnic University of Valencia (East Spain). The first experiment was performed from 3 June to 1 September 2003 (Summer trial), and the second was done from 5 December 2003 until 1 May 2004 (Winter trial).

### **PepMV isolates**

Here a PepMV isolate is defined as the virus preparation obtained from one field-infected plant. Isolates are codified by a two-letter code indicative of the geographic origin, an ordinal number if more than one isolate per location and year was obtained, and followed by the collection year. Four PepMV isolates (*Mu 2-00*, *Mu 1-01*, *Tf 01*, and *Al 1-01*) were selected from the tomato samples

collected during surveys (Table 5.2) as representative isolates associated with “sudden wilt” by severity and geographical origin.

**Table 5.2.** Characteristics of the *Pepino mosaic virus* isolates used in this paper.

Isolate	Origin	Date	Symptoms (leaf/fruit) <sup>a</sup>	GenBank accession no. <sup>b</sup>			
				RdRp+TGB+CP	RdRp	TGB	CP
<b>Mu 1-00</b>	Murcia	2000	C / S		AM042567	AM041932	AM113790
<b>Mu 2-00</b>	Murcia	2000	W / Ma		AM042588	AM041933	AM113791
<b>Mu 1-01</b>	Murcia	2001	W / -		AM042568	AM041934	AM113792
<b>Mu 2-01</b>	Murcia	2001	W / -		AM042575	AM041951	AM113809
<b>Mu 04</b>	Murcia	2004	W / -	<i>FJ820177</i>			
<b>Mu 1-05</b>	Murcia	2005	B, W / -	<i>FJ820180</i>			
<b>Mu 2-05</b>	Murcia	2005	C, B / -	<i>FJ820183</i>			
<b>Mu 08</b>	Murcia	2008	B, M, W / -	<i>GQ438739</i>			
<b>Tf 01</b>	Tenerife	2001	W, M / -		AM042590	AM041935	AM113793
<b>Tf 05</b>	Tenerife	2005	C / S	<i>FJ820181</i>			
<b>LP 1-01</b>	Las Palmas	2001	W / -	<i>FJ820173</i>			
<b>LP 2-01</b>	Las Palmas	2001	W, M / -	<i>FJ820184</i>			
<b>LP 04</b>	Las Palmas	2004	C / -	<i>FJ820178</i>			
<b>LP 05</b>	Las Palmas	2005	C / -	<i>FJ820179</i>			
<b>Al 1-01</b>	Alicante	2001	W / -	<i>FJ820174</i>			
<b>Al 2-01</b>	Alicante	2001	W, C / -	<i>GQ438737</i>			
<b>Al 1-02</b>	Alicante	2002	W / Ma		AM042573	AM041952	AM113810
<b>Al 2-02</b>	Alicante	2002	M, B, W / -	<i>FJ820176</i>			
<b>Am 05</b>	Almeria	2005	M, W / -	<i>GQ438738</i>			
<b>GR 04</b>	Granada	2004	IY, B, N / -	<i>FJ820182</i>			

<sup>a</sup> B: bubbling; C: collapse; IY: interveinal yellowing; Ma: marbling; M: green mosaic; N: necrosis; S: symptomless; W: wilt; -: no data.

<sup>b</sup> Sequences of the PepMV isolates obtained in this study from the partial RdRp gene and the complete TGB and CP genes, and those deposited in public databases are shown in italics.

### *Olpidium virulentus* cultures

Two different isolates of *O. virulentus* (SP-8 and SP-9), which had been molecularly characterised in previous studies (Herrera-Vasquez *et al.*, 2009), were trapped by using homologous bait plants (the same species which was growing in the original field) from two soil samples collected from lettuce crops

(SP-8), showing typical symptoms of LBVV, and from tomato crops (SP-9), with collapse symptoms, where the fungus had been previously detected. No other micro-organisms were present in these soil samples. Soils were air dried and sifted through a large mesh screen to remove rocks and root debris in order to be finally mixed at a ratio of 1:10 with a three-times sterilised planting mix in the bait pots. The bait pot with *O. virulentus* SP-8 constituted the stock culture A that was routinely maintained in lettuce plants to keep the fungus in the roots of its original host, while the bait pot with *O. virulentus* SP-9 constituted the stock culture B and was maintained in tomato plants (cv. Marmande). To avoid possible contamination with other *Olpidium* spp. isolates, the fungal cultures were watered with sterile tap water during the experiments and stringent precautions were taken in handling and maintaining these cultures. The characteristics of both fungal cultures are provided in Table 5.3.

**Table 5.3.** Characteristics of the *O. virulentus* cultures used in this paper

Culture	Isolate <sup>a</sup>	Collection date	Origin	Original crop	Field symptoms
A	SP-8	2001	Castellón, Spain	Lettuce	Big-Vein disease
B	SP-9	2001	Murcia, Spain	Tomato	Collapse

<sup>a</sup> The *Olpidium virulentus* isolates used in this work were molecularly characterised by Herrera-Vásquez et al., 2009

### ***Plant material***

Tomato seeds of the cultivar *Marmande cuarenteno* were disinfested in a solution of trisodium phosphate (10% for 3 h) [Córdoba-Sellés *et al.*, 2007] and sown in trays containing a three-times sterilized mixture of peat and sand (3:1) in a growth chamber (23-25°C, 13 h light, 65% relative humidity) until the transplant stage. Seedlings at the three true-leaf expanded stage were transplanted individually into 40 cm-diameter plastic pots containing the same sterile mixture, but supplemented with fertiliser, and transferred to the greenhouse.

Ninety plants were used in each experiment. Plants were distributed into five plots according to the PepMV isolate inoculated to them, which were kept on separate benches to prevent cross-contamination between plots. Furthermore pots

inside each plot, were placed into plastic trays to avoid contaminations by the drainage waters, and distributed into three subplots according to the fungal culture applied to them. A number of six plants constitute each subplot.

### ***Inoculative procedures***

The drainage water from both fungal culture stock-pots (A and B) was collected after irrigation with an extra dose of sterile tap water so that a sufficient volume of drainage water infested with the zoospores of the fungus could be collected from these pots. This drainage water was employed during the “inoculative irrigation” of the plants. The concentration of the zoospores in these waters varied from  $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^6$  per ml, as estimated by the method of Campbell (1988). Six plants within each plot were inoculated with *O. virulentus* by irrigation with the drainage water obtained from the fungal culture A, and represent the sub-plot A inside each plot. Similarly, other group of six plants within each plot was irrigated with the drainage water obtained from the fungal culture B, and represents the corresponding sub-plot B. The sub-plots *O-free* in each plot contained six plants always irrigated with sterile tap water and represent the *Olpidium*-free controls of the experiment. The first fungal inoculation was achieved by irrigating on the transplant day, when roots are usually damaged as a result of the transplanting process, in order to maximise entry through wounds and infection by zoospores. The inoculative irrigations were alternated during the trials with other non-inoculative irrigations using sterile tap water.

Each PepMV isolate (Mu 2-00, Mu 1-01, Tf 01 and Al 1-01; Table 5.2) was inoculated onto all plants of one out of four plots *Mu 00*, *Mu 01*, *Tf 01* and *Al 01*, respectively. The remaining fifth plot was maintained without PepMV inoculation, thus constituting the *PepMV-free control* plot. Sap inoculation of the tomato plants at the four-leaf stage was done by grinding a portion of 1 g of infected leaves of each inoculum in 4 ml of inoculation buffer [0.01 M phosphate buffer (pH 7.2) supplemented with 0.2% sodium bisulphite and 0.2% DIECA]. Extracted sap was rubbed onto two developed leaves previously dusted with carborundum (600 mesh) and then washed with tap water.

After inoculation, plants were maintained under greenhouse conditions with natural light at temperatures between 20°C and 30°C, and carefully irrigated to minimise cross-contamination between or within plots. Air temperature and

humidity were measured using two Data Loggers (Hanna Instruments S.L., Spain) placed in the greenhouse room at the plants level. Measurements were taken automatically at hourly intervals from the time of tomato transplanting until harvest. The overall means were calculated from hourly readings of maximum, minimum, and average daily temperatures. Conventional cultivation practices were followed each season.

### ***Disease evaluation***

Disease incidence was determined as the percentage of wilted or collapsed plants in each subplot during the growing season. Plants were scored for symptoms at weekly intervals from transplanting until harvest.

To confirm correct PepMV inoculation in the inoculated plots and to ensure non-infection in the control plot, all the plants were analyzed after a 15-day viral acquisition period. Samples of 0.15 g were taken from the uppermost expanded leaf of each plant and were tested by ELISA against PepMV as described above. After a 30-day fungal infection period, the presence of the fungus in the roots was verified. Feeder roots from each plant were taken and observed by light microscopy, following the procedure described above. At harvest, all the plants were cut off at ground level, and were tested by ELISA, PCR and RT-PCR to rule out the presence of ToMV, TSWV, CMV, TYLCV or ToCV, as explained above. The PepMV infection was verified by RT-PCR in those plants showing a negative serological reaction and the root exam was done in those plants that had not previously presented root colonisation by *Olpidium*. PepMV and *Olpidium* infections were calculated as the percentage of infected plants of the total plants in the subplot.

### ***Statistical analysis***

Analyses of variance (three-way ANOVA) followed by a mean separation using Fisher’s multiple range test were done at the significance level of  $P = 0.05$ . The effects in the appearance of tomato Collapse of the three factors: viral infection with different PepMV isolates, the *O. virulentus* stock culture used in the watering, and the growing season in which the experiment was done, as well as their interactions, were all considered. Analyses were carried out using the STATGRAPHICS Plus for Windows package (Version 5.1; Manugistics Inc.). The data taken as percentages were arcsin-transformed before analysis.

### **Molecular variability of selected PepMV isolates**

A molecular study was conducted to assess whether the different behaviours of the PepMV isolates could correlate with the genetic variability and the structure of the PepMV population. In addition to the four PepMV isolates used in the bioassay, 16 PepMV isolates from different locations in Spain, showing wilting or collapse symptoms were also included (Table 5.2).

The genetic characterisation of the PepMV isolates was done by determining the nucleotide (nt) sequence for three genomic regions: one part of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene and the entire triple-gene block (TGB) and capsid protein (CP) genes. Total RNA preparations from 0.1 g of leaf tissues were used in the RT-PCR carried out in a single step using the SuperScript<sup>TM</sup> III One step RT-PCR system with the Platinum *Taq* DNA polymerase kit (Invitrogen Life Technologies) and the appropriate primers listed in Table 5.1: partial RdRp gene was amplified using primers Pep3 and Pep4; the complete TGB was amplified using PepTGB-D and PepTGB-R and CP was amplified with primers and PepCP-D and PepCP-R. Total RNAs were denatured by heating at 65°C for 5 min and chilled on ice. The reaction mix included 1x primers mix (at a final concentration of 0.5 µM for each primer), 1 x reaction buffer (containing 0.4 mM dNTPs and 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>), 1x polyvinylpyrrolidone-40 (PVP-40) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 0.1 µl RNaseOUT<sup>TM</sup> (Invitrogen Life Technologies) and 0.4 µl of the enzyme mix, in a final reaction volume of 10 µl. The RT-PCR program consisted in an initial incubation at 50°C for 30 min, followed by 2 min at 94°C and 40 cycles of 94°C for 15 s, 55°C for 30 s, and 68°C for 1 min. A final extension of 68°C for 10 min was added at the end of the 40 cycles to finish the incomplete PCR fragments. The amplified cDNA products were electrophoresed in 1.5% agarose gels in TAE buffer stained with ethidium bromide and visualised under UV light. For direct sequencing, PCR products were purified using the High Pure PCR Product Purification kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The nucleotide sequences were determined in both directions by means of an ABI Prism 377 DNA Sequencer. The sequences determined in this study were deposited in the NCBI database (Table 5.2). The BLAST program (Altschul *et al.*, 1997) was used to search for homologies between the obtained sequences and those in the GenBank. Sequences with highest homologies were retrieved and used for multiple-

sequence alignments with CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). Phylogenetic analyses were performed on the basis of the 3 fragments sequences of amino acids using the MEGA 4.0 software with neighbour-joining algorithm (NJ). The stability of groups analysed by this method was assessed using 1000 bootstrap replications of the dataset. An identity/similarity matrix of the amino acid-analysed sequences was calculated using the Matrix Global Alignment Tool software, version 2.02 (<http://bitincka.com/ledion/matgat>). The published nucleotide sequences included in the analyses belong to PepMV isolates obtained in tomato from Spain (Sp-13, AF484251), France (Fr, AJ438767), Hungary (AM491606), Poland (PK, EF408821), the United Kingdom (UK-2008, FJ212288), the United States (US1, AY509926; US2, AY509927), and Chile (CH1, DQ000984; CH2, DQ000985), and from *Solanum muricatum* (SM74, AM109896) and *Lycopersicon peruvianum* (LP-2001, AJ606361) from Peru.

## RESULTS

### Surveys of collapse, symptoms and field diagnostic

#### *Random surveys*

The presence or absence of symptoms in the greenhouses was recorded (Table 5.4) by our random survey of 50 plants in 10 greenhouses located in Murcia in 2000 and 112 plants in 20 greenhouses in Alicante and the Canary Islands during 2001 (Figure 5.1).

Electron microscope observations (EM) of tomato samples collected during 2000, showed the presence of a large number of aggregated flexuous rod-shaped virus particles in about 87% of plants with different degrees of wilting (Table 5.4). The approximated length of the particles of 510 nm, revealed the presence in the symptomatic samples of a *Potexvirus*. However the same particles appeared in 60% of the observed asymptomatic plants but with lower concentrations than in those symptomatic.

Neither symptomatic sample reacted positively in the serological assay against PVX, nor did asymptomatic sample react in the same assay. However the

ELISA against NMV showed positive results in 70% of asymptomatic plants and in 87% of all the wilted plants. The appearance of infections caused by another virus analysed was not detected in the plants surveyed during 2000 (Table 5.4).

**Table 5.4.** Pathogen incidence in sampled plants from random surveys

Assay	2000 (10 crops)				2001 (20 crops)			
	No wilted plants		Wilted plants		No wilted plants		Wilted plants	
	I <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	I <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	I <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	I <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>
EM	20	12	30	26	-	-	-	-
NMV	20	14	30	26	-	-	-	-
LM	-	-	-	-	32	0	28	26
PepMV	-	-	-	-	70	28	42	38
PVX	20	0	30	0	-	-	-	-
TSWV	2	0	2	0	8	0	-	-
TBSV	14	0	24	0	-	-	-	-
TNV	8	0	20	0	-	-	-	-
CMV	10	0	18	0	-	-	-	-
PVY	-	-	-	-	8	0	-	-
TICV	-	-	-	-	14	0	-	-
ToCV	-	-	-	-	18	4	-	-
TYLCV	-	-	-	-	16	12	2	0

<sup>a</sup> I: Number of plants collected in the random surveys that were analysed

<sup>b</sup> P: Number of analysed plants giving positive results

EM: Electron Microscopy observation; LM: Light Microscopy observation; -: Assay not realized

In 2001 the feeder roots of 53% of all plants collected were observed by light microscopy (LM) (Table 5.4). No fungal structure was observed in the symptomless plants inspected. On the contrary, the observation of the roots revealed the presence of stellate resting spores which are characteristic of *O. virulentus* and zoosporangia to a different extent in 93% of the symptomatic plants inspected. Only in those plants that suffered a reversible wilting no fungal



structure was observed. The results of testing show that PepMV was present in about 40% of the asymptomatic plants while the wilted plants showed a high rate of infection by PepMV, 90% (38 out of 42 plants) tested positive for PepMV. In 2001 TYLCV appeared in 75% of the no wilted plants inspected. The appearance in the no wilted plants of infections caused by a mixture of PepMV and ToCV and PepMV and TYLCV were also noted in this survey in 22% and 25% of the inspected plants respectively (Table 5.4).

### ***Directed surveys***

In 2000-2005, directed surveys were conducted to find plants with sudden wilt or collapse symptoms. A total of 69 commercial crops were visited where the presence of the disease had been reported by technicians or growers. The incidence of the disease in Spain has significantly fluctuated over the years. In 2000, the surveys were concentrated in Murcia where 19 greenhouses were inspected (Table 5.5). At this time, extreme levels of yield losses occurred because of the appearance of collapsed tomatoes during the early stages of plant development. The complete crop loss was common in this season. By 2001, the disease had spread to Alicante (on the northern border of Murcia), and to both provinces of the Canary Islands (Tenerife and Las Palmas) in the Atlantic (Fig. 5.1). In the Murcia Region, the proportion of the total field area affected by collapse in the Spring growing season of 2001 varied from less than 20% to 100%, whereas the appearance of was very low in the Autumn growing season. A total of 25 fields were inspected throughout this year (Table 5.5). In 2002, the disease seemed to disappear since the first half of December when the incidence of the disease in southern areas of Murcia was considerable. Only 10 fields located in Alicante were inspected that year. In 2003, the disease was absent in the tomato fields given the generalised use of grafted plants in rootstocks with resistance to soil pathogens, and only one field with wilted plants was surveyed in Alicante. In 2004, a new outbreak of the disease was detected and affected cherry tomatoes in Granada (south Spain). In addition to the samples from Granada, two other outbreaks were sampled in the same year (Table 5.5). The incidence of the disease increased again in 2005, and a new outbreak of tomato collapse was detected in Almería (on the southern border of the Murcia Region). Eleven commercial crops were surveyed in 2005, including the new report of collapse in Almería (Table 5.5).

**Table 5.5.** Results of the directed surveys to collect symptomatic plants in 2000-05.

Date	No. of crops per location <sup>a</sup>		Score <sup>b</sup>	No. samples		No. samples infected with the indicated pathogen <sup>d</sup>			
				Total	Roots <sup>c</sup>	PepMV	<i>O. vir.</i>	Co-infec. <sup>e</sup>	Others <sup>f</sup>
2000	Mu	19	1	6	0	6	n.d.	n.d.	-
			2	22	0	14	n.d.	n.d.	-
			3	7	0	6	n.d.	n.d.	-
			4	6	0	5	n.d.	n.d.	-
2001	Mu	7	2	17	5	14	1	1	4 <i>Colle</i>
			3	3	0	0	n.d.	n.d.	-
			4	1	1	1	1	1	-
	Al	7	2	6	5	5	5	5	-
			3	6	3	6	3	3	-
			4	1	1	1	1	1	-
	Tf	7	1	1	1	1	0	0	-
			2	13	9	10	8	8	-
LP	4	2	9	8	9	8	8	-	
2002	Al	10	2	10	5	10	5	5	1 ToCV
			3	1	0	1	n.d.	n.d.	-
2003	Al	1	2	6	6	6	6	6	-
2004	Mu	1	2	1	0	1	n.d.	n.d.	-
	LP	1	3	1	0	1	n.d.	n.d.	-
	GR	1	2	3	0	3	n.d.	n.d.	-
2005	Mu	5	2	2	0	2	n.d.	n.d.	1 ToCV
			3	2	1	2	1	1	1 ToTV
			4	1	1	1	1	1	-
	LP	2	3	2	1	2	1	1	-
	Tf	1	1	1	1	1	1	1	-
	Al	2	2	2	0	2	n.d.	n.d.	-
			3	1	1	1	1	1	-
	Am	1	3	1	1	1	1	1	-
<b>TOTAL</b>	<b>62</b>			<b>131</b>	<b>49</b>	<b>111</b>	<b>43</b>	<b>43</b>	<b>4 Colle, 2 ToCV, 1 ToTV</b>

<sup>a</sup> Mu: Murcia, Al: Alicante, Tf: Tenerife, LP: Las Palmas, GR: Granada, Am: Almeria.

<sup>b</sup> Collapse score: 1= recovered plant, 2= moderate wilting, 3= severe wilting, and 5= collapse and plant death.

<sup>c</sup> Number of samples that contained feeder roots of the total analysed, and the observation of roots was possible.

<sup>d</sup> n.d.: the infection was not determined

<sup>e</sup> Number of samples in which the co-infection by PepMV and *O. virulentus* was detected.

<sup>f</sup> Other pathogens detected in the samples: -: no other pathogen detected, *Colle*: *Colletotrichum coccodes*.

Based on the field diagnostics, the field pattern of collapsed plants was irregular. The disease was recorded in tomato plants in all the production areas surveyed, but ever after cloudy periods with low temperatures and poor light. PepMV was found in 85% of the samples, whereas other viruses such as ToCV and ToTV were occasionally detected in diseased plants (1.5% and 0.7% of the infection rates, respectively).

The correct feeder roots examination was only possible in 49 plants because the root systems were severely deteriorated in the rest. Examinations detected the presence of *O. virulentus* in 88% of the samples and *Colletotrichum coccodes* was present in 8% of the samples. Then 88% of the samples, whose leaves and roots had been analysed, presented coinfection with PepMV and *O. virulentus* (both pathogens in the same plant). Wilted plants appeared in greenhouses with similar structures or cultivation techniques to others located in the same area where no plant had collapsed. The plants of these greenhouses presented lower infection with PepMV and/or *Olpidium* or did not result infected. Thus, a correlation emerged between the coinfection with PepMV and *O. virulentus* and plant collapse. All the tomato cultivars grown in Spain were susceptible to collapse (data not shown). Our field surveys indicate that those rootstocks resistant to soil pathogens and vascular diseases, such as He-man, Maxifort, Beaufort and Popeye, show proven tolerance to collapse while the same non-grafted cultivars were susceptible to collapse. No collapse symptoms were seen in grafted tomatoes, and the incidence of tomato wilt was low and reversible in grafted tomatoes. Nevertheless, PepMV and a low level of *O. virulentus* could be detected in tomato rootstock roots.

The results presented in Table 5.5 led us to analyse the dynamics of symptom development and the presence of pathogens over two tomato growing seasons.

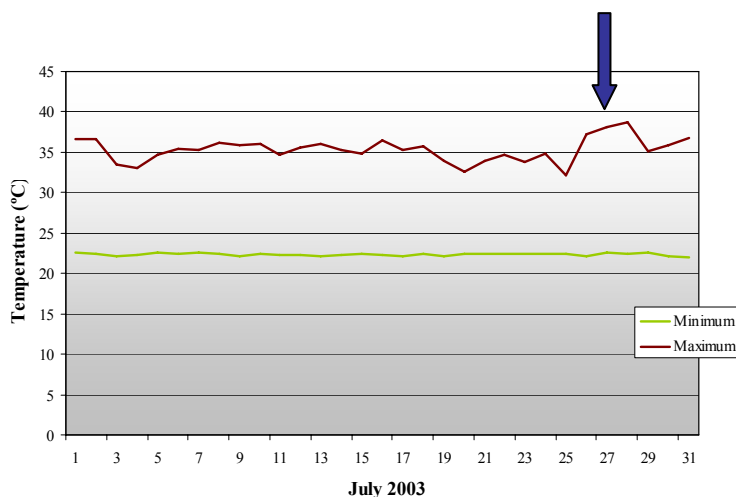
## **Pathogenicity studies**

### ***Summer trial***

In this trial, symptoms of PepMV infection were first observed at 20 days post-inoculation (DPI) on plots *Mu 01*, *Tf 01* and *Al 01* (Table 5.6). However, plants inoculated with *Mu 2-00* grew vigorously without viral symptoms. PepMV was

detected in 76% of the inoculated plants. No plants of the control plot were infected with PepMV and no other virus was detected during the trial. The infection rate of *O. virulentus* was 100% in the plants watered with culture A, but only 93% in the plants of subplots watered with culture B. Plants watered with only sterile water remained free of fungal colonisation.

Between 24 and 25 July, 50 DPI, the daily maximum temperature inside the greenhouse dropped by 2.7°C, with a suddenly increase of 5.1°C in the next 24 h (Fig. 5.2). On 27 July, the daily maximum temperature inside the greenhouse reached the monthly maximum temperature of July (38.1°C). Under these environmental conditions, 6.25% of the PepMV inoculated plants presented wilting symptoms. All the wilted plants were coinfecting with PepMV and *O. virulentus*. No plant inoculated with PepMV *Mu 2-00* showed wilt symptoms, and no plant watered with culture B collapsed.



**Figure 5.2.** Recordings of daily maximum and minimum temperatures inside the greenhouse in the Summer trial when plants suffered collapse. Arrow indicates the day on which Collapse was detected in each trial.

**Table 5.6.** Symptomatology detected in the plots during the Summer and Winter trials.

Plot	Summer trial <sup>a</sup>		Winter trial <sup>a</sup>	
	Leaf	Fruit	Leaf	Fruit
<i>Mu 00</i>	S	S	YM, Nv, C	S
<i>Mu 01</i>	IY, B, C	Ma	GM, D, B, N, C	S
<i>Tf 01</i>	Dw,GM, N, C	S	S, C	S
<i>Al 01</i>	B, C	S	GM, D, B, N, St, C	S
<b>Virus free-Control</b>	S	S	S	S

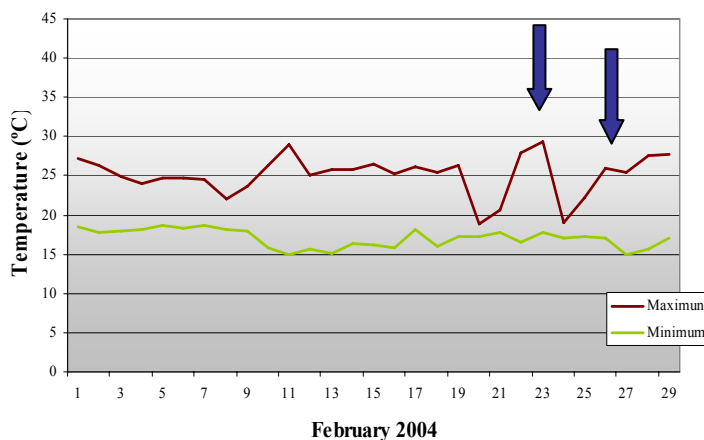
<sup>a</sup> **B:** bubbling; **C:** collapse; **D:** distortion and blisters on leaves; **Dw:** dwarfing; **GM:** green mosaic; **IY:** interveinal yellowing; **Ma:** marbling; **N:** necrotic patches; **Nv:** vein necrosis; **S:** symptomless; **St:** striped patterns on stems and/or petioles; **YM:** yellow mosaic

### **Winter trial**

During the Winter trial, PepMV symptoms appeared at 24 DPI. The symptomatology observed in plots *Mu 01* and *Al 01* were the most severe of both experiments (Table 5.6). At this time, plants in plot *Mu 00* presented a noticeable yellow mosaic in leaves that are characteristic of PepMV infection. However, no systemic symptoms were observed in the plants of plot *Tf 01*, which was seen to be very aggressive during the Summer season. PepMV was detected in all the inoculated plants, and a 100% root colonisation by *O. virulentus* was observed in the plants watered with both fungal cultures. Moreover, the non inoculated plants remained free of either PepMV or *O. virulentus* infection, and no other virus was detected in the plants.

Between 19 and 20 February, 76 and 77 DPI, a drop in the daily maximum temperature of 6.3°C was recorded inside the greenhouse (Fig 5.3). On 23 February, the monthly maximum temperature value was registered (29.3°C). The first wilting was observed in all the inoculated plots on this day. Affected plants recovered over the following 24 hours thanks to a drop of 10.3°C in the daily maximum temperature inside the greenhouse. However 2 days later, a rise in the daily maximum temperature inside the greenhouse to 26.0°C was recorded

and 27 plants collapsed. Collapse was recorded in all the inoculated plots with an incidence of 56.25% of the plants inoculated with PepMV (66% of the PepMV inoculated plants watered with culture A, and 46% of those watered with culture B).

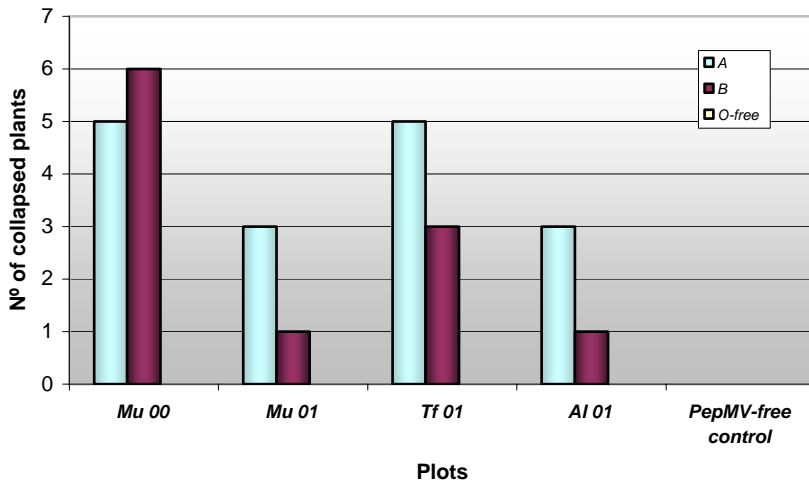


**Figure 5.3.** Recordings of daily maximum and minimum temperatures inside the greenhouse in the Winter trial when plants suffered collapse. Arrow indicates the day on which Collapse was detected in each trial.

The incidence of collapse in Winter was significantly higher than that recorded in Summer ( $P=0.0022$ ). Unlike the Summer trial, the most affected plot in the Winter trial was the plot *Mu 00* with a 91% of collapse registered in the PepMV inoculated plants. The incidence of collapse was 66.6% of the inoculated plants in plot *Tf 01*. The same collapse rates (33% of the inoculated plants) were detected in those plants inoculated of plots *Mu 01* and *Al 01* (Fig. 5.4). The infection of tomato plants with a PepMV isolate had a significant effect on the appearance of Collapse ( $P=0.0212$ ), but no statistically significant differences between the PepMV isolates were detected.

In order to confirm the identity of the *O. virulentus* present in roots of the collapsed plants, feeder roots of these plants were analysed by multiplex PCR, as described by Herrera-Vasquez *et al.* (2009). *O. virulentus* was detected in all the samples. Leaf extracts of several plants collapsed in both subplots (A and B)

were prepared for examination with the EM. In all the samples viral particles, rod shaped with a modal length of approximately 500 nm were detected that corresponds to PepMV. Viral particles rod-shaped with a modal length of 120-360 nm characteristic of *Varicosavirus*, were not observed and neither extremely filamentous particles of 1500-2500 nm typical of *Ophiovirus* were detected. Therefore the possibility of infection in collapsed plants with viruses transmitted by *O. virulentus* was rejected.



**Figure 5.4.** Collapse incidence during the Winter trial expressed as the number of collapsed plants detected in each subplot. The trial consisted of 5 plots: 4 inoculated with a different PepMV isolate (*Mu 2-00*, *Mu 1-01*, *Tf 01* and *Al 1-01*) and 1 PepMV-free control plot. Each plot grouped 18 tomato plants, which were divided into three subplots: two watered with the zoospore suspensions of two different *O. virulentus* stock cultures (A and B), and one *Olpidium*-free subplot watered with sterile water (*O-free*).

The results of the Winter trial were corroborated by the inoculation of healthy tomato plants only with the isolate *Mu 2-00* of PepMV and both fungal cultures, under controlled conditions in a growth chamber (data not shown). We induced a drop of 6°C in the daily maximum temperature and the illuminance was reduced to one half in the chamber. These conditions were maintained

during two days until we increased the temperature in 11°C and the normal illuminance in the chamber was restored. Under these conditions similar collapse rates to those obtained in the winter trial were registered in the growth chamber.

### **Molecular variability**

To further assess the genetic diversity of the encountered PepMV isolates, the nucleotide sequences of a 625 bp fragment of the RdRp gene, the complete 1434 bp TGB and a 845 bp fragment of the CP gene were determined in a set of 19 samples taken between the growing seasons of 2000 and 2005, from greenhouses of the different regions in Spain that were diagnosed with collapse. A recent PepMV isolate with wilt symptoms from Murcia was added to the study. These isolates were selected by represent different collapse epidemic episodes in Spain and by the severity of symptoms shown. Subsequently, the sequences were compared with reference sequences from the different genotypes.

Based on the amino acids alignments for each genomic region, a phylogenetic tree was constructed by using the NJ method. The phylogenetic tree for the fragment amplified of the RdRp gene (Fig.5.5.a) distributed the PepMV isolates in four main clusters corresponding to EU, PE, US1 and CH2 strains. The first of these clusters formed by the most diverse sequence included ten PepMV isolates of collapse, all the four isolates used during the greenhouse experiments and the European reference isolates Fr, H and Sp-13. The CH2 group included the other six isolates, the Chilean reference isolate CH2, PK and UK-2008. The amino acid sequence identities ranged between 96.8 and 100% for EU group isolates and 98.7 to 100% for CH2 group isolates. The amino acid sequence identities between both groups were about 91-92.9%.

The phylogenetic tree for the complete TGB (Fig 5.5.b) distributed the isolates of PepMV in three main clusters. Two distinct PepMV genotype groups, EU and PE, formed the first main cluster, as for the second main group that clustered together the two different genotypes CH2 and US2. The third cluster includes the reference isolates that belonged to US1 strain. Thirteen sequences were assigned to the EU sub-cluster, while one of the sequences used in the greenhouse experiments (Tf 01) landed in the PE sub-cluster, and as for the RdRp fragment, the same six isolates are included in the CH2 cluster. The amino

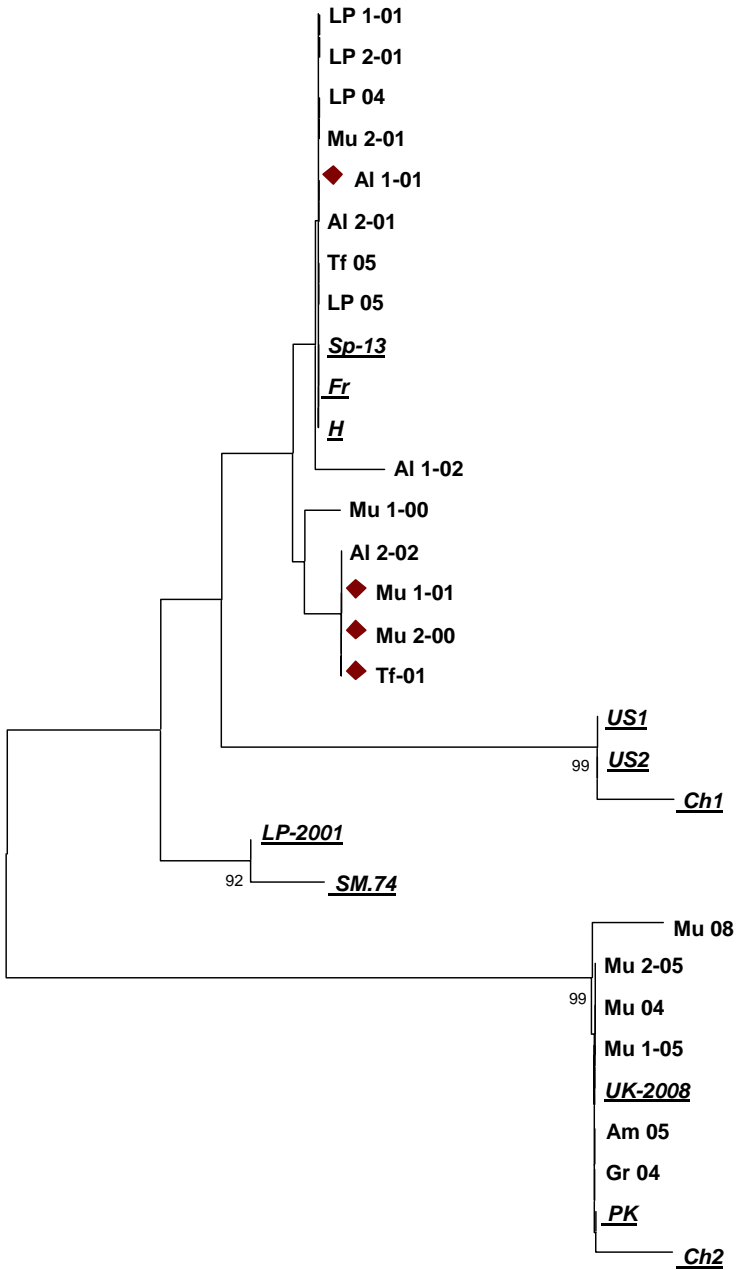


acid sequence identities ranged between 97.4 and 100% for EU group isolates and 92.3 to 100% for CH2 group isolates. The amino acid sequence identities between both groups were about 84.2-87.2%.

Sequence alignments of the CP and the corresponding phylogenetic tree (Fig 5.5.c) distributed the isolates of PepMV in only three main clusters. Again, the EU strain and the PE strain are together in the same cluster but not taking part into two distinct subclusters. The same fourteen isolates of collapse landed in this cluster. The second main undifferentiated cluster encompassing the Chilean reference isolates CH2, US2, PK, UK-2008 and the same six isolates as in the RdRp and TGB trees. The third cluster includes the reference isolates that belonged to US1 strain. The amino acid sequence identities ranged between 98 and 100% for EU group isolates and 98.5 to 100% for CH2 group isolates. The amino acid sequence identities between both groups were about 88.9-90.9%. For the three regions studied, no sequences were identified that clustered in the US1 strain.

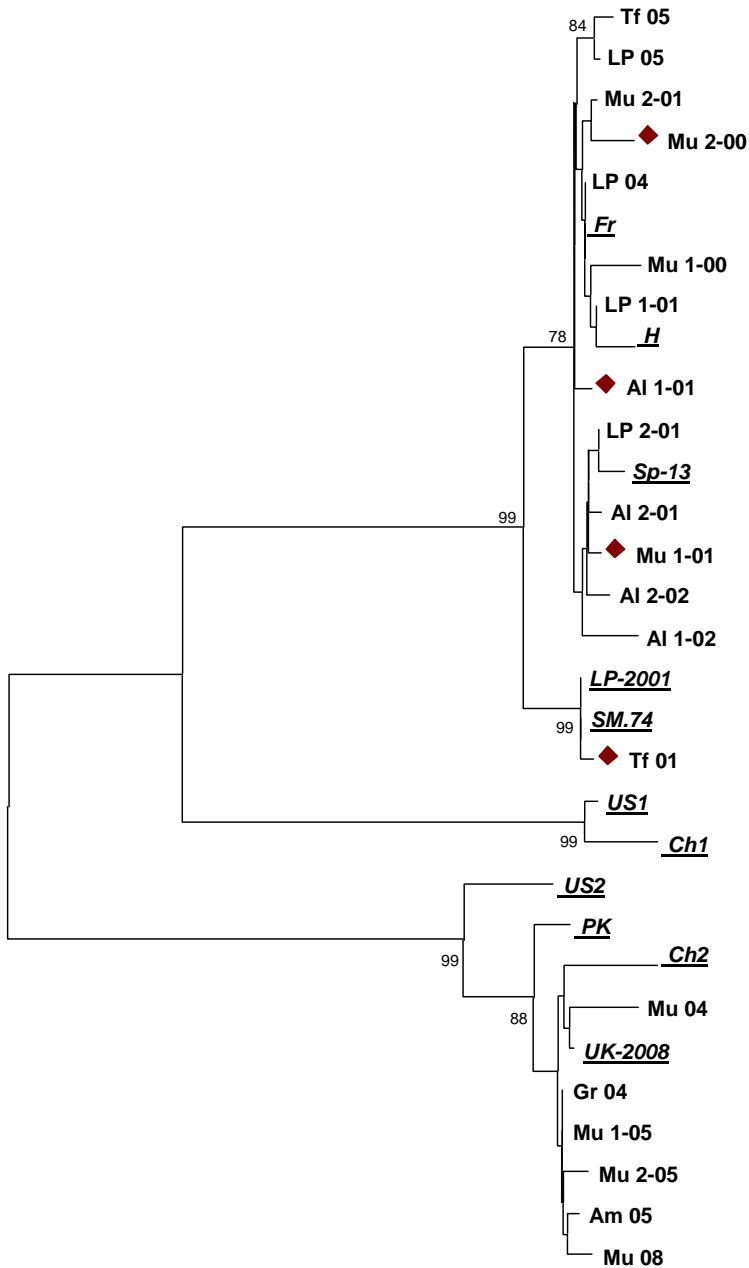
Within the clusters, isolates did not group according to either the geographical origin or the symptoms on field-infected plants. The PepMV isolates obtained from wilted tomato plants clustered together with other PepMV isolates that showed typical PepMV symptomatology within the EU, PE or CH2 strains. Hence, this is indicative of a biological diversity within the PepMV population that does not correlate with different strains.

**Figure 5.5.** Phylogenetic tree analyses based on the amino acids alignments for three genomic regions of PepMV: RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp); Triple gene block (TGB), and coat protein gene (CP). Twenty isolates representing all the Spanish regions with collapse outbreaks were analysed (Table 5.2) Filled rhombs denote the isolates used in the pathogenicity trials. Sequences for other PepMV isolates obtained from public databases (in italics and underlined) were included: tomato isolates from Spain (Sp-13, AF484251), France (Fr, AJ438767), Hungary (AM491606), Poland (PK, EF408821), the United Kingdom (UK-2008, FJ212288), the United States (US1, AY509926; US2, AY509927), and Chile (CH1, DQ000984; CH2, DQ000985), and from *Solanum muricatum* (SM74, AM109896) and *Lycopersicon peruvianum* (LP-2001, AJ606361) from Peru. The values shown at the nodes indicate the bootstrap values estimated from 1000 replications of the dataset when the bootstrap values were higher than 70%. The scale bar, for the horizontal branch lengths, represents genetic distances of 0.05.

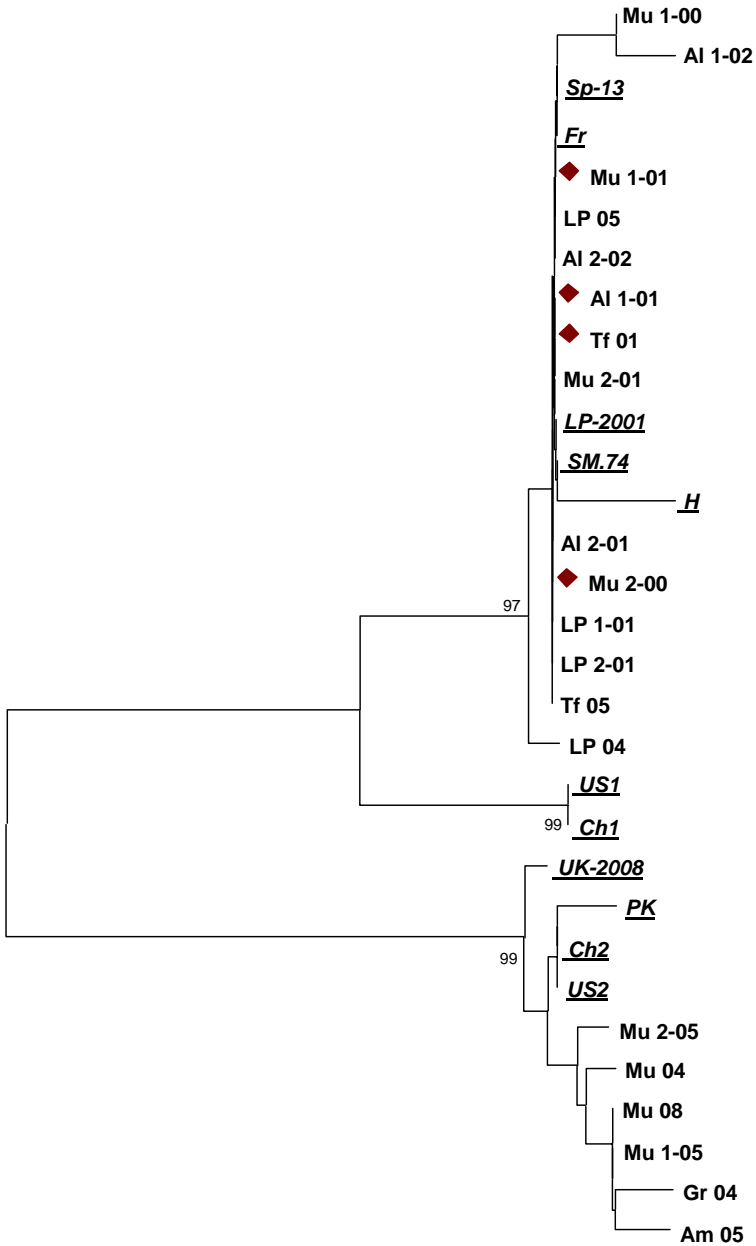


0.005

TGB



—|—  
0.005



0.005

## DISCUSSION

This is the first known report of field surveys of tomato collapse in commercial tomato production fields in Spain. Previous reports (Soler-Aleixandre *et al.*, 2005) only detected the presence of collapse located in the Mazarrón area (the Province of Murcia). The present study shows that wilt symptoms are widely distributed throughout an area, which includes the Murcia Region, Almería, Alicante, Granada, and the Canary Islands.

The results derived from previous studies (IMIDA, 2001) indicate that the isolation of fungal and bacterial pathogens described to have caused tomato wilt is anecdotal, and only involves plants with typical symptoms of these pathogens. In the analysis performed in this study on plants displaying different degrees of wilt symptoms, which had been sampled in greenhouses affected by collapse, PepMV is the only viral organism detected in all of them, while the occurrence of other viruses is always incidental. PepMV has been cited in literature as causal agent of wilt in tomatoes especially in bright sun (Flechter, 2000). In addition, *O. virulentus* is observed consistently, with the highest frequency in root segments of collapsed plants, and is in agreement with the previously mentioned studies. The disease was reproduced under controlled conditions, by the inoculation of healthy tomato plants with *O. virulentus* and PepMV at similar levels as in commercial crops (6.25% in Summer and 56.25% in Winter). Both organisms were detected in all collapsed plants, so all Koch's postulates were fulfilled and it has been demonstrated for the first time that both pathogens, PepMV and *O. virulentus*, are associated with sudden wilt and the collapse symptoms of tomatoes. However, the appearance of wilt symptoms in the infected plants was triggered by a sudden change of daily maximum temperatures over a short period of time (two-four days). During Winter, fluctuations in daily maximum temperatures are frequent, and the temperature can drop to low values, or increase to high values which stress plants during development and expose them to pathogen infection to which plants are more susceptible. During Summer growing season, the maximum temperature range is more stable with no sudden fluctuations, and the higher temperatures after transplanting ensure more favourable conditions for root development and early maturation of fruits. The defect of thermal fluctuations may be the reason that

collapse was not detected during Summer and in greenhouses with additional heating. The variation in the magnitude of wilt incidence across geographical regions and years may reflect differences in environmental conditions and cropping practices among the surveyed areas and over the different growing seasons. The absence of collapse observed by Soler-Alexander *et al.* (2005) in Almería, where PepMV and *O. virulentus* were present, may have been owing to the range of temperature values being uniform in Almería during the period of this study. Nonetheless, we detected collapse in Almería after an unusual cloudy period in April 2005. Furthermore, because these authors did not present the collapse incidence results obtained in the different years that their studies covered, a direct comparison with this study is not possible.

This study presents evidence that temperature plays a major role in the aetiology and severity of collapse. Plant roots and pathogens develop and function under dynamic thermal environmental conditions that change diurnally and seasonally. The expression of virus-related symptoms is known to vary considerably from year to year, depending on the environmental conditions (Spence *et al.*, 2006). Furthermore, PepMV symptoms are highly dependent on the environmental conditions, and decrease with increased temperatures (Jordá *et al.*, 2001; Martínez-Culebras *et al.*, 2002; Spence *et al.*, 2006). PepMV-infected plants are less able to adapt to the additional stress caused by a rapid increase in temperature in the glasshouses, accompanied by strong sunlight, than uninfected plants (Spence *et al.*, 2006).

On the other hand, initially it was thought that the different virus strains induced different symptoms due to the differences observed in the symptoms induced by the isolates of the EU and PE strains on the same host species (van der Vlugt *et al.*, 2000), but isolates belonging to the same strain may also differ greatly in the severity of symptoms they cause in a tomato crop. Severity and nature of symptoms induced in tomato plants differ between isolates, and even within the same genotype (Pagán *et al.*, 2006), as our pathogenicity tests have confirmed when the same PepMV isolate (*Mu 2-00*) infected tomato plants without viral symptoms during the Summer trial, but with a very aggressive symptomatology and the highest level of collapse during the Winter trial. The different behaviour of isolates *Mu 2-00* and *Tf 01* observed in both trials may be related to differences in the replication rates and/or rates of systemic movement

linked to temperature. In this paper, we have determined the partial nucleotide sequence of RdRp, as well as the complete TGB and CP sequences of the 20 PepMV isolates obtained on wilted tomatoes to compare them with other PepMV isolates with a view to better characterising the PepMV isolates associated with the collapse disorder. Both collapse and non-collapse isolates clustered together in the same group in the three regions studied. Collapse isolates belong to the EU, or CH2 strains, and some of them are identical to other isolates in the studied genomic regions with typical PepMV symptoms. These data confirm that the capacity to induce wilt or collapse does not correlate with the genotype, but seems to be a property of the isolate itself and is indicative of the biological diversity within the PepMV population.

Research over the years has established the simultaneous presence of PepMV and *O. virulentus* in wilted plants, which is an important finding in this study, and has implications for tomato wilt management. In Spain, tomato is cultivated intensively by alternating open field crops with protected production. It is possible that such an intensive system could, in part, give rise to both the synergistically occurring co-infection conditions and the development of collapse when specific environmental conditions come about. *Olpidium* spp. has always been considered fungal vectors that cause conspicuous damage to the roots of the host. However, reduced root density between inoculated plants and non-inoculated plants was evident as reported by Campbell & Sim (1994) who observed the browning of roots and reduced development in the stock culture plants inoculated with *O. brassicae*. A reduction in root and shoot growth of 20-50%, and increased respiration of roots, have been attributed to an unidentified *Olpidium* spp. in melons (suspected to be *O. bornovanus*) (Hadar *et al.*, 1992). Similarly, the root systems of infected and non-infected plants resulted in clear developmental differences in this study. The root tissues invaded by *Olpidium* are more sensitive to degradation. The roots observed in this work lack feeder roots, and have a reduced water and nutrient absorption capacity that predisposes the plant to wilting, especially during fruit filling. This perspective is supported in the literature by reports of synergistic interactions among the pathogenic organisms causing wilt, such as *Melon necrotic spot virus* and *Olpidium bornovanus* (de Cara *et al.*, 2008). Collapse was reproduced with both *O. virulentus* cultures used, but was not detected in the *Olpidium*-free subplots. These data not only suggest that *O. virulentus* is involved in the disease, but

provide evidence of differences in the aggressiveness of each *O. virulentus* isolate. In the observation of roots from plants irrigated with the fungal culture A from lettuce, we detected a generally higher grade of root infection than in roots obtained from plants irrigated with the fungal culture B from tomato crops, in coincidence with a significantly higher incidence of collapse in subplots irrigated with culture A in both seasons (12.5% in Summer and 66.6% in Winter season) than in those plants inoculated with culture B (0.0% in Summer and 45.8% in Winter). In our opinion the differences observed in incidence levels of collapse between greenhouses and inside the same crops are associated to differences in viral concentrations and/or fungal colonization in each plant as we observed in those recovery plants. These plants suffered a reversible wilting and both root and EM observation, showed lower quantities of viral particles and *O. virulentus* spores.

Several cultural practices may be adopted to prevent tomato collapse. The widespread use of grafted tomatoes in commercial tomato crops in Spain from 2003, in addition to temperature fluctuations, may account for the decreased incidence levels observed in the last period of the surveys. The main purpose of growing grafted tomatoes is to control soil-borne diseases. Rootstocks resistant to soil pathogens and vascular diseases have been reported as a control solution for other wilt diseases, such as sudden wilt in melon (Edelstein *et al.*, 1999). However, a significant reduction in wilt incidence at one particular time does not necessarily reflect the whole picture. PepMV and *O. virulentus* are two well-established pathogens in the Spanish tomato-producing areas. This fungus is a water-loving, soil-borne type that can be introduced into agricultural soils in a good number of ways as infected debris, blonde peat, or in water used for irrigation (Gomez & Velasco, 1991). The introduction of PepMV into a new culture area may occur by infected seeds or seedlings (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007). This virus is highly infectious and persistent, so the mechanical transmission and infected debris, tools, and common weeds not removed from fields are possible sources of infection and dispersion. These factors provide us a situation in which pathogen populations can still gradually increase in soil and when reached a certain level, grafted plants might be endangered and provide limited control. In addition, differences in environmental conditions can enhance symptom development and cause disease in grafted plants. Thus, the occasional incidence of wilt may be expected, and additional measures for disease control



should be established. The development of an affordable management scheme for tomato collapse is required. An integrated management approach may involve the control of weeds, soil biosolarisation, a strict control of temperature inside the greenhouse, stringent hygienic measures during crop manipulation, and the use of resistant rootstocks, healthy seedlings or disinfected tomato seeds.

## REFERENCES

- Accotto G.P., Navas-Castillo J., Noris E., Moriones E., Louro D., 2000. Typing of Tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 179-86.
- Alfaro-Fernández A., Cebrián M.C., Córdoba-Sellés M.C., Herrera-Vásquez J.A., Jordá C., 2008. First report of the US1 strain of *Pepino mosaic virus* in Tomato in the Canary Islands, Spain. *Plant Disease* **92**, 1590.
- Black R., Seal S., Abubakar A., Nono-Womdim R., Swai I, 1999. Wilt pathogens of Solanaceae in Tanzania: *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, *Pseudomonas corrugata*, and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* **83**, 1070.
- Campbell R.N., 1988. Cultural characteristics and manipulative methods. In: Cooper & Asher (eds.), *Viruses with fungal vectors*, Wellesbourne, U.K: Association of Applied Biologists. pp. 153-65.
- Campbell R.N., 1996. Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 87-108.
- Campbell T.N., Sim S.T., 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radicale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1136-43.
- de Cara M., López V., Córdoba M.C., Santos M., Jordá C., Tello C., 2008. Association of *Olpidium bornovanus* and *Melon necrotic spot virus* with Vine Decline of Melon in Guatemala. *Plant Disease* **92**, 709-13.

- Córdoba M.C., Martínez-Priego L., Jordá C., 2004a. New natural Hosts of *Pepino mosaic virus* in Spain. *Plant Disease* **88**, 906.
- Córdoba M.C., Martínez-Priego L., Saval P., Lacasa A., Jordá, C., 2004b. La relación entre la infección con PepMV (*Pepino mosaic virus*) y la presencia de *Olpidium sp* en raíces, como causa del síndrome del colapso del tomate. *XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*, Gerona, Spain
- Córdoba-Sellés M.C., García-Rández A., Alfaro-Fernández A., Jordá, C., 2007. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* and efficacy of the tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease* **91**, 1250-4.
- Edelstein M., Cohen R., Burger Y., Shriber S., Pivonia S., Shtienberg D., 1999. Integrated management of sudden wilt in melons, caused by *Monosporascus cannonballus*, using grafting and reduced rates of methyl bromide. *Plant Disease* **83**, 1142-5.
- EPPO, 2009. EPPO Alert list viruses. Internet resource: [http://eppo.org/QUARANTINE/Alert\\_List/Viruses/PEPMV0.htm](http://eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/Viruses/PEPMV0.htm).
- Fletcher J., 2000. Pepino mosaic, a new disease of tomatoes. Horticultural Development Council, Fact Sheet, **12**, 6 pp.
- Gómez J., Velasco V., 1991. Presencia de *Olpidium radiale* en los embalses para riego de Almería. *Phytoma-Spain* **33**, 23-7.
- Hadar E., Katan J., Jacoby B., Zamski E., 1992. Effect of biotrophic root fungi *Olpidium* and *Polymyxa* on plant development. *Phytoparasitica* **20**, 227.
- Herrera-Vásquez J.A., Cebrián M.C., Alfaro-Fernández A., Córdoba-Sellés, M.C., Jordá C., 2009. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. *Mycological Research*. doi: [10.1016/j.mycres.2009.01.007](https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.01.007)
- IMIDA, 2001. Internet resource: <http://www.imida.es/docs/memorias>.
- Jones R.A.C., Koenig R., Lesemann D.E., 1980. *Pepino mosaic virus*, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology* **94**, 61-8.

- Jordá C., Lázaro A., Martínez-Culebras P., Abad P., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* on Tomato in Spain. *Plant Disease* **85**, 1292.
- Jordá C., Armengol J., Gisbert J., Osca J.M., Lacasa A., Velásquez B., 2002. El tratamiento con microondas para la desinfección de suelos. *Phytoma-España* **138**, 118-21.
- Kim J.T., Park I.H., Lee H.B., Hahm Y.I., Yu S.H., 2001. Identification of *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum* causing wilt of tomato in Korea. *Plant Pathology Journal* **17**, 222-6.
- Koganezawa H., Inoue H., Sasaya T., 2005. Host specificity and multiplication of eight isolates of *Olpidium brassicae* sensu lato and its related *Olpidium* sp. *Bulletin National Agriculture Research Center Western Region* **4**, 39-59.
- Lacasa A., Guerrero M.M., Hita I., Martínez C., Jordá C., Bielza P., Contreras J., Alcázar A., Cano A., 2003. Implicaciones de los abejorros (*Bombus* spp.) en la dispersión del virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*) en cultivos de tomate. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **29**, 393-403.
- Larkin R.P., Fravel D.R., 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. *Plant Disease* **82**, 1022-8.
- Louro D., Accotto G.P., Vaira A.M., 2000. Occurrence and Diagnosis of Tomato chlorosis virus in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 589-92.
- Martínez-Culebras P.V., Lázaro A., Abad P., Jordá C., 2002. A RT-PCR assay combined with RFLP analysis for detection and differentiation of isolates of *Pepino mosaic virus* (PepMV) from tomato. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 887-92.
- Pagan I., Córdoba-Sellés M.C., Martínez-Priego L., Fraile A., Malpica J.M., Jordá C., García-Arenal F., 2006. Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology* **96**, 274-9.

- Pospieszny H., Borodynko N., Obrepalska-Stepłowska A., Hasiów B., 2007. The First Report of Tomato torrado virus in Poland. *Plant Disease* **94**, 1364.
- Sasaya T., Koganezawa H., 2006. Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of *Mirafiori lettuce big-vein virus* and *Tobacco stunt virus*, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. *Journal of General Plant Pathology* **72**, 20-5.
- Soler-Aleixandre S., López C., Díez M.J., Pérez de Castro A., Nuez F., 2005. Association of *Pepino mosaic virus* with Tomato Collapse. *Journal of Phytopathology* **153**, 464-9.
- Spence N.J., Basham J., Mumford R.A., Hayman G., Edmondson R., Jones D.R., 2006. Effect of *Pepino mosaic virus* on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology* **55**, 596-606.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-82.
- Vaira A.M., Accotto G.P., Vecchiati M., Bragaloni M., 2002. Tomato infectious chlorosis virus causes leaf yellowing and reddening of tomato in Italy. *Phytoparasitica* **30**, 290-4.
- van der Vlugt R.A.A., Stijger C.C.M.M., Verhoeven J.Th.J., Lesemann D.E., 2000. First Report of *Pepino mosaic virus* on Tomato. *Plant Disease* **84**, 103.
- van der Vlugt R.A.A., Cuperus C., Vink J., Stijger C.C.M.M., Lesemann D.E., Verhoeven J.Th.J., Roenhorst J.W., 2002. Identification and characterization of *Pepino mosaic potexvirus* in tomato. *EPPO Bulletin* **32**, 503.
- Villemson S., Khunt V., Yarvekyul'g R.L.V., 2003. Pepino mosaic virus- a threat to vegetable crops. *Zashchita i Karantin Rastenic* **11**, 37-40.
- Wright D., Mumford R., 1999. *Pepino mosaic potexvirus (PepMV)*. *First records in tomato in United Kingdom*. Plant Disease Notice No. 89. York, UK: Central Science Laboratory.

## Capítulo 6

---

**Necrosis.**



# Capítulo 6

## ***Characterisation of distinct Spanish isolates of Pepino mosaic virus causing necrosis in tomato***

**M.C. Córdoba-Sellés, M. Juárez, J.A. Herrera-Vásquez, M.C. Cebrián, A. Alfaro-Fernández, and C. Jordá Gutiérrez**

Submitted to *Plant Pathology* (2009)

### **ABSTRACT**

A severe disease of greenhouse-grown tomato in Spain was characterised by expanding necrotic patches on stems, leaves and green fruits or by expanding necrotic spots on the leaves of chlorotic tomato plants. Two strains of *Pepino mosaic virus* (PepMV) were identified as the causal agents of necrosis on the basis of host range and symptomatology. Phylogenetic analysis, based on two complete regions of the genomes; the triple gene block (TGB) and the coat protein gene (CP); and a portion of the polymerase (RdRp) gene, revealed that Spanish necrotic isolates share high nucleotide sequence identity with isolates of the EU and CH2 genotypes. This is the first report to describe two necrotic types of PepMV in Spain.

**Keywords:** host range, genotype, PepMV, phylogeny, symptomatology, *Solanum lycopersicum*, Spain.

## INTRODUCTION

*Pepino mosaic virus*, a member of the *Potexvirus* genus and the family *Flexiviridae*, was found for the first time in 1974 in Peru on *Solanum muricatum* Ait. (Jones *et al.*, 1980). Only a few years after its first discovery on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the Netherlands in 1999 (van der Vlugt *et al.*, 2000), the pepino mosaic disease has become widespread in greenhouse tomato production areas in Europe (Jorda *et al.*, 2001; Mumford & Metcalfe 2001; Roggero *et al.*, 2001; Cotillon *et al.*, 2002; Pospieszny & Borodynko, 2006; Hanssen *et al.*, 2008), and the virus has proved to be a very dangerous pathogen for tomato. This virus has also been detected in tomato crops in North America (French *et al.*, 2001; Maroon-Lango *et al.*, 2005), South America (Soler *et al.*, 2002; Ling, 2007), and Asia (Zhang *et al.*, 2003). Five genotypes of PepMV have been described (Hanssen *et al.*, 2008). The EU genotype was used to group the European tomato isolates that show a high genome nucleotide sequence identity of ca. 99% (Mumford & Metcalfe, 2001; Aguilar *et al.*, 2002; Cotillon *et al.*, 2002; Verhoeven *et al.*, 2003). The PE genotype was used to represent the originally isolate found on pepino and wild *Lycopersicon* spp, (van der Vlugt, 2009). More recently, two distinct PepMV isolates from tomato have been reported in the USA (Maroon-Lango *et al.*, 2005), and represent the US1 and US2 genotypes which share ca. 80% of nucleotide sequence identity with each other and with the EU genotype. The CH2 genotype was derived from an isolate from infected tomato seed in Chile which shares 90% of nucleotide sequence identity with US2, but only 80% of similarity to the EU or US1 genotypes (Ling, 2007). The CH2 and US2 genotypes were the same in the 5' and 3' portions of the genome, but the central one-third of the genome shared only 80% of nucleotide sequence identity. Whether this represents a true recombination event in the US2 isolate or is an artefact from the equence assembly process remains unclear. Thus, CH2 is considered a distinct genotype (Ling, 2007) and currently four different strains of PepMV isolates are recognized: the Peruvian (PE), the EU-tomato, the US1/CH1 and the CH2 strain (van der Vlugt, 2009). In 2005, the



population structure of PepMV in Spain was analysed (Pagan *et al.*, 2006). The EU genotype was found to be the most prevalent genotype in Spain. In addition, the isolates belonging to the PE and US2 genotypes were detected, as well as mixed infection and recombinant isolates. More recently, the US1 genotype was detected in the Canary Islands (Alfaro-Fernández *et al.*, 2008).

In the last four years, tomato plants with severe necrotic leaf symptoms were observed in the area of Alicante in south-east Spain. Tomato plants showed severe chlorosis with scattered necrotic interveinal spots that eventually coalesced and became necrotic patches. However a more severe necrosis in tomato plants was detected. The symptoms appeared in the margin of the leaflets as brown necrotic areas surrounded by a light yellow line. The necrotic area progressed from the margin along the leaf to the midrib and the leaf rachis. The affected plants had a burn-like appearance due to the browning of the leaf margins which looked burned and dry. Necrotic stripes along the leaf rachis and necrotic patches on the stem are the typical symptoms of the disease. Generally, symptoms appear on the medium part of the plant, and young leaves often appear symptomless. Green fruits from the affected plants develop necrotic patches, and are sometimes depressed. This syndrome developed into a severe necrosis and dry of complete plants, resulting in serious economic damage such as yield loss and deterioration in the quality of commercial tomato fruits.

Primary diagnostics always reveal the presence of PepMV in diseased plants. In Spain, infection with PepMV in tomatoes has been accompanied by several symptoms including leaf distortion, chlorosis, dark green or bright yellow mosaic, bubbling of the leaf surface, green striations on the stem and sepals, and marbling of fruits (Jordá *et al.*, 2001). To date, no necrotic isolate of PepMV has been reported in Spain. However a Canadian isolate, classified as an EU isolate, has been described as causing necrotic symptoms on tomato and systemic necrosis on *Datura metel* (Verhoeven *et al.*, 2003). More recently in 2007 in greenhouses of Poland, three PepMV isolates of the CH2 genotype were found, which induced severe necrosis on tomato (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2009).

In this paper, we describe the first detection and identification in Spain of PepMV necrotic isolates, and the characterisation of these isolates in terms of differential host range, symptomatology and nucleotide sequences of the full-

length coat protein (CP), the triple gene block (TGB) and a part of the RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp).

## MATERIALS AND METHODS

### Field surveys and sample collection

Surveys were conducted to collect tomato plants with necrotic symptoms from 2005 to 2008 in tomato crops at the main growing locations in south-east Spain and in the Canary Islands in the Atlantic (Figure 6.1). We also included two tomato cherry plants showing veinal necrosis and yellowing of the central part of leaves collected from one greenhouse in Granada in 2005. Sixty-two plants showing severe necrosis were collected. Sampled tomato plants belonged to 8 different commercial varieties (Boludo, Carlota, Silver, Magnitud, Savoid, Velasco, Mariana and Doroty) and to 5 other unknown varieties. All the samples were kept at 4°C, and were either mechanically inoculated as soon as possible to test plants or tested by either direct antibody-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) or reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in 2-5 days, while the stock material was stored at -80°C.

### Virus detection by ELISA

Serological analyses were carried out against different viruses commonly found to infect tomato crops in Spain which generally produce necrosis in tomato plants, such as: *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco necrosis virus* (TNV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Loewe Biochemica); and PepMV, (DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Tissue samples (0.15 g) were homogenised in sample extraction buffer (1:20 w:v). DAS-ELISA was carried out in paired wells using 100 µl of the extracts obtained following the manufacturer's instructions. Each plate included a healthy tomato tissue sample and an extraction buffer as negative controls. The tissue known to be positive for a particular virus was used as the positive control. ELISA reactions were

measured spectrophotometrically at 405 nm using a Titertek Multiskan immunoplate reader (Flow Laboratories). Samples were considered positive when the mean absorbance of duplicate wells exceeded twice the mean absorbance of the corresponding healthy controls.



**Figure 6.1.** Map of Spain showing the location of Regions where field-grown tomato crops were surveyed for necrotic symptoms in the growing seasons from 2005 to 2008. Regions: Al, Alicante; CI, Canary Islands; Gr, Granada; Mu, Murcia; Am, Almería.

### ***Virus detection by molecular assays***

Total RNA was extracted from 0.1g of fresh leaf tissue from infected plants using the silica capture protocol (MacKenzie *et al.*, 1997). The extracted RNAs were stored at -80°C until use. The primers used in this work are described in Table 6.1. RT-PCR amplifications of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) and *Tomato torrado virus* (ToTV) were conducted as previously described by Louro *et al.* (2000) and Pospieszny *et al.* (2007), respectively.

In order to identify the specific genotype of PepMV in the infected samples, a multiplex RT-PCR assay was performed as described by Alfaro-

Fernández *et al.* (2009). Briefly, this method identifies the PepMV genotype present in the infected sample among the five determined genotypes. It uses a mixture of six primers that amplify a part of the RNA-dependent RNA polymerase gene of PepMV, and an internal control followed by the digestion of the amplicons with the *SacI* enzyme. Each PepMV sample from an individual plant was considered a separate isolate and was codified by a two-letter code to indicate geographic origin (Al: Alicante, Mu: Murcia, CI: Canary Islands, Am: Almería, and Gr: Granada), followed by an ordinal if more than one sample was collected, and the collection year.

**Table 6.1.** The primers used for identification and characterisation

Virus	Primers	Nucleotide sequence (5'→3') <sup>c</sup>	Amplicon size (nt)	Reference
ToCV	ToCV172 <sup>a</sup>	GCTTCGAAACTCCGTCTTG	439	Louro <i>et al.</i> (2000)
	ToCV610 <sup>b</sup>	TGTCGAAAGTACCGCCACC		
ToTV	TR1F <sup>a</sup>	CAATGTGCCAAAGATGAGCG	573	Pospieszny <i>et al.</i> (2007)
	TR1R <sup>b</sup>	ACTCCCGTGTCTATGTTTTTC		
PepMV	Pep3 <sup>a</sup>	ATGAGGTTGTCTGGTGAA	624	Pagán <i>et al.</i> (2006)
	Pep4 <sup>b</sup>	AATCCCGTGCACTACTAT		
	PepTGB-D <sup>a</sup>	GATGAAGCTGARCAACAYTTC	1434	Alfaro-Fernández <i>et al.</i> (2008)
	PepTGB-R <sup>b</sup>	GGAGCTGTATTTRGGATTTGA		
	PepCP-D <sup>a</sup>	CACACCAGAAGTGCTTAAAGCA	845	Pagán <i>et al.</i> (2006)
	PepCP-R <sup>b</sup>	CTCTGATTAAGTTTCGAGTG		
	PepMV-DEP <sup>c</sup>	TCAATGTTTCATCTTCTAGCAGTC	980	Alfaro-Fernández <i>et al.</i> (2009)
	PepMV-D1 <sup>c</sup>	ACAGCACAACCTACCATATCTCACAAT	703	
	PepMV-D2 <sup>c</sup>	ACTATCCGTCTTCTCTGCCATGT	549	
	PepMV-R <sup>d</sup>	ATAGTACTCAGGTTGTTACTTCG		

<sup>a</sup> Specific forward primer

<sup>b</sup> Specific reverse primer

<sup>c</sup> Species-specific forward primer

<sup>d</sup> Common reverse primer

<sup>e</sup> R= A or G; Y= C or T

RT-PCR analyses were performed using the SuperScript III One Step RT-PCR system with the Platinum Taq DNA polymerase kit (Invitrogen Life Technologies) according to the instructions provided with the enzyme. All the amplification reactions were carried out in a Mastercycler Personal Thermocycler (Eppendorf). The products of the reaction were separated in 1.2% agarose gels in 1X TAE buffer. Gels were stained with EtBr solution and analysed under UV light.

With all the surveyed samples, non isotopic dot-blot hybridisation was performed as previously described by Sánchez-Navarro *et al.* (1998) in order to detect the *Parietaria mottle virus* (PMoV) using a dig-RNA probe complementary to a fragment of the coat protein of PMoV provided by Dr. Pallás (IBMCP-UPV, Valencia, Spain). One microlitre of total RNA was firstly denatured with formaldehyde and then directly applied onto a nylon membrane.

### **Electron Microscopy**

Crude sap from infected tomato leaves, were prepared for examination with the electron microscope by grinding in 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, at a ratio of approximately 1 part tissue to 5 parts buffer. A 0.4% Formvard-coated copper grid was placed on a drop of leaf extract for 1 min, followed by 1 min on a drop of 2% potassium phosphotungstate (pH 7.2), and finally on a drop of water during 1 min. When dried, the stained grids were observed under an electron microscope Philips EM 201 (Philips Company). The length of the viral particles observed was measured.

### **Experimental host range**

Two PepMV isolates obtained from field plants only infected by this virus and showing different types of necrotic symptoms were tested for their experimental host range. The first isolate, designated *Al-2-05*, was isolated in 2005 in Muchamiel in the province of Alicante. One isolate, designated *Al-1-07*, was obtained in 2007 from a greenhouse in Font-Calent in the same province. Infected leaf tissue was ground with 1:10 (w:v) of inoculation buffer (0.01 M sodium-potassium phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.5% sodium bisulphite

and 0.5% DIECA). The resulting sap extract was rubbed onto host leaves that had been previously dusted with carborundum powder. To compare the host range and symptoms, at least three adequate-age plants of: *Capsicum annuum*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. tabacum* cv Xanthi, *Solanum lycopersicum* and *S. melongena* were mechanically inoculated with each isolate. One healthy plant of each species was mechanically inoculated with buffer only, and were considered negative controls. Experiments were conducted at least three times. Plants were maintained under controlled conditions in a growth chamber (28-28°C, 54% relative humidity and long day period), and monitored weekly for up to 8 weeks for symptom development. The presence of the virus in the indicator plants was evaluated by DAS-ELISA or RT-PCR as described above.

### **Genetic characterisation of necrotic isolates**

Genetic characterisation of the necrotic isolates of PepMV was done by determining the nucleotide (nt) sequence of three genomic regions: a part of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, the entire triple-gene block (TGB) and the capsid protein (CP) genes. Initial attempts by the direct sequencing of the RT-PCR products did not produce sufficient high-quality sequence data to make an accurate assessment of the genetic relationship, particularly for those isolates in which a mixed infection of different genotypes may have occurred. We selected only the single infections detected by multiplex RT-PCR in an attempt to undertake the molecular characterisation of 26 selected PepMV isolates.

Total RNA preparations, which had been previously obtained, were used in the RT-PCR carried out in a single step using the SuperScript™ III One step RT-PCR system with Platinum *Taq* DNA polymerase kit (Invitrogen Life Technologies) and the appropriate primers listed in Table 6.1. The partial RdRp gene was amplified using primers Pep3 and Pep4; the complete TGB and CP genes were amplified with PepTGB-D and PepTGB-R and with primers PepCP-D and PepCP-R, respectively. Total RNAs were denatured by heating at 65°C for 5 min and chilling on ice. The reaction mix included 1x primers mix (at a final concentration of 0.5 µM for each primer), 1x reaction buffer (containing 0.4 mM dNTPs and 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>), 1x polyvinylpyrrolidone-40 (PVP-40) (Sigma-

Aldrich), 0.1 µl RNaseOUT™ (Invitrogen Life Technologies) and 0.4 µl of the enzyme mix in a final reaction volume of 10 µl. The RT-PCR program consisted of an initial incubation at 50°C for 30 min followed by 2 min at 94°C and 40 cycles of 94°C for 15 s, 55°C for 30 s, and 68°C for 1 min. A final extension of 68°C for 10 min was added at the end of the 40 cycles to finish the incomplete PCR fragments. For direct sequencing, PCR products were purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. PCR fragments were sequenced in both strands using an ABI Prism 377 DNA Sequencer. The sequenced fragments were submitted to the NCBI database.

### **Phylogenetic analysis**

The data obtained in the sequencing of the 26 Spanish PepMV necrotic isolates were compared with those available in the NCBI database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nih.gov/>) (Altschul *et al.*, 1997). Multiple alignments of the obtained sequences and the phylogeny analysis of the studied isolates were performed on the basis of the 3 fragments sequences using the MEGA 4.0 software (Tamura *et al.*, 2007) with neighbour-joining algorithm and a bootstrap value of 1000 replicates. An identity/similarity matrix of the amino acid-analysed sequences was calculated using the Matrix Global Alignment Tool software (MatGAT 2.02) (<http://bitincka.com/ledion/matgat>). Apart from the sequences of necrotic isolates, for this analysis we also used the sequences of the PepMV isolates deposited in the NCBI database, which had been obtained in tomato from Spain (Sp-13, AF484251), Poland (PK, EF408821), France (AJ438767), the United States (US1, AY509926; US2, AY509927), and Chile (CH1, DQ000984; CH2, DQ000985), plus the isolates from *Solanum muricatum* (SM74, AM109896) and *Lycopersicum peruvianum* (LP-01, AJ606361) from Peru, an unpublished necrotic isolate from the Netherlands (DB1, FJ940224) and the necrotic isolate from Poland (Pa, FJ612601).

## RESULTS

### **Origin of the samples and disease symptoms**

Tomato plants showing very typical necrotic symptoms on leaves and/or fruits were found in Alicante, Murcia, Almeria, Granada and the Canary Islands in Spain. Diseased plants showed two different types of necrotic symptoms. Plants from fields with severe tomato necrosis disease showed extensive necrosis on the leaves, which progressed from the leaflet apex or margin to the rachis (Fig. 6.2.a) and looked burned, resulting in a completely dry leaf, necrotic stripes on the rachis (Fig. 6.2.d) and necrotic silver patches on the stem. A noticeable early abscission of green fruits was registered. These fruits presented brown areas that did not disappear during ripening (Fig. 6.2.b), and necrotic stripes on the sepals (Fig. 6.2.c). We named this symptomatology “Brown Necrosis”. In other fields, but only in 2005, tomato plants showing chlorosis and localised interveinal necrosis on leaves were found sporadically (Fig. 6.2.e). Necrotic stripes on the rachis or stems were not detected. We named this symptomatology “Chlorotic Necrosis”. Tomato cherry plants from greenhouses in Granada showing necrosis of the midrib, and tomato plants with a purplish appearance, apical necrosis and fruit cracking from the Canary Islands were also included in the study.

### ***Virus detected during the surveys***

We analysed 12 tomato samples from the Canary Islands and 50 tomato samples from areas of mainland Spain during the surveys. The results of these surveys are summarized in Table 6.2. AMV, CMV, PVX, TNV, TBSV or PMoV were not detected in any of the samples. In 2005, the incidence of symptomatic plants was high in Alicante and affected the cultivar Carlota, whereas symptomatic plants were rarely found in the Murcia Region and in the Canary Islands. All the samples reacted positively to the PepMV antiserum. PVY and ToCV were detected in 4 and 3 samples, respectively (Table 6.2). Detection of PepMV in plant samples was also done by multiplex RT-PCR.





**Figure 6.2.** Characteristic necrotic symptomatology caused by PepMV on tomato. The so-called “Brown necrosis” is characterized by (a) extensive necrosis on the leaves progressing from the leaf margin to the rachis which looks burned and results in a completely dry leaf, (b) brown necrotic patches on green fruits, (c) appearance of necrotic stripes on the fruit sepals, and (d) on the rachis of the leaves. “Chlorotic necrosis” presents (e) chlorotic leaves with interveinal necrosis.

The EU genotype was only detected in single infections in samples showing the symptoms of “Chlorotic Necrosis” collected in January in both Alicante and the Canary Islands. Afterward, only “Brown Necrosis” was detected, and the CH2 genotype was prevalent in all the fields surveyed in October and November either in single infections (86.6%) or mixed infections with the EU genotype (13.3%). All the samples with veinal necrosis from Granada were infected with the CH2 genotype.

In October 2006, “Brown Necrotic” symptoms were detected in 20% of the tomato cv. Boludo grown in commercial greenhouses in Cox (Alicante). A similar situation was detected in the commercial greenhouses we visited in Mazarrón (the Murcia Region). Necrotic symptoms were observed in 30% of the tomato plants. Unfortunately we could not analyse any sample from these locations. Only five samples of tomato cv. Carlota from a location in Rebolledo (Alicante) were analysed in 2006. Four samples showing “Brown Necrosis”, and one plant with bubbling and pointed leaflets, but no necrosis, were included in the assays. In all the necrotic samples, the mixed infection between the EU and CH2 strains was detected. The EU genotype was only detected in a single infection in one non necrotic sample, and infection with ToMV was detected in one of the necrotic samples. In May 2007 during the early growing season, and in the same location in Alicante (Rebolledo), 100% of the necrotic plants sampled presented infection with isolates of PepMV belonging to the CH2 genotype. Four months later during the late growing season, the necrotic symptoms had generalised in the same greenhouses. A single infection of the CH2 isolates and the EU+CH2 mixed infections was detected.

<sup>a</sup> Al: Alicante; Mu: Murcia, CI: Canary Islands; Am: Almería; Gr: Granada.

<sup>b</sup> Collection date: month-year

<sup>c</sup> na: not available

<sup>d</sup> B: bubbling; Bp: brown patches in fruit, sometimes depressed; C: chlorosis; Df: Deformed fruits; IN: interveinal necrosis; IR: irregular ripening; Ma: marbling; Na: apex necrosis; Np: necrotic patches of brown color on leaves which look burned and dry; Ns: necrotic stripes along the rachis; Nss: Necrotic stripes in sepals; Nv: vein necrosis; P: purplish-brown sunken leaf lesions; PS: brown patches on stem; Sl: spindly leaves; Sp: silver patches in stems and petioles; Y: yellowing

<sup>e</sup> The virus identified in the samples and the number of samples infected are presented with a number in parentheses.

<sup>f</sup> The PepMV genotype detected by multiplex RT-PCR in the samples and the number of samples that had the genotype are presented with a number in parentheses.

**Table 6.2.** Characteristics of directed surveys to collect symptomatic plants in 2005-08.

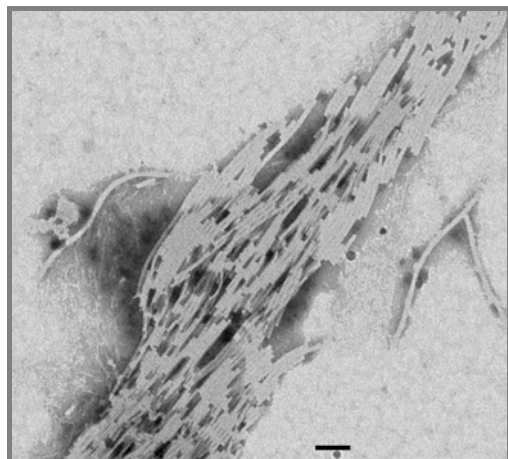
Location <sup>a</sup>	Date <sup>b</sup>	Cultivar <sup>c</sup>	Symptoms <sup>d</sup>	Samples infection <sup>e</sup>	Genotype <sup>f</sup>
Muchamiel (AL)	1-05	Boludo	B, C, IN	PepMV+PVY (3)	EU (3)
		Silver	B, C, IN	PepMV (2), PVY (1)	EU (2)
Bacarot (AL)	10-05	na	IN, Np, Ns	PepMV (2)	CH2 (2)
		na	IN, Np	PepMV (1)	CH2 (1)
		na	IN, Np, IR, Bp	PepMV (1)	CH2 (1)
		na	IN, Np, IR, Bp, Ns	PepMV (2), ToCV (1)	CH2 (2)
		na	IN, Np, Bp	PepMV + ToCV (1)	CH2 (1)
Font-Calent (AL)	11-05	Boludo	IR, Bp	PepMV (1)	CH2 (1)
		Carlota	IR, Bp, Ma	PepMV (1)	EU+CH2 (1)
		Carlota	Sp, IN	PepMV (1)	CH2 (1)
		Carlota	PS, Bp, Ns, Np	PepMV (3)	CH2 (3)
		Carlota	PS, Np	PepMV (1)	EU+CH2 (1)
Rebolledo (AL)	10-06	Carlota	B, SI	PepMV (1)	EU (1)
		Carlota	IN, Np, Df, Nss, Bp	PepMV (1)	EU+ CH2 (1)
		Carlota	Np, PS, B, Ns, Nss, IR, Bp	PepMV (3), ToMV (1)	EU+ CH2 (3)
	5-07	Carlota	Ns, IN, Np, PS, Nss	PepMV (2)	CH2 (2)
		Carlota	Ns, IN, Np, PS, Nss, Bp, IR	PepMV (2)	CH2 (2)
Alicante (AL)	9-07	Carlota	IN, Np	PepMV (1)	CH2 (1)
		Carlota	IN, Np	PepMV (1)	EU+ CH2 (1)
Mazarron (Mu)	11-05	na	PS, IN, B, IR, Bp	PepMV(3), ToCV (1)	CH2 (1)
	11-07	Magnitud	C, IN	PepMV (1)	EU (1)
	12-07	Savoid	B, Sp, IN	PepMV (4)	EU+CH2 (4)
		Magnitud	IN, Np	PepMV (2)	CH2 (2)
Calnegre (Mu)	4-08	Magnitud	IN, Sp	PepMV (2)	CH2 (2)
		Velasco	PS, IN	PepMV (2)	CH2 (2)
		Velasco	Ns, IN, Bp	PepMV (1)	EU+CH2 (1)
Granada (Gr)	1-05	Cherry	Y, B, Nv	PepMV (2)	CH2 (2)
Almeria (Am)	11-07	na	Ns, IN, Np, PS	PepMV (2)	CH2 (2)
		na	IN	PepMV+ToCV (1)	CH2 (1)
Canary (CI)	1-05	na	IR, IN, SI	PepMV (2)	EU (2)
La Aldea (CI)	2-08	Mariana	Y, P, IN, Na	TSWV (4)	-
Vecindario (CI)	2-08	Boludo	Df, PS, IN, Np, IR	PepMV (2)	CH2 (2)
Agiüimes (CI)	3-08	Doroty	IN	PepMV+ToTV + ToCV (1)	EU+CH2 (1)
		Doroty	IN	PepMV+TSWV (2)	CH2 (2)
		Doroty	P, IN, SI, Np, Df	PepMV+TSWV (1)	CH2 (1)

In the Murcia Region, the frequency of single CH2-infected plants in the analysed population was 44.4% in both single and mixed infection with the EU genotype. A sample with symptoms of “Chlorotic Necrosis” collected in November was detected during the survey. This sample was infected with the EU genotype that represented the 11,1% of the population. Only the CH2 genotype was detected among the symptomatic plants from Almeria.

By the end of the early growing season of 2008 (February to April), symptoms had appeared in the Murcia Region and the Canary Islands. Unlike 2007, the CH2 single infections in the Murcia Region were more frequent than the mixed infections (66.6% versus 33.3%). Four chlorotic samples showing necrotic spots and apical necrosis from the Canary Islands were negative to PepMV, but positive to the presence of TSWV. In this region, TSWV was detected in 3 other plants which presented mixed infections with the PepMV CH2 genotype, and mixed infections of three viruses (ToCV, ToTV and PepMV EU+CH2) were also detected. Single infections by the CH2 genotype were prevalent in the Canary Islands.

### Electron Microscopy

A high concentration of flexuous particles of approximately 510 nm in length was observed in the leaf sap extracts from the original samples. The majority of particles occurred in small aggregates of filaments in parallel arrays in the cytoplasm (Fig. 6.3).



**Figure 6.3.** Electron micrographs of aggregated particles of PepMV in crude extracts of infected tomatoes negatively stained with phosphotungstate. Bar=100 nm.

### Host range and symptoms

When inoculated on tomato, both necrotic PepMV isolates reproduced necrotic symptoms. However, isolate *Al-1-07* caused more severe symptoms in the tomato leaflets and stems than the *Al-2-05* isolate. Most of the mechanically inoculated plant species reacted differently to the necrotic PepMV isolates (Table 6.3). The main differences appeared in *Nicotiana occidentalis*, *Solanum melongena*, and *Capsicum annuum* which were not infected by *Al-2-05*, unlike *Al-1-07*. Overall, the *Al-2-05* isolate caused mild symptoms or did not produce symptoms at all, while *Al-1-07* induced severe necrotic symptoms on leaves, veins and the stem of infected plants. It was possible to re-isolate the virus from the inoculated tomato plants, and the corresponding genotypes were verified by multiplex RT-PCR.

**Table 6.3.** Host range and symptoms caused by Spanish necrotic isolates of PepMV on different plant species

Plants	Symptoms <sup>a</sup>	
	<i>Al-2-05</i>	<i>Al-1-07</i>
<i>Capsicum annuum</i>	-	s
<i>Datura stramonium</i>	M, B	Np, M, B
<i>Nicotiana benthamiana</i>	M, B	Np, M, B
<i>N. glutinosa</i>	-	-
<i>N. occidentalis</i>	Np, M	Nv, Np, Nst, M, B
<i>N. rustica</i>	s	s
<i>N. tabacum</i> cv. <b>Xanthi nc</b>	-	-
<i>Solanum lycopersicum</i>	Ns	LD, B, N, Ys
<i>Solanum melongena</i>	s	MM

<sup>a</sup> **B**, bubbling; **M**, mosaic; **MM**, mild mosaic; **LD**, leaf deformations; **IY**, interveinal yellowing; **Nv**, vein necrosis; **Nst**, necrotic stripes on sepals; **Np**, necrotic patches on leaves; **Ns**, necrotic spots on leaves; **N**, severe necrosis; **Ys**, isolated yellow spots; **s**, symptomless; **-**, no infection.

### Genetic diversity and phylogenetic analysis

To assess the diversity among the Spanish necrotic isolates of PepMV, the nucleotide sequences coding for part of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, and the entire triple-gene block (TGB) and capsid protein (CP) genes of the 26 isolates, were obtained. For 8 isolates, the chromatograms revealed numerous double peaks in the fragments sequenced, suggesting that a mixed infection by different virus variants had occurred in these samples. This hypothesis was corroborated by using the multiplex-RT-PCR since double infections EU+CH2 were amplified. Thus these samples were not further used.

Six isolates showed the same nucleotide sequence in all the genomic regions analysed as another six isolates: *Al-1-05* and *Al-7-05*, *Al-4-05* and *Al-8-05*, *Al-6-05* and *Al-9-05*, *Am-07* and *Am-3-07*, *Mu-07* and *Mu-1-07*, *Mu-4-08* and *Mu-9-08*. Only one isolate of each pair was included in the phylogenetic study. Twenty sequences of the representative necrotic isolates obtained in this study have been submitted to the NCBI database under accession numbers GU130078 to GU130097 (Table 6.4). Sequences were aligned and compared with the sequences available in the molecular databases. The neighbour-joining tree (Fig. 6.4) revealed that the necrotic PepMV isolates from Spain grouped into two of the four strains defined by van der Vlugt (2009) in all three genomic regions studied. Most of the isolates clustered in the CH2 strain, and only the three isolates obtained early in 2005 (*Al-1-05*, *Al-2-05* and *CI-05*) clustered in the EU strain. The EU cluster group was basal to all the groups in the three genomic regions analysed. In general, all the clusters were confidently supported by the bootstrap technique (Fig. 6.4).

**Table 6.4** . Isolates of PepMV analysed in this work

Location <sup>a</sup>	Date <sup>b</sup>	Isolate	Symptoms <sup>c</sup>	Genotype	Accession no <sup>d</sup> .
Muchamiel (AL)	1-05	<b>Al-1-05</b>	B, C, IN	EU	GU130078 <sup>(u)</sup>
		<b>Al-2-05</b>	B, C, IN	EU	GU130079
		<b>Al-7-05</b>	B, C, IN	EU	<sup>(u)</sup>
Bacarot (AL)	10-05	<b>Al-3-05</b>	IN, Np, Ns	CH2	GU130082
		<b>Al-4-05</b>	IN, Np, IR, Bp, Ns	CH2	GU130083 <sup>(v)</sup>
		<b>Al-8-05</b>	IN, Np, IR, Bp, Ns	CH2	<sup>(v)</sup>
Font-Calent (AL)	11-05	<b>Al-5-05</b>	IR, Bp	CH2	GU130084
		<b>Al-6-05</b>	PS, Bp, Ns, Np	CH2	GU130085 <sup>(w)</sup>
		<b>Al-9-05</b>	PS, Bp, Ns, Np	CH2	<sup>(w)</sup>
Rebolledo (AL)	10-06	<b>Al-06</b>	IN, Np, Df, Nss, Bp	CH2	GU130087
		<b>Al-2-06</b>	Np, PS, B, Ns, Nss, IR, Bp	CH2	GU130096
	5-07	<b>Al-1-07</b>	Ns, IN, Np, PS, Nss	CH2	GU130088
Alicante (AL)	9-07	<b>Al-2-07</b>	Np, IN	CH2	GU130089
Granada (Gr)	1-05	<b>Gr-05</b>	Y, B, Nv	CH2	GU130081
Mazarron (Mu)	11-05	<b>Mu-05</b>	PS, IN, B, IR, Bp	CH2	GU130086
		<b>Mu-4-05</b>	PS, IN, B, IR, Bp	CH2	GU130095
	12-07	<b>Mu-07</b>	IN, Sp	CH2	GU130091 <sup>(x)</sup>
		<b>Mu-1-07</b>	IN, Sp	CH2	<sup>(x)</sup>
Calnegre (Mu)	4-08	<b>Mu-4-08</b>	PS, IN	CH2	GU130094 <sup>(y)</sup>
		<b>Mu-9-08</b>	PS, IN	CH2	<sup>(y)</sup>
Almeria (Am)	11-07	<b>Am-07</b>	Ns, IN, Np, PS	CH2	GU130090 <sup>(z)</sup>
		<b>Am-3-07</b>	Ns, IN, Np, PS	CH2	<sup>(z)</sup>
Canary (CI)	1-05	<b>CI-05</b>	IR, IN, Sl	EU	GU130080
Vecindario (CI)	2-08	<b>CI-1-08</b>	Df, PS, IN, Np, IR	CH2	GU130092
Agüimes (CI)	3-08	<b>CI-2-08</b>	IN	CH2	GU130093
		<b>CI-3-08</b>	P, IN, Sl, Np, Df	CH2	GU130097

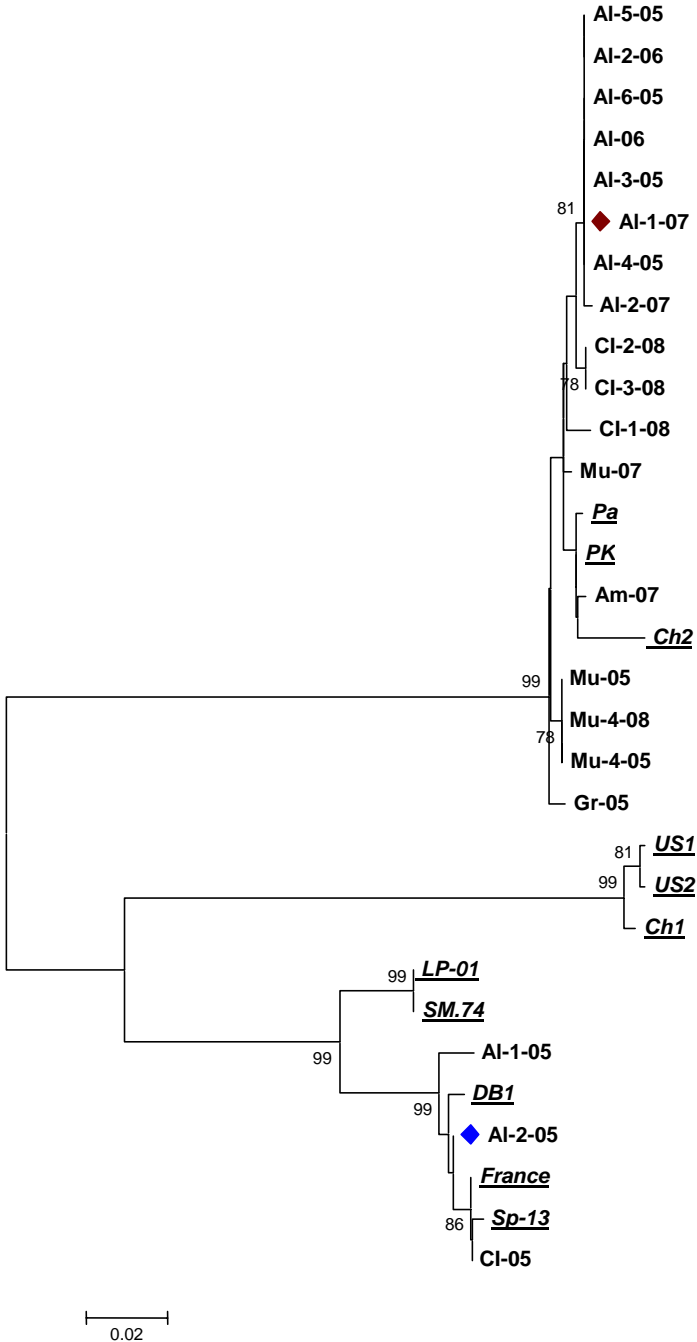
<sup>a</sup> Al: Alicante; Mu: Murcia , CI: Canary Islands; Am: Almería; Gr: Granada.

<sup>b</sup> Collection date: month-year

<sup>c</sup> B: bubbling; Bp: brown patches in fruit, sometimes depressed; C: chlorosis; Df: Deformed fruits; IN: interveinal necrosis; IR: irregular ripening; Ma: marbling; Na: apex necrosis; Np: necrotic patches of brown color on leaves which look burned and dry; Ns: necrotic stripes along the rachis; Nss: Necrotic stripes in sepals; Nv: vein necrosis; P: purplish-brown sunken leaf lesions; PS: brown patches on stem; Sl: spindly leaves; Sp: silver patches in stems and petioles; Y: yellowing

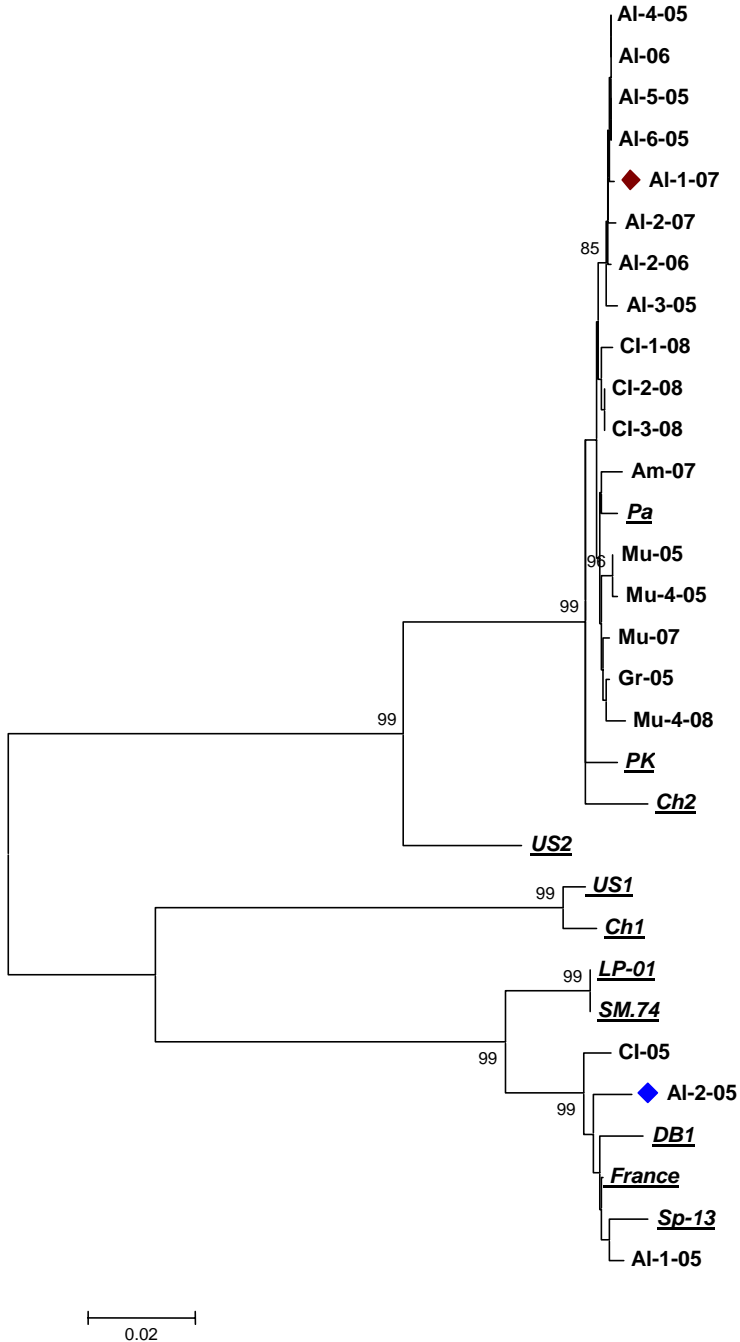
<sup>d</sup> Sequences showing the same letter (in parentheses) are 100% identical

RdRp

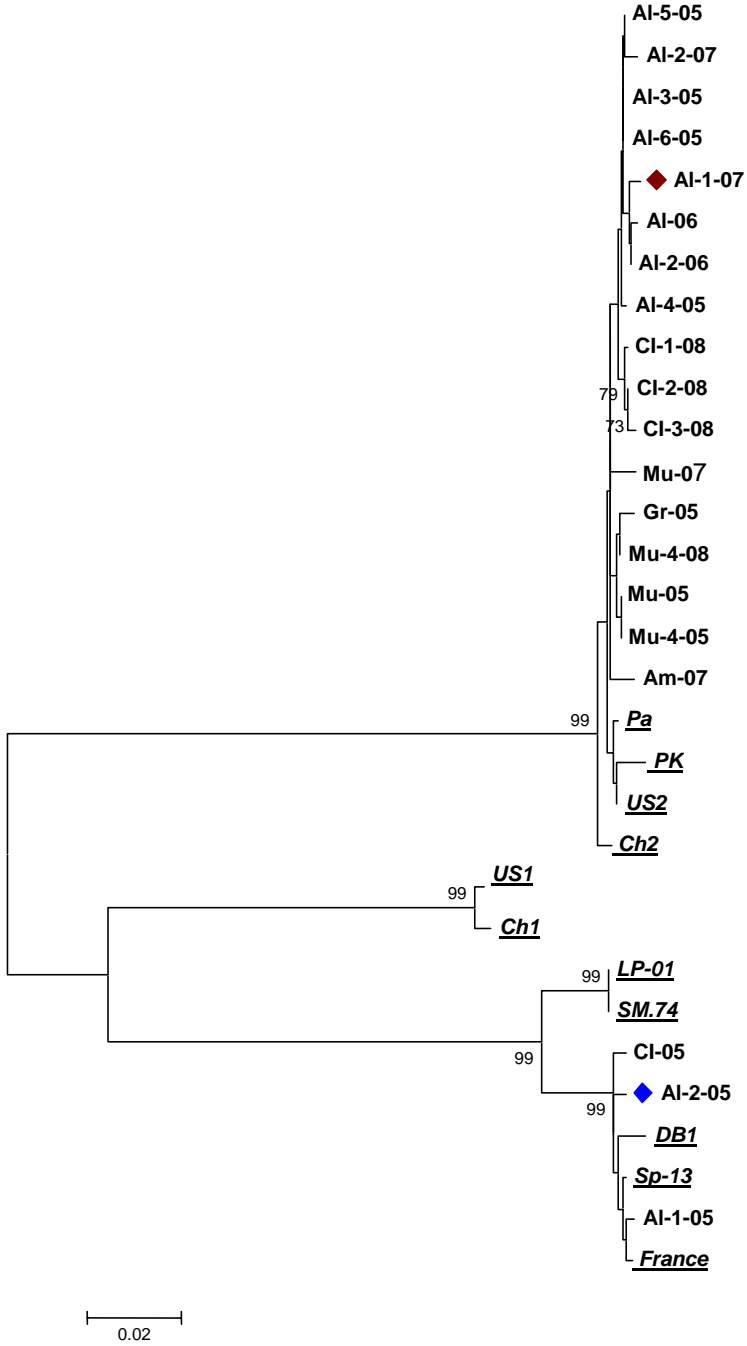




TGB



CP



**Figure 6.4.** Unrooted neighbor-joining tree obtained with MEGA from the nucleotide sequences of 28 PepMV isolates, including 20 necrotic isolates from Spain, coding for: a fragment of the RdRp region; the complete TGB region; the complete CP region. The bootstrap analysis was applied using 1000 bootstrap samples. Bootstrap values > 70% at the internal nodes are indicated. The scale bar represents a genetic distance of 0.02. Filled rhombs denote the Spanish isolates used in the host range study (in red the CH2 isolate and in blue the EU isolate). The sequences for other PepMV isolates obtained from public databases (underlined) were included: from tomato from Spain (Sp-13, AF484251), France (AJ438767), Poland (PK, EF408821; Pa, FJ612601), the Netherlands (DB1, FJ940224), the United States (US1, AY509926; US2, AY509927), and Chile (CH1, DQ000984; CH2, DQ000985), and from *Solanum muricatum* (SM74, AM109896) and *Lycopersicon peruvianum* (LP-01, AJ606361) from Peru.

The nucleotide distance matrix for the Spanish necrotic isolates indicated that the nucleotide identity percentages were as follows: 77.8-100% for the RdRp, 80.2-100% for the TGB genes, and 77.4-100% for the CP. The *Al-2-05* isolate showed very high identities (98.4-99.2%) to the EU genotype. On the other hand, the *Al-1-07* isolate was very similar to the CH2 genotype (98.3-99.8%). The comparison of DB1 (the European necrotic type isolate) and the Spanish isolates included in the European genotype revealed the following nucleotide identities: 98.4-99.3% for the RdRp, 98.9-99% for the CP and 97.7-98.7%, 98.7-99.2% and 98.4-99.2% for the TGB1, TGB2 and TGB3, respectively. A similar comparison between the Pa (the CH2 necrotic type isolate) and the Spanish isolates in the CH2 group revealed the following nucleotide identities: 98.9-99.5% for the RdRp, 99.0-99.7% for the CP and 99.1-99.7%, 99.2-99.7% and 98.8-99.6% for the TGB1, TGB2 and TGB3, respectively.

The comparison of the amino acid sequences of five proteins from both isolates (Table 6.5) used in the host range assay revealed the highest identity/similarity to the *Al-2-05* isolate with the European and PE genotypes (96.3-100/96.3-100), and a lower one in relation with the CH2 genotype (82.9-92.4/90.2-97.2). Conversely, isolate *Al-1-07* was seen to be the most identified with the CH2 genotype, particularly to the Pa isolate (98.8-100/99.1-100), and was less identified with the EU and CH1 genotypes (80.5-92.7/86.6-97.9) (Table 6.5).

**Table 6.5.** Comparison of amino acid sequences of the five proteins of both necrotic isolates used in the host range study with selected isolates deposited in the NCBI database.

Spanish isolate	Region	aa comparison	SP-13	DBI	SM.74	CHI	CH2	PK	Pa
<i>A1-2-05</i>	<b>RdRp</b>	<b>Id. %</b>	99.3	99.3	97.2	94.4	92.4	93.1	93.1
		<b>Sim. %</b>	100.0	100.0	99.3	97.2	97.2	97.9	97.9
	<b>TGBp1</b>	<b>Id. %</b>	98.3	97	97.4	88.9	85.9	86.3	86.8
		<b>Sim. %</b>	99.1	98.7	99.1	94.9	91.0	91.0	91.5
	<b>TGBp2</b>	<b>Id. %</b>	100.0	99.2	99.2	96.7	91.1	92.7	92.7
		<b>Sim. %</b>	100.0	100.0	100.0	96.7	92.7	93.5	93.5
	<b>TGBp3</b>	<b>Id. %</b>	96.3	97.6	98.8	85.4	82.9	84.1	82.9
		<b>Sim. %</b>	96.3	100.0	98.8	87.8	90.2	90.2	90.2
	<b>CP</b>	<b>Id. %</b>	100.0	99.6	100.0	96.6	92.3	91.9	92.3
		<b>Sim. %</b>	100.0	99.6	100.0	97.9	95.7	95.7	95.7
<i>A1-1-07</i>	<b>RdRp</b>	<b>Id. %</b>	91.7	91.7	92.4	88.9	98.6	99.3	99.3
		<b>Sim. %</b>	97.9	97.9	97.2	96.5	99.3	100.0	100.0
	<b>TGBp1</b>	<b>Id. %</b>	86.3	87.2	86.8	83.3	97.0	99.1	99.6
		<b>Sim. %</b>	91.5	92.3	92.3	90.2	97.4	99.6	100.0
	<b>TGBp2</b>	<b>Id. %</b>	92.7	91.9	91.9	91.9	98.4	100.0	100.0
		<b>Sim. %</b>	93.5	93.5	93.5	93.5	99.2	100.0	100.0
	<b>TGBp3</b>	<b>Id. %</b>	80.5	82.9	84.1	84.1	98.8	100.0	98.8
		<b>Sim. %</b>	86.6	90.2	90.2	91.5	100.0	100.0	100.0
	<b>CP</b>	<b>Id. %</b>	91.9	91.9	91.9	92.4	99.1	98.7	99.1
		<b>Sim. %</b>	94.9	94.9	94.9	95.3	99.1	99.1	99.1

## DISCUSSION

In the last few years, several necrotic diseases of tomato crops have been reported in Spain, caused by viruses as ToTV, ToCV, TYLCV, PMoV, PVY and severe strains of TSWV and PepMV (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007). We characterised in detail two Spanish isolates of PepMV that induce necrosis in tomato crops: one isolate with the EU genotype (*Al-2-05*) and another more severe isolate with the CH2 genotype (*Al-1-07*). The biological and molecular studies show that the Spanish isolates are closely related to other necrotic isolates as the DB1 isolate detected in the Netherlands (unpublished), and also to the Polish isolate (Pa) that had been previously described by Hasiów-Jaroszewska *et al.* (2009), that belong to the EU or CH2 genotypes respectively. Besides inducing severe necrotic symptoms on leaves, veins and the stem of infected tomato plants, the Spanish CH2 isolate is also able to produce a symptomless infection on *Capsicum annuum*. Unfortunately we could not inoculate *Datura innoxia* with both isolates to compare the response of this plant to the Spanish isolates with the symptoms obtained by Hasiów-Jaroszewska *et al.* (2009) with the Polish isolate Pa. The necrotic symptoms produced in tomato by both isolates are slightly different. The plants infected with the EU isolates show interveinal necrosis and a general plant chlorosis, characteristic of the “Chlorotic Necrosis”, and the incidence was lower in all sampling areas. On the other hand, the CH2 isolate was detected in plants with a severely expanding brown necrosis of the leaves, necrotic stripes on both the rachis and stems and brown necrotic patches on fruits, typical symptoms of the “Brown Necrosis”. This symptomatology was observed in tomato crops since the second half of 2005 until the end of 2008, and it caused very important economic losses.

PepMV is widespread in tomato crops in Spain. The surveys conducted from 2000 to 2004 reveal that the EU genotype shows a high incidence in single (80%) or mixed infections with the PE or the US2 PepMV genotype (16.0% and 8.0% respectively; Pagán *et al.*, 2006). Since then, new PepMV strains and genotypes have been identified and, nowadays, five PepMV genotypes may be distinguished: EU, PE, CH2, CH1/US1 and US2. Another similar study

conducted in Belgium with tomato crops from 2006 detected two major genotypes, CH2 and EU, in a single or mixed infection (Hanssen *et al.*, 2008). The distribution and occurrence of the PepMV genotypes among North American greenhouse tomato facilities has also been reported showing that the predominant genotype of PepMV was the EU, and that US1, US2 and CH2 were found only in a mixed infection in samples and have a limited distribution (Ling *et al.*, 2008). In Spain, the US1 genotype was detected in February 2007 in the Canary Islands (Alfaro-Fernández *et al.*, 2008). More recently, an analysis performed in Spain using specific multiplex RT-PCR, that discriminates among the five PepMV genotypes, showed how the EU strain is the most prevalent in the country (94.0% of infected plants), followed by CH2 (61.0%) and CH1/US1 (25.0%) (Alfaro-Fernández *et al.*, 2009). In previous studies, US2 was detected in Spain, but only in samples collected in the Murcia Region in 2004 (Pagán *et al.*, 2006). At that time, CH2 was not described and the US2 isolates identified in the 2006 paper were real CH2 isolates. In the most recent study, the incidence of CH2 in analysed tomato plants increased from 8.3% (2001) to 73.3% (2008). The same distribution was found in our study. The incidence of the EU genotype in single infections decreased from the second half of 2005 which could be interpreted as the CH2 genotype displacing the EU genotype, that in 2008 was only identified in the greenhouses as mixed infections with the CH2 genotype. A similar situation was found in the tomato greenhouses in Belgium and Netherlands, where the CH2 genotype spreads faster than the EU genotype in greenhouses with mixed infections (Hanssen *et al.*, 2008). The widespread occurrence of the CH2 genotype may have a biological advantage over the EU genotype. However, our surveys had been directed to the collection of tomato plants showing a specific necrotic symptomatology, and our results could be slanted. A large number of samples obtained in non directed surveys are required to confirm this notion.

A phylogenetic analysis based on different PepMV regions (RdRp, TGB and CP) produced similar results: a low level of genetic variability among the necrotic isolates in the EU genotype (DB1 and *Al-2-05* shared 98.4% identity in all the analysed regions), and among the necrotic isolates in the CH2 genotype (*Pa* and *Al-1-07* shared 99.1% identity in all the regions covered in the analysis). To date, no correlation between the different PepMV genotypes and symptoms observed on infected plants has been found (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2009).

Different PepMV strains represent the same genotype, even if they induce different symptoms on a majority of the tested plant species. The occurrence of the new necrotic PepMV isolates in both genotypes, indicates that PepMV may create different genetic variants that induce different symptoms. Our results corroborate previous findings of Hasiów-Jaroszewska *et al*, (2009) showing that even one small nucleotide substitution may have a dramatic effect on the virulence of PepMV isolates, and may result in severe phenotypic changes. This nucleotide change remains unknown in necrotic isolates.

## REFERENCES

- Aguilar J.M., Hernández-Gallardo M.D., Cenis J.L., Lacasa A., Aranda M.A., 2002. Complete sequence of the *Pepino mosaic virus* RNA genome. *Archives of Virology* **147**, 2009–15.
- Alfaro-Fernández A., Cebrián M.C., Córdoba-Sellés M.C., Herrera-Vásquez J.A., Jordá C., 2008. First report of the US1 strain of *Pepino mosaic virus* in Tomato in the Canary Islands, Spain. *Plant Disease* **92**, 1590.
- Alfaro-Fernández A., Sánchez-Navarro J.A., Cebrián M.C., Córdoba-Sellés M.C., Pallás V., Jordá C., 2009. Simultaneous detection and identification of *Pepino mosaic virus* (PepMV) isolates by multiplex one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 143–58.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–402.
- Córdoba-Sellés M.C., Alfaro-Fernández A., Cebrián-Micó M.C., Sánchez-Navarro J.A., Jordá C., 2007. Spanish situation of viral diseases that caused necrosis in tomato. *International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*, Sorrento, Italy. Book of abstracts p. 281.

- Cotillon A.C., Girard M., Ducouret S., 2002. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of *Pepino mosaic virus* (PepMV). *Archives of Virology* **147**, 2231–8.
- French C.J., Bouthillier M., Bernardy M., Ferguson G., Sabourin M., Johnson R.C., Masters C., Godkin S., Mumford R., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. *Plant Disease* **85**, 1121.
- Hanssen I.M., Paeleman A., Wittemans L., Goen K., Lievens B., Bragard C., Vanacheter A.C.R.C., Thomma B.P.H.J., 2008. Genetic characterization of *Pepino mosaic virus* isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology* **121**, 131–46.
- Hasiów-Jaroszewska B., Pospieszny H., Borodynko N., 2009. New necrotic isolates of pepino mosaic virus representing the Ch2 genotype. *Journal of Phytopathology* **157**, 494–6.
- Jones R.A.C., Koenig R., Lesemann D.E., 1980. Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology* **94**, 61-8.
- Jordá C., Lázaro A., Martínez-Culebras P., Abad P., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* on Tomato in Spain. *Plant Disease* **85**, 1292.
- Ling K.S., 2007. Molecular characterization of two *Pepino mosaic virus* variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes* **34**, 1–8
- Ling K.S., Wintermantel W.M., Bledsoe M., 2008. Genetic composition of *Pepino mosaic virus* population in North American greenhouse tomatoes. *Plant Disease* **92**, 1683–8.
- Lopez C., Soler S., Nuez F., 2005. Comparison of the complete sequences of three different isolates of *Pepino mosaic virus*: Size variability of the TGBp3 protein between tomato and *L. peruvianum* isolates. *Archives of Virology* **150**, 619–27.
- Louro D., Accotto G.P., Varia A.M., 2000. Occurrence and Diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 589–92.



- Maroon-Lango C.J., Guaragna M.A., Jordan R.L., Hammond J., Bandla M., Marquardt S.K., 2005. Two unique US isolates of *Pepino mosaic virus* from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate. *Archives of Virology* **150**, 1187-201.
- MacKenzie D.J., Mclean M.A., Mukerji S., Green M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Disease* **81**, 222–6.
- Mumford R.A., Metcalfe E.J., 2001. The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology* **146**, 2455–60.
- Pagan I., Córdoba-Sellés M.C., Martínez-Priego L., Fraile A., Malpica J.M., Jorda C., García-Arenal F., 2006. Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology* **96**, 274–9.
- Pospieszny H., Borodynko N., 2006. New Polish isolate of *Pepino mosaic virus* highly distinct from European tomato, Peruvian, and US2 strains. *Plant Disease* **90**, 1106.
- Pospieszny H., Borodynko N., Obrepalska-Stepłowska A., Hasiów B., 2007. The First Report of Tomato torrado virus in Poland. *Plant Disease* **91**, 1364.
- Roggero P., Masenga V., Lenzi R., Coghe F., Ena S., Winter S., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* in tomato in Italy. *Plant Pathology* **50**, 798.
- Sánchez-Navarro J.A., Aparicio F., Rowhani A., Pallás V., 1998. Comparative analysis of ELISA, non-radiative molecular hybridization and PCR for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in herbaceous and *Prunus* hosts. *Plant Pathology* **47**, 780–6.
- Soler S., Prohens J., Diez M.J., Nuez F., 2002. Natural occurrence of *Pepino mosaic virus* in *Lycopersicon* Species in Central and Southern Peru. *Journal of Phytopathology* **150**, 49–53.

- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596–9.
- Verhoeven J.Th.J., van der Vlugt R.A.A., Roenhorst J.W., 2003. High similarity between tomato isolates of *Pepino mosaic virus* suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 419–25.
- van der Vlugt R.A.A., Stijger C.C.M.M., Verhoeven J.Th.J., Lesemann D.E., 2000. First Report of *Pepino mosaic virus* on Tomato. *Plant Disease* **84**, 103.
- van der Vlugt R.A.A., 2009. *Pepino mosaic virus*. *Hellenic Plant Protection Journal* **2**, 47-56.
- Zhang Y., Shen Z.J., Zhong J., Lu X.L., Cheng G., Li R.D., 2003. Preliminary characterization of *Pepino mosaic virus* Shanghai isolate (PepMV-Sh) and its detection with ELISA. *Acta Agriculturae Shanghai* **19**, 90–2.

## **Capítulo 7**

---

**Discusión general.**



# Capítulo 7

## *DISCUSIÓN GENERAL*

El PepMV, a pesar de ser una de las virosis de más reciente introducción en los cultivos de tomate se ha convertido en la actualidad en una enfermedad emergente de primer orden, debido a su extremada adaptabilidad a distintos ambientes, a los daños que provoca por si solo o junto con otros agentes patógenos, a su rápida dispersión y a su considerable estabilidad. Además, dada su gran capacidad de adaptación, el PepMV supone un riesgo muy importante de infección para otras solanáceas de gran interés económico como son la patata, el pimiento, la berenjena o el tabaco. De hecho, grupos de investigación de todo el mundo estudian distintos aspectos de la epidemiología del PepMV, la caracterización de aislados y el diseño de métodos adecuados para su diagnóstico precoz. Es importante avanzar en el conocimiento de la “vida oculta” del PepMV, conocer sus formas de supervivencia en el campo, conocer sus reservorios, así como estudiar los mecanismos de transmisión a corta y larga distancia, que nos permitirá optimizar tanto la detección del patógeno como las medidas de prevención y control de la enfermedad.

En esta memoria se ha demostrado, en primer lugar, la presencia y transmisión del PepMV en la semilla de tomate. Éste ha sido siempre un aspecto epidemiológico de gran controversia. Desde 1999 se han venido interceptando en los controles aduaneros, los lotes de semilla comercial de tomate infectados con PepMV, sin embargo tanto las empresas productoras de semilla, como distintos organismos oficiales, siempre han negado la posibilidad de que este virus se pudiera transmitir por semilla, basándose en resultados obtenidos en estudios previos al respecto. Por ejemplo, Salomone y Roggero en el año 2002 no llegan a detectar ninguna transmisión del virus al analizar únicamente 52 plántulas de tomate. En un trabajo mas reciente, de 10.000 plántulas crecidas de semilla

comercial infectada, ninguna presentó infección con PepMV ni cuando se analizaron por ELISA, ni cuando los extractos de las plantas de tomate se inocularon en *N. benthamiana*, especie en la que el virus se acumula en mayor cantidad que en tomate (Ling, 2008). En cambio, otros estudios han detectado transmisión por semilla. En un ensayo llevado a cabo por el Servicio de Protección de las Plantas de Holanda, en colaboración con empresas productoras de semilla, se estimó que la tasa de transmisión por semilla variaba entre el 0.06 y el 0.03% cuando se manejaba semilla que se había limpiado mediante una fermentación natural y posterior secado (Krinkels, 2001). Posteriormente, distintos autores han señalado a la semilla como el vehículo de entrada y dispersión a larga distancia del virus, pudiendo haber sido ésta la fuente común de infección durante las primeras epidemias de tomate (Ling *et al.*, 2008). En el trabajo presentado en esta tesis, se logró estimar la tasa de transmisión del virus en un 1.84%. Este resultado fue obtenido a partir de semillas con un alto título viral, procedentes de frutos infectados naturalmente en campo que presentaban los típicos síntomas de “marbling” y que además habían sido extraídas de los frutos sin fermentación ni tratamiento enzimático, simplemente mediante lavado con agua y posterior secado a temperatura ambiente. Se trata por tanto del peor de los casos, de la peor situación de partida, y la que podría realmente ocurrir en la naturaleza. El mismo año en que se publican estos resultados, se detectan en Estados Unidos, dos nuevas variantes del virus precisamente en lotes de semilla comercial procedentes de Chile (Ling, 2007), que posteriormente se han detectado en invernaderos de todo el mundo, llegando a desplazar a las poblaciones iniciales de la cepa europea como ha ocurrido en Bélgica (Hanssen *et al.*, 2008).

Muy recientemente, el fruto del trabajo conjunto de distintos grupos pertenecientes a 10 países europeos integrantes del proyecto europeo PEPEIRA ha corroborado nuestros resultados de transmisión. En este caso se han analizado las plántulas crecidas de más de 100.000 semillas de tomate procedentes de plantas infectadas artificialmente con PepMV. A las 5 semanas de la emergencia, el análisis serológico de 8.778 muestras (10 plántulas/muestra) dió 23 resultados positivos que significaban una tasa de transmisión del 0.026%. Este resultado fue corroborado en un segundo ensayo en el que se observó el hecho de que el porcentaje de transmisión resulta variable con el tiempo transcurrido entre el momento en que la planta madre se infecta con el virus y el momento en que se

realiza la recolección de la semilla. Así para periodos de infección de 8 semanas, la tasa de transmisión estimada es del 0.005% mientras que para periodos de 15 semanas, la transmisión aumenta significativamente hasta rondar valores del 0.057% (Hanssen *et al.*, 2009b).

Por otra parte, se ha evaluado la eficacia desinfectante que muestran diferentes tratamientos a lotes de semillas infectadas con PepMV. Se han evaluado tanto tratamientos térmicos de diferente duración y temperatura, eficaces en la desinfección de otras virosis en tomate, como tratamientos químicos ácidos y enzimáticos como los que se podrían estar aplicando a nivel industrial. Debido a la gran estabilidad térmica del PepMV, sólo utilizando temperaturas superiores a la de inactivación viral (70°C) se consiguió eliminar la transmisión a plántula, aunque la presencia del virus en semilla entera todavía se detectaba al mismo nivel que en los lotes no tratados. Esto podría deberse a que los análisis se realizaron mediante la técnica ELISA, tal y como recomienda la ISHI, por lo que las partículas virales que se estarían detectando podrían no ser infecciosas. Con los tratamientos enzimáticos a base de pectinasa ocurría lo mismo, el virus se detectaba en la semilla aunque posteriormente no se producía transmisión a plántula. Sin embargo, cuando el tratamiento enzimático se realizaba en un medio ácido, sí que se conseguía eliminar el virus de la semilla entera, pero la germinación se veía perjudicada. Todo lo contrario sucedía cuando las semillas eran tratadas con una solución de fosfato trisódico, el virus se eliminaba de la cubierta de las semillas y el poder germinativo de las mismas no se veía afectado. Este tratamiento presenta grandes ventajas no solo en capacidad desinfectante frente a los tratamientos habituales llevados a cabo en la industria sino también en coste económico, rapidez y sencillez.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y la elevadísima eficiencia de la transmisión mecánica que tiene el PepMV, sospechamos que el virus se localiza en la cubierta y que por tanto la transmisión se produce en el momento en que al germinar, se rompe la cubierta de la semilla y la plántula entra en contacto con la superficie contaminada de esta. Por esta razón, aspectos como la limpieza y tratamiento post-extracción de las semillas han podido tener una importante influencia en las diferentes tasas de transmisión que han sido citadas por distintos autores.

Con los resultados obtenidos se pudo dar respuesta a una de las grandes incógnitas en la epidemiología del PepMV y se presentaron pruebas concluyentes de que el PepMV podía ser transmitido por las semillas procedentes de frutos infectados. A pesar de tener una relativa baja tasa de transmisión por semilla, el alto poder infectivo del PepMV en tomate implica que una sola planta infectada con el virus derivada de una semilla contaminada, sea suficiente como para comenzar un nuevo brote de la enfermedad en un nuevo invernadero comercial que puede llegar a albergar varios miles de plantas. El uso de semilla infectada, aún extraída mediante tratamientos ácidos y enzimáticos como recomienda la ISHI pero no desinfectada comporta un elevado riesgo de obtener plántulas infectadas y sería la explicación más razonable de cómo el PepMV ha sido capaz de aparecer de una forma tan rápida y casi simultánea en las distintas zonas productoras de tomate de todo el mundo. Para prevenir la dispersión del PepMV con la semilla de tomate, se hacen necesarias la adopción de una regulación estricta para la obtención y desinfección de la semilla de tomate, así como de procedimientos eficaces de análisis que garanticen la sanidad de la misma.

En esta memoria se presentan los resultados del primer estudio sobre la composición genética de las poblaciones del PepMV. Este es un ejemplo típico de patógeno emergente y para poder entender la aparición de cualquier enfermedad emergente en un cultivo, es esencial conocer su epidemiología y la evolución genética que sufren las poblaciones del patógeno en cuestión.

Hasta el año 2004, la población española de PepMV está compuesta mayoritariamente (mas del 80% de la población) por una única cepa, la cepa EU, presente tanto en la Península como en las Islas Canarias desde el inicio de las epidemias. La caracterización molecular de distintos aislados de PepMV de Europa y Norte America restringida a una pequeña zona de 547 nt de la RNA polimerasa o de 844 nt de la CP (Mumford y Metcalfe, 2001; Verhoeven *et al.*, 2003) mostraba elevados porcentajes de identidad nucleotídica entre todos los aislados (por encima del 99%). Los análisis moleculares de aislados obtenidos en tomate indicaban como causa de las epidemias de PepMV en Europa y Norte América, la expansión demográfica de una única cepa del virus como anteriormente se había ya citado (Verhoeven *et al.*, 2003). La existencia de una población de la cepa EU indiferenciada y altamente conservada es compatible con que se produzca la expansión demográfica durante la epidemia. En una



población en expansión, la selección del genotipo más adaptado puede resultar en la fijación de éste como un único clon (Fraile *et al.*, 1997; Moya *et al.*, 2004). La disponibilidad de plantas de tomate todo el año en campo, así como la transmisión por semilla y la alta capacidad que tiene el PepMV de supervivencia en los restos de cosecha en el suelo, pueden contribuir a que la población viral alcance el nivel poblacional necesario para que actúe la selección, que de acuerdo con esta interpretación, muchos de los polimorfismos se producirían en posiciones silenciadas en los genes analizados.

Hemos visto que los aislados de la cepa europea de tomate se agrupan junto con los aislados peruanos procedentes de otros hospedantes distintos al tomate. La gran identidad genética entre el aislado obtenido de pepino en 1974 (Jones *et al.*, 1980) y otro aislado detectado en *L. peruvianum* en 2002 (Lopez *et al.*, 2005) podría sugerir que la población de la cepa peruana compuesta por aislados no-tomate de PepMV también podría estar muy conservada. Por otro lado, la amplia incidencia del PepMV detectada en especies salvajes del género *Lycopersicon* así como en tomate en Perú (Soler *et al.*, 2002), sugiere que éste país sea la zona originaria de ambas cepas, la tomate europea y la peruana. Además se ha podido comprobar que aislados asintomáticos en tomate obtenidos de especies salvajes de *Lycopersicon* o de *S. muricatum* se acumulan con menor eficiencia en tomate que los aislados virulentos (Soler *et al.*, 2002). Aunque estas comparaciones incluyen un limitado número de aislados virales, sugieren una mayor adaptación a este hospedante ligada a la virulencia que podría explicar la mayor expansión demográfica que ha tenido la cepa europea. Curiosamente, algunos aislados procedentes de *L. peruvianum* se acumulan en tomate a los mismos niveles que los procedentes de tomate y causan síntomas severos similares (Soler *et al.*, 2002), lo que apoyaría nuestra hipótesis sobre el origen peruano de la cepa europea. Desafortunadamente, no hay disponibles datos de secuencias de estos aislados que pudieran utilizarse para demostrarlo. La expansión demográfica de la cepa europea también podría estar favorecida por el mayor rango de hospedantes que han presentado los aislados españoles pertenecientes a dicha cepa, muy superior al que presentó el aislado original de pepino (Jones *et al.*, 1980; Jordá *et al.*, 2001b; Martínez-Culebras *et al.*, 2002). En nuestro trabajo, no hemos tratado de identificar la mutación o mutaciones que conllevan a la virulencia en tomate, pero hemos de señalar que este tipo de cambios en el rango de hospedantes o en la virulencia con que se produce la

infección en un hospedante en particular, pueden ser debidos a unas pocas mutaciones en su genoma (Maule *et al.*, 2002; Whitham y Wang 2004).

En la población viral responsable de las epidemias del año 2004 en Murcia, se detectaron aislados con otros dos genotipos distintos, el PE y el US2. Sin embargo la cepa peruana ya se había detectado en las Islas Canarias en el año 2000. De lo que se deduce que en las Islas Canarias se produjo la introducción de esta cepa de forma independiente a su posterior introducción en la Península.

El aislado 3253 citado por Martínez-Culebras *et al.* (2002) y recogido en Canarias en 1999, presentaba en la zona de la RdRp un 98% de identidad con los aislados US1 y US2 (Maroon-Lango *et al.*, 2005). Estos datos implican la presencia temprana de aislados con genotipo US2 en España. En un análisis de restricción realizado previamente a 107 aislados de PepMV en la misma región de la RdRp que hemos analizado en este trabajo, dió como resultado tres patrones de restricción distintos (P1, P2 y P3) que se corresponderían con los genotipos EU, PE y US2 respectivamente (Martínez-Culebras *et al.*, 2002). En aquel momento ya se identificaron aislados de PepMV con perfiles de restricción P2 o P3 en Murcia y Canarias desde el año 2000. Es decir que los tres genotipos de PepMV estarían presentes en la Península y en Canarias desde que se produjo la primera epidemia importante en tomate en el año 2000. Si esto fuera cierto, nuestros resultados indicarían que se produjo un incremento de la presencia de aislados del genotipo US2 en las epidemias del año 2004.

Hasta el año 2004, los genotipos PE y US2 siempre se habían encontrado en infecciones mixtas con el genotipo EU, sin embargo en 2004 se detectan aislados recombinantes entre los genotipos EU y US2, que han intercambiado porciones de los genes del TGB y de la CP. En el caso de las poblaciones de otros virus vegetales RNA analizadas a escala local (Bonnet *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2004), las recombinaciones dentro de un mismo gen parecen no estar favorecidas en la población viral. Futuros análisis de la población de PepMV en Murcia nos dirán si este también es el caso del PepMV.

Los resultados de este trabajo dieron pie a la aparición de estudios similares en otros países como Bélgica (Hanssen *et al.*, 2008) o Estados Unidos (Ling *et al.*, 2008). Muy recientemente, se ha publicado el trabajo que vendría a ser la continuación del nuestro al realizar el estudio poblacional del virus desde el año 2005, aunque restringido a la región de Murcia (Gómez *et al.*, 2009).

El “Marchitamiento súbito o Colapso” del tomate es un síndrome muy complejo y que llega a ser devastador para el cultivo de tomate que se ve afectado. En contra de lo que otros autores han venido afirmando (Soler-Aleixandre *et al.*, 2005b), en esta memoria se ha demostrado que no es un síndrome endémico y restringido a la zona concreta de Mazarrón (Murcia), sino que se trata de una enfermedad en expansión, que se ha presentado con mayor o menor incidencia en los invernaderos de tomate de las principales zonas productoras españolas.

Fruto de numerosos análisis a plantas con distinto grado de marchitamiento, así como a plantas asintomáticas procedentes de los mismos invernaderos donde se han dado casos de colapso, podemos afirmar que los únicos agentes patógenos presentes en todas las muestras con marchitamiento son el PepMV y el hongo vector *Olpidium virulentus*, corroborando los resultados de estudios previos en los que no se logró aislar ninguna de las especies fúngicas o bacterianas descritas como causantes de marchitamiento (IMIDA, 2001). Basándonos en las observaciones de campo y en los resultados de laboratorio, ambos organismos fueron inoculados en plantas sanas bajo condiciones controladas de invernadero para lo que se emplearon dos fuentes distintas de *O. virulentus* y cuatro aislados de PepMV obtenidos en plantas marchitas. Bajo estas condiciones, se logró reproducir el colapso durante dos ciclos de cultivo distintos cuando se produjo una importante bajada de las temperaturas máximas, previa a un fuerte incremento térmico que situó la temperatura máxima en el interior del invernadero en los registros máximos mensuales. Sólo colapsaron plantas que presentaban infección con ambos patógenos y a unos niveles similares a los que nos encontrábamos en campo (6.25% en verano y 56.25% en invierno). Todos los postulados de Koch quedaron satisfechos y por tanto demostrado por vez primera que la asociación de ambos patógenos PepMV y *O. virulentus* con el síndrome del colapso, y se constata por vez primera, la gran influencia que tiene la temperatura en la etiología y severidad del colapso.

Durante el ciclo invernal las temperaturas máximas sufren continuas fluctuaciones durante el día, que someten a las plantas a un continuo estrés que las hace más susceptibles a los ataques por agentes patógenos. Durante los ciclos estivales estas fluctuaciones térmicas se producen muy raramente, permitiendo que las plantas vegeten mejor. Esta diferencia explicaría que las mayores tasas de

colapso se produzcan durante el ciclo invernal y que no se detecten plantas colapsadas en invernaderos con calefacción ya que logran mantener estables las temperaturas en el interior del recinto. La distinta incidencia del síndrome a lo largo de los años, de los ciclos de cultivo y de las áreas geográficas, se explica por las diferencias tanto en las condiciones ambientales como en las prácticas de cultivo que existen entre ellas. Es conocido que la expresión de los síntomas virales, varía considerablemente de un año a otro, en función de las condiciones ambientales (Spence *et al.*, 2006). Además, la aparición de los síntomas causados por PepMV está muy ligada a las condiciones ambientales de luz y temperatura (Jordá *et al.*, 2001a; Spence *et al.*, 2006). Las plantas infectadas por PepMV son menos capaces que las plantas sanas, de adaptarse al estrés adicional causado por rápidos incrementos en la temperatura y fuertes insolaciones en el invernadero (Spence *et al.*, 2006).

Al inicio se pensaba que las diferentes cepas del virus producirían sintomatologías diferentes en los mismos hospedantes (van der Vlugt *et al.*, 2000), sin embargo aislados de la misma cepa provocan síntomas muy distintos en tomate. La agresividad y naturaleza de los síntomas producidos varía entre aislados aún siendo del mismo tipo génico como bien pudimos comprobar durante nuestros ensayos de patogenicidad cuando el mismo aislado (*Mu 2-00*) producía infecciones asintomáticas durante el verano, mientras que en invierno los síntomas que provocaba en tomate eran los más agresivos del ensayo. El distinto comportamiento que muestran los aislados *Mu 2-00* y *Tf 01* en ambos ensayos podría estar relacionado con diferencias en las tasas de replicación y/o de movimiento sistémico del virus, ligadas con las diferencias térmicas entre los ensayos. Por otro lado no hemos detectado ninguna diferencia a nivel genético entre los aislados detectados en plantas marchitas y el resto de aislados de PepMV. Aislados de colapso y de no colapso se agrupan juntos en cada uno de los genotipos descritos de PepMV. Con lo que se confirma que la capacidad para inducir marchitamiento no esta relacionada con el genotipo sino que es propia del aislado del virus e indicadora de la existencia de una gran diversidad biológica en las poblaciones de PepMV.

Un importante hallazgo de nuestro estudio que tiene implicaciones en el manejo del marchitamiento del tomate es que en las plantas marchitas siempre se detecta la presencia de PepMV y *O. virulentus*. En España el tomate se cultiva de

forma intensiva, pudiendo alternarse los cultivos protegidos con los tradicionales al aire libre. Este cultivo intensivo puede en parte propiciar que se den las condiciones óptimas para que ambos organismos estén presentes en el campo y que así se produzca el colapso cuando se den las condiciones ambientales específicas. Siempre se ha considerado que la importancia de las distintas especies de *Olpidium* radicaba únicamente en que se trata de importantes vectores virales pero que por si solos no provocaban daños importantes en las raíces de las plantas invadidas. Sin embargo, se han constatado importantes reducciones en la densidad y desarrollo radicular, así como una mayor degradación en los tejidos de las raíces de plantas inoculadas con *O. brassicae* (Campbell y Sim, 1994), mientras que una reducción del 20 al 50% en el crecimiento de tallos y raíces, junto con el aumento en la respiración radicular, se han relacionado en melón con la presencia de *O. bornovanus* en las raíces (Hadar *et al.*, 1992). Los mismos efectos se han constatado durante nuestro estudio en las plantas infectadas por el hongo: menor desarrollo de la planta (tallo y raíces), mayor degradación radicular, pérdida de raicillas secundarias, disminución en la capacidad de absorción de agua y nutrientes del suelo y por tanto mayor predisposición al marchitamiento especialmente en los momentos de cuajado y desarrollo del fruto. El mismo tipo de sinergismo entre organismos patógenos que conlleva al marchitamiento se ha citado en el caso del colapso del melón entre *Melon necrotic spot virus* (MNSV) y *Olpidium bornovanus* (de Cara *et al.*, 2008).

Otro interesante resultado de nuestro trabajo fue la reproducción del síndrome utilizando dos fuentes distintas de *O. virulentus*, una procedente de un cultivo de lechuga y otra de tomate. Este dato no solo sugiere que el hongo está implicado en la enfermedad sino que evidencia diferencias significativas en agresividad entre ambos aislados fúngicos empleados. Al observar las raíces de plantas regadas con la fuente A del hongo, estas presentaron un mayor grado de infección que las regadas con la fuente B, que además coincidía con una mayor incidencia del colapso en las plantas inoculadas con la primera fuente fúngica en ambos ensayos (12.5% y 0.0% en ciclo estival y 66.6% y 45,8% en el ciclo invernal, respectivamente). En nuestra opinión, las diferencias observadas en nivel de incidencia de colapso entre invernaderos, y dentro de un mismo invernadero se deben a diferencias tanto en concentración viral como en grado de

invasión fúngica entre plantas, como se ha constatado en plantas que han sufrido un marchitamiento reversible.

Desde el 2003 en España, el uso casi generalizado del injerto junto con regímenes térmicos estables, parecen haber contribuido al control de la enfermedad, si bien no a su erradicación. Sin embargo, para lograr controlar la enfermedad es necesario el establecimiento de un esquema de manejo integrado eficaz, ya que tanto el PepMV como el *O. virulentus* son dos patógenos muy bien establecidos en nuestros cultivos. Ambos son organismos de fácil dispersión en los cultivos. El hongo se disemina fácilmente mediante el agua de riego, el uso de turbas contaminadas o los restos de cultivo infectados presentes en las parcelas (Gómez y Velasco, 1991), mientras que el virus por el uso de semilla o plántula infectada (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007), el uso de herramientas o de ropa contaminadas (Wright y Mumford, 1999; Lacasa *et al.*, 2001) o los abejorros polinizadores (Lacasa *et al.*, 2003) entre otras formas de transmisión mecánica. Para ambos la flora arvense constituye un reservorio o foco de infección futuro (Jordá *et al.*, 2001b; Córdoba *et al.*, 2004a). Estos factores favorecen el gradual incremento en los cultivos de las poblaciones de ambos patógenos y si además se producen cambios térmicos bruscos que pueden acentuar el desarrollo de los síntomas, hasta las plantas injertadas podrían llegar a verse afectadas. Por tanto hemos de prepararnos ante la posible incidencia del marchitamiento en tomate con la adopción de medidas de control adicionales.

Queda demostrado en esta memoria que la introducción de nuevas cepas y la aparición de nuevos tipos genéticos mediante recombinación entre cepas representa un riesgo potencial muy alto que debe ser considerado en el diseño de estrategias de control eficientes. Un ejemplo de esto es la aparición, durante los últimos años, de severas enfermedades necróticas en tomate en España (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007). Hemos caracterizado en detalle, tanto biológica como molecularmente dos aislados españoles de PepMV (*Al-2-05* de la cepa EU y *Al-1-07* de la cepa CH2) que inducen necrosis en tomate. De su caracterización se desprende su alta relación con otros aislados necróticos de la cepa EU detectados en Holanda (DB1), y con el aislado polaco (Pa) de la cepa CH2 descrito por Hasiów-Jaroszewska *et al.*, (2009). Además de inducir síntomas severos de necrosis en hojas, venas y tallo en tomate, el aislado necrótico español *Al-1-07* produce infección asintomática en pimiento lo que representa un gran riesgo para

este importante cultivo en España. Los síntomas necróticos que producen cada uno de los aislados son algo distintos. Las plantas infectadas por el aislado EU muestran necrosis internervial y una clorosis generalizada, por lo que se ha denominado a la sintomatología provocada por este tipo de aislados como “Necrosis Clorótica”. En cambio, los aislados pertenecientes a la cepa CH2 producían necrosis marrones severas en los folíolos que se extendían hasta cubrir toda la hoja, estrías necróticas tanto en tallo como en raquis y parches marrones en frutos y por ello hemos denominado a esta sintomatología como “Necrosis Marrón”. La necrosis provocada por la cepa EU se detectó en campo principalmente hasta principios del año 2005, a partir de la segunda mitad de ese mismo año, esta sintomatología es desplazada por la “Necrosis Marrón” que causa pérdidas económicas muy importantes pérdidas en los campos afectados debido sobre todo a la importante abscisión de fruto todavía verde que ocasiona.

En estos momentos la incidencia de la cepa EU en infecciones simples ha disminuido desde el año 2004 al verse desplazada por la cepa CH2 que parece presentar una mayor capacidad de adaptación al cultivo como ya se ha sido citado (Hanssen *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2009) y que en estos momentos sería la cepa mayoritaria tanto en infecciones simples como en mixtas con la cepa EU. Aunque nuestro trabajo se encuentra en cierta forma sesgado al estudiar únicamente muestras con sintomatologías necróticas, los últimos datos que se conocen acerca de la composición genética de la población del virus en España, son coincidentes con nuestros resultados (Gómez *et al.*, 2009).

El análisis filogenético realizado en tres zonas del genoma del PepMV (RdRp, TGB y CP) produjo similares resultados con los aislados necróticos: un bajo nivel de variabilidad genética entre aislados necróticos de la cepa EU y entre aislados necróticos de la cepa CH2, corroborando lo anteriormente citado. Hasta la fecha no se ha encontrado ninguna relación entre distintos genotipos de PepMV y sintomatología observada en las plantas infectadas (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2009). Nuestros resultados están de acuerdo con las afirmaciones de estos autores ya que diferentes aislados de PepMV pertenecen a la misma cepa o genotipo, aunque induzcan diferentes síntomas en la mayoría de plantas hospedantes. Pequeños cambios a nivel nucleotídico pueden tener un efecto dramático en la virulencia de los aislados de PepMV que pueden originar severos cambios fenotípicos. La aparición de estos nuevos tipos necróticos en dos

cepas distintas indica la capacidad que tiene el virus para crear diferentes variantes genéticas inductoras de sintomatologías diversas. Estos últimos resultados presentados en la memoria validan los obtenidos previamente por Hasiów-Jaroszewska *et al*, (2009). Queda pendiente para futuros trabajos, la identificación del cambio nucleotídico que provoca este importante cambio fenotípico en los aislados necróticos.

En conclusión, los resultados recogidos en esta memoria han permitido avanzar y profundizar en el conocimiento de las formas de transmisión y dispersión del virus tanto a corta como a larga distancia, descubrir los reservorios naturales del virus en campo, explicar la aparición de síndromes agresivos como el “marchitamiento súbito” o las nuevas sintomatologías necróticas que han aparecido en España y por último se ha logrado determinar la composición genética de las poblaciones del PepMV durante los distintos brotes epidémicos que se han producido en España durante un periodo de siete años desde su primera detección. Se han esclarecido pues, algunos aspectos de la “vida oculta” de este importante patógeno que podrían contribuir a la optimización tanto de su detección como de las medidas de prevención y control de esta enfermedad.



## Capítulo 8

---

**Conclusiones.**



# Capítulo 8

## Conclusiones

De los resultados obtenidos en cada uno de los capítulos que constituyen la presente tesis doctoral, podemos extraer las conclusiones generales que se enumeran a continuación.

1. Se ha estimado que al menos el 25% de las semillas extraídas de frutos de tomate recolectados de plantas infectadas naturalmente con PepMV, están infectadas.
2. Cuando se utilizan lotes de semilla de tomates infectados y no sometidos a desinfección previa a la siembra, la tasa de transmisión del PepMV se ha estimado cercana al 1,8%.
3. Los únicos tratamientos a semillas que logran eliminar el virus de la superficie de la semilla entera son los que consisten en la inmersión de las semillas en soluciones a base de fosfato trisódico al 10% durante 3 horas (TP), de 3 g/l de pectinasa y 2% de ácido clorhídrico durante 24 horas (PH) y de 3 g/l de pectinasa, 2% de ácido clorhídrico y un 30% de lejía comercial durante 24 horas (PHB).
4. La germinación de las semillas se vió perjudicada por todos los tratamientos de desinfección a base de ácido clorhídrico, anulándose la germinación cuando el ácido se combina con lejía. Los tratamientos térmicos de las semillas a 70°C durante 96 horas también tienen efectos negativos en la germinación.

5. El tratamiento desinfectante que mejores resultados mostró tanto en la desinfección como en la germinación de las semillas fue el tratamiento con fosfato trisódico. Además es el tratamiento que se recomienda por su rápida y sencilla realización.
6. Diferentes especies de la flora arvense asociada al cultivo de tomate son susceptibles al virus y pueden constituir reservorios asintomáticos de la enfermedad en campo.
7. Se determinó la secuencia nucleotídica parcial de la RdRp de 29 aislados españoles recogidos entre los años 2000 y 2004. Además se determinó la secuencia nucleotídica completa del TGB y CP de los mismos aislados y de otros 36 aislados murcianos recolectados en el mismo periodo.
8. La proteína RdRp resultó ser la más variable, mientras que la CP resultó ser la proteína que presentó menor diversidad genética o una mayor selección en las posiciones sinónimas de esta región con respecto a lo que ocurre en las mismas posiciones del resto del genoma.
9. La diversidad genética de los aislados españoles de la cepa EU es muy baja en las tres zonas analizadas, de tal forma que durante las epidemias de los años 2000, 2001 y 2003 en España se estableció una única población viral de la cepa europea, no diferenciada ni por origen geográfico ni por sintomatología en tomate.
10. En el año 2004 aparecen dos nuevos genotipos dentro de la población murciana: el genotipo US2 y el genotipo Peruano, que ya estaba presente en Canarias desde el año 2000. Además en la población española del 2004 se detectó la presencia de infecciones mixtas entre las cepas peruana y europea así como de aislados recombinantes que presentaban la CP del genotipo US2 y el TGB del EU.
11. Se detectó una asociación significativa entre la expresión de síntomas y la cuantía viral en la planta según se detectó mediante la técnica ELISA.
12. La capacidad para inducir diferentes síntomas parece ser una propiedad del aislado viral que indica la diversidad biológica existente dentro de la población española de PepMV que no está relacionada con el genotipo del aislado.

13. La incidencia del colapso del tomate ha sido variable con los años y los ciclos de cultivo. Hemos detectado plantas afectadas por la enfermedad en Alicante, Almería, Murcia, Granada y en ambas provincias Canarias. Es un síndrome que se puede producir en cualquier condición de cultivo o de manejo, excepto en invernaderos con calefacción adicional en los que se puede llevar un riguroso control de las temperaturas en su interior.
14. Se ha logrado reproducir la enfermedad bajo condiciones controladas de invernadero, mediante la inoculación de las plantas con 4 aislados de PepMV obtenidos de plantas con marchitamiento y el riego de las plantas con dos fuentes distintas de *O. virulentus*, tras producirse una brusca bajada térmica en el invernadero durante periodos de cielos cubiertos que precedieron a periodos de elevadas insolaciones durante los cuales se registraron las máximas temperaturas mensuales.
15. Se registró un 6,25% de colapso durante el ciclo de verano y un 56,25% de colapso durante el ciclo invernal, periodo en que se registraron los mayores cambios térmicos durante el cultivo.
16. Ni la cepa viral a la que pertenece el aislado de PepMV, ni el origen de la fuente de *O. virulentus*, son determinantes de la cuantía en que se produce el colapso, sino la concentración en la planta y la virulencia o capacidad de colonizar las raíces que tenga dicho hongo.
17. Dos tipos de sintomatologías necróticas asociadas con cepas distintas de PepMV (EU y CH2) se han detectado en Alicante, Murcia, Almería, Granada y Canarias, desde el año 2005.
18. La “Necrosis clorótica”, se caracteriza por la presencia de pequeñas manchas necróticas internerviales en los folíolos de plantas que muestran una clorosis generalizada. Esta sintomatología es producida por aislados de PepMV de la cepa EU y sólo se detectó en contadas ocasiones en Alicante, Murcia y Canarias.
19. La “Necrosis marrón”, se caracteriza por ser mucho más agresiva, con manchas necróticas en la zona marginal de los folíolos que se expanden hacia el interior, llegándose a producir la necrosis y seca de toda la hoja que presenta un aspecto quemado. En el raquis aparecen estrías marrones longitudinales y manchas o parches, a veces plateados, en los tallos. En

frutos todavía verdes, aparecen manchas marrones, en ocasiones deprimidas y se registra una importante abscisión. Esta sintomatología se observa desde el año 2005 en los cultivos de la Península y Canarias y se la relaciona con aislados de PepMV de la cepa CH2.

20. Se han caracterizado biológicamente dos aislados necróticos, procedentes de la misma zona geográfica pero ocasionando distinto tipo de necrosis. Ambos aislados reprodujeron la sintomatología necrótica en tomate y mostraron diferente respuesta a la inoculación artificial en un reducido número de especies hospedantes.
21. Se determinó la secuencia nucleotídica completa de las regiones del TGB y CP, y una parte de la RdRp de un total de 19 aislados de PepMV obtenidos de plantas con síntomas de colapso procedentes de todas las zonas donde se ha detectado la enfermedad en España entre los años 2001 y 2008; así como de 28 aislados necróticos recolectados desde el 2005 al 2008. Los aislados se agruparon en los distintos clusters: *Europeo*, *Peruano* o *CH2*, sin poder establecerse ninguna relación entre año de recolección o zona geográfica de origen.
22. En la subpoblación viral española compuesta por aislados necróticos de PepMV se detectó la presencia de infecciones mixtas entre las cepas EU y CH2 que no provocaron sintomatologías distinguibles, ni de mayor gravedad que las ocasionadas por la cepa CH2 en infecciones simples. Tras un periodo de tiempo en que las infecciones mixtas son muy superiores en proporción que las simples, en la actualidad la cepa CH2 se ha convertido en la predominante en los invernaderos españoles, demostrando una ventaja biológica de esta cepa sobre las demás.

## Capítulo 9

---

**Bibliografía general.**





# Capítulo 9

## Bibliografía general

- Adams M.J., Antoniw J.F., Bar-Joseph M., Brunt A.A., Candresse T., Foster G.D., Martelli G.P., Milne R.G., Fauquet C.M., 2004. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* **149**, 1045-60.
- Aguilar J.M., Hernández-Gallardo M.D., Cenis J.L., Lacasa A., Aranda M.A., 2002. Complete sequence of the *Pepino mosaic virus* RNA genome. *Archives of Virology* **147**, 2009-15.
- Alfaro-Fernández A., Cebrián M.C., Córdoba-Sellés M.C., Herrera-Vásquez J.A., Jordá C., 2008. First report of the US1 strain of *Pepino mosaic virus* in Tomato in the Canary Islands, Spain. *Plant Disease* **92**, 1590.
- Alfaro-Fernández A., Sánchez-Navarro J.A., Cebrián M.C., Córdoba-Sellés M.C., Pallás V., Jordá C., 2009a. Simultaneous detection and identification of *Pepino mosaic virus* (PepMV) isolates by multiplex one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 143-58.
- Alfaro-Fernández A., Córdoba-Sellés M.C., Herrera-Vásquez J.A., Cebrián M.C., Jordá C., 2009b. Transmission of *Pepino mosaic virus* by the fungal vector *Olpidium virulentus*. *Journal of Phytopathology*, doi: [10.1111/j.1439-0434.2009.01605.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01605.x)
- Anónimo, 2000. Brèves du Ministère de l'Agriculture. Internet resource : <http://www.agriculture.gov.fr>
- Anónimo, 2005. Pest Risk Analysis for *Pepino mosaic virus*, 29 abril 2005. Central Science Laboratory, Sand Hutton, York.

- Bonnet J., Fraile A., Sacristán S., Malpica J.M., García-Arenal F., 2005. Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus. *Virology* **332**, 359–68.
- de Buck A., Stijger I., 2002. *Schade door Pepinomaazaïekvirus Onderzoek en Aanbevelingen*. Report no. 539. Wageningen, the Netherlands: Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Sector Glastuinbouw.
- Campbell R.N., 1996. Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 87-108.
- Campbell T.N., Sim S.T., 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radicale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1136-43.
- de Cara M., López V., Córdoba M.C., Santos M., Jordá C., Tello C., 2008. Association of *Olpidium bornovanus* and *Melon necrotic spot virus* with Vine Decline of Melon in Guatemala. *Plant Disease* **92**, 709-13.
- Cassells A.C., Herrick C.C., 1977. Cross protection between mild and severe strains of *Tobacco mosaic virus* in doubly inoculated tomato plants. *Virology* **78**, 253-320.
- Cho J.J., Ullman D.E., Wheatley E., Holly J., Gonsalves D., 1992. Commercialization of ZYMV cross protection for zucchini production in Hawaii. *Phytopathology* **82**, 1073.
- Cooke A., 2000. Mystery virus. *Grower* , **24** February, 19-20.
- Córdoba M.C., Martínez-Priego L., Jordá C., 2004a. New natural hosts of *Pepino mosaic virus* in Spain. *Plant Disease* **88**, 906.
- Córdoba M.C., Martínez-Priego Ll., Saval P., Lacasa A., Jordá C., 2004b. La relación entre la infección con PepMV (*Pepino mosaic virus*) y la presencia de *Olpidium* sp en raíces, como causa del síndrome del colapso del tomate. Lloret de Mar. XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, 46.
- Córdoba-Sellés M.C., García-Rández A., Alfaro-Fernández A., Jordá-Gutiérrez C., 2007. Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*, **91**, 1250-4.

- Cotillon A.C., Girard M., Ducouret S., 2002. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of *Pepino mosaic virus* (PepMV). *Archives of Virology* **147**, 2231-8.
- Davino S., Bellardi M.G., Agosteo G.E., Iacomo G., Davino M., 2006. Characterization of a strain of *Pepino mosaic virus* found in Sicily. *Journal of Plant Pathology* **88** (supplement 3), 40.
- Davino S., Accotto G.P., Masenga V., Torta L., Davino M., 2009. Basil (*Ocinum basilicum*), a new host of *Pepino mosaic virus*. *Plant Pathology* **58**, 407.
- Delic D., Mehle N., Gutiérrez-Aguirre I., GrudenK., Ravnikar M., 2008. One-step real time RT/qPCR for the detection of *Pepino mosaic virus* in different matrixes. *Journal of Plant Pathology*, **90(2, Supplement)**, S2.299.
- Dodds J.A., 1982. Cross protection and interference between electrophoretically distinct strains of *Cucumber mosaic virus* in tomato. *Virology* **118**, 235-40.
- EPPO, 2001. First report of *Pepino mosaic potexvirus* in Sweden. *EPPO Reporting Service* **9**, 157.
- EPPO, 2003a. *New pest situations-Pepino mosaic potexvirus*. EPPO Working Party on Phytosanitary Regulations, Document 03/10351.
- EPPO, 2003b. *Pepino mosaic potexvirus*. EPPO Alert list. <http://www.eppo.org>.
- EPPO, 2003c. Situation of *Pepino Mosaic Potexvirus* in EPPO countries. *EPPO Reporting Service* **9**, 132.
- EPPO, 2004a. First finding of *Pepino Mosaic Potexvirus* in Slovakia. *EPPO Reporting Service* **1**, 8.
- EPPO, 2004b. First report of *Pepino Mosaic Potexvirus* in Bulgaria. *EPPO Reporting Service* **5**, 76.
- EPPO, 2004c. Results of the 2003/2004 surveys on *Pepino Mosaic Potexvirus* done in United Kingdom. *EPPO Reporting Service* **10**, 146.
- EPPO, 2004d. First report of *Pepino Mosaic Potexvirus* in Hungary. *EPPO Reporting Service* **11**, 167.

- EPPO, 2007. First report of *Pepino Mosaic Potexvirus* in Austria. *EPPO Reporting Service* **1**, 006.
- EPPO, 2008. First outbreak of *Pepino Mosaic Potexvirus* in the Czech Republic. *EPPO Reporting Service* **7**, 144.
- EPPO, 2009. European and Mediterranean Plant Protection Organization. [http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert\\_List/viruses/PEPMV0.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/viruses/PEPMV0.htm)
- Fakhro A., Paschek U., von Bargaen S., Büttner C., Schwartz D., 2005. Distribution and spread of *Pepino mosaic virus* (PepMV) in tomatoes cultivated in a recirculating hydroponic system. In: Alford DV, Backhaus GF, eds. *Introduction and Spread of Invasive Species*. Symposium Proceedings **No. 81**. Alton, UK: British Crop Production Council, 223-4.
- Fakhro A., von Bargaen S., Bandte M., Büttner C., Schwartz D., Franken P., 2009. Can root endophytic fungi confine spread of *Pepino mosaic virus* in tomato? *Acta Horticulturae* **821**, 169-74.
- Fletcher J., 2000. Pepino mosaic, a new disease of tomatoes. Horticultural Development Council, Fact Sheet, **12**, 6 pp.
- Fraile A., Escriu F., Aranda M.A., Malpica J.M., Gibbs A., García-Arenal F., 1997. A century of Tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *Journal of Virology* **71**, 8316–20.
- French C.J., Bouthillier M., Bernardy M., Ferguson G., Sabourin M., Johnson R.C., Masters C., Godkin S., Mumford R., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. *Plant Disease* **85**, 1121.
- Forray A., Tüske M., Gáborjányi R., 2004. First report on the occurrence of *Pepino mosaic virus* in Hungary. *Növényvédelem*, **40(9)**, 471-3.
- Gómez J., Velasco V., 1991. Presencia de *Olpidium radicale* en los embalses para riego de Almería. *Phytoma-Spain* **33**, 23-7.
- Gómez P., Sempere R.N., Elena S.F., Aranda M.A., 2009. Mixed infections of Pepino Mosaic Virus strains modulate the evolutionary dynamics of this emergent virus. *Journal of Virology*, doi:10.1128/JVI.01486-09.
- Gutiérrez-Aguirre I., Mehle N., Delíc D., Gruñen K., Mumford R., Ravnkar M., 2009. Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype

- discrimination of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Virological Methods* **162**, 46-55.
- Hadar E., Katan J., Jacoby B., Zamski E., 1992. Effect of biotrophic root fungi *Olpidium* and *Polymyxa* on plant development. *Phytoparasitica* **20**, 227.
- Hanssen I.M., Paeleman A., Wittemans L., Goen K., Lievens B., Bragard C., Vanacheter A.C.R.C., Thomma B.P.H.J., 2008. Genetic characterization of *Pepino mosaic virus* isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology* **121**, 131–46.
- Hanssen I.M., Paeleman A., Vandewoestijne E., van Bergen L., Bragard C., Lievens B., Vanachter A.C.R.C., Thomma B.P.H.J., 2009a. *Pepino mosaic virus* isolates and differential symptomatology in tomato. *Plant Pathology* **58**, 450-60.
- Hanssen I.M., Mumford R., Blystad D.R., Cortez I., Hasiów-Jaroszewska B., Hristova D., Pagán I., Pereira A.M., Peters J., Pospieszny H., Ravnikar M., Stijger I., Tomassoli L., Varveri C., van der Vlugt R., Nielsen S.L., 2009b. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* in tomato. *European Journal of Plant Pathology*. doi: [10.1007/s10658-009-9528-x](https://doi.org/10.1007/s10658-009-9528-x)
- Harris K.F., 1981. Arthropod and Nematode vectors of plant viruses. *Annual Review of Phthopathology* **19**, 391-426.
- Hasiów B., Borodynko N., Pospieszny H., 2008a. Complete genomic RNA sequence of the Polish *Pepino mosaic virus* isolate belonging to the US2 strain. *Virus Genes* **36**, 209-14.
- Hasiów B., Borodynko N., Pospieszny H., 2008b. Development of a real time RT-PCR assay for detecting genetically different *Pepino mosaic virus* isolates. *Journal of plant protection research* **48**, 295-301.
- Hasiów-Jaroszewska B., Borodynko N., Pospieszny H., 2009. Infectious RNA transcripts derived from cloned cDNA of a *Pepino mosaic virus* isolate. *Archives of Virology* **154**, 853-6.
- IMIDA, 2001. Internet resource: <http://www.imida.es/docs/memorias>.

- Jones R.A.C., Koenig R., Lesemann D.E., 1980. *Pepino mosaic virus*, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology* **94**, 61-8.
- Jordá C., Lázaro A., Font I., Lacasa A., Guerrero M.M., Cano A., 2000a. Nueva enfermedad en el tomate. *PHYTOMA España* **119**, 23-8.
- 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.
- Jordá C., Lázaro A., Martínez-Culebras P., Abad P., Lacasa A., Guerrero M.M., 2001a. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato in Spain. *Plant Disease* **85**, 1292.
- Jordá C., Lázaro A., Martínez-Culebras P., Lacasa A., 2001b. First report of *Pepino mosaic virus* on natural hosts. *Plant Disease* **85**, 1292.
- Kadaré G., Haenni A.L., 1997. Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology* **71**, 2583-90.
- Kamer F., Argos P., 1984. Primary structural comparisons of RNA-dependent RNA-polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research* **12**, 7269-82.
- Koenig R., Lesemann D.E., Jones R.A.C., 1989. Pepino mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses n° 350, 3 pp.
- Krinkels M., 2001. *Pepino mosaic virus* causes sticky problem. *Prophyta: The Annual* **May 2001**, 30-3.
- 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* **28**, 34-40.
- Lacasa A., Guerrero M.M., Hita I., Martínez C., 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. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **27**, 489-501.

- Lacasa A., Jordá C., 2002. El virus del mosaico del pepino dulce y sus connotaciones en el cultivo del tomate. *Terralia* **26**, 58-65.
- Lacasa A., Guerrero M.M., Hita I., Martínez C., Jordá C., Bielza P., Contreras J., Alcázar A., Cano A., 2003. Implicaciones de los abejorros (*Bombus* spp.) en la dispersión del virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*) en cultivos de tomate. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **29**, 393-403.
- Lecoq H., Lemaire J.M., Wipf-Scheibel C., 1991. Control of *Zucchini yellow mosaic* in squash by cross protection. *Plant Disease* **75**, 208-11.
- Lesemann D.E., Dalchow J., Winter S., Pfeilstetter E., 2000. Occurrence of *Pepino mosaic virus* in European tomato crops: identification, etiology and epidemiology. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt* **376**, 323.
- Ling K.S., 2007. Molecular characterization of two *Pepino mosaic virus* variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes* **34**, 1-8.
- Ling K.S., Scott J.W., 2007. Sources of Resistance to *Pepino mosaic virus* in tomato accessions. *Plant Disease* **91**, 749-53.
- Ling K.S., Wechter W.P., Jordan R., 2007. Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Virological Methods* **144**, 65-72.
- Ling K.S., 2008. *Pepino mosaic virus* on tomato seed: Virus location and mechanical transmission. *Plant Disease* **92**, 1701-5.
- Ling K.S., Wintermantel W.M., Bledsoe M., 2008. Genetic composition of *Pepino mosaic virus* population in North American greenhouse tomatoes. *Plant Disease* **92**: 1683-8.
- Loomans A., Franssen J., van der Staaij M., Stijger I., Klapwijk J., 2000. Latest news on whitefly in the Netherlands. *EWSN Newsletter* **6**, 2.
- López C., Soler S., Nuez F., 2005. Comparison of the complete sequences of three different isolates of *Pepino mosaic virus*: Size variability of the

- TGBp3 protein between tomato and *L. peruvianum* isolates. *Archives of Virology* **150**, 619-27.
- Maroon-Lango C.J., Guaragna M.A., Jordan R.L., Hammond J., Bandla M., Marquardt S.K., 2003. Detection and characterization of a US isolate of *Pepino mosaic virus*. *Phytopathology* **93**, S57.
- Maroon-Lango C.J., Guaragna M.A., Jordan R.L., Hammond J., Bandla M., Marquardt S.K., 2005. Two unique US isolates of *Pepino mosaic virus* from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate. *Archives of Virology* **150**, 1187-201.
- Martínez-Culebras P.V., Lázaro A., Abad-Campos P., Jordá C., 2002. A RT-PCR assay combined with RFLP analysis for detection and differentiation of isolates of *Pepino mosaic virus* (PepMV) from tomato. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 887-92.
- Matthews R.E.F., 1991. *Plant Virology*, 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press, New York.
- Maule A., Leh V., Lederer C., 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 279–84.
- Moreno I.M., Malpica J.M., Díaz-Pendón J.A., Moriones E., Fraile A., García-Arenal F., 2004. Variability and genetic structure of the population of *Watermelon mosaic virus* infecting melon in Spain. *Virology* **318**, 451–60.
- Moya A., Holmes E.C., González-Candelas F., 2004. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 279–88.
- Mumford R.A., Metcalfe E.J., 2001. The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology* **146**, 2455-60.
- O'Neill T., Spence N., Mumford R., Skelton A., 2003. *Pepino mosaic virus* of tomato new results on virus persistence and disinfection. Factsheet 20/03, Tomato, Project No. PC 181, Horticultural Development Council, East Malling, Kent, UK, 4 pp.



- Pagán I., Córdoba-Sellés M.C., Martínez-Priego L., Fraile A., Malpica J.M., Jordá C., García-Arenal F., 2006. Genetic Structure of the Population of *Pepino mosaic virus* Infecting Tomato Crops in Spain. *Phytopathology* **96**, 274-9.
- Perring T.M., Farrar C.A., Blua M.J., Wang H.L., Gosalves D., 1995. Cross protection of cantaloupe with a mild strain of *Zucchini yellow mosaic virus*: effectiveness and application. *Crop Protection* **14**, 601-6.
- Pfeilstetter E., 2002. Monitoring on the presence of *Pepino mosaic virus* in Germany. Letter to the European Commission, 2 October 2002. Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft.
- Pfeilstetter E., 2003. Monitoring on the presence of *Pepino mosaic virus* in Germany. Letter to the European Commission, 2 October 2003. Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft.
- Picó B., Herraiz J., Ruiz J.J., Nuez F., 2002. Widening the genetic basis of virus resistance on tomato. *Scientia Horticulturae* **94**, 73-89.
- Pospieszny H., Borodynko N., 2006. New Polish isolate of *Pepino mosaic virus* highly distinct from European tomato, Peruvian, and US2 strains. *Plant Disease* **90**, 1106.
- Pospieszny H., Hasiów B., Borodynko N., 2008. Characterization of two distinct Polish isolates of *Pepino mosaic virus*. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 443-5.
- Ramel M.E., Gugerli P., Gilli C., 2007. La mosaïque du pépino sur tomate. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture* **39 (3)**, 211-2.
- Ramírez G., Bustamante P., 2001. Detección del *Pepino mosaic virus* (PepMV) en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) mediante técnicas serológicas. Resúmenes de XI Congreso Nacional de Fitopatología de Chile. *Fitopatología* **37**, 67-108.
- Roggero P., Masenga V., Lenzi R., Coghe F., Ena S., Winter S., 2001. First report of *Pepino mosaic virus* in tomato in Italy. *Plant Pathology* **50**, 798.

- Rozanov M.N., Koonin E.V., Gorbalenya A.E., 1992. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the “Sindbis-like” supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, **73**, 2129-34.
- Salomone A., Roggero P., 2002. Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Plant Pathology* **84**, 65-8.
- Schwarz D., Paschek U., Bandte M., Büttner C., Obermeier C., 2009. Detection, spread, and interactions of *Pepino mosaic virus* and *Pythium aphanidermatum* in the root environment of tomato in hydroponics. *Acta Horticulturae* **808**, 163-70.
- Shipp J.L., Buitenhuis R., Stobbs L., Wang K., Kim W.S., Ferguson G., 2008. Vectoring of *Pepino mosaic virus* by bumble-bees in tomato greenhouses. *Annals of Applied Biology* **153**, 149-55.
- Soler S., Prohens J., Díez M.J., Nuez F., 2002. Natural occurrence of *Pepino mosaic virus* in *Lycopersicon* species in Central and Southern Peru. *Journal of Phytopathology* **150**, 49-53.
- Soler S., López C., Nuez F., 2005. Natural occurrence of viruses in *Lycopersicon* spp. in Ecuador. *Plant Disease* **89**, 1244.
- Soler-Aleixandre S., Cebolla-Cornejo J., Nuez F., 2005a. Sources of resistance to *Pepino mosaic virus* (PepMV) in tomato. *Rep. Tomato Genet. Coop.* **55**, 43-5.
- Soler-Aleixandre S., López C., Díez M.J., Pérez de Castro A., Nuez F., 2005b. Association of *Pepino mosaic virus* with Tomato Collapse. *Journal of Phytopathology* **153**, 464-9.
- Spence N.J., Basham J., Mumford R.A., Hayman G., Edmondson R., Jones D.R., 2006. Effect of *Pepino mosaic virus* on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology* **55**, 595-606.
- Stäubli A., 2005. Faits marquants dans la recherche 2004. Nouvelle virose sur tomate. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture* **37**(3), p 150.

- Stijger I., 2007. Controlling Pepino mosaic virus in tomato. Canadian Greenhouse Conference. [www.canadiangreenhouseconference.com/](http://www.canadiangreenhouseconference.com/)
- Thresh J.M., 1981. The role of weeds and wild plants in the epidemiology of plant virus diseases. In *Pests, pathogens and vegetation* (ed. Thresh, J.M.) Pitman: London, pp. 53-70.
- Tomlinson J.A., Thomas B.J., 1986. Studies on melon necrotic spot virus disease of cucumber and on the control of the fungus vector (*Olpidium radicale*). *Annals of Applied Biology* **108**, 71-80.
- Verhoeven J.Th.J., van der Vlugt R.A.A., Roenhorst J.W., 2003. High similarity between tomato isolates of *Pepino mosaic virus* suggest a common origin. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 419-25.
- van der Vlugt R.A.A., Stijger C.C.M.M., Verhoeven J.Th.J., Lesemann D.E., 2000. First Report of *Pepino mosaic virus* on Tomato. *Plant Disease* **84**, 103.
- van der Vlugt R.A.A., Cuperus C., Vink J., Stijger C.C.M.M., Lesemann D.E., Verhoeven J.Th.J., Roenhorst J.W., 2002. Identification and characterization of *Pepino mosaic potexvirus* in tomato. *EPPO Bulletin*, **32**, 503.
- van der Vlugt R.A.A. 2009. *Pepino mosaic virus*. *Hellenic Plant Protection Journal* **2**, 47-56.
- Walkey D.G.A., Lecoq H., Collier R., Dobson S., 1992. Studies on the control of *Zucchini yellow mosaic virus* in courgettes by mild strain protection. *Plant Pathology* **41**, 762-71.
- Wang H.L., Gonsalves D., Provvidenti R., Lecoq H.L., 1991. Effectiveness of cross protection by a mild strain of *Zucchini yellow mosaic* in cucumber, melon, and squash. *Plant Disease* **75**, 203-7.
- Whitham S.A., Wang Y.Z., 2004. Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 365-72.
- Wong S.M., Mahtani P.H., Lee K.C., Yu H.H. Tan Y., Neo K.K., Chan Y., Wu M., Chang C.G., 1997. *Cymbidium mosaic potexvirus* RNA:complete

nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *Archives of Virology* **142**: 383-91.

Wright D., Mumford R., 1999. *Pepino mosaic potexvirus (PepMV). First records in tomato in United Kingdom*. Plant Disease Notice No. 89. York, UK: Central Science Laboratory.

Yanten Y., Renas C., Espinosa C., Lolas M., Sandoval C., 2005. Determinación de la importancia de Pepino mosaic potexvirus- PepMV en áreas productoras de tomate bajo invernadero de la zona central de Chile. Resumen del XV Congreso de Fitopatología

Yeh S.D., Gonsalves D., Wang H.L., Namba R., Chiu R.J., 1988. Control of *Papaya ringspot virus* by cross protection. *Plant Disease* **72**, 375-80.

Zhang Y., Shen Z.J., Zhong J., Lu X.L., Cheng G., Li R.D., 2003. Preliminary characterization of *Pepino mosaic virus* Shanghai isolate (PepMV-Sh) and its detection with ELISA. *Acta Agriculturae Shanghai* **19**, 90-2.