



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

TESIS DOCTORAL

**Epidemiología, caracterización molecular y desarrollo de
métodos de diagnóstico del virus de las manchas necróticas
del melón (MNSV) y de su hongo vector
*Olpidium bornovanus***

José Ángel Herrera Vásquez

Directora:

Dra. Concepción Jordá Gutiérrez

Valencia, Octubre de 2009



**PATOLOGÍA VEGETAL
(VIRUS FITOPATÓGENOS)
DPTO. ECOSISTEMAS AGROFORESTALES
E.T.S.LAGRÓNOMOS
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
Camino de Vera, s.n. 46122- Valencia- ESPAÑA**

Tel.: 96 387 9255 Fax: 96 387 9269 E-mail: mjordag@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 Don José Ángel Herrera Vásquez, ha realizado bajo su dirección en el Laboratorio nacional de referencia para la identificación y diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas de especies vegetales no leñosas, el trabajo que con título “Epidemiología, caracterización molecular y desarrollo de métodos de diagnóstico del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) y de su hongo vector *Olpidium bornovanus*” presenta para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo.

Para que así conste a los efectos oportunos

Valencia, 17 de septiembre de 2009

Firmado: Concepción Jordá Gutiérrez

El trabajo presentado en esta tesis ha sido realizado en el Grupo de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia, España, gracias a la concesión de dos becas de Doctorado, una de ellas otorgada por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID, España, periodo 2004–2007), y la otra por el Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos y la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (IFARHU-SENACYT, Panamá, periodo 2007–2010).

Parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en:

- Herrera JA, Cebrián MC, Jordá C, 2006. First report of *Melon necrotic spot virus* in Panama. *Plant Disease* **90**, 1261.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Jordá C, 2008. *Melon necrotic spot virus* (MNSV): nuevo virus en el cultivo de melón en Panamá. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* **79–80**, 40–48.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Córdoba-Sellés MC, Jordá C, 2009. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. *Mycological Research* **113**, 602–610.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2009. Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of seed-disinfection treatments. *Plant Pathology* **58**, 436–442.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Rosselló JA, Jordá C. Genetic diversity of *Melon necrotic spot virus* and *Olpidium* isolates from different origins. *Plant Pathology*, Accept (11-Sep-2009).
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Jordá C. Occurrence, distribution and characterization of viruses in cucurbit crops in Panama. *Journal of Plant Pathology*, Accept (05-Sep-2009).

Y presentados en los congresos científicos:

- Herrera JA, Cebrián MC, Jordá C. 2006. Avances en el estudio de la variabilidad presentada por aislados del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en España y Centroamérica. En: *XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Murcia: España, p. 277.
- Herrera JA, Cebrián MC, Roselló JA, Jordá C. 2006. Avances en el estudio de la variabilidad presentada por aislados del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en España, México y Centroamérica. En: *XI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología*.

Asociación Panameña para el Avance de la Ciencia (APANAC). Panamá: Panamá, P-10.

- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá, C, 2007. Molecular variability of different isolates of *Olpidium bornovanus*. In: *XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Sorrento: Italy, p. 275.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Roselló JA, Córdoba-Sellés C, Jordá C, 2007. Molecular variability among isolates of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) from Spain, Mexico and Central America. In: *XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Sorrento: Italy, p. 281.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Córdoba-Sellés MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2008. *Melon necrotic spot virus* (MNSV): new virus in melon crops in Panama. *Journal of Plant Pathology* **90**, S2.379 (*IX International Congress of Plant Pathology*, Torino, Italy).
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Córdoba-Sellés MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2008. Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of melon seed disinfection treatments assessed by ELISA and RT-PCR. *Journal of Plant Pathology* **90**, S2.379 (En: *IX International Congress of Plant Pathology*, Torino, Italy).
- López V, De Cara M, Córdoba-Sellés MC, Herrera-Vásquez JA, Santos M, Diáñez F, Carretero F, Ruíz FJ, Jordá C, Tello JC, 2006. Agentes asociados al colapso del melón en suelos cultivados con melón de Guatemala. En: *XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Murcia: España, p. 223.
- López V, De Cara M, Córdoba-Sellés MC, Herrera-Vásquez JA, Diáñez F, Aliaga P, Ruíz FJ, Santos M, Jordá C, Tello JC, 2006. Agentes asociados al colapso del melón en suelos cultivados con melón de Honduras. En: *XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Murcia: España, p. 224.

Agradecimientos

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”**Albert Einstein**

Después de casi 5 años de intenso trabajo, ha llegado el momento de dar fin a esta tesis doctoral. Durante este tiempo fueron muchas las personas que de una u otra manera han colaborado en su realización y, por ello, quiero agradecer sinceramente a cada una de ellas.

En primer lugar quiero agradecer a Dios, porque me ha abierto el camino y me ha dado el espíritu de seguir siempre adelante, mostrándome su fidelidad a cada paso de mi vida.

A la directora de esta tesis, la Dra. Concepción Jordá Gutiérrez (“Concha”), por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su Grupo de Virología, creo que no la he defraudado. Por todo lo que he aprendido con sus enseñanzas, sin duda serán referentes en mi futuro camino de la investigación.

A la Dra. María Luz Herrero (Bioforsk, Plant Health and Plant Protection Division, Noruega) y al Dr. Julio César Tello Marquina (Departamento de Producción de Plantas, Universidad de Almería, España) por los aislados fúngicos que tan amablemente nos cedieron; al Dr. Julio Gómez [Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA), La Mojonera, Almería, España] por los aislados monoesporangiales de *Olpidium bornovanus*; a la Dra. Laura Tomassoli (Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Roma, Italia) por el aislado italiano del MNSV; al Dr. Roberto Beltrán por las muestras de suelo de Brasil.

Al Dr. José Antonio Navarro (“Toni”) [Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Valencia, España] por las secuencias de los “primers” de las proteínas de movimiento del

MNSV que tan amablemente nos cedió y por su colaboración y sugerencias siempre útiles.

Al Dr. Josep Antoni Rosselló (“Pep Toni”) (Jardín Botánico, Universidad de Valencia, España) por enseñarme todo lo relacionado al análisis de secuencias.

A la Dirección Nacional de Sanidad Vegetal, Ministerio de Desarrollo Agropecuario (DNSV-MIDA, Panamá) por su asistencia técnica y económica en parte de los muestreos realizados en los cultivos de cucurbitáceas en Panamá, especialmente a los ingenieros Alberto Moreno, Ariel Espino, Jorge Ramos, José Angel Bellanero, Juan Batista, Juan Pablo Soriano, Ricardo Gaona, Roberto Samaniego y a la Dra. Indira Molo; a la Ing. Oris de Beitía por enviarme algunas referencias sobre coleópteros transmisores del MNSV presentes en Panamá; al técnico Manuel Martínez por su amistad y ayuda en gran parte de los muestreos realizados a nivel nacional; al Ing. Olehg Aguilar quiero agradecer de manera especial por su colaboración, la experiencia y el ánimo transmitido, principalmente en lo referente a los estudios doctorales, además de su gran amistad.

Al Ing. Orlando Osorio [Unión de Cooperativistas Agropecuarios Panameños para la Exportación (UCAPE)] quiero agradecer muy especialmente por su apoyo en los muestreos de cucurbitáceas en las provincias de Los Santos y Herrera, Panamá, y al Dr. Miguel Juárez (Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, España) por su colaboración en los muestreos de cucurbitáceas en la región de Murcia, España.

Al Ing. José Luis Jorge (Dirección Nacional de Agricultura, Programa Nacional de Cucurbitáceas-MIDA, Panamá) por facilitarme toda la información relacionada con los datos de producción y superficie de cucurbitáceas en Panamá.

A los agricultores de las diferentes regiones del cultivo de cucurbitáceas, tanto en España como en Panamá, por permitirme realizar los muestreos en sus campos de cultivo.

A los compañeros del Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos, en especial a Josep, por todo el apoyo recibido durante estos años y, a Mónica, por ayudarme en todo lo relacionado con el proceso de maquetación de la tesis.

A mis compañeros del Grupo de Virología por el compañerismo y amistad (incluyendo a los que un día han participado en este grupo de trabajo): Ana Alfaro (por su buena amistad y disponibilidad en todo momento), Dani (aunque lo conozco desde hace poco tiempo, hemos compartido buenos momentos, principalmente a la hora de la comida), Maica (por su buena amistad, disponibilidad en todo momento y por introducirme en el mundo molecular), Mari (por su buena amistad, disponibilidad en todo momento y la gran ayuda brindada en todo lo relacionado con las técnicas serológicas, además de su inestimable aportación en la revisión de los artículos resultado de estos años de trabajo y por sus aportaciones siempre interesantes). Gracias a todos ellos no solo por sus aportes sino también por todos los momentos que hemos compartido haciendo más ameno todo este tiempo. A Isabel y M^a Carmen (por su colaboración y atención) y a José Manuel (por su extraordinaria colaboración y compañerismo hasta el final de esta tesis).

A mis amigos por escucharme, por preocuparse y también por animarme, apoyándose incondicionalmente en este nuevo reto. A Wendy, por su apoyo y su valiosa ayuda, mi infinita gratitud.

Un agradecimiento enorme al Dr. Orencio Fernández (D.E.P.) por todo lo que aprendí de él, por proporcionarme una visión y un entusiasmo en el mundo de la Virología, por su confianza y estímulo y por sus apreciables consejos tanto en lo personal como en lo científico, impulsándome en todo momento a enfrentar este gran desafío.

A esa familia tan especial, incluida Cuccitta, que me ha acogido y enseñado cosas de su país, la verdad no tengo palabras para expresar todo mi agradecimiento. Sin ellos habría sido mucho más difícil llegar hasta aquí, gracias de corazón. Estoy seguro que la buena amistad y el cariño que siento por ellos superará con creces la distancia física y el tiempo.

A mi familia que siempre me ha apoyado incondicionalmente. A mis padres y hermanas por animarme en todo momento en la realización de este trabajo, a ellos quiero dar las gracias más grandes y dedicar esta tesis que para mí son un ejemplo a seguir, sin ellos habría resultado muchísimo más complicado cumplir esta meta.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID, España) por la concesión, durante el periodo 2004–2007, de una beca de doctorado, y al Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos y la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (IFARHU-SENACYT, Panamá) por la concesión, durante el periodo 2007–2010, de una beca para continuar dichos estudios doctorales, sin las cuales habría resultado mucho más difícil culminar este trabajo.

Resumen

El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) es una de las principales entidades virales que afectan a los cultivos de cucurbitáceas a nivel mundial. No obstante, existe muy poca información sobre la epidemiología de la enfermedad causada por este virus, especialmente en lo que respecta a la transmisión por semilla, a la desinfección de éstas, a la presencia y distribución del virus y de su hongo vector *Olpidium bornovanus* en el mundo y a la diversidad genética de ambas entidades. En este sentido, conocer estos aspectos epidemiológicos así como la variabilidad en las poblaciones de dichos agentes infecciosos es un factor clave para el manejo de la enfermedad. Del mismo modo, hay aspectos relacionados con los métodos de diagnóstico del MNSV y *O. bornovanus*, así como de otras especies de *Olpidium*, entre ellas, *O. brassicae* y *O. virulentus*, claramente mejorables, especies estas últimas citadas como transmisoras de importantes virus en diversos cultivos hortícolas, que es necesario estudiar para comprender mejor las interacciones entre los virus y sus hongos vectores, así como también para determinar el rango de hospedantes de estas entidades.

La transmisión por semilla del MNSV fue evaluada en plántulas procedentes de semilla comercial de melón. Dichas plántulas, en estado de cotiledón y posteriormente en estado adulto, fueron analizadas mediante DAS-ELISA y RT-PCR para la detección del citado virus. Ningún grupo de plántulas resultó positivo al MNSV mediante DAS-ELISA. En cambio, mediante RT-PCR, la proporción de plántulas infectadas fue de al menos 7–8%, con un índice de transmisión de semilla infectada a plántula de 11.3–14.8%. Diferentes tratamientos de desinfección de semilla fueron evaluados para prevenir la transmisión por semilla del MNSV. Así pues, los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento de 144 h a 70°C podría ser usado para erradicar el virus de las semillas de melón, sin afectar la germinación de las mismas.

Debido a la importancia que adquiere *O. bornovanus* en la transmisión por semilla del MNSV, se ha desarrollado y puesto a punto un método multiplex PCR con la finalidad de detectar el citado hongo. Adicionalmente, mediante dicho método es posible detectar con alta sensibilidad y diferenciar otras especies de *Olpidium* que infectan las raíces de diferentes cultivos hortícolas, *O. brassicae* y *O. virulentus*, permitiendo distinguir dichas especies, lo que no es posible con

la simple observación morfológica de las esporas de resistencia. Este método fue también efectivo en la detección de *O. bornovanus* en muestras de agua. Adicionalmente, la especificidad y sensibilidad del método fueron evaluadas, y el mismo fue validado con muestras de 9 diferentes cultivos procedentes de 11 países de América, Europa y África.

Se ha estudiado la incidencia geográfica y la diversidad genética del MNSV y *Olpidium* en diferentes especies de cucurbitáceas procedentes de varios países de América Latina (Guatemala, Honduras, México y Panamá) y Europa (Italia y España). Veintinueve aislados del MNSV de estas procedencias fueron seleccionados con el objetivo de estudiar la diversidad genética de todas las proteínas que componen el genoma de este virus (p29, p89, p7A, p7B, p42), además de determinar las relaciones filogenéticas de la población del MNSV. Dicha población presento cierta variación en términos geográficos. La diversidad genética observada en las proteínas completas p7A y p7B sugiere que estas regiones codificantes se encuentran bajo una fuerte presión de selección. Por otro lado, se analizó la región ITS del DNA ribosómico en 40 aislados de *Olpidium* asociados con cada una de las regiones geográficas analizadas en este estudio. Estos aislados estuvieron relacionados con el hospedante en el cual fueron obtenidos.

Finalmente, se realizaron dos prospecciones en 2006 y 2008 para determinar la presencia y distribución del MNSV y *O. bornovanus* en las principales regiones del cultivo de cucurbitáceas en Panamá, siendo identificadas estas entidades en el 12% y 45% de las muestras analizadas, respectivamente, pero solamente en muestras de melón. *O. bornovanus* fue observado en todas las regiones en las cuales el MNSV fue detectado. Cabe destacar en este aspecto que ni el MNSV ni su hongo vector habían sido citados en Panamá anteriormente a esta tesis. Asimismo, los aislados del MNSV y *O. bornovanus* obtenidos en este estudio fueron analizados molecularmente en orden de estimar su variabilidad. Adicionalmente, en 2008 fueron analizados otros virus que infectan a las cucurbitáceas, entre ellos, el CMV, SqMV, PRSV, WMV-2 y ZYMV, debido a que en ese año fueron observados síntomas similares a los que producen dichos virus. Tanto la presencia como la distribución de cada uno de ellos varían según la región y la especie de cucurbitácea analizada.

Resum

El virus de les taques necròtiques del meló (MNSV) és una de les principals entitats virals que afecten als cultius de cucurbitàcies a nivell mundial. No obstant, existix molt poca informació sobre l'epidemiologia de la malaltia causada per este virus, especialment pel que fa a la transmissió per llavor, a la desinfecció d'estes, a la presència i distribució del virus i del seu fong vector *Olpidium bornovanus* en el món i a la diversitat genètica d'ambdós entitats. En este sentit, conèixer estos aspectes epidemiològics així com la variabilitat en les poblacions dels dits agents infecciosos és un factor clau per al maneig de la malaltia. De la mateixa manera, hi ha aspectes relacionats amb els mètodes de diagnòstic del MNSV i *O. bornovanus*, així com d'altres espècies d'*Olpidium*, entre elles, *O. brassicae* i *O. virulentus*, clarament millorables, espècies estes últimes citades com a transmissores d'importants virus en diversos cultius hortícoles, que és necessari estudiar per a comprendre millor les interaccions entre els virus i els seus fongs vectors, així com també per a determinar el rang d'hostes d'estas entitats.

La transmissió per llavor del MNSV va ser avaluada en plantes procedents de llavor comercial de meló. Dites plantes, en estat de cotiledó i posteriorment en estat adult, van ser analitzades per mitjà de DAS-ELISA i RT-PCR per a la detecció del citat virus. Cap grup de plantes va resultar positiu al MNSV per mitjà de DAS-ELISA. En canvi, per mitjà de RT-PCR, la proporció de plantes infectades va ser de, al menys 7–8%, amb un índex de transmissió de llavor infectada a plantes del 11.3–14.8%. Diferents tractaments de desinfecció de llavor van ser avaluats per a previndre la transmissió per llavor del MNSV. Així doncs, els resultats obtinguts suggerixen que el tractament de 144 h a 70°C podria ser usat per a eradicar el virus de les llavors de meló, sense afectar la germinació de les mateixes.

A causa de la importància que adquirix *O. bornovanus* en la transmissió per llavor del MNSV, s'ha desenvolupat i posat a punt un mètode multiplex PCR amb la finalitat de detectar el citat fong. Addicionalment, per mitjà del dit mètode és possible detectar amb alta sensibilitat i diferenciar altres espècies d'*Olpidium* que infecten les arrels de diferents cultius hortícoles, *O. brassicae* i *O. virulentus*, permetent distingir dites espècies, que no és possible amb la simple observació

morfològica de les espores de resistència. Este mètode va ser també efectiu en la detecció d'*O. bornovanus* en mostres d'aigua. Addicionalment, l'especificitat i sensibilitat del mètode van ser avaluades, i el mateix va ser validat amb mostres de 9 diferents cultius procedents d'11 països d'Amèrica, Europa i Àfrica.

S'ha estudiat la incidència geogràfica i la diversitat genètica del MNSV i *Olpidium* en diferents espècies de cucurbitàcies procedents de diversos països d'Amèrica Llatina (Guatemala, Hondures, Mèxic i Panamà) i Europa (Itàlia i Espanya). Vint-i-nou aïllats del MNSV d'estes procedències van ser seleccionats amb l'objectiu d'estudiar la diversitat genètica de totes les proteïnes que componen el genoma d'este virus (p29, p89, p7A, p7B, p42), a més de determinar les relacions filogenètiques de la població del MNSV. La dita població presenta certa variació en termes geogràfics. La diversitat genètica observada en les proteïnes completes p7A i p7B suggerix que estes regions codificants es troben davall una forta pressió de selecció. D'altra banda, es va analitzar la regió ITS del ADN ribosòmic en 40 aïllats d'*Olpidium* associats amb cada una de les regions geogràfiques analitzades en este estudi. Estos aïllats van estar relacionats amb l'hoste en el qual van ser obtinguts.

Finalment, es van realitzar dos prospeccions en 2006 i 2008 per a determinar la presència i distribució del MNSV i *O. bornovanus* en les principals regions del cultiu de cucurbitàcies en Panamà, sent identificats estas entitats en el 12% i 45% de les mostres analitzades, respectivament, però només en mostres de meló. *O. bornovanus* va ser observat en totes les regions en les quals el MNSV va ser detectat. Cal destacar en este aspecte que ni el MNSV ni el seu fong vector havien sigut citats en Panamà anteriorment a esta tesi. Així mateix, els aïllats del MNSV i *O. bornovanus* obtinguts en este estudi van ser analitzats molecularment en orde d'estimar la seua variabilitat. Addicionalment, en 2008 van ser analitzats altres virus que infecten a les cucurbitàcies, entre ells, el CMV, SqMV, PRSV, WMV-2 i ZYMV, pel fet que en eixe any van ser observats símptomes semblants als que produïxen els dits virus. Tant la presència com la distribució de cada un d'ells varien segons la regió i l'espècie de cucurbitàcia analitzada.

Abstract

Melon necrotic spot virus (MNSV) is one of the major viruses affecting cucurbit crops worldwide. However, very little information on the epidemiology of the disease caused by this virus is available, especially regarding seed transmission, seed disinfection, the presence and distribution of the virus and its fungal vector *Olpidium bornovanus* in the world, and the genetic diversity of both entities. Therefore, discovering the epidemiological aspects and variability in populations of these infectious agents is a key factor to manage the disease. Similarly, some aspects of the diagnostic methods of MNSV and *O. bornovanus* and of other *Olpidium* species, including *O. brassicae* and *O. virulentus*, may clearly improve. The aforementioned species transmit different viruses in various horticultural crops, a scenario which needs studying to better understand the interactions between viruses and fungal vectors, and to determine the host range of these entities.

Seed transmission of MNSV was assessed in seedlings grown from commercial melon seeds. Seedlings at the cotyledon and adult stages were analyzed by DAS-ELISA and RT-PCR to detect the virus. No seedling group was positive for MNSV by DAS-ELISA. However, RT-PCR revealed that at least 7.0–8.0% of seedlings were infected, corresponding to seed-to-seedling transmission rates of 11.3–14.8%. Different seed-disinfection treatments were evaluated to prevent seed transmission of MNSV. The results suggest that a treatment of 144 h at 70°C could eradicate the virus in melon seeds without affecting germination.

Given the importance of acquiring *O. bornovanus* in seed transmission of MNSV, a multiplex PCR method to detect this fungus was established. This method also detected with high sensitivity and differentiated other *Olpidium* species that infect the roots of different vegetable crops, *O. brassicae* and *O. virulentus*, to distinguish these species, which is not possible by a simple morphological observation of resting spores. This method also detected *O. bornovanus* in water samples. Additionally, the specificity and sensitivity of the method were evaluated, and the method was validated with samples of 9 different crops from 11 American, European and African countries.

The geographic incidence and genetic diversity of MNSV and *Olpidium* in different cucurbits species from several Latin American (Guatemala, Honduras, Mexico and Panama) and European (Italy and Spain) countries have been studied. Twenty-nine MNSV isolates of these countries were selected to study the genetic diversity of all the proteins that compose the genome of this virus (p29, p89, p7A, p7b, p42) and to determine the phylogenetic relationships of the MNSV population. This population varies in geographical terms. The genetic diversity observed in the entire p7A and p7b proteins suggests that these coding regions are under strong selection pressure. We also analyzed the ITS regions of ribosomal DNA of 40 *Olpidium* isolates associated with each geographic region of this study. These isolates were related to the host from which they were obtained.

Finally, we conducted two surveys (2006 and 2008) to determine the presence and distribution of MNSV and *O. bornovanus* in the main cucurbit-growing regions of Panama where these entities were identified in 12% and 45% of the samples analyzed, respectively, but only in melon. *O. bornovanus* was observed in all the regions where MNSV was detected. Neither MNSV nor its fungus vector has been cited in Panama before this thesis. Likewise, the MNSV and *O. bornovanus* isolates obtained in this study were molecularly analyzed to estimate their variability. Additionally, other viruses that infect cucurbits were analysed in 2008, including CMV, SqMV, PRSV, WMV-2 and ZYMV, because symptoms similar to those producing these viruses were reported that year. The presence and distribution of each virus varied according to the region and cucurbit species analyzed.

Índice general

Índice de figuras.....	xvi
Índice de tablas.....	xxii
Abreviaturas.....	xxiv
Capítulo 1. Introducción general.....	3
1. EL CULTIVO DE MELÓN.....	3
1.1 Origen y generalidades.....	3
1.2 Descripción biológica, taxonomía y usos.....	3
1.3 Importancia Económica.....	4
1.3.1 Producción mundial.....	4
1.3.2 Comercio Exterior.....	5
1.3.3 Producción en España.....	5
1.3.4 Producción en Panamá.....	7
2. VIRUS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE MELÓN.....	8
3. LA FAMILIA TOMBUSVIRIDAE.....	17
4. EL GÉNERO CARMOVIRUS.....	19
5. EL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV).....	21
5.1 Distribución y antecedentes históricos.....	21
5.2 Hospedantes y sintomatología de la enfermedad.....	22
5.3 Agente causal y organización genómica.....	26
5.4 Diagnóstico.....	28
5.5 Variabilidad de aislados.....	30
5.6 Transmisión.....	32
5.6.1 Transmisión por semilla.....	32
5.6.2 Transmisión por <i>O. bornovanus</i>	34
5.6.2.1 Taxonomía y ciclo de vida de <i>Olpidium</i>	34
5.6.2.2 Morfología y características de <i>Olpidium</i>	36
5.6.2.3 Aislamiento, diagnóstico y preservación de <i>Olpidium</i>	38
5.7 Control.....	41
5.7.1 Control del vector.....	41

5.7.2 Prácticas culturales.....	42
5.7.3 Material vegetal.....	43
5.7.4 Fuentes de resistencia en melón.....	44
6. OTROS AGENTES QUE PRESENTAN SINTOMATOLOGÍA DE “COLAPSO” SIMILAR AL MNSV.....	45
7. BIBLIOGRAFÍA.....	52
Capítulo 2. Justificación y objetivos.....	69
Capítulo 3. Seed transmission of <i>Melon necrotic spot virus</i> and efficacy of seed-disinfection treatments. <i>Plant Pathology</i> 58 , 436–442 (2009).....	75
Capítulo 4. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of <i>Olpidium bornovanus</i> , <i>O. brassicae</i> , and <i>O. virulentus</i> . <i>Mycological Research</i> 113 , 602–610 (2009).....	93
Capítulo 5. Genetic diversity of <i>Melon necrotic spot virus</i> and <i>Olpidium</i> isolates from different origins. <i>Plant Pathology</i> , Accept (11-Sep-2009).....	117
Capítulo 6. Occurrence, distribution and characterization of viruses in cucurbit crops in Panama. <i>Journal of Plant Pathology</i> , Accept (05-Sep-2009).....	147
Capítulo 7. First report of <i>Melon necrotic spot virus</i> in Panama. <i>Plant Disease</i> 90 , 1261 (2006).....	171
Capítulo 8. <i>Melon necrotic spot virus</i> (MNSV): nuevo virus en el cultivo de melón en Panamá. <i>Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)</i> 79–80 , 40–48 (2008).....	175
Capítulo 9. Discusión general.....	195
Capítulo 10. Conclusiones.....	209

Capítulo 11. Bibliografía general.....	217
Anexos	239

Índice de figuras

Figura 1.1. Producción (A) y superficie (B) de melón por continentes en 2007.....	5
Figura 1.2. Producción y superficie de melón por provincias y comunidades autónomas españolas en 2006.....	6
Figura 1.3. Producción y superficie de melón por provincias en Panamá en 2007.....	7
Figura 1.4. Círculos concéntricos en fruto de sandía producidos por CMV (A) y mosaico y abullonado en hojas de melón causados por ZYMV (B).....	11
Figura 1.5. Abullonado y deformación del limbo foliar en sandía producidos por WMV-2 (A) y amarilleo con deformación y abullonado en hojas de sandía causados por PRSV-W (B).....	12
Figura 1.6. Mosaico, abullonado, deformación y reducción del crecimiento en hojas de melón producidos por SqMV.....	13
Figura 1.7. Moteado internerval y amarilleo conservando los nervios verdes en hojas de melón producidos por BPYV (A) y amarilleo internerval generalizado manteniendo los nervios verdes en hojas de melón causado por CYSDV (B).....	14
Figura 1.8. Amarilleo de venas y clorosis internerval en hoja de pepino producidos por CVYV (A) y amarilleo generalizado en melón causado por CABYV (B).....	15
Figura 1.9. Manchas cloróticas con centro necrótico en hoja de pepino producido por CLSV (A) y mosaico moteado verde, así como reducción del tamaño en hoja de sandía causados por CGMMV (B).....	16

Figura 1.10. “Cribado” (A), lesiones cloróticas evolucionan a necróticas (B) y “enrejado” de la hoja en melón (C).....23

Figura 1.11. Estrías necróticas en el cuello (A) y necrosis marrón en la base del tallo en melón (B).....23

Figura 1.12. “Cribado” (A), manchas necróticas externas (B), manchas “corchosas” en fruto de melón (C) y jaspeado de la pulpa en fruto de sandía (D).....24

Figura 1.13. Marchitez en melón (A) y “muerte súbita” o “colapso” en sandía (B).....25

Figura 1.14. Campos de melón (A) y sandía (B) gravemente afectados por el MNSV con pérdidas importantes en la producción.....26

Figura 1.15. Típicas partículas isométricas del MNSV.....27

Figura 1.16. Representación de la organización y expresión del genoma del MNSV. Los rectángulos representan las pautas de lectura abierta (ORF) y las líneas inferiores el producto de su traducción.....27

Figura 1.17. Ciclo de vida de *Olpidium*: fase asexual y sexual. Z, zoosporas; G, planogametos procedentes de diferentes zoosporangios; P, planogametos fusionados; K, cariogamia; R, esporas de resistencia.....36

Figura 1.18. Zoosporangios de *Olpidium* sp. en raíz de melón. Observación 40×.....37

Figura 1.19. Esporas de resistencia de *O. bornovanus* (A) y *O. brassicae* sl (B) en raíz de melón y lechuga, respectivamente. Observación 40×.....38

Figura 1.20. Región ITS usada frecuentemente en el diseño de cebadores o “primers” para la detección molecular y secuenciación de diferentes especies de hongos. Los cebadores usados rutinariamente en ambas situaciones son mostrados en negrita.....40

Figura 2.1. RT-PCR amplification of a 651-bp fragment representing the partial sequence of the *Melon necrotic spot virus* (MNSV) coat protein gene (p42). Lanes 1–8, composite root samples from 10 seedlings at the cotyledon stage germinated from untreated seeds; HC, healthy control; PC, MNSV-positive control (MNSV-PAN2); M, 100-bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas).....82

Figura 3.1. Resting spores of *Olpidium bornovanus* (A) and *Olpidium brassicae* sl (B). 40× magnifier.....102

Figura 3.2. Zoosporangia of *Olpidium* sp. 40× magnifier.....102

Figura 3.3. Multiplex PCR amplified DNA of three *Olpidium* spp. from root bait plants. Lanes 1–2, *O. bornovanus*; 3–4, *O. virulentus*; 5–6, *O. brassicae*; 7–8, *O. bornovanus*-dual infection detection with *O. virulentus*; NC, Negative control (sterile water); M, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).....105

Figura 3.4. Multiplex PCR amplified DNA of *O. bornovanus* from roots (R) or water (W) samples of melon hydroponic culture; NC, Negative control (sterile water); M, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).....105

Figura 3.5. Specificity of the multiplex PCR amplified DNA of *Olpidium* spp. artificial mixed infections from single infection root extracts. Lane 1, *O. bornovanus*/*O. virulentus*/*O. brassicae*-triple infection detection; 2, *O. bornovanus*/*O. virulentus*-dual infection detection; 3, *O. bornovanus*/*O. brassicae*-dual infection detection; *O. virulentus*/*O. brassicae*-dual infection detection; NC, Negative control (sterile water); M, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).....106

Figura 3.6. Sensitivity of the multiplex PCR amplified DNA of *Olpidium* spp. artificial mixed infections from single infection root extracts (A) and single infection zoospore extracts (B). Lane 5⁰, approximately 0.137 µg µl⁻¹ of total DNA (root + fungus) (A) and zoospore DNA (B); In both figures, 5⁻¹ to 5⁻¹², are serial twelve-time dilution from 5⁰; NC, Negative control (sterile water); Bands of 977, 579, and 204 bp corresponding to *O. bornovanus*, *O. virulentus*, and *O. brassicae*, respectively; M, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).....108

Figura 4.1. Neighbor-joining phylogenetic trees of 1000 bootstrap replicates obtained from the distance matrix (Kimura 2-parameters) with MEGA from the nucleotide sequences coding for the p29/p89 (RdRp) (A), p7A (MP) (B), p7B (MP) (C), and p42 (CP) (D) proteins of 29 *Melon necrotic spot virus* (MNSV) isolates from three cucurbit species from Latin America and Europe. Sequences for the other MNSV isolates obtained from the NCBI database (indicated with a triangle) were included: melon isolates were from Israel (ISR, GenBank accession No. DQ922807), Japan (Chiba, AB250684; Kochi, AB250685; Nagasaki, AB250686; Yamaguchi, AB250687; NH, AB044291; NK, AB044292), and Spain (Al, DQ339157; 264, AY330700; Malfa5, AY122286), from cucumber from the Netherlands (Dutch, D12536), or from watermelon from Japan (Tottori, AB232925; Kochi, AB232926). Bootstrap values >60 are shown. The scale bar represents a genetic distance of 0.05...134

Figura 4.2. Neighbor-joining phylogenetic tree of 1000 bootstrap replicates obtained from the distance matrix (Kimura 2-parameters) with MEGA from the nucleotide sequences of the rDNA-ITS region of 33 *Olpidium bornovanus* and 7 *Olpidium virulentus* isolates from three cucurbit species from Latin America and Europe. Sequences for other *Olpidium* isolates obtained from the NCBI database were included: *O. bornovanus* isolates of melon (indicated with a triangle) were from Japan (CH, AB205214; NA, AB205215); *O. virulentus* isolates of non-cucurbit species (shown with a rhomb) were from Japan (WT-1, AB205203; HY-1, AB205204; KZ-1, AB205205; TAK-1, AB205206; CH-1, AB205207; WOmS-3, AB205208), and Spain (SP-O8, EU981901; SP-O9, EU981902). Bootstrap values >60 are shown. The scale bar represents a genetic distance of 0.05.....137

Figura 5.1. Map of Panama showing the location of Regions 1 to 5 where field-grown cucurbit crops were surveyed for MNSV, *Ospidium bornovanus* and mosaic viruses in the growing seasons of 2006 and 2008. Regions 1: Los Santos, 2: Herrera, 3: Coclé, 4: Veraguas, 5: Chiriquí.....150

Figura 5.2. Symptoms of stem necrosis at the crown level (A), mosaic, mottling and distortion on a leaf (B), and mottling, distortion and abnormal growth on a fruit (C) of virus-infected melon plants..... 151

Figura 5.3. RT-PCR amplification of a 650-bp fragment representing the partial sequence of the p42 protein of MNSV (coat protein, CP). Lanes 1 to 6, root samples from field-grown melon plants; NC, Negative control; PC, MNSV-Positive control; M, 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).....155

Figura 5.4. Resting spores of *Ospidium bornovanus*. 40× magnifier.....155

Figura 5.5. Multiplex PCR amplification of a 977-bp fragment representing the partial sequence of the *Ospidium bornovanus* rDNA-ITS region. Lanes 1 to 5, root samples from infected bait melon plants. NC, Negative control; PC, *O. bornovanus*-Positive control; M, 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)..... 156

Figura 6.1. Sintomatología del MNSV en melón. Estrías necróticas en tallo de planta de melón de campo (A) y manchas necróticas en hojas cotiledonares de melón (B).....177

Figura 6.2. Localización geográfica del estudio. El mapeo de los datos obtenidos se realizó con el programa ArcGIS® 9 ArcMAP™ versión 9.1 (1999–2005). Esc.: 1:10,000,000.....179

Figura 6.3. Ensayo de detección de *O. bornovanus* en los suelos muestreados. Macetas con una mezcla 3:1 de arena:suelo (A) y macetas con arena solamente (400 g) usadas como control sano (B). Una planta/maceta, y tres repeticiones por muestra y control sano.....183

Figura 6.4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RT-PCR de los aislados del MNSV amplificadas a partir de plantas de melón de campo. Líneas 1 y 2 = muestra 7777 dilución 1:100 y 1:500, respectivamente; líneas 3 y 4 = muestra 7779 dilución 1:100 y 1:500, respectivamente; línea 5 = muestra 8180 dilución 1:200; C- = control sano; C+ = control positivo del MNSV; M = 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas Life Sciences, Opelstrasse, Alemania).....186

Figura 6.5. *Olpidium bornovanus*. Esporangios (A) y esporas de resistencia (B). Observación 40×.....188

Índice de tablas

Tabla 1.1. Principales virus que afectan a las cucurbitáceas cultivadas en condiciones naturales a nivel mundial.....	9
Tabla 1.2. Listado de las diferentes especies virales que componen el género <i>Carmovirus</i> y la forma de transmisión de cada una de ellas.....	20
Tabla 1.3. Principales patógenos asociados al “colapso” del melón.....	46
Tabla 2.1. Effect of disinfection treatments on melon seed germination rates.....	80
Tabla 2.2. Efficacy of seven disinfection treatments for eradication of <i>Melon necrotic spot virus</i> (MNSV) from infected melon seed, infection rates obtained after each seed treatment, and probability of seedling infection, using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).....	83
Tabla 3.1. Nucleotide sequences of species-specific primers designed for <i>O. bornovanus</i> , <i>O. virulentus</i> , and <i>O. brassicae</i> based on rDNA-ITS sequences.....	100
Tabla 3.2. Morphological and molecular identification of <i>Olpidium</i> spp.....	103
Tabla 4.1. Nucleotide sequences of MNSV-specific primers based on the p29, p89, p7A, p7B, and p42 proteins.....	122
Tabla 4.2. MNSV isolates obtained in this study.....	123
Tabla 4.3. <i>Olpidium</i> isolates obtained in this study.....	126
Tabla 4.4. Identification and geographic incidence of MNSV and <i>Olpidium</i> species.....	128

Tabla 4.5. Nucleotide diversity for two entire genomic regions of the 29 MNSV isolates (this study), including 13 reference isolates.....135

Tabla 5.1. Occurrence and distribution of MNSV (surveys of 2006 and 2008) and mosaic viruses (survey of 2008) as determined by enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) on cucurbit samples with virus-like symptoms.....157

Tabla 5.2. Occurrence and distribution of *Olpidium bornovanus* as determined by resting spores morphology on cucurbit samples collected from the fields surveyed in 2006 and 2008.....159

Tabla 5.3. Percentage of amino acid identity (above the diagonal) and similarity (below the diagonal) in the p29, p89, p7A, p7B and p42 proteins by two-way comparisons between the isolates of *Melon necrotic spot virus* obtained in this work (PA-1, PA-2, PA-3) and the isolates in the NCBI database.....160

Tabla 6.1. Muestras de melón recolectadas en 2005 y 2006 durante las prospecciones realizadas en campos de melón de exportación de Panamá...180

Tabla 6.2. Porcentaje de homología de nucleótidos y aminoácidos de un fragmento del gen de la proteína de cubierta (p42) de aislados del MNSV (aislados descritos anteriormente).....187

Abreviaturas

(por orden alfabético)

VIRUS

ArMV: *Arabidopsis mosaic virus* (virus del mosaico del arabis)

AWBV: *Ahlu waterborne virus* (virus transmitido por el agua del río Ahlu)

BCTV: *Beet curly top virus* (virus del ápice rizado de la remolacha)

BMMV: *Bean mild mosaic virus* (virus del mosaico suave de la judía)

BMoV: *Blackgram mottle virus* (virus del moteado de la judía negra)

BPYV: *Beet pseudo-yellows virus* (virus del falso amarilleo de la remolacha)

BYMV: *Bean yellow mosaic virus* (virus del mosaico amarillo de la judía)

CABYV: *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones)

CarMV: *Carnation mottle virus* (virus del moteado del clavel)

CCFV: *Cardamine chlorotic fleck virus* (virus del punteado clorótico del *Cardamine*)

CGMMV: *Cucumber green mottle mosaic virus* (virus del mosaico moteado verde del pepino)

CLSV: *Cucumber leaf spot virus* (virus de las manchas de la hoja del pepino)

CIYVV: *Clover yellow vein virus* (virus del amarilleo de las venas del trébol)

CMV: *Cucumber mosaic virus* (virus del mosaico del pepino)

CNV: *Cucumber necrosis virus* (virus de la necrosis del pepino)

CPFV: *Cucumber pale fruit viroid* (viroide del fruto pálido del pepino)

CPMoV: *Cowpea mottle virus* (virus del moteado del caupí)

CTSV: *Cucumber toad-skin virus* (virus de la piel de sapo del pepino)

CuLCrV: *Cucurbit leaf crumple virus* (virus de la hoja arrugada de las cucurbitáceas)

CuSBV: *Cucumber soil-borne virus* (virus transmitido por el suelo en pepino)

CVYV: *Cucumber vein yellowing virus* (virus de las venas amarillas del pepino)

CYSDV: *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas)

EILV: *Elderberry latent virus* (virus latente del *Elderberry*)

GaMV: *Galinsoga mosaic virus* (virus del mosaico de la *Galinsoga*)

GMoV: *Glycine mottle virus* (virus del moteado de la soja)

- HCRSV: *Hibiscus chlorotic ringspot virus* (virus de las manchas anilladas cloróticas del hibisco)
- JINRV: *Japanese iris necrotic ring virus* (virus de los anillos necróticos del iris japonés)
- LBVV: *Lettuce big-vein virus* (virus de las venas grandes de la lechuga)
- LIYV: *Lettuce infectious yellows virus* (virus del amarilleo infeccioso de la lechuga)
- MCLCV: *Melon chlorotic leaf curl virus* (virus del rizado clorótico de la hoja del melón)
- MCMV: *Maize chlorotic mottle virus* (virus del moteado clorótico del maíz)
- MLCV: *Melon leaf curl virus* (virus del rizado de la hoja del melón)
- MNSV: *Melon necrotic spot virus* (virus de las manchas necróticas del melón)
- MRMV: *Melon rugose mosaic virus* (virus del mosaico rugoso del melón)
- MuVNV: *Muskmelon vein necrosis virus* (virus de la necrosis de las venas del melón)
- MVBMV: *Melon vein banding mosaic virus* (virus del mosaico bandeado de las venas del melón)
- MVV: *Melon variegaton virus* (virus del variegado del melón)
- NTNV: *Narcissus tip necrosis virus* (virus de la necrosis apical del narciso)
- OuMV: *Ourmia melon virus* (virus del melón de Ourmia)
- PepMV: *Pepino mosaic virus* (virus del mosaico del pepino dulce)
- PFBV: *Pelargonium flower break virus* (virus de la rotura de la flor del pelargonio)
- PIV-6: *Plantain virus 6* (virus 6 del plátano)
- PRSV-W: *Papaya ringspot virus-W* (virus de las manchas anilladas de la papaya-W), anteriormente denominado WMV-1: *Watermelon mosaic virus-1* (virus del mosaico 1 de la sandía)
- RCNMV: *Red clover necrotic mosaic virus* (virus del mosaico necrótico del trébol rojo)
- SgCV: *Saguaro cactus virus* (virus del cactus saguaro)
- SLCV: *Squash leaf curl virus* (virus del rizado de la hoja de la calabaza)
- SqMV: *Squash mosaic virus* (virus del mosaico de la calabaza)
- SqNV: *Squash necrosis virus* (virus de la necrosis de la calabaza)
- SqVYV: *Squash vein yellowing virus* (virus de las venas amarillas de la calabaza)
- TBRV: *Tomato black ring virus* (virus de los anillos negros del tomate)

TCV: *Turnip crinkle virus* (virus del arrugamiento del nabo)
TeSV: *Tephrosia symptomless virus* (virus asintomático de la *Tephrosia*)
TMV: *Tobacco mosaic virus* (virus del mosaico del tabaco)
TNV: *Tobacco necrosis virus* (virus de la necrosis del tabaco)
ToMV: *Tomato mosaic virus* (virus del mosaico del tomate)
ToRSV: *Tomato ringspot virus* (virus de las manchas anilladas del tomate)
TRSV: *Tobacco ringspot virus* (virus de las manchas anilladas del tabaco)
TSV: *Tobacco stunt virus* (virus del enanismo del tabaco)
TSWV: *Tomato spotted wilt virus* (virus del bronceado del tomate)
TuMV: *Turnip mosaic virus* (virus del mosaico del nabo)
WmCMV: *Watermelon curly mottle virus* (virus del moteado rizado de la sandía)
WMV-2: *Watermelon mosaic virus-2* (virus del mosaico 2 de la sandía)
WSMoV: *Watermelon silver mottle virus* (virus del moteado plateado de la sandía)
WWBV: *Weddel waterborne virus* (virus transmitido por el agua del río Weddel)
ZYFV: *Zucchini yellow fleck virus* (virus del punteado amarillo del calabacín)
ZYMV: *Zucchini yellow mosaic virus* (virus del mosaico amarillo del calabacín)

OTRAS ABREVIATURAS

(+) ssRNA: single-stranded RNA of positive polarity (RNA de simple cadena de polaridad positiva)
 $A_{405\text{nm}}$: absorbancia a 405 nanómetros
aa: aminoácido
a. C.: antes de Cristo
BLAST: basic local alignments search tool (instrumento de búsqueda de alineamientos locales básicos)
BLOs: bacterium-like organisms (organismos similares a bacterias)
bp: pares de base
BSA: bovine serum albumin (albúmina de suero bovino)
cm: centímetro
CP: coat protein (proteína de cubierta o cápsida)
d: día
DAS-ELISA: double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (inmunoensayo enzimático de doble anticuerpo)
DI RNA: defective interfering RNA (RNA defectivo de interferencia)

d_N: sustituciones sinónimas

d_S: sustituciones no-sinónimas

dNTPs: deoxinucleótidos trifosfatos

d.p.i: días post-inoculación

d.p.s: días post-siembra

d.p.t: días post-transplante

EcoRI: las tres primeras letras corresponden al nombre científico de la bacteria (*Escherichia coli*), la letra R corresponde a la cepa de la bacteria (aislada de la cepa "RY13" de *E. coli*), mientras que el número romano I indica el orden de identificación de la enzima en la bacteria

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

E.Z.N.A.: EaZy Nucleic Acid Isolation

FS: frame shift (desplazamiento de pauta de lectura)

g: gramo

GPS: global positioning system (sistema de posicionamiento global)

gRNA: RNA genómico

GS: solución compuesta de 0.05 M de glicina y 1% de sucrosa

h: hora

ha: hectárea

HCL: ácido clorhídrico

IgG: inmunoglobulina G

ISEM: immunosorbent electron microscopy (serología mediante microscopía electrónica)

ITS: internal transcribed spacer (espaciador interno transcrito)

K2P: Kimura 2-parámetros

kb: kilobase

kDa: kilodalton

KOH: hidróxido de potasio

L: litro

M: molaridad

MatGAT: Matrix Global Alignment Tool

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Análisis Evolutivo Molecular de la Genética)

MgCl⁺²: cloruro de magnesio

mg: miligramo

MgSO₄: sulfato de magnesio pentahidratado
min: minuto
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
MP: movement protein (proteína de movimiento)
m.s.n.m.: metros sobre el nivel del mar
N: Normalidad
Na₃PO₄: fosfato trisódico
NaCl: cloruro de sodio
NCBI: National Center of Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
NJ: neighbor-joining method
nm: nanómetro
nt: nucleótido
ORF: open reading frame (pauta de lectura abierta)
PBL: Pamilo, Bianchi and Li method
PBS-Tween: tampón fosfato salino-tween
PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PDA: potato dextrose agar (agar de dextrosa y patata)
pH: medida de la acidez o basicidad de una solución
PVP: polivinilpirrolidona
rDNA: DNA ribosómico
RdRp: RNA dependent RNA polimerase (RNA polimerasa RNA dependiente)
RFLP: restriction fragment length polymorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)
r.p.m: revoluciones por minuto
RT: read through (lectura a través del codón de parada)
RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction (retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa)
s: segundo
sgRNA: RNA subgenómico
sl: sensu lato
t: tonelada
TAE: tris acetato EDTA

U: unidad

μg: microgramo

μL: microlitro

μm: micrómetro

μM: micromolar

UTR: untranslated region (región no traducible)

V: voltios

VAST: vector-assisted seed transmission (transmisión por semilla asistida por el vector)

y: año

Capítulo 1

Capítulo 1

Introducción general

1. EL CULTIVO DE MELÓN

1.1 Origen y generalidades

El melón (*Cucumis melo* L.) ha experimentado desde finales de la década de los sesenta un desarrollo extraordinario en todo el mundo, pasando de ser un producto de consumo minoritario a otro de amplia aceptación, hecho que se fundamenta en un crecimiento continuado de la superficie cultivada y, sobre todo, en la mejora general del cultivo y de las variedades que se cultivan.

El origen del melón no está claramente establecido, debido a que algunos autores afirman que es originario de Asia, mientras que otros sitúan su origen en el continente africano. Probablemente, los primeros testimonios del cultivo de esta especie provienen de Egipto, ya que se han encontrado representaciones del melón en tumbas egipcias del 2400 antes de Cristo (a. C.) Otros autores relatan que posiblemente procede de la India, el Sudán, o los desiertos iraníes. Su introducción en Europa parece ser que tuvo lugar durante el imperio romano, pero durante la Edad Media desapareció del continente europeo, con excepción de la Península Ibérica, ocupada en aquella época por los árabes. Las expediciones comerciales del siglo XVII favorecieron la dispersión de esta hortícola, llegando a todas las urbes, lo que permitió el desarrollo de las especies hoy conocidas, siendo los colonizadores españoles los que introdujeron el melón en el continente americano (Zapata *et al.*, 1989; Maroto, 2002).

1.2 Descripción biológica, taxonomía y usos

El melón es una planta anual que pertenece a la familia *Cucurbitaceae* (Serrano-Cermeño, 1996). Es una especie con alto polimorfismo, de tallos lisos o estriados con pubescencia suave y zarcillos simples (León, 1987). Esta familia comprende

dos subfamilias (*Zanonioideae* y *Cucurbitoideae*), 8 tribus, 118 géneros y 825 especies, la mayoría de regiones cálidas, con una mayor presencia en las regiones tropicales y subtropicales. De este total de especies, aproximadamente 30 son cultivadas, destacando por su mayor relevancia económica el melón, la sandía [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai], el pepino (*Cucumis sativus* L.), el calabacín (*Cucurbita pepo* L. var. *medullosa* Alef.) y la calabaza (*Cucurbita maxima* var. *maxima* Duch. y *C. moschata* Duch.) (Maroto, 2002).

Taxonómicamente, el melón se encuentra ubicado en el Reino *Plantae*, División *Magnoliophyta*, Clase *Magnoliopsida*, Subclase *Dilliniidae*, Superorden *Violanae*, Orden *Violales*, Familia *Cucurbitaceae*, Subfamilia *Cucurbitoideae*, Tribu *Melothriaceae*, Subtribu *Cucumerinae*, Género *Cucumis*, Subgénero *Melo*, Sección *Melo*, Serie *Melo*, Especie *Cucumis melo* L. (CONABIO, 2008; USDA-ARS, 2008).

La principal utilización de esta especie consiste en el consumo de sus frutos como fruta fresca, aunque también se emplea para elaborar dulces y, cuando el fruto es joven, para preparar encurtidos. De las semillas se extrae un aceite apto para el consumo humano (Maroto, 2002).

1.3 Importancia Económica

1.3.1 Producción mundial

La producción de melón a nivel mundial ha seguido una tendencia alcista, aumentando de 13.579.004 toneladas (t) en 1990 a 26.021.159 t en 2007, incrementándose en un 47.8% entre un año y otro. La superficie destinada a su cultivo también ha aumentado de 895.398 hectáreas (ha) en 1990 a 1.268.874 ha en 2007, incrementándose en un 29.4% (FAO, 2008).

El mayor productor de melón del mundo es China, mientras que Turquía e Irán destacan también en este aspecto en el continente asiático, ocupando dicho continente el 73.1% del melón a nivel mundial (Fig. 1.1A) con una superficie cultivada de 71.9% (Fig. 1.1B) en 2007 (FAO, 2008). Le siguen en importancia al continente asiático en cuanto a producción y superficie de melón (Fig. 1.1: A, B), América (principalmente Estados Unidos, México, Costa Rica, Brasil, Guatemala, Honduras, Venezuela y Panamá), Europa (España, Italia, Rumania y

Francia), África (Egipto y Marruecos) y Oceanía (principalmente Australia) (FAO, 2008).

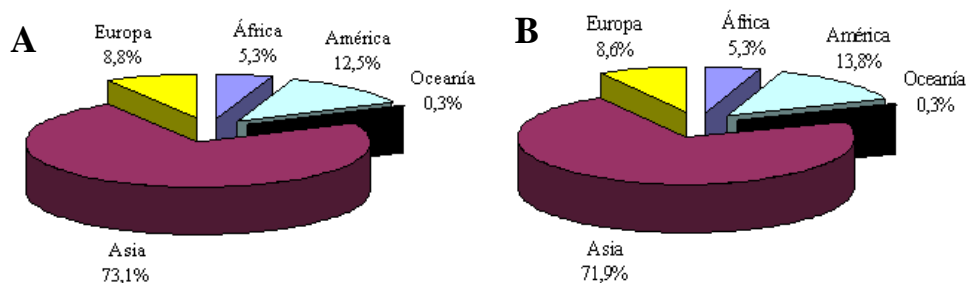


Figura 1.1 Producción (A) y superficie (B) de melón por continentes en 2007. Fuente: FAO, 2008.

1.3.2 Comercio Exterior

Gracias al crecimiento de la producción mundial de melón, el comercio internacional de esta hortícola ha podido mantener una tendencia alcista.

El mayor importador de melón del mundo es Estados Unidos, seguido de Canadá, en el continente americano. En Europa, las importaciones por países son variables, destacando Reino Unido, Francia, Alemania, Holanda y Rusia (FAO, 2008).

El principal exportador de melón del mundo es España, destacando también en este apartado México, Estados Unidos, Costa Rica, Honduras, Brasil, Guatemala e Irán (FAO, 2008). Los principales destinos de las exportaciones españolas son los países de la Comunidad Europea, los cuales reciben cerca del 95.0% de éstas. Con este incremento en el comercio mundial de melón, el valor del mismo también ha mostrado un saldo positivo, reflejándose en que el valor de las importaciones y exportaciones se ha incrementado paulatinamente.

1.3.3 Producción en España

El cultivo de melón en España tiene una considerable importancia debido a que en el marco europeo ha sido el país de mayor producción, mientras que a nivel mundial ocupa el quinto puesto, después de China, Turquía, Estados Unidos e Irán (FAO, 2008). En España, el melón es el segundo cultivo hortícola después

del tomate tanto por producción como por superficie cultivada, siendo también uno de los principales cultivos en cuanto a rendimiento económico (MAPA, 2008). España produjo el 47.1% de la producción de melón en Europa en 2007 y ha aumentado de 947.200 t en 1990 a 1.081.800 t en 2007, incrementándose en un 12.4% entre un año y otro, mientras que la superficie destinada a su cultivo se redujo de 61.500 ha a 38.700 ha, disminuyendo en un 58.9% en este mismo periodo (FAO, 2008). Esta reducción se debe a varios factores, entre los cuales cabe destacar la incidencia del denominado “colapso” del melón el cual ocupa un lugar predominante entre las enfermedades que afectan a esta hortícola (Iglesias-Culebras, 2000). No obstante, como indicamos anteriormente, la producción se ha incrementado durante el mismo periodo, probablemente por la utilización de variedades de mayor rendimiento y una especialización e intensificación de su cultivo.

Geográficamente, la producción de melón en España se concentra en el Levante y en el sur del país, donde se produce la mayor parte del melón destinado a la exportación hacia los mercados europeos. Los tipos de melones mas cultivados son los de Piel lisa, Tendral y Cantalupo. Por comunidades autónomas, los últimos datos de producción y superficie destacan, en orden de importancia, a Castilla-La Mancha, Andalucía, la Región de Murcia, Madrid, Extremadura, la Comunidad Valenciana y Cataluña (Fig. 1.2) como principales productores de melón y con la mayor superficie destinada a este cultivo en España (MAPA, 2008).

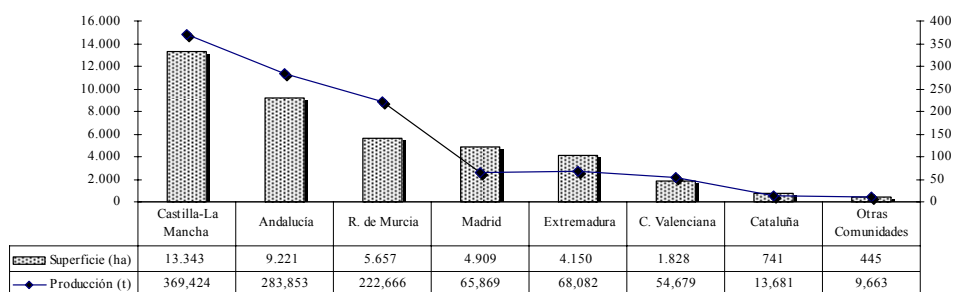


Figura 1.2 Producción y superficie de melón por provincias y comunidades autónomas españolas en 2006. Fuente: MAPA, 2008.

1.3.4 Producción en Panamá

El cultivo de melón en Panamá ha adquirido una gran importancia en los últimos años, ocupando el octavo puesto en producción en el continente americano. La producción de melón en este país ha aumentado de 5.580 t en 1990 a 41.769 t en 2007 incrementándose en un 86.6% entre un año y otro. Asimismo, la superficie destinada a su cultivo aumentó de 1428.5 ha en 1990 a 2379.4 ha en 2007, aumentando en un 39.9% en este mismo periodo (FAO, 2008; MIDA, 2008). La producción y la superficie, como ya se ha indicado, se han incrementado considerablemente, probablemente por la utilización de variedades de mayor rendimiento y una mayor especialización en las técnicas de cultivo, entre las cuales podemos destacar el uso de la plasticultura en los cultivos comerciales [Ing. Orlando Osorio, Unión de Cooperativistas Agropecuarios Panameños para la Exportación (UCAPE), comunicación personal].

La provincia de Los Santos, en la región central de Panamá, es la principal productora de la hortaliza ocupando el 68.1% de la producción nacional, mientras que la superficie destinada a su cultivo representó el 64.3% en 2007. En orden de importancia en cuanto a superficie le siguen las provincias de Coclé, Chiriquí, Herrera, Panamá y Veraguas (Fig. 1.3). Asimismo, la producción sigue esta misma tendencia, a excepción de la provincia de Herrera (Fig. 1.3), la cual ocupa el tercer lugar en este aspecto (MIDA, 2008).

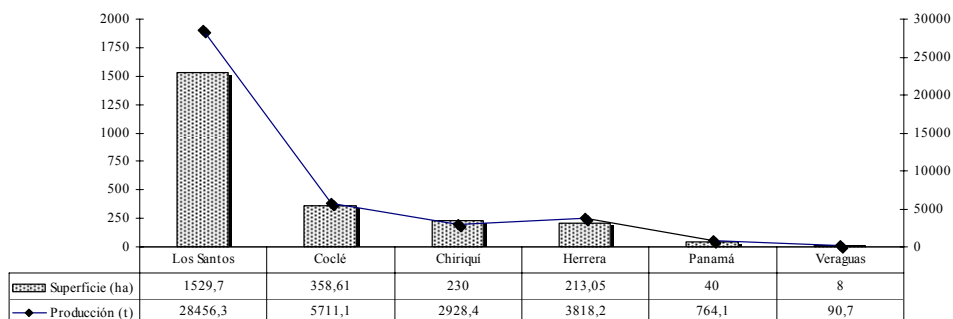


Figura 1.3 Producción y superficie de melón por provincias en Panamá en 2007. Fuente: MIDA, 2008.

En la actualidad, la mayor parte de la producción de melón en Panamá está destinada a la exportación, principalmente a Estados Unidos los melones tipo Honey Dew, mientras que a Europa las principales exportaciones están dirigidas a España, Inglaterra y Holanda, los melones tipo Piel de sapo, Galia y Tendral, respectivamente (Ing. Orlando Osorio, UCAPE, comunicación personal).

La intensificación del cultivo de melón en el mundo ha venido acompañado de una mayor incidencia de plagas y enfermedades, con los correspondientes efectos perjudiciales sobre la producción y la calidad del fruto. Estos contratiempos, unidos a la importancia económica de este cultivo en España, Panamá y en otros países productores de esta hortícola, justifican los enormes esfuerzos que se están llevando a cabo con el fin de buscar soluciones a los problemas fitosanitarios que han ido surgiendo a lo largo de estos años.

2. VIRUS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE MELÓN

El cultivo de melón dentro del sistema de producción mundial, como ya se ha indicado anteriormente, constituye uno de los cultivos más importantes. Su extensión e intensificación ha propiciado, como se ha dicho, la aparición de diversas problemáticas fitosanitarias que han incidido negativamente en su rendimiento produciendo importantes pérdidas económicas.

Las enfermedades ocasionadas por hongos y virus son las que aparecen con mayor frecuencia asociadas a esta hortícola. Sin embargo, de todos los patógenos que afectan al melón, los más difíciles de controlar son los virus (Naval-Merino, 2005). El melón, así como otras cucurbitáceas cultivadas como la sandía, el pepino y la calabaza, son afectados por numerosos virus, la mayoría de los cuales causan síntomas evidentes y pérdidas económicas importantes. En el mundo han sido descritos más de 50 virus y cuatro viroides capaces de afectar, de forma natural o artificial, una o más especies de cucurbitáceas. De ellos, 18 pueden afectar de forma natural al melón (Lovisoló, 1980; Luis-Arteaga, 1994). Según la bibliografía consultada, en la Tabla 1.1 se recogen los principales virus que afectan de forma natural a las cucurbitáceas a nivel mundial, citándose a que especies de cultivo.

Tabla 1.1 Principales virus que afectan a las cucurbitáceas cultivadas en condiciones naturales a nivel mundial^a

Vector	Género	Virus ^b	Hospedantes naturales ^c	Distribución geográfica ^d	
Pulgones	<i>Carlavirus</i>	<i>Muskmelon vein necrosis virus</i> (MuVNV)	M, P	China, EE. UU.	
		<i>Cucumber mosaic virus (CMV)*</i>	C, M, P, S	Mundial	
	<i>Luteovirus</i>	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV)</i>	C, M, P	Túnez, Asia, Europa	
		<i>Potyvirus</i>	<i>Bean yellow mosaic virus (BYMV)</i>	C	Mundial
			<i>Clover yellow vein virus (CIYVV)</i>	C	Mundial
			<i>Melon vein banding mosaic virus (MVBMV)</i>	M	Taiwán
			<i>Papaya ringspot virus-W (PRSV-W)*</i>	C, M, P, S	Mundial
			<i>Watermelon mosaic virus-2 (WMV-2)*</i>	C, M, P, S	Mundial
			<i>Zucchini yellow fleck virus (ZYFV)</i>	C, M, P, S	Grecia, Italia, Líbano, Siria
			<i>Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)*</i>	C, M, P, S	Mundial
Moscas blancas	<i>Begomovirus</i>	<i>Cucurbit leaf crumple virus (CuLCrV)</i>	C, M, P, S	EE. UU., México	
		<i>Melon chlorotic leaf curl virus (MCLCV)</i>	M	Guatemala	
		<i>Melon leaf curl virus (MLCV)</i>	M	EE. UU.	
		<i>Squash leaf curl virus (SLCV)</i>	C, M, P	EE. UU., México	
		<i>Watermelon curly mottle virus (WmCMV)</i>	M, S	EE. UU.	
	<i>Crimivirus</i>	<i>Beet pseudo-yellows virus (BPYV)</i>	C, M, P	Australia, Costa Rica, EE. UU., Japón, Europa	
		<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)</i>	C, M, P, S	Mundial	
	<i>Ipomovirus</i>	<i>Lettuce infectious yellows virus (LIYV)</i>	C, M	EE. UU.	
		<i>Cucumber vein yellowing virus (CVYV)</i>	M, P, S	España, Francia, Irán, Israel	
		<i>Squash vein yellowing virus (SqVYV)</i>	C, S	EE. UU.	
Cicádulas	<i>Curtovirus</i>	<i>Beet curly top virus (BCTV)</i>	C, M, P, S	Mundial	
Escarabajos	<i>Comovirus</i>	<i>Squash mosaic virus (SqMV)*</i>	C, M, S	Mundial	
Thrips	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i>	M, S	Mundial	
		<i>Watermelon silver mottle virus (WSMoV)</i>	M, S	Japón, Taiwán	
Nemátodos	<i>Nepovirus</i>	<i>Arabid mosaic virus (ArMV)</i>	C, P	Mundial	
		<i>Tobacco ringspot virus (TRSV)</i>	C, M, P, S	Alemania, Australia, China, EE. UU., Nueva Zelanda, Reino Unido	
		<i>Tomato black ring virus (TBRV)</i>	C	Mundial	
		<i>Tomato ringspot virus (ToRSV)</i>	M, P, S	Mundial	
Hongos	<i>Carmovirus</i>	<i>Cucumber leaf spot virus (CLSV)</i>	P	Arabia Saudita, Jordania, Europa	
		<i>Melon necrotic spot virus (MNSV)*</i>	M, P, S	Mundial	
	<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus (TNV)</i>	P	Mundial	
	<i>Tombusvirus</i>	<i>Cucumber necrosis virus (CNV)</i>	P	Canadá	

Continúa en la página siguiente

Vector	Género	Virus ^b	Hospedantes naturales ^c	Distribución geográfica ^d
Desconocido	<i>Ourmiavirus</i>	<i>Ourmia melon virus</i> (OuMV)	M	Irán
	<i>Rhabdovirus</i>	<i>Cucumber toad-skin virus</i> (CTSV)	P	Francia
		<i>Melon variegation virus</i> (MVV)	M	—
	<i>Tobamovirus</i>	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (CGMMV)	M, P, S	Asia, Europa
	<i>Tymovirus</i>	<i>Melon rugose mosaic virus</i> (MRMV)	M, S	Yemen
<i>Hostuviroide</i>	<i>Cucumber pale fruit viroid</i> (CPFV)	P	Holanda	

^aFuente: Adaptado de Luis-Arteaga (1994), Brunt *et al.* (1996), Jordá (1997) y Büchen-Osmond (2002).

^bLos virus descritos en España aparecen marcados en negrita, mientras que los descritos en Panamá aparecen indicados con un asterisco.

^c C, calabaza y/o calabacín; M, melón; P, pepino; S, sandía.

^dCuando se indica un determinado continente nos referimos a que el virus en particular ha sido descrito en 3 o más países de dicho continente.

Entre las principales infecciones virales en los cultivos de melón y otras cucurbitáceas cultivadas en España y en Panamá, cabe citar las causadas por el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), el cual produce en melón un fuerte mosaico verde claro-verde oscuro en las hojas, malformación, reducción de tamaño, así como también abullonado y bandeado verde oscuro de las venas y achaparamiento de la planta, mientras que en frutos puede observarse mosaico, moteado, y generalmente, reducción del tamaño. El número de semillas de estos frutos, cuando la afección es grave, disminuye considerablemente (Jordá, 1997). En frutos de sandía puede producir círculos concéntricos (Fig. 1.4A). Otro virus importante en este grupo de hortícolas es el virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) el cual produce, en las plantas de melón afectadas, aclaramiento de los nervios de las hojas, amarilleo con zonas necróticas en nervios y pecíolos, mosaico verde oscuro, asimetría, filiformismo, deformaciones, enaciones, enanismo general de la planta e incluso marchitez (Fig. 1.4B), mientras que en los frutos se observa una reducción del tamaño y número, mosaico externo con grietas, moteado interno y endurecimiento de la pulpa, con la consiguiente pérdida de calidad comercial. El tamaño de las semillas se reduce considerablemente en frutos afectados (Jordá, 1997). En frutos de sandía se observan mosaicos foliares y deformaciones con bultos (Luis-Arteaga, 1994).

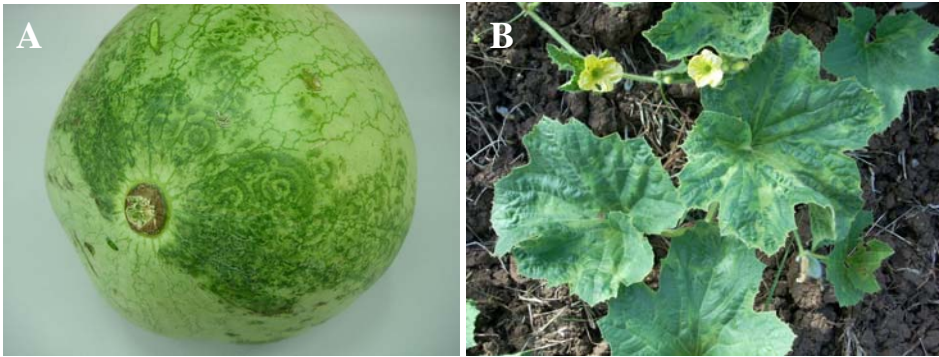


Figura 1.4 Círculos concéntricos en fruto de sandía producidos por CMV (A) y abullonado en hojas de melón causados por ZYMV (B). Cortesía: Figura A [Ing. M.Sc. M.C. Córdoba-Sellés, Grupo de Virología, Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM)-Universidad Politécnica de Valencia (UPV), Valencia-España].

Otro virus no menos importante que los citados anteriormente es el virus del mosaico 2 de la sandía (*Watermelon mosaic virus-2*, WMV-2), el cual causa graves daños que se traducen en importantes pérdidas económicas, presentando una sintomatología muy variada pero, en general, se puede decir que en melón produce mosaico en hojas, deformación, parada del crecimiento y reducción de la superficie foliar y, en frutos, mosaico pronunciado, mientras que en sandía (Fig. 1.5A) los síntomas descritos son mosaico verde oscuro junto a los nervios y deformación del limbo en hojas (Luis-Arteaga, 1994; Jordá, 1997). También podemos mencionar al virus de las manchas anilladas de la papaya-W (*Papaya ringspot virus-W*, PRSV-W), anteriormente denominado virus del mosaico 1 de la sandía (*Watermelon mosaic virus-1*, WMV-1), el cual ocasiona en melón un amarilleo generalizado, deformación en hojas con fasciación de nervios y, en frutos, mosaico verde oscuro en relieve, mientras que en sandía (Fig. 1.5B) se observa moteado y deformación de hojas y frutos (Luis-Arteaga, 1994; Jordá, 1997). Las infecciones presentadas por todos estos virus se realizan por pulgones de forma no persistente, y en el caso del CMV, además está citada la transmisión por semilla en pepino silvestre [*Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. & A. Gray] (Doolittle *et al.*, 1925), calabaza (Sharma y Chohan, 1974), judía verde (*Phaseolus vulgaris* L.) (Bos y Maat, 1974) y espinaca (*Spinacia oleracea* L.) (Yang *et al.*, 1997), entre otras especies de plantas.



Figura 1.5 Abullonado y deformación del limbo foliar en sandía producidos por WMV-2 (A) y amarilleo con deformación y abullonado en hojas de sandía causados por PRSV-W (B).

Una de las enfermedades más importantes es la causada por el virus del mosaico de la calabaza (*Squash mosaic virus*, SqMV) de fácil transmisión mecánica, además de transmisión por semilla (Franken *et al.*, 1990). Se ha citado también la transmisión del SqMV por las especies de insectos *Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata* Mannerheim (1843), *D. bivittula* Kirsch (1883), *Acalymma trivittata* Mannerheim (1843) y *A. thiemei thiemei* Weise (1916) (*Coleóptera*, *Crisomelidae*), *Epilachna chrysomelina* Fabricius (1775) y *E. paenulata* Germar (1824) (*Coleóptera*, *Coccinelidae*) (Brunt *et al.*, 1996), especies no citadas en

España ni en Panamá, según los datos que disponemos. Dada la forma de transmisión mecánica de éste virus, constituye un potencial y grave peligro debido al frecuentemente método utilizado del injerto, como medida de tipo cultural frente a los problemas fitosanitarios ligados al suelo. En cuanto a la sintomatología observada en las plantas afectadas por SqMV, en melón encontramos bandeado verde oscuro de las hojas, deformación y reducción del crecimiento, mosaico fuerte y abullonado (Fig. 1.6), mientras que en los frutos se observa una reducción del crecimiento y del tamaño y número de semillas, así como mosaico y deformación. Sin embargo, en sandía los síntomas son mucho más suaves (Luis-Arteaga, 1994; Jordá, 1997). En calabacín puede observarse un fuerte mosaico y deformación en hojas, así como abullonado y deformación en frutos.



Figura 1.6 Mosaico, abullonado, deformación y reducción del crecimiento en hojas de melón producidos por SqMV. Cortesía: Dra. C. Jordá (Grupo de Virología, IAM-UPV, Valencia-España).

Otro grupo de virus importantes en España son los causantes de amarillos en cucurbitáceas, los cuales presentan una sintomatología totalmente diferente a la descrita para los virus indicados anteriormente. Entre estos podemos mencionar las infecciones presentadas por el virus del falso amarilleo de la remolacha (*Beet pseudo-yellows virus*, BPYV) (Jordá-Gutiérrez *et al.*, 1993), cuya transmisión se realiza por *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (1856) (*Hemíptera*, *Aleyrodidae*). Los síntomas foliares causados por este virus comienzan con un pequeño moteado en las zonas internerviales de la hoja apenas perceptible. Posteriormente, se van haciendo mayores hasta que prácticamente la hoja queda

totalmente amarilla conservando los nervios verdes. También puede comenzar con una mancha amarilla en la base de la hoja que se va extendiendo hasta que toda la hoja está asimismo amarilla, conservándose los nervios verdes (Fig. 1.7A). El número de frutos disminuye considerablemente, mientras que los daños en cultivo protegido son importantes pudiendo llegar hasta un 100% de infección (Jordá, 1997).



Figura 1.7 Moteado internerval y amarilleo conservando los nervios verdes en hojas de melón producidos por BPYV (A) y amarilleo internerval generalizado manteniendo los nervios verdes en hojas de melón causado por CYSDV (B). Cortesía: Dra. C. Jordá (Grupo de Virología, IAM-UPV, Valencia-España).

El BPYV no es el único virus que produce amarilleos en cucurbitáceas. El virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*, CYSDV) (Rubio *et al.*, 1999) y el virus de las venas amarillas del pepino (*Cucumber vein yellowing virus*, CVYV) (Cuadrado *et al.*, 2001), cuya transmisión se realiza en ambos casos de forma semipersistente por *Bemisia tabaci* Gennadius (1889) (*Hemiptera*, *Aleyrodidae*), producen una sintomatología un tanto similar al BPYV. En el caso del CYSDV se produce un amarilleo internerval manteniendo los nervios verdes como en el caso anterior (Fig. 1.7B), mientras que en el caso del CVYV se produce un mosaico con moteado y el síntoma más típico y que le da nombre es el amarilleo de las venas formando un

enrejado (Fig. 1.8A). Posteriormente, se ha identificado un nuevo virus causante de amarillos en este grupo de hortalizas (Fig. 1.8B). Se trata del virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) (Juárez *et al.*, 2004), transmitido por pulgones de forma persistente.

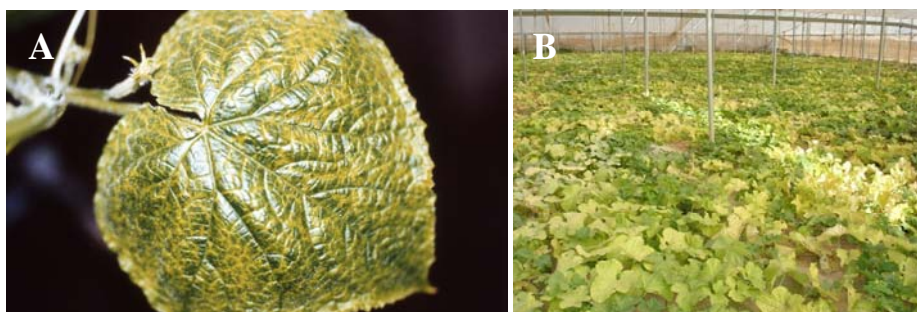


Figura 1.8 Amarilleo de venas y clorosis internerval en hoja de pepino producidos por CVYV (A) y amarilleo generalizado en melón causado por CABYV (B). Cortesía: Figura A (Dra. C. Jordá, Grupo de Virología, IAM-UPV, Valencia-España) y Figura B (Dr. Miguel Juárez, Escuela Politécnica Superior de Orihuela-Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante-España).

Además de los virus indicados anteriormente, en España se han identificado otros virus en los cultivos de cucurbitáceas, entre ellos, el virus de las manchas de la hoja del pepino (*Cucumber leaf spot virus*, CLSV) (Segundo *et al.*, 2001), transmitido de forma mecánica, además de presentar transmisión por semilla y por el hongo quítrido *Olpidium bornovanus* (Sahtiyanci) Karling (1977) (Brunt *et al.*, 1996), y cuya sintomatología típica consiste en manchas cloróticas con centro necrótico en hoja de pepino (Fig. 1.9A), así como también el virus del mosaico moteado verde del pepino (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) (Celix *et al.*, 1996), de transmisión por semilla y de forma mecánica con gran facilidad. Los síntomas más característicos producidos por este virus (Fig. 1.9B) son un fuerte moteado verde, reducción del tamaño de la hoja, acortamiento de entrenudos, achaparamiento de la planta y reducción de flores y frutos (Jordá, 1997).

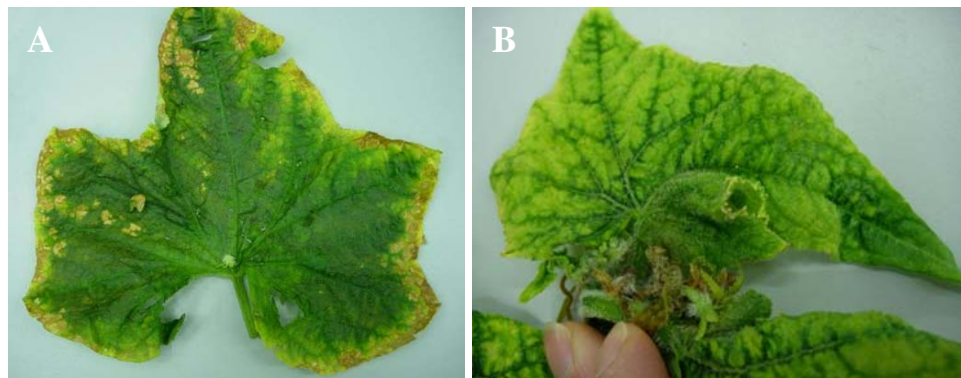


Figura 1.9 Manchas cloróticas con centro necrótico en hoja de pepino producidas por CLSV (A) y mosaico moteado verde, así como reducción del tamaño en hoja de sandía causados por CGMMV (B). Cortesía: Ing. MSc. M.C. Córdoba-Sellés (Grupo de Virología, IAM-UPV, Valencia-España).

Se han identificado otros virus en los cultivos de cucurbitáceas españoles, tal es el caso del virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) transmitido por thrips de forma persistente, aunque no ha sido encontrado de forma muy frecuente en esta hortícola (Dra. Concepción Jordá, Grupo de Virología, IAM-UPV, comunicación personal), y el virus del variegado del melón (*Melon variegation virus*, MVV) (Rubio-Huertos y Peña-Iglesias, 1973), citado desde antiguo aunque no existe ninguna cita posterior, según los datos que disponemos.

Sin duda, una de las enfermedades más importantes en las áreas de cultivo de este grupo de hortalizas, la cual presenta una sintomatología totalmente diferente a la indicada anteriormente para los otros virus presentes también en los cultivos de cucurbitáceas, la constituye el denominado “colapso” del melón cuyo nombre hace alusión al aspecto más representativo de su sintomatología y cuyo agente causal es el virus del “cribado” o de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV), virus transmitido por semilla (Herrera-Vásquez *et al.*, 2009b), por *O. bornovanus* (Campbell *et al.*, 1995) y por las especies de insectos *D. undecimpunctata undecimpunctata* Mannerheim (1843) y *D. balteata* LeConte (1865) (*Coleóptera*, *Crisomelidae*) (Coudried *et al.*, 1979). Es importante indicar que estos insectos no han sido citados de momento su presencia en España, mientras que en Panamá se ha citado solamente a *D. balteata* (OIRSA-PARSA, 1999; CABI, 2005), lo que establece a este vector como implicado peligroso en la expansión de la

enfermedad en este país. Como ya hemos indicado, la sintomatología producida por todos estos virus resulta totalmente distinta a la provocada por el MNSV, tal y como se describe más adelante.

La presente tesis aborda el estudio del MNSV, encuadrado taxonómicamente dentro del género *Carmovirus*, familia *Tombusviridae*, así como el estudio de su hongo vector, el quítrido *O. bornovanus*, debido a la importancia que ha ido adquiriendo este binomio en los cultivos de melón y otras cucurbitáceas tales como sandía y pepino y las importantes pérdidas económicas que produce, tanto en España como en Panamá.

3. LA FAMILIA TOMBUSVIRIDAE

La familia *Tombusviridae* está compuesta por 8 géneros: *Tombusvirus*, *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Machlomovirus*, *Necrovirus*, *Panicovirus*, *Dianthovirus* y *Carmovirus*. A este último pertenece, como indicamos anteriormente, el MNSV. Los genomas de los miembros de la familia *Tombusviridae* se componen de moléculas únicas de RNA de simple cadena de polaridad positiva [(+) ssRNA], a excepción del género *Dianthovirus*, cuyos miembros presentan genomas divididos. El tamaño del genoma oscila entre 3.7–4.7 kilobase (kb), dependiendo del género, presentando extremos 3' no poliadenilados y, aunque la mayoría no las tiene, se han descrito estructuras de tipo CAP en los extremos 5' del virus del moteado del clavel (*Carnation mottle virus*, CarMV), el virus del mosaico necrótico del trébol rojo (*Red clover necrotic mosaic virus*, RCNMV) y el virus del moteado clorótico del maíz (*Maize chlorotic mottle virus*, MCMV). Además, en algunos géneros se han detectado RNAs defectivos de interferencia (Defective Interfering RNAs, DI RNA) y RNAs o virus satélites asociados (White y Nagy, 2004).

En lo referente a la organización genómica existen caracteres que se han mantenido muy conservados entre los miembros de la familia. La mayoría presenta en su genoma hasta cinco pautas de lectura abierta (Open reading frame, ORF), excepto los géneros *Dianthovirus* y *Avenavirus*, que presentan cuatro. Además, los géneros *Panicovirus* y *Machlomovirus* tienen mecanismos de desplazamiento de pauta de lectura (Frame shift, FS) y lectura a través del codón de parada (Read through, RT) en sus ORFs 4 y 3, respectivamente, que podrían dar lugar a proteínas de mayor tamaño. En general, a excepción del MCMV, tras

un extremo 5' no codificante se halla el gen de la RNA polimerasa RNA dependiente (RNA dependent RNA polimerase, RdRp) viral. Esta ORF presenta un codón de parada débil interno cuya activación da lugar a una proteína más pequeña, a excepción de los *Dianthovirus* que utilizan un mecanismo de FS para obtener la misma. Ambas proteínas (la RdRp completa y la parcial) se han detectado durante una infección viral y son imprescindibles para la replicación. Del análisis de la secuencia de estas RdRps virales se dedujo que están altamente conservadas y cabe destacar el motivo GDD junto con el de unión a RNA (helicasa), común con otras RdRp de otras familias virales. El resto de los ORFs del genoma de la familia *Tombusviridae* codifican las proteínas de movimiento (movement protein, MP) y la proteína de cubierta o cápsida (coat protein, CP). Mientras que las ORF 1 y 2 se traducen a partir del RNA genómico (gRNA), las demás lo hacen a partir de RNAs subgenómicos virales (sgRNA) derivados del gRNA (Genovés, 2008).

Como característica general de la familia *Tombusviridae* es interesante destacar la formación de viriones con simetría icosaédrica (T=3) y compuestos por 180 copias de una misma proteína, la cápsida. De acuerdo con las características filogenéticas de la CP, los miembros de esta familia pueden dividirse en dos grandes grupos. Al primero pertenecen los géneros *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Carmovirus*, *Dianthovirus* y *Tombusvirus*. Sus viriones son partículas redondeadas de superficie rugosa y un diámetro de aproximadamente 32–35 nanómetros (nm), compuestos por subunidades con tres dominios estructurales distintos: (i) R, es el dominio interno N-terminal, posee la mayor densidad de residuos con carga positiva y es el encargado de interactuar con el RNA; (ii) S, forma una estructura en barril β que constituye el esqueleto de la cápsida y conecta con un brazo amino terminal al dominio R y (iii) P, es el dominio C-terminal protuberante, característica que le confiere la apariencia granular o rugosa al virión. Al segundo pertenecen los géneros *Machlomovirus*, *Necrovirus* y *Panicovirus* que se caracterizan por carecer del extremo protuberante P, por lo que sus viriones presentan una superficie de aspecto no rugoso. Respecto a las MP podemos diferenciar hasta tres grupos filogenéticos dentro de la familia: (i) los *Avenavirus*, *Carmovirus*, *Machlomovirus*, *Necrovirus* y *Panicovirus* presentan dos proteínas de movimiento de masa molecular de 7–9 y 8–9 kilodalton (kDa); (ii) los *Tombusvirus* y *Aureusvirus* poseen una proteína de movimiento con masa molecular de 22–27 kDa junto con una adicional de 14–

19 kDa implicada en el movimiento de la severidad de los síntomas y (iii) el género *Dianthovirus*, con una única proteína de masa molecular de 35 kDa (Giesman-Cookmeyer *et al.*, 1995; Solovyev *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Cañizares *et al.*, 2001; Huppert *et al.*, 2002).

La replicación de los miembros de esta familia ocurre en el citoplasma celular y posiblemente en vesículas membranosas asociadas con el retículo endoplasmático o algunos orgánulos (peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos). Asimismo, el ensamblaje del virión tiene lugar en el citoplasma aunque también se han descrito casos en los que se da en la mitocondria y el núcleo. Los viriones formados se acumulan en el citoplasma o en vacuolas citoplasmáticas.

En lo que concierne a las virosis provocadas por miembros de la familia *Tombusviridae*, éstas presentan una amplia distribución mundial, siendo especialmente incidentes en zonas de climas templados. Respecto a la gama de hospedantes afectan tanto plantas mono como dicotiledóneas y la sintomatología ocasionada presenta determinados rasgos comunes destacando moteado, arrugamiento, necrosis y deformación de las hojas de las plantas afectadas. Sin embargo, algunas especies pueden ser no sintomáticas en determinados hospedantes. Todas las especies de esta familia pueden transmitirse por inoculación mecánica, mientras que algunas por contacto o a través de semillas. Además, algunos hongos del género *Olpidium* y ciertas especies de escarabajos pueden ser vectores para la transmisión de algunos miembros de esta familia. Por último, se ha descrito la presencia de alguno de estos virus en muestras de agua procedentes de cultivos hidropónicos, por ejemplo, en el caso del MNSV (Gosalvez *et al.*, 2003), de modo que dicho virus pudiera ser transmitido desde estos medios con dependencia o no del vector.

4. EL GÉNERO CARMOVIRUS

Los viriones del género *Carmovirus* están formados en un 86% por proteína, principalmente la CP, y un 14% de ácido nucleico, mayoritariamente RNA de simple cadena y polaridad positiva, con un tamaño de 3879 a 4450 nucleótidos (nt). El CarMV es la especie tipo para este género, por tanto, las características de su organización genómica son comunes para otros miembros del grupo. Este virus codifica en su genoma cinco ORFs flanqueadas por dos regiones no traducibles (UnsTranslated Region, UTR) (Cañizares *et al.*, 2001), de manera

similar a lo que ocurre con el MNSV, virus objeto del presente estudio. Por lo tanto, este apartado será descrito en detalle más adelante.

El género *Carmovirus* está compuesto por 22 especies, 13 de ellas incluidas formalmente en dicho género y, el resto, propuestas para ser incluidas en el citado género. La gran mayoría de estas especies se transmiten mecánicamente, aunque algunas de ellas además pueden ser transmitidas por el agua, injerto, insectos (escarabajos), semilla, suelo, y por hongos (específicamente *O. bornovanus*), tal y como se describe en la Tabla 1.2 (Brunt *et al.*, 1996; Büchen-Osmond, 2002).

Tabla 1.2 Listado de las diferentes especies virales que componen el género *Carmovirus* y la forma de transmisión de cada una de ellas^a

Especies virales incluidas en el género <i>Carmovirus</i>	Forma de transmisión ^b
<i>Ahlu</i> m waterborne virus (AWBV)	a
<i>Bean mild mosaic virus</i> (BMMV)	e, m
<i>Cardamine chlorotic fleck virus</i> (CCFV)	m
<i>Carnation mottle virus</i> (CarMV)	i, m
<i>Cowpea mottle virus</i> (CPMoV)	e, m, s
<i>Cucumber soil-borne virus</i> (CuSBV)	m
<i>Galinsoga mosaic virus</i> (GaMV)	m, sl
<i>Hibiscus chlorotic ringspot virus</i> (HCRSV)	m
Melon necrotic spot virus (MNSV)	e, m, ob, s
<i>Pelargonium flower break virus</i> (PFBV)	i, m
<i>Saguaro cactus virus</i> (SgCV)	m
<i>Turnip crinkle virus</i> (TCV)	e, m
<i>Weddel waterborne virus</i> (WWBV)	a
Especies virales propuestas para ser incluidas en el género <i>Carmovirus</i>	
<i>Cucumber leaf spot virus</i> (CLSV)	m, ob, s
<i>Japanese iris necrotic ring virus</i> (JINRV)	m
Especies virales incluidas de manera provisional en el género <i>Carmovirus</i>	
<i>Blackgram mottle virus</i> (BMoV)	e, m, s
<i>Elderberry latent virus</i> (EILV)	i, m
<i>Glycine mottle virus</i> (GMoV)	m
<i>Narcissus tip necrosis virus</i> (NTNV)	m
<i>Plantain virus 6</i> (PIV-6)	m
<i>Squash necrosis virus</i> (SqNV)	m, ob
<i>Tephrosia symptomless virus</i> (TeSV)	m

^aFuente: Adaptado de Brunt *et al.* (1996) y Büchen-Osmond (2002).

^ba, agua; e, escarabajos; i, injerto; m, mecánica; ob, *O. bornovanus*; s, semilla; sl, suelo.

5. EL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV)

5.1 Distribución y antecedentes históricos

El MNSV fue citado por primera vez en Japón en 1966 en melón cultivado en invernadero (Kishi, 1966). Posteriormente, se ha detectado en varios países de América y Europa, donde se han producido brotes epidémicos en cultivos de cucurbitáceas en diversas ocasiones, entre ellos Estados Unidos (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979), Francia (Lovisollo *et al.*, 1982), Holanda (Bos *et al.*, 1984), Grecia (Avgelis, 1985), Suecia (Ryden y Persson, 1986), Reino Unido (Tomlinson y Thomas, 1986), España (Martínez de Salinas *et al.*, 1987), Noruega (Blystad y Nes, 1995), Italia (Tomassoli *et al.*, 1999), Corea (Gug-Seoun *et al.*, 2003), Guatemala (Jordá *et al.*, 2005), Panamá (Herrera *et al.*, 2006), Honduras, México (Herrera *et al.*, 2007b) y Uruguay (Dra. Concepción Jordá, Grupo de Virología, IAM-UPV, comunicación personal). Recientemente, este virus fue detectado también en China (Gu *et al.*, 2008) y Túnez (Yakoubi *et al.*, 2008). Por lo tanto, el MNSV podría considerarse un virus endémico en los cultivos protegidos y al aire libre de cucurbitáceas del mundo entero.

En España, el MNSV fue detectado por primera vez en 1984 en cultivos protegidos de melón en la zona de Almería, siendo identificado por transmisión a especies indicadoras y posteriormente caracterizado un aislado español en dicha zona (Martínez de Salinas *et al.*, 1987). La enfermedad se ha extendido considerablemente por la costa almeriense, constituyendo un factor limitante de la expansión y mantenimiento de la superficie del cultivo de melón (Cuadrado *et al.*, 1993). Hasta 1991 no se había observado síntomas de la enfermedad en pepino, siendo posteriormente aislado de esta hortícola, así como también de sandía. El MNSV ha sido detectado también en otras zonas de la comunidad andaluza como Córdoba, Granada y Sevilla, y en otras zonas de España como Zaragoza, Valencia, Alicante, Murcia, Tenerife e Ibiza (Juárez *et al.*, 1994; Luis-Arteaga, 1994). En los últimos años, ha sido aislado también de plantas de melón con sintomatología de “colapso” procedentes de Baleares (García-Jiménez *et al.*, 2000).

En Panamá, el MNSV fue detectado por primera vez en 2005 en cultivos de melón al aire libre de la provincia de Los Santos (Herrera *et al.*, 2006), detectándose posteriormente en esta hortícola en la provincia de Coclé (Herrera

et al., 2008). En una prospección realizada en 2008, además de las zonas indicadas anteriormente, se muestrearon otras zonas importantes del cultivo de melón en Panamá, tales como Herrera, Chiriquí y Veraguas, y se ampliaron los muestreos al cultivo de sandía, debido a que este virus afecta también dicho cultivo. Los resultados a la presencia del MNSV en las muestras de sandía recolectadas fueron negativos, excepto en las muestras de melón procedentes de la provincia de Los Santos. Dada la situación y desarrollo de la enfermedad en otros países que han precedido a Panamá en la introducción de este virus, deben contemplarse las medidas sanitarias adecuadas ya que ha causado daños importantes en cultivos de cucurbitáceas tanto en invernadero como al aire libre en varios de los principales países productores (Estados Unidos, España, Guatemala, Honduras), siendo sin duda alguna, una de las enfermedades más importantes en las áreas dedicadas a estos cultivos hortícolas.

5.2 Hospedantes y sintomatología de la enfermedad

El rango de hospedantes naturales del MNSV es muy limitado, ya que afecta exclusivamente a especies de plantas de la familia *Cucurbitaceae*. En cuanto a los hospedantes artificiales, solamente tres especies de plantas de esta familia han sido descritas por presentar infección sistémica tras la inoculación mecánica artificial con el virus, siendo éstas *Cucumis anguria*, *C. melo* y *C. sativus*, mientras que solamente se ha observado infección localizada en *Gomphrena globosa* (*Amaranthaceae*), *Nicotiana benthamiana* y *N. clevelandii* (*Solanaceae*), según se describe en las diferentes fuentes consultadas (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979; Bos *et al.*, 1984; Avgelis, 1985; Tomlinson y Thomas, 1986; Matsuo *et al.*, 1991; Cuadrado *et al.*, 1993; Brunt *et al.*, 1996; Tomassoli *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2003). Así pues, el rango de hospedantes artificiales del MNSV podría depender del aislado del virus, de las condiciones ambientales y de las especies de plantas inoculadas mecánicamente con el virus.

Tal y como indicamos anteriormente, el MNSV es conocido como el virus de las manchas necróticas del melón, virus del “cribado” del melón que alude a uno de sus típicos, aunque no muy frecuentes aspectos (Fig. 1.10A), o el virus del “colapso” del melón que describe a otra de sus manifestaciones sintomatológicas (Fig. 1.13B). Este virus presenta tanto en melón como en pepino una sintomatología similar (Fig. 1.10A) con la aparición de pequeñas

manchas cloróticas en las hojas que evolucionan a necróticas y posteriormente se produce el mencionado “cribado” (Jordá, 1997). Estas manchas pueden medir de 0.5 a 2 milímetros (mm) de diámetro (Fig. 1.10B), extendiéndose y evolucionando a grandes zonas (Luis-Arteaga, 1991; Cuadrado *et al.*, 1993). Otro aspecto muy característico es la necrosis de los nervios de las hojas inferiores e intermedias (Fig. 1.10C), síntoma conocido como “enrejado” (Cuadrado *et al.*, 1993).

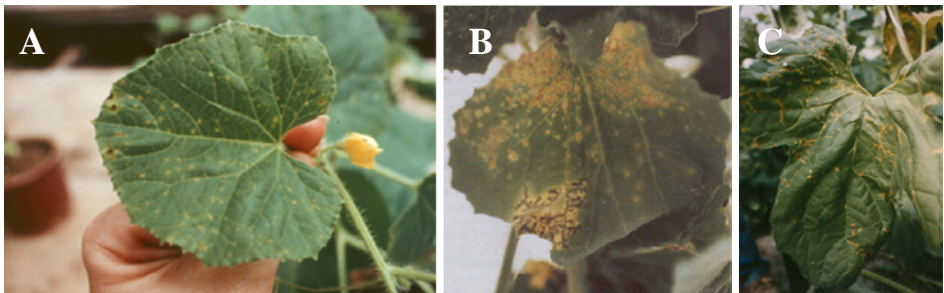


Figura 1.10 “Cribado” (A), lesiones cloróticas evolucionan a necróticas (B) y “enrejado” de la hoja en melón (C). Cortesía: Dra. C. Jordá (Grupo de Virología, IAM-UPV).



Figura 1.11 Estrías necróticas en el cuello (A) y necrosis marrón en la base del tallo en melón (B).

Paralelamente, aparecen estrías necróticas en el cuello y tallo de las plantas, que frecuentemente es el único síntoma de la enfermedad (Fig. 1.11A). Su longitud es variable, desde pocos milímetros hasta incluso más de 70 centímetros (cm) y son observables también en los pecíolos de las hojas e incluso en los pedúnculos del fruto. Además, puede aparecer una necrosis marrón en la base del tallo que sólo

afecta a la epidermis y que también puede constituir el único síntoma de la enfermedad (Fig. 1.11B), pudiendo incluso provocar la muerte de la planta por deshidratación (Cuadrado *et al.*, 1993).

En general, los frutos no suelen verse afectados, aunque en ocasiones se puede presentar “cribado” (Fig. 1.12A) y la corteza puede aparecer rugosa, con manchas necróticas (Fig. 1.12B) y “corchosas” (Fig. 1.12C), y la pulpa puede presentar un jaspeado (Fig. 1.12D). Aunque los frutos no presenten ningún tipo de síntoma, la producción se reduce considerablemente (Tomlinson y Thomas, 1986).

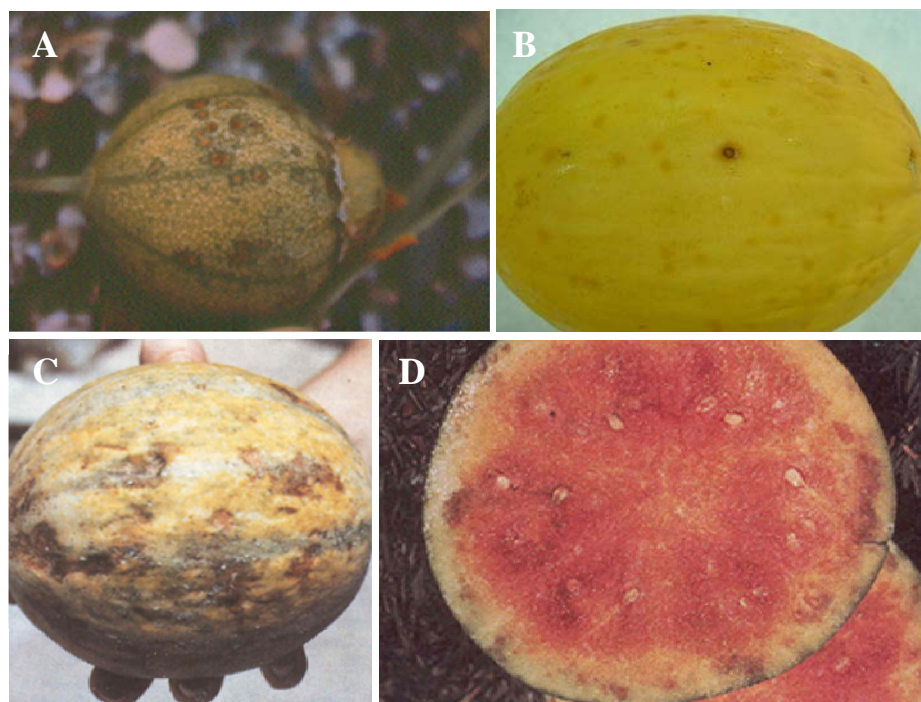


Figura 1.12 “Cribado” (A), manchas necróticas externas (B), manchas “corchosas” en fruto de melón (C) y jaspeado de la pulpa en fruto de sandía (D). Cortesía: Figuras A, C, D (Dra. C. Jordá, Grupo de Virología, IAM-UPV, Valencia-España).

Otra manifestación cada vez más frecuente ha sido la aparición de un marchitamiento súbito (Fig. 1.13A) que concluye con la muerte de las plantas. Este aspecto sintomatológico ha servido para denominar la enfermedad como

“muerte súbita” o “colapso” del melón (Fig. 1.13B) como se conoce en el Sudeste español (Jordá, 1997). En la mayoría de los casos las plantas presentan estos síntomas después del cuajado de los frutos marchitándose y llegando a morir (Fig. 1.13A). Ocasionalmente, en porcentajes variables del 1 al 15%, las plantas mueren sin mostrar ninguno de los síntomas aéreos antes descritos (Cuadrado *et al.*, 1993).

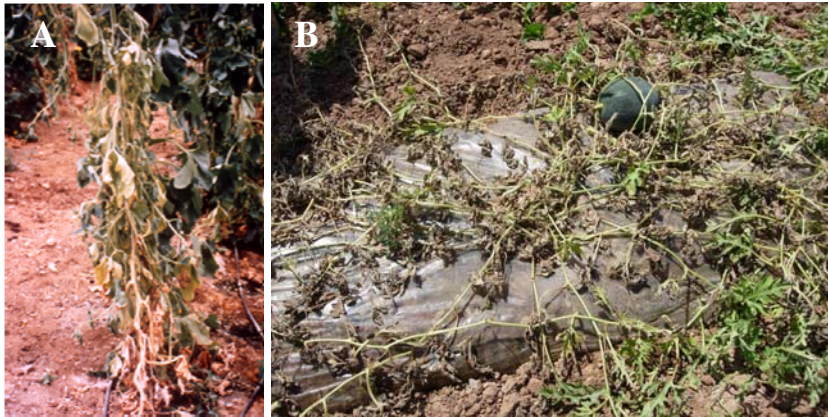


Figura 1.13 Marchitez en melón (A) y “muerte súbita” o “colapso” en sandía (B). Cortesía: Figura A (Dra. C. Jordá, Grupo de Virología, IAM-UPV, Valencia-España).

Como hemos dicho en un principio, el MNSV se encontraba siempre en cultivo protegido, pero posteriormente también ha sido localizado en cultivos al aire libre ocasionando importantes pérdidas, llegando a constituir un factor limitante, como ya hemos indicado, para el cultivo de melón (Fig. 1.14A), sandía (Fig. 1.14B) y otras cucurbitáceas en diferentes zonas del cultivo de los miembros de esta familia. Todos estos síntomas aparecen independientemente unos de otros, o bien es posible observarlos todos en la misma planta. Con respecto al estado vegetativo de la planta, la enfermedad aparece principalmente durante la maduración y recolección de los primeros frutos, aunque a veces se presenta incluso antes del cuajado de éstos (Cuadrado *et al.*, 1993). La expresión de los síntomas varía según las condiciones ambientales, de forma que un fotoperiodo corto y una temperatura relativamente baja aumenta su gravedad. Esto explica que este virus se detecta mayoritariamente en los cultivos de invernadero en

primavera y otoño, aunque se ha podido observar cambios en estos requerimientos climáticos ampliando su época de aparición.

Otra de las características del MNSV es su aparición en rodales en el terreno y expansión en forma de mancha de aceite, típico este aspecto de su forma de transmisión mediante un agente de naturaleza fúngica del suelo.

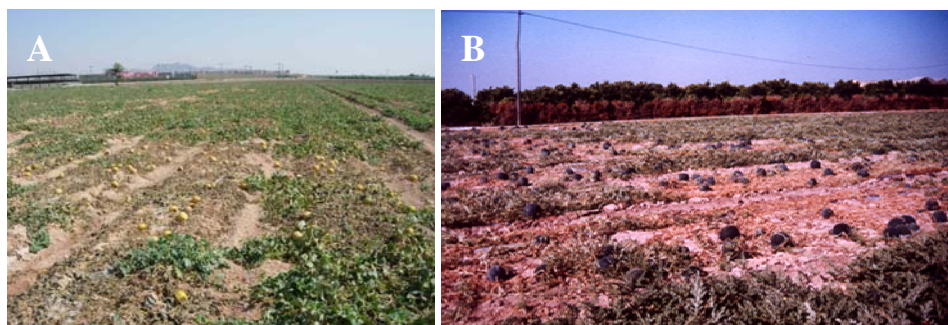


Figura 1.14 Campos de melón (A) y sandía (B) gravemente afectados por el MNSV con pérdidas importantes en la producción. Cortesía: Figura B (Dra. C. Jordá, Grupo de Virología, IAM-UPV, Valencia-España).

5.3 Agente causal y organización genómica

El MNSV pertenece, como ya se ha indicado, al género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae* (Riviere y Rochon, 1990), presentándose al microscopio electrónico en forma de partículas isométricas (Fig. 1.15) de aproximadamente 30 nm de diámetro (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979; Bos *et al.*, 1984).

Este virus está compuesto por una molécula de RNA de simple cadena de polaridad positiva [(+) ssRNA] de aproximadamente 4.3 kb. Además, por comparación con otras secuencias de nt de virus relacionados, se ha postulado que en el genoma del MNSV (Fig. 1.16) se encuentran codificadas al menos cinco proteínas flanqueadas por dos UTR (Riviere y Rochon, 1990). La 5'-UTR presenta un tamaño de 87 a 95 nt, dependiendo del aislado y se desconoce si contiene alguna estructura tipo CAP en su extremo. La 3'-UTR tiene un tamaño de 280 nt y no está poliadenilada, pero contiene estructuras secundarias, similares a las descritas para otros *Carmovirus*, que podrían ser esenciales para la replicación y/o traducción. En esta región se encuentran los elementos

estructurales responsables de la superación de la resistencia al virus debida al gen *nsv* de melón (Díaz *et al.*, 2004). Los aislados como el MNSV-264, capaces de infectar plantas de melón portadoras del gen *nsv*, presentan una secuencia nucleotídica de la región 3'-UTR muy diferente a los que no la superan (Díaz *et al.*, 2004).

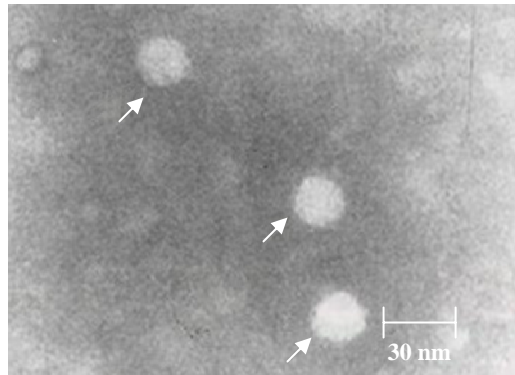


Figura 1.15 Típicas partículas isométricas del MNSV. Cortesía: Dra. C. Jordá (Grupo de Virología, IAM-UPV).

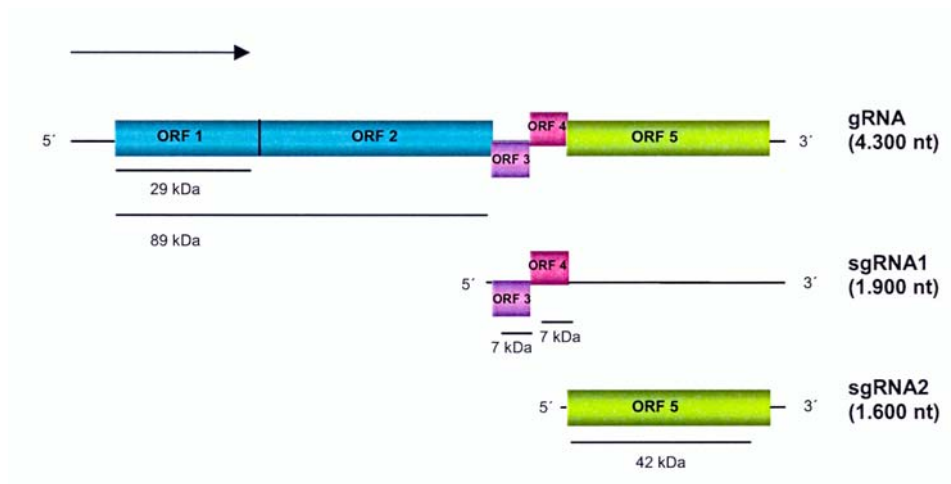


Figura 1.16 Representación de la organización y expresión del genoma del MNSV. Los rectángulos representan las pautas de lectura abierta (ORF) y las líneas inferiores el producto de su traducción. Fuente: Genovés (2008).

La ORF más próxima al extremo 5' es una proteína de 29 kDa (p29) que finaliza con un codón ámbar. Continuando la lectura por dicho codón se obtiene una proteína de 89 kDa (p89) que contiene el motivo GDD y el dominio característico de la RdRp, por lo que probablemente esta proteína esté implicada en la replicación del virus (Genovés *et al.*, 2006). Las dos ORFs situadas en la parte central del genoma constituyen las proteínas p7A y p7B, de 7 kDa cada una. Estas proteínas podrían facilitar el movimiento a corta distancia del virus por comparación con otras proteínas de *Carmovirus* implicadas en esta función (Hacker *et al.*, 1992; Marcos *et al.*, 1999). Recientemente, Genovés *et al.* (2006) demostraron dicha hipótesis. Por último, la ORF del extremo 3' representa la proteína de cubierta o cápsida. Esta proteína de 42 kDa (p42) está implicada en la encapsidación del virus y probablemente en el movimiento a larga distancia dentro de la planta. Además, podría desempeñar un papel importante en la transmisión del MNSV por *O. bornovanus* (Mochizuki *et al.*, 2008). Asimismo, la detección de dos RNAs subgenómicos de 1.9 kb (sgRNA1) y 1.6 kb (sgRNA2) que comparten el mismo extremo 3' del gRNA ha permitido proponer una estrategia similar a la de otros *Carmovirus* para la expresión del genoma del MNSV. Básicamente, el gRNA actuaría como mensajero para la síntesis de las proteínas p29 y p89. Las proteínas p7A y p7B se producirían a partir del sgRNA1, mientras que la proteína de cubierta se obtendría a partir del sgRNA2 (Riviere *et al.*, 1989).

5.4 Diagnóstico

El diagnóstico de los virus que producen las enfermedades en las plantas constituye el punto de partida para adoptar medidas adecuadas de control, llevar a cabo estudios epidemiológicos o afrontar temas de investigación básica (Ferrer-Gual, 2008).

El diagnóstico de las enfermedades de origen viral se efectúa normalmente con una serie de técnicas que permiten identificar el virus a nivel de familia, género o especie (Robertson *et al.*, 1991; Xing *et al.*, 2006), y en ocasiones, permiten diferenciar entre distintos aislados o cepas de un mismo virus (Gillings *et al.*, 1993). Así pues, uno de los problemas añadidos en el estudio de la epidemiología del MNSV y de su diagnóstico es la dificultad que presenta en la detección del virus, obteniéndose con facilidad falsos negativos en

su diagnóstico si éste no se realiza en el momento adecuado o la selección de la zona de la muestra no se hace de forma conveniente. En lo referente al diagnóstico de este virus han sido usados diferentes métodos, entre ellos, la observación de síntomas en campo, tal y como describimos en detalle anteriormente, la cual proporciona la primera información sobre la identidad del virus, sin embargo, éstos no suelen ser suficientemente específicos ya que algunos virus, así como distintos hongos y bacterias, pueden causar síntomas similares al MNSV (necrosis, marchitez, colapso) y distintos aislados de una especie viral pueden inducir distinta sintomatología (Díaz *et al.*, 2003). También han sido usados, en el diagnóstico del MNSV, métodos serológicos, entre ellos, serología mediante microscopía electrónica (immunosorbent electron microscopy, ISEM) (Tomlinson y Thomas, 1986) y DAS-ELISA (double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay) (Campbell *et al.*, 1996), además de métodos moleculares como la hibridación molecular no radioactiva (dot-blot) y RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) (Gosalvez *et al.*, 2003), aunque de forma rutinaria suele utilizarse el ELISA y la hibridación molecular, utilizando la RT-PCR cuando se requiere mayor sensibilidad. Una vez detectada la infección viral mediante RT-PCR, varios autores, entre ellos Kubo *et al.* (2005), utilizan el método RFLP (restriction fragment length polymorphism) debido a que puede resultar interesante o necesaria la diferenciación de aislados virales muy próximos genéticamente. Por otro lado, el método de secuenciación es el más preciso y específico, ya que la comparación de una secuencia nucleotídica determinada con aquellas depositadas en la base de datos permite la asignación a un grupo viral así como estimar el grado de similitud con otros aislados virales (Ferrer-Gual, 2008). No obstante, a continuación haremos una comparación entre los métodos usados mayormente en el diagnóstico de virus de plantas, y en particular, del MNSV, siendo éstos el método ELISA, la hibridación molecular y la RT-PCR. En relación al ELISA, varios autores, entre ellos Gómez *et al.* (2005), indican que este método presenta baja sensibilidad para detectar el MNSV en semillas de melón y posiblemente en semillas de sandía. Por otro lado, en cuanto a la detección del MNSV en plántulas de melón, Gosalvez *et al.* (2003) observaron que los títulos de virus más altos obtenidos mediante este método serológico, aparte de los cotiledones inoculados, se obtuvieron en las raíces 4 días post-inoculación (d.p.i). Estos autores observaron también que los títulos de virus en

las hojas fueron suficientemente altos para su detección, por lo que podría ser utilizado este tejido en el diagnóstico rutinario del MNSV. Asimismo, la detección de este virus a partir de partículas purificadas ha demostrado que la hibridación molecular no radioactiva (dot-blot) fue suficientemente sensible a una concentración de $3.2 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$, 5 veces más sensible que el método DAS-ELISA, pero 625 menos sensible que la RT-PCR. Del mismo modo, en cuanto a la detección del virus a partir de plantas de melón infectadas, la hibridación molecular fue sensible a una concentración de $6.4 \mu\text{g mL}^{-1}$, siendo igualmente más sensible que el ELISA, pero menos que la RT-PCR. Estos resultados indican que la hibridación molecular y la RT-PCR son métodos alternativos al ELISA para el diagnóstico del MNSV debido a las limitaciones de sensibilidad de este último método en muestras asintomáticas (Gosalvez *et al.*, 2003). La utilización de estos métodos de diagnóstico podría ayudar a mejorar el estado fitosanitario del cultivo de melón, gracias a la pronta detección del virus en las plántulas procedentes de los semilleros, como una medida preventiva para controlar la enfermedad.

5.5 Variabilidad de aislados

Se tienen pocos conocimientos, según la información de la que se dispone, sobre la variabilidad que pueda presentar el MNSV y el alcance de su extensión (Dra. Concepción Jordá, Grupo de Virología, IAM-UPV, comunicación personal), siendo algunos de ellos estudios antiguos basados en su comportamiento serológico y en algunos casos por diferencias en su comportamiento biológico. Entre estos, podemos mencionar los trabajos de Bos *et al.* (1984) y Tomlinson y Thomas (1986), cuyos resultados indican que aislados del MNSV de California, Japón y Holanda tuvieron la misma gama de hospedantes y fueron serológicamente indistinguibles. No obstante, otros autores observaron cierta variabilidad sintomatológica y serológica entre aislados japoneses del MNSV (NK, NH, S) (Matsuo *et al.*, 1991) y entre el aislado holandés MNSV-Cu 18 y el aislado español MNSV-A1 (Cuadrado *et al.*, 1993). Asimismo, Gonzalez-Garza *et al.* (1979) y Avgelis (1989) también observaron diferencias en cuanto a serología entre el aislado griego WM-6 que produce necrosis en sandía y el aislado californiano MNSV-C de melón. No obstante, el rango de hospedantes y los síntomas inducidos por estos aislados fueron en general similares, excepto en

Gomphrena globosa L., un hospedante que parece ser útil para distinguir el aislado WM-6 de otros aislados del MNSV. Por lo tanto, estos autores indican que el agente implicado en la necrosis de la sandía podría ser considerado una raza serológicamente distinta del MNSV. Otros estudios realizados por Tomassoli *et al.* (1999) indican que un aislado italiano del MNSV obtenido en melón reaccionó serológicamente con el aislado WM-6, por lo que se establece una posible relación serológica entre ambos aislados. Es importante destacar además que varios cultivares americanos de pepino exhibieron síntomas locales y sistémicos tras la inoculación mecánica con el aislado MNSV-UK del Reino Unido. Por todo lo anterior, es probable que los aislados europeos del MNSV difieran biológicamente de los aislados americanos y japoneses, anteriormente mostrados por inducir solamente síntomas locales en ciertos cultivares americanos (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979; Tomlinson y Thomas, 1986). En España también se han realizado estudios de variabilidad de aislados del MNSV de campo en cuanto a su comportamiento serológico frente a antiseros comerciales, así como los obtenidos a partir de un aislado del MNSV procedente de cultivo de melón bajo plástico de Almería (Juárez *et al.*, 1994). Sin embargo, no hemos encontrado demasiados estudios publicados al respecto, lo que sí parece evidente que esta variabilidad existe y requeriría un estudio más profundo y amplio sobre todo para comprender el comportamiento de las variedades resistentes.

En cuanto a la variabilidad molecular del MNSV, aparte de los trabajos recientemente publicados por Herrera-Vásquez *et al.* (2007b), no hemos encontrado estudios que involucren el análisis de una diversidad de aislados procedentes de diferentes zonas geográficas. No obstante, algunos estudios, entre estos los realizados por Díaz *et al.* (2004), indican que la identidad a nivel de secuencia de nt en todo el genoma del MNSV varía entre un 84% y 98% entre el aislado español 264 y el aislado holandés Dutch, español Malfa5 y japoneses NK y NH, a excepción de la región 3' no traducible (3'-UTR), donde al menos el 50% de los nt difieren entre el aislado 264 y los aislados Dutch y Malfa5. Del mismo modo, estos autores observaron que la identidad a nivel de aminoácidos (aa) en todas las proteínas del MNSV de los aislados indicados anteriormente, varía entre un 90% y 100%, presentando la proteína de movimiento p7B la mayor variación respecto a las otras proteínas del citado virus. Por otro lado, Díaz *et al.* (2003) observaron diferencias en cuanto a morfología y número de lesiones que el

aislado Dutch y Malfa5 podrían inducir en los cotiledones inoculados de pepino, pero no observaron diferencias en la habilidad de infectar sistémicamente sus hospedantes. De la misma forma, Kubo *et al.* (2005) encontraron también diferencias a nivel molecular en aislados japoneses del MNSV obtenidos en melón (NH, YS, KS) con la ayuda del método RT-PCR-RFLP, obteniendo diferentes patrones de bandas para cada uno de estos aislados tras la digestión con la endonucleasa *EcoRI*, quedando de manifiesto la variabilidad molecular que puede presentar este virus, incluso en aislados obtenidos en un mismo tipo de hospedante y origen geográfico.

5.6 Transmisión

En lo referente a la transmisión del MNSV, algunos autores reseñan que este virus es fácilmente transmisible de forma mecánica, siendo citada en Francia la transmisión mecánica durante la poda y por contacto entre hojas (Blancard *et al.*, 1991). La transmisión por insectos esta citada en la bibliografía muy someramente, puesto que se conoce como la menos importante de las formas de contagio. Se trataría de las especies *D. undecimpunctata undecimpunctata* y *D. balteata* (Coudriet *et al.*, 1979). Con respecto a este tipo de transmisión, otros autores, entre ellos, Tomlinson y Thomas (1986), no evaluaron la transmisión del MNSV por estos insectos. No obstante, estos autores afirman que dichos insectos no estuvieron presentes en 1983 en Humberside (Reino Unido) en cultivos de pepino cuando la enfermedad se diseminó alcanzando proporciones epidémicas.

Los tipos de transmisión del MNSV mas importantes son a través de semilla y por el hongo vector *O. bornovanus*. Por lo tanto, ambas situaciones son descritas en detalle a continuación.

5.6.1 Transmisión por semilla

Como bien hemos indicado anteriormente, uno de los más importantes tipos de transmisión del MNSV es por semilla (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979). No obstante, en los países donde ha sido detectado el virus se da tanta importancia a la transmisión por *O. bornovanus*, como a la transmisión por semilla. Ante esta situación, Campbell *et al.* (1996) utilizaron el término "vector-assisted" seed transmission (VAST), porque el virus se transmite por semilla

independientemente del vector, pero se ve reforzada su extensión con la presencia de éste. Estos autores observaron también que en ausencia de *O. bornovanus*, la transmisión del MNSV en semillas y plántulas de melón fue de 0.1% (2/1800) y 0.04% (2/5227), respectivamente. No obstante, cuando el vector estuvo presente, la transmisión fue mayor del 50%. *O. bornovanus* juega pues un papel importante en la epidemiología del MNSV, ya que adquiere y transmite el virus a las raíces de las plántulas provenientes de semilla infectada iniciándose así la infección primaria y continuando con los ciclos de infección secundaria mediante éste. Es importante indicar también que diversas controversias han surgido respecto a la transmisión del MNSV por semilla, entre ellas, los diferentes índices de transmisión obtenidos, siendo citados en algunos trabajos índices de transmisión tan amplios como de 0 a 20% (Kishi, 1966; Gonzalez-Garza *et al.*, 1979; Yoshida *et al.*, 1980; Avgelis, 1985), aunque hay que hacer alusión nuevamente a que la mayoría de estos estudios fueron hechos sin el conocimiento del papel que desempeña el hongo vector en dicha transmisión (Campbell *et al.*, 1996), si bien hay autores que afirman que la transmisión de virus por semilla no es un buen indicador de la importancia epidemiológica, debido a que bajos índices de transmisión por semilla, conjuntamente con la diseminación secundaria del virus con la ayuda del vector, facilita la introducción del virus a nuevas áreas de cultivo, lo cual podría producir enfermedades virales epidémicas en el caso de encontrarse presente el vector (Dinant y Lot, 1992; Johansen *et al.*, 1994). También es importante destacar que la localización del MNSV en la semilla ocurre en la superficie y en el endospermo, no así en el embrión. Es probable entonces que la transmisión por semilla se produzca durante el desarrollo de estas o cuando las semillas son extraídas del fruto (Campbell *et al.*, 1996). Ante esta situación, la transmisión por semilla puede proporcionar un mecanismo para mantener el virus infectivo por varios años, además de transportarlo a largas distancias independientemente del vector (Campbell, 1996; Campbell *et al.*, 1996). Por todo lo anterior, la producción de semilla comercial debe ser objeto de un control fitosanitario estricto, ya que si la incidencia de la enfermedad es baja o la expresión de los síntomas suave puede escapar a la detección y la producción para obtención de semilla comercial verse comprometida. Además, el intercambio comercial de semillas podría suponer un riesgo de introducción y/o diseminación del virus en una determinada zona o país.

5.6.2 Transmisión por *O. bornovanus*

Tal y como indicamos anteriormente, en condiciones naturales el MNSV es transmitido por el hongo quítrido *O. bornovanus* (Campbell *et al.*, 1995), hongo implicado en el proceso denominado transmisión por semilla asistida por el vector (VAST), el cual describimos en detalle en el apartado anterior. La transmisión del MNSV por *O. bornovanus* tiene lugar mediante un proceso que se ha denominado, con discutible acierto, “*adquisición in vitro*” (Campbell, 1996). Dicho proceso se inicia cuando las partículas virales son adsorbidas por la superficie de la zoospora del hongo, lo cual tiene lugar en el agua o en la solución del suelo, así como también podría tener lugar en las propias células de las raíces de las plantas infectadas. Durante la fase de penetración de la zoospora en la célula vegetal, el virus penetra en el citoplasma de las células de las raíces de la planta hospedante. Posteriormente, el virus comienza a replicarse y propagarse sin la ayuda del vector y las nuevas coinfecciones podrían iniciarse de forma similar a la aquí descrita. Recientemente, Mochizuki *et al.* (2008) determinaron que la proteína de cubierta del MNSV es la responsable de la transmisión del virus por *O. bornovanus*. Es importante indicar también que la asociación entre el virus y el hongo vector es específica, lo cual podría reflejar las interacciones observadas en la naturaleza (Adams, 1991; Campbell, 1996; Rochon *et al.*, 2004).

Debido a que esta tesis aborda, además del MNSV, el estudio de *O. bornovanus* y otras especies de *Olpidium* relacionadas con la transmisión de virus a diferentes cultivos hortícolas para establecer su diferenciación, a continuación presentamos algunos aspectos y características importantes relacionadas con este tipo de hongos, debido a la dificultad que presenta su determinación en estados previos.

5.6.2.1 Taxonomía y ciclo de vida de *Olpidium*

O. bornovanus y *O. brassicae* (Woronin) P.A. Dangeard sensu lato (sl) (1962) son dos especies de hongos parásitos obligados de las raíces de las plantas, cuya principal importancia radica en la transmisión de virus a varias especies hortícolas (Rochon *et al.*, 2004; Sasaya y Koganezawa, 2006). *O. bornovanus* presenta dos grupos distintos: un grupo polífago y otro restringido a las

cucurbitáceas (Lange e Insunza, 1977; Campbell y Sim, 1994). Por otro lado, el término *O. brassicae* si ha englobado tanto a *O. brassicae* (especie heterotálica que afecta a las crucíferas) como a *O. virulentus* (Sahtiyanci) Karling (1977) (especie homotálica que no afecta a las crucíferas), siendo esta última altamente polífaga (Koganezawa *et al.*, 2005). Antiguamente, *Olpidium* estaba encuadrado taxonómicamente en el Orden *Spizellomycetales*, perteneciente éste al Phylum *Chytridiomycota* (quítridos) (Barr, 1980). Sin embargo, dicha clasificación ha sido objeto de diversas controversias en trabajos posteriores (Barr, 2001). En este sentido, estudios filogenéticos más recientes basados en los genes del RNA ribosómico (18S+5.8S+28S) indican que *Olpidium*, específicamente *O. brassicae*, no se encuadra taxonómicamente en el citado Orden ni en ningún otro Orden del Phylum *Chytridiomycota*, por lo cual, futuras investigaciones que incluyan el análisis de un gran número de secuencias de diferentes especies de *Olpidium* resultan necesarias para determinar la posición filogenética de éste (James *et al.*, 2006).

Es importante indicar que la mayoría de los quítridos prevalecen en hábitat terrestres, como es el caso de *Olpidium* que habita en el suelo (Barr, 2001). El ciclo de vida de *Olpidium* envuelve la producción de zoosporangios los cuales contienen las zoosporas que permiten la dispersión a larga distancia del hongo, junto con la producción de esporas de resistencia que permiten la supervivencia del hongo durante varios años (Rochon *et al.*, 2004). *Olpidium* puede presentar fase asexual y sexual (MICOD, 2008), tal y como se esquematiza en la Fig. 1.17. Algunos autores, entre ellos Alexopoulos y Mims (1979), especulan el siguiente ciclo de vida de *Olpidium*: la fase asexual se inicia inmediatamente las raíces del hospedante entran en contacto con el agua, produciéndose la liberación de las zoosporas contenidas en los zoosporangios (Fig. 1.17-Z). A continuación, las zoosporas pueden llegar a enquistarse. Dentro de la célula del hospedante, el parásito se sitúa cerca del núcleo y, posteriormente, se forma un zoosporangio, mientras que el núcleo se divide repetidamente. Seguidamente, las zoosporas se forman dentro del zoosporangio, son liberadas de éste y se repite la fase asexual.

Por otro lado, la fase sexual se inicia cuando dos zoosporas, comportándose como planogametos, se fusionan (Fig. 1.17-P). Los planogametos se originan, con mayor frecuencia, de diferentes zoosporangios (Fig. 1.17-G), aunque planogametos de un mismo zoosporangio también podrían fusionarse. La

copulación de dos planogametos da lugar a un cigoto móvil que infecta una célula del hospedante de manera similar que una zoospora, pero se convierte en un zoosporangio de resistencia de pared gruesa que no libera inmediatamente las zoosporas. El zoosporangio es binucleado al principio y, antes de la germinación, ocurre la cariogamia (Fig. 1.17-K), probablemente seguida por meiosis. Varias divisiones nucleares dan lugar a una estructura multinucleada (Fig. 1.17-R), la cual produce zoosporas uninucleadas. Éstas son liberadas y podrían reinfectar las raíces de la planta hospedante (Alexopoulos y Mims, 1979).

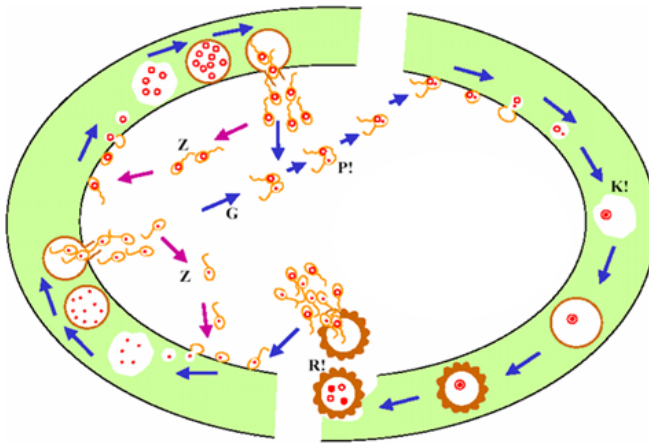


Figura 1.17 Ciclo de vida de *Olpidium*: fase asexual y sexual. Z, zoosporas; G, planogametos procedentes de diferentes zoosporangios; P, planogametos fusionados; K, cariogamia; R, esporas de resistencia. Fuente: Adaptado de MICOD (2008).

5.6.2.2 Morfología y características de *Olpidium*

En cuanto a la morfología de *Olpidium*, es importante indicar que este tipo de hongos presentan tres fases durante su ciclo de vida: zoosporas, zoosporangios y esporas de resistencia. Las zoosporas de *O. bornovanus* y *O. brassicae* sí podrían ser diferenciadas por su tamaño y patrones de nado (Lange e Insunza, 1977). No obstante, estas características resultan inadecuadas en el diagnóstico rutinario. Por otro lado, los zoosporangios de estas especies resultan muy similares (Fig. 1.18). Por lo tanto, estos hongos podrían no ser diferenciados por esta característica morfológica (Herrera-Vásquez *et al.*, 2007a).

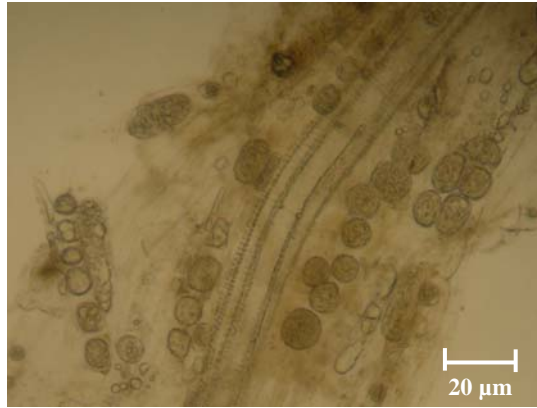


Figura 1.18 Zoosporangios de *Olpidium* sp. en raíz de melón. Observación 40 \times .

La morfología de las esporas de resistencia es aceptada como la característica más importante para diferenciar *O. bornovanus* de *O. brassicae* sl (Campbell y Sim, 1994). Por lo tanto, a continuación presentamos algunos aspectos y características esenciales relacionadas con este tipo de esporas. *O. bornovanus* se distingue por su espora de resistencia de pared exterior lisa e interior con apariencia de panal de abejas (Fig. 1.19A), en contraste con la de *O. brassicae* sl (Fig. 1.19B) de forma estrellada (Gómez, 1994; Campbell y Sim, 1994). Como bien hemos dicho, las esporas de resistencia estrelladas corresponderían así a *O. brassicae* sl, debido a que *O. brassicae* podría no ser diferenciado de *O. virulentus* usando esta característica morfológica (Koganezawa *et al.*, 2005). Como se ha indicado anteriormente, las esporas de resistencia pueden permanecer en el suelo por varios años soportando condiciones adversas, constituyendo así una de las formas de contaminación más importantes. Así pues, en cuanto a su ubicación en el hospedante, éstas se sitúan tanto en las células epidérmicas como en las células corticales de la raíz (Lange e Insunza, 1977).

Por otro lado, en relación a su tamaño Campbell y Sim (1994) observaron que los diámetros de las esporas de resistencia de *O. bornovanus* oscilan entre 21.5 ± 4.4 y 26.5 ± 3.1 micrómetros (μm) en pepino y melón, respectivamente, mientras que en calabaza éstas suelen ser más pequeñas con diámetros que van desde 14.2 ± 2.8 μm a 17.6 ± 4.4 μm , tamaños descritos para este hongo por otros autores (Cook y Collins, 1935; Sahtiyanci, 1962; Barr, 1968; Karling, 1977). En cambio, los diámetros de las esporas de resistencia de

O. brassicae sl oscilan entre $16.1 \pm 2.5 \mu\text{m}$ y $18.1 \pm 3.4 \mu\text{m}$, citados desde antiguo estos tamaños para este hongo (Campbell y Lin, 1976).

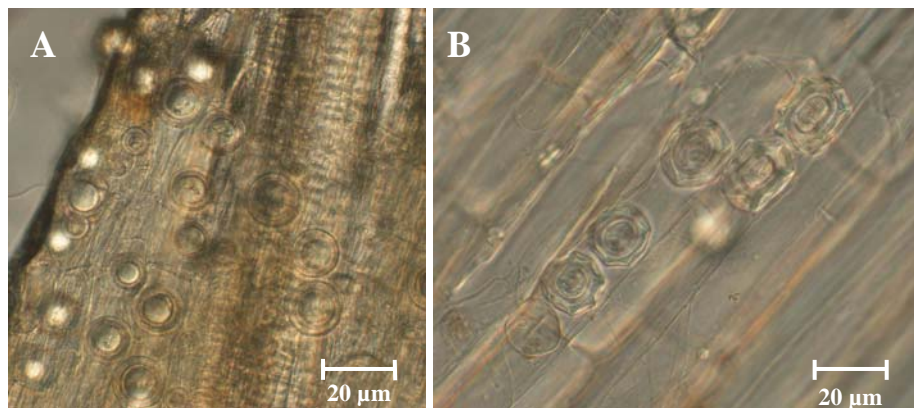


Figura 1.19 Esporas de resistencia de *O. bornovanus* (A) y *O. brassicae* sl (B) en raíz de melón y lechuga, respectivamente. Observación 40 \times .

5.6.2.3 Aislamiento, diagnóstico y preservación de *Olpidium*

Tal y como indicamos anteriormente, *Olpidium* es un parásito obligado, por lo tanto, no puede ser cultivado en medio de cultivo artificial. Ante esta situación, el aislamiento de este tipo de hongos se debe realizar mediante la utilización de plantas trampas o “bait plants”, que no es mas que atrapar el hongo en las raíces de las plántulas (en estado cotiledonal) de la especie hospedante en la cual la enfermedad se presenta en el campo (hospedante homólogo), previamente transplantadas a macetas conteniendo una mezcla de suelo de campo y arena estéril. Tras la infección del hongo, las raíces son lavadas y posteriormente las plantas son transplantadas a macetas conteniendo solamente arena, debido a que ésta provee un medio excelente para el desarrollo de las raíces, además de favorecer el movimiento de las zoosporas, permitiendo que el hongo se multiplique abundantemente (Campbell, 1988). Con la ayuda de este método se pueden obtener zoosporas de manera rutinaria mediante el lavado de las raíces, sin causarles el menor daño físico a las mismas. No obstante, en cultivos de *Olpidium* establecidos de esta manera puede haber mezclas de diferentes genotipos de *Olpidium* o de otro tipo de hongos. Por lo tanto, con la finalidad de seleccionar cultivos relativamente puros es importante establecer una temperatura

que favorezca solamente la multiplicación del hongo deseado. Por ejemplo, *O. bornovanus* crece abundantemente a 30°C, no así *O. brassicae* sl, el cual requiere temperaturas más frescas, entre 24°C y 30°C (Campbell y Sim, 1994). Sin embargo, el nivel más alto de pureza lo constituye el cultivo obtenido a partir de una zoospora, pero éstas son difíciles de obtener individualmente en este tipo de hongos, por lo que se suele utilizar un zoosporangio para tal fin (Sahtiyanci, 1962; Dias, 1970).

En cuanto al diagnóstico de *Olpidium*, la especificidad y el rango de hospedantes, así como la transmisión de virus, son reconocidas como las características convencionales más importantes para diferenciar *O. bornovanus* de *O. brassicae* sl (Campbell y Sim, 1994; Sasaya y Koganezawa, 2006). No obstante, la observación microscópica de las raíces es generalmente el método utilizado para diferenciar estas especies mediante la morfología de las esporas de resistencia (Tomlinson y Thomas, 1986). Sin embargo, este método no permite la diferenciación de *O. brassicae* y *O. virulentus*, como ya se ha indicado, debido a que las esporas de resistencia de estos hongos resultan muy similares (Koganezawa *et al.*, 2005). Por lo tanto, el diagnóstico molecular de *Olpidium* podría ayudarnos a determinar la especie específica presente en las raíces de las plantas infectadas. Así pues, Jian e Hiruki (1996) utilizaron el método PCR-RFLP para detectar y diferenciar *O. bornovanus* de *O. brassicae* sl. Dichos autores amplificaron la región que se extiende desde el extremo 3' de la subunidad pequeña del ribosoma hasta el extremo 5' de la subunidad grande del ribosoma, incluyendo el gen 5.8 S y dos espaciadores internos transcritos (internal transcribed spacer, ITS), con la ayuda de los cebadores o "primers" universales ITS4-ITS5 (White *et al.*, 1990). No obstante, es importante indicar que mediante este método, Jian e Hiruki (1996) no pudieron amplificar estos hongos directamente de las raíces infectadas, sino solamente a partir de suspensiones de zoosporas. Sin embargo, a partir de estas suspensiones, además de amplificar DNA de *Olpidium*, amplificaron DNA del hospedante, debido probablemente a la inespecificidad de los cebadores utilizados y a la contaminación de las suspensiones de zoosporas con células de la epidermis de las raíces del hospedante. Es importante resaltar que la región ITS (Fig. 1.20) ha sido la más estudiada a nivel molecular para diferenciar distintas especies de hongos (Vilgalys, 2008).

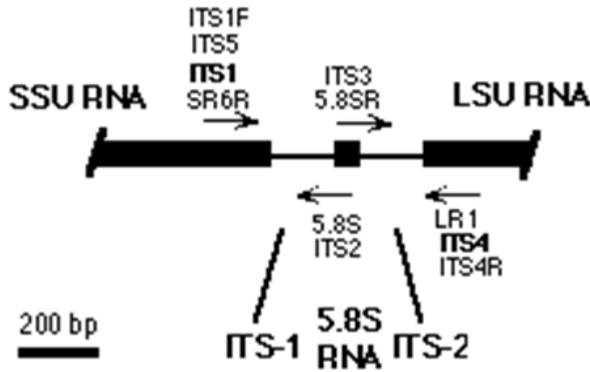


Figura 1.20 Región ITS usada frecuentemente en el diseño de cebadores o “primers” para la detección molecular y secuenciación de diferentes especies de hongos. Los cebadores usados rutinariamente en ambas situaciones son mostrados en negrita. Fuente: Adaptado de Vilgalys (2008).

La limitante de utilizar la región ITS en la detección molecular de *Olpidium* u otro tipo de hongos que no crecen en medio de cultivo artificial, es que el DNA de la planta también podría ser amplificado, como ya se ha indicado, y producir bandas tras la PCR por las razones anteriormente descritas. Por lo tanto, el uso de cebadores específicos es imprescindible con la finalidad de detectar solamente el hongo deseado (Kularatne *et al.*, 2004), de igual forma Herrera-Vásquez *et al.* (2009a) utilizaron el método multiplex PCR con cebadores específicos para la detección simultánea y la diferenciación de *O. bornovanus*, *O. brassicae* y *O. virulentus*, especies de *Olpidium* descritas en la literatura por transmitir diferentes virus en la mayoría de los cultivos hortícolas de importancia económica (Rochon *et al.*, 2004; Sasaya y Koganezawa, 2006), tal y como indicamos previamente.

Por otro lado, en cuanto al método de preservación de este tipo de hongos tras el diagnóstico, es importante indicar nuevamente que estos hongos forman esporas de resistencia, cuya principal función es la supervivencia en el tiempo del hongo. Ante esta situación, las raíces infectadas por este tipo de esporas, una vez hayan sido lavadas para eliminar la arena o el suelo adheridos a éstas y posteriormente secadas al aire, pueden almacenarse y permanecer infectivas durante varios años (Campbell, 1988). Este tipo de hongos también puede ser preservado en el suelo previamente secado al aire, logrando

permanecer el hongo infectivo de esta manera durante muchos años (Campbell, 1985).

5.7 Control

Como todas las enfermedades de origen vírico, los posibles métodos de lucha son esencialmente preventivos, ya que una vez se presenta la enfermedad en la planta es prácticamente imposible influir sobre ella. Los métodos de lucha tanto para el MNSV como para su vector *O. bornovanus*, se agrupan en varias líneas de actuación que se exponen a continuación.

5.7.1 Control del vector

El control del MNSV se basa principalmente en el control de su hongo vector, *O. bornovanus*. La erradicación de este virus resulta difícil, debido a que las esporas de resistencia de este hongo son capaces de conservarse durante años en el suelo y alcanzar profundidades de al menos 60 cm, además de permanecer infectadas por el virus por varios años. Ante esta situación, sin excluir la transmisión del virus por semilla, podría pensarse que el inóculo del hongo que queda en el suelo es la causa de la ineficacia de la desinfección para luchar contra la virosis (Gómez *et al.*, 1993a). Tal y como se ha indicado previamente, esta localización en el suelo hace difícil su control, tanto por medios físicos como químicos. En cultivos hidropónicos ha dado buenos resultados la utilización del humectante Agral (óxido de alquilfenol etileno), surfactante no iónico, a la concentración de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, añadido como aditivo a las soluciones nutritivas, el cual afecta drásticamente las zoosporas de *O. bornovanus* (Tomlinson y Thomas, 1986). Ante esta situación, es importante indicar que este hongo produce zoosporas móviles, como ya hemos indicado anteriormente, por lo que puede ser diseminado con facilidad por el agua de riego utilizada en las explotaciones agrícolas. Por lo tanto, es importante tomar las medidas preventivas al respecto. Se ha utilizado también la desinfección del suelo con bromuro de metilo, pero su aplicación además de ser perjudicial para el medioambiente, por lo cual ha sido retirada su comercialización y uso, se ha demostrado que es ineficaz para disminuir significativamente la incidencia del hongo (Gómez *et al.*, 1993a). Dichos autores señalan también otros productos, tales como metam sodio y

formol, de dudosa a mala eficacia, puesto que los niveles de producción no aumentaron de forma notable tras su aplicación. Por otra parte, dentro de los tratamientos físicos podemos encontrar la solarización. Este es un método útil, sobretodo para cultivos de melón o sandía al aire libre, aunque también se puede utilizar en invernaderos. No obstante, la eficacia de este método se considera media (Gómez *et al.*, 1993a). Recientemente, estudios realizados en condiciones controladas indican que la biofumigación y biosolarización de sustratos conteniendo restos de raíces infectadas con *O. brassicae* sl, no fue capaz de controlar al 100% el citado hongo. No obstante, dicho tratamiento produjo una considerable disminución en el número de zoosporangios y esporas de resistencia, estructuras relacionadas con el ciclo de vida del mencionado quítrido. Así pues, el tratamiento de biosolarización a 55⁰C durante 5 semanas aplicado a macetas conteniendo 10 g de raíces enterradas en sustrato e infectas con el hongo, produjo una importante disminución de estas estructuras, resultando dicho tratamiento más eficiente sobre el control de zoosporangios que sobre esporas de resistencia, conclusión bastante evidente dado las características de estas últimas (Vilaseca, 2007). Otros estudios realizados por dicho autor para tratar de controlar por completo el mencionado hongo, indican que tras la adición de material vegetal de la parte aérea de plantas de tomate junto con las raíces infectadas con *O. brassicae* en proporción 1:1, y posteriormente realizar el tratamiento de biosolarización indicado anteriormente, no se logra reducir en su totalidad el número de zoosporangios, sin embargo, se observa una reducción mayor, aunque no suficiente, del número de esporas de resistencia.

5.7.2 Prácticas culturales

Existen algunas prácticas a tomar en cuenta para prevenir la aparición tanto del MNSV como de su vector. En primer lugar, y dado que las esporas de resistencia del hongo sobreviven largo tiempo en el suelo, es importante hacer rotaciones de cultivo por lo menos cada 5 años (Tomassoli *et al.*, 1999). Se debe tener en cuenta también las plantas ruderales, por ejemplo, *Phaseolus aureus* Roxb. (*Fabaceae*), ya que estas podrían actuar de reservorio de *O. bornovanus* (Campbell y Sim, 1994). Se ha comprobado que uno de las formas más importantes de controlar la aparición de la enfermedad es utilizando el injerto de melón u otras cucurbitáceas sobre portainjertos resistentes al virus o bien a *O.*

bornovanus (García-Jiménez *et al.*, 2007). En este sentido, Bos *et al.* (1984) indican que injertando pepino sobre *Cucurbita ficifolia* Bouché, inmune al virus, se podría evitar la enfermedad. Otros autores, entre ellos Gómez *et al.* (1993b), observaron además que injertando melón tipo Galia cv. “Gallicum” sobre los portainjertos RS-841 y *Benincasa cerifera* Savi., la producción de las plantas injertadas aumentó considerablemente. Sin embargo, el porcentaje de plantas muertas al final del cultivo, muy variable según los años, no era nada despreciable. Según estos autores, dichas muertes podrían deberse a alguna enfermedad de etiología desconocida o bien a una falta de afinidad total entre los portainjertos y el cv. “Gallicum” injertado. Asimismo, otros portainjertos fueron descartados por estos autores, entre ellos, *Cucurbita moschata* Duch. ex Lam. y *Cucumis melo* L. cv. Partner, el primero por no ser totalmente compatible y morir un elevado número de plantas antes de producirse la fructificación, sin causa patológica o de cultivo apreciable y, el segundo, por ser sensible tanto al MNSV como a su vector, mientras que por la mala afinidad presentada, destacaron los portainjertos *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem., *L. acutangula* (L.) Roxb. y *Lagenaria vulgaris* L. El método del injerto podría ser prometedor si tomamos como ejemplo a la sandía, la cual es una práctica muy extendida el injertar las plantas sobre calabaza, además de ser una medida adoptada también para prevenir otros problemas patológicos que presenta este cultivo (De Miguel, 2007). Otra medida recomendable es la desinfección con fosfato trisódico o lejía (hipoclorito de sodio) de los utensilios de poda para evitar una posible transmisión mecánica del virus, así como la desinfección de las manos durante las operaciones de trasplante, poda, recolección (Luis-Artega, 1994).

5.7.3 Material vegetal

Una de las medidas importantes para controlar la enfermedad es eliminar cuanto antes las plantas enfermas, puesto que éstas podrían actuar de foco de infección. Asimismo, se debe realizar un riguroso control del material vegetal y evitar la introducción, en explotaciones sanas, de plántulas de semillero infectadas con el virus y con el hongo vector (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979). Esta situación se puede evitar, en el caso de *O. bornovanus*, mediante el lavado y desinfección de las bandejas y el autoclavado del sustrato utilizado en los semilleros. En el caso del MNSV, hay autores que afirman que se puede controlar mediante el

tratamiento de las semillas de melón con ácido clorhídrico (HCL) o bien mediante el secado de éstas por 4 días o más (Dumas de Vaulx, 1970). No obstante, es importante indicar que estos resultados están basados solamente en la sintomatología que podrían mostrar las plántulas procedentes de las semillas tratadas, como ya se ha indicado. Otros estudios indican que el HCL es capaz de inactivar el MNSV presente en la cubierta de las semillas de melón, situación que fue corroborada mediante ELISA (Campbell *et al.*, 1996). Todos estos tratamientos surgen ante la necesidad del uso de semilla libre de virus como una medida importante de control, aunque hay que hacer alusión nuevamente a la dificultad que presenta la detección del MNSV en las semillas dado que suele presentar índices de transmisión tan bajos que son difícilmente detectables mediante los métodos convencionales.

5.7.4 Fuentes de resistencia en melón

La estrategia a la que se le está dedicando más tiempo y esfuerzo para el control del MNSV en melón es el empleo de la resistencia genética derivada de la propia especie. En cuanto a la respuesta de algunos cultivares a la infección por el virus, se han observado importantes diferencias varietales en melón, que van desde la resistencia a una extremada sensibilidad (Lovisoló *et al.*, 1982). Hasta el momento, la fuente de resistencia recesiva y monogénica más estudiada es la conferida por el gen *nsv*, que asegura una detención precoz de la multiplicación del virus (Álvarez, 1997), la cual ha sido observada en varios cultivares de melón, tales como “Gulfstream”, “PMR-5”, “Planter’s Jumb” y en la línea “PI 161375-Songwhan-Charmi” (Coudried *et al.*, 1981). Así pues, la resistencia conferida por este gen era efectiva contra todos los aislados del virus descritos, hasta que Díaz *et al.* (2002) identificaron el aislado MNSV-264 capaz de superar dicha resistencia. Análisis posteriores confirmaron que la región 3'-UTR contenía el determinante genético de la virulencia del MNSV-264 sobre genotipos *nsv/nsv* y que la resistencia se expresaba a nivel celular (Díaz *et al.*, 2004). Estos autores concluyen que, dado que esta región está implicada en la replicación y traducción de RNAs virales, la resistencia conferida por *nsv* debe actuar en la replicación y/o traducción del genoma viral. Se ha descrito también otra resistencia genética al MNSV, controlada por dos genes dominantes (*Mnr 1* y *Mnr2*), en el cultivar de melón “Doublon” (Mallor *et al.*, 2003). Otros autores

presentan indicios de que el cv. “Cantaloup Haogen” podría tener algún tipo de resistencia al MNSV diferente a la controlada por el gen *nsv* y a la descrita para el cv. “Doublon” (Mallor *et al.*, 2004).

Las resistencias naturales (derivadas de la misma especie) al MNSV descritas son pocas, y además como ya se ha dicho, existen precedentes de superación de la resistencia controlada por el gen *nsv*. Por ello, algunos autores se apoyan en la ingeniería genética como una alternativa interesante al uso de resistencias naturales para el control de la enfermedad, en la búsqueda de nuevos genes en melón que confieran resistencia al virus. Asimismo, hemos encontrado en la literatura una larga lista de cultivares comerciales de melón que muestran tolerancia o resistencia al MNSV. Entre estos, podemos mencionar los cultivares tipo Piel de Sapo, destacando en este tipo de melón Bruneto F₁ y Pinzon F₁ (MP-470) (SYNGENTA SEEDS) y Valverde F₁ (CLAUSE TEZIER), los cuales muestran resistencia al MNSV, mientras que los cultivares Nicolas F₁ (MP-245) y Simbad F₁ (MP-292) (SYNGENTA SEEDS), están descritos como tolerantes. En cuanto a los cultivares tipo Galia destacan Abellán, Cyro, Pepe, Raul, Riscal y Zondra (DE RUITER), Don Juan F₁ (ZERAIM), Elario, Galante y Galápago (HAZERA), Eros (PSI 04400) y Gallardo (SEMINIS), Mastrio F₁ (MG 1477), Primal F₁, Radical F₁ y Siglo F₁ (SYNGENTA SEEDS), 34-031 RZ (RIJK ZWAAN), todos resistentes al MNSV. En melones tipo Cantalupo, solamente el cultivar Palmero F₁ (CLAUSE TEZIER) parece mostrar resistencia al MNSV. En la literatura consultada, hemos encontrado también algunos portainjertos de calabaza disponibles comercialmente que presentan resistencia al MNSV, entre los cuales podemos destacar Ercole F₁ (Nun 6001 F₁) y Shintosa Camelforce F₁ (NUNHEMS) (Rodríguez, 2004).

6. OTROS AGENTES QUE PRESENTAN SINTOMATOLOGÍA DE “COLAPSO” SIMILAR AL MNSV

En cucurbitáceas, el “colapso” se ha descrito principalmente en melón y también en sandía y pepino. Este síndrome es conocido desde hace muchos años y su problemática desde un punto de vista etiológico resulta muy compleja (García-Jiménez, 2006). Así, el “colapso” del melón ha llegado a ser uno de los principales factores limitantes de esta hortícola y una de las causas de la disminución de la superficie cultivada. El término “colapso” engloba una serie de

enfermedades que presentan una sintomatología similar a la descrita para el MNSV (marchitez rápida e irreversible de las plantas, generalmente durante las épocas de engorde y maduración de los frutos), pero atribuidas a diferentes agentes causales, que deben ser debidamente identificados (García-Jiménez *et al.*, 1993). Bajo un término ambiguo que recibe diferentes denominaciones, tanto en España (“colapso”, “muerte súbita”) como en el resto del mundo (“collapse”, “sudden death”, “sudden wilt”, “vine decline”), se engloban una serie de afecciones cuya expresión final es la muerte de la planta (García-Jiménez, 2006). Entre los patógenos capaces de producir “colapso” del melón se han descrito virus, bacterias y hongos. Sin embargo, en la mayoría de los casos los estudios se centran en agentes de etiología fúngica (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 Principales patógenos asociados al “colapso” del melón^a

Patógeno ^b	Distribución geográfica	Referencia
VIRUS		
Virus de las manchas necróticas del melón (<i>Melon necrotic spot virus</i> , MNSV)	América, Asia, Europa, Túnez	Gu <i>et al.</i> , 2008
Virus de las venas amarillas de la calabaza (<i>Squash vein yellowing virus</i> , SqVYV)	EE. UU.	Egel y Adkins, 2007
BACTERIAS		
Bacterias localizadas en el floema (Bacterium-like organisms, BLOs)	EE. UU.	Bruton <i>et al.</i> , 1998
<i>Erwinia tracheiphila</i> (Smith) Bergey.	Norte-centro de Europa EE. UU. Japón Sudáfrica	Ferreira y Boley, 1992
HONGOS		
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	India	Sen y Palodhi, 1979
<i>Fusarium solani</i> , <i>F. equiseti</i> (Corda) Sacc., <i>F. javanicum</i> Koord	Israel	Palti y Joffe, 1971
<i>Didymella bryoniae</i> (Auersw.) Rhem	EE. UU.	Sitterly y Keinath, 1996
<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.	Australia EE. UU. España Israel Sudáfrica	Walker, 1994 Bruton y Wann, 1994 García-Jiménez, 1994 Reuveni <i>et al.</i> , 1982 Reuveni, 1985
<i>Diaporthe melonis</i> Baraha & O'Brien	EE. UU.	Bruton, 1996
<i>Rhizoctonia solani</i> Khün	España	Cebolla, 1994
<i>Pythium</i> spp.	EE. UU. España	Munnecke <i>et al.</i> , 1984 Tello <i>et al.</i> , 1990
<i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat.	EE. UU.	Bruton, 1996
<i>Nodulisporium melonis</i> Watanabe & Sato	Japón	Sato <i>et al.</i> , 1995
<i>Verticillium dahliae</i> Klebahn	EE. UU.	Bruton, 1996
<i>Rhizopycnis vagum</i> D. F. Farr, sp. nov.	EE. UU. España	Aegerter <i>et al.</i> , 2000 García-Jiménez <i>et al.</i> , 2000

Continúa en la página siguiente

Patógeno ^b	Distribución geográfica	Referencia
HONGOS		
<i>Rhizopycnis vagum</i> D. F. Farr, sp. nov.	Guatemala	Bruton y Miller, 1997a
	Honduras	Bruton y Miller, 1997b
<i>Plectosporium tabacinum</i> (van Beyma) M. E. Palm, W. Gams & Nirenberg	España	García-Jiménez <i>et al.</i> , 2000
<i>Acremonium cucurbitacearum</i> Alfaro-García, W. Gams <i>et J.</i> García-Jiménez	EE. UU.	Bruton, 1996
<i>Monosporascus</i> spp.	España	García-Jiménez <i>et al.</i> , 2000
	Brasil	Sales <i>et al.</i> , 2004
	EE. UU.	Mertely <i>et al.</i> , 1991
	España	García-Jiménez <i>et al.</i> , 2000
	Guatemala	Bruton y Miller, 1997a
	Honduras	Bruton y Miller, 1997b
	Israel	Reuveni <i>et al.</i> , 1983
	Japón	Uematsu <i>et al.</i> , 1985
	México	Martyn <i>et al.</i> , 1996
	Taiwán	Tsay y Tung, 1995
Túnez	Martyn <i>et al.</i> , 1994	

^aFuente: Adaptado de Cássia-Souza-Dias (2003).

^bDe esta tabla se han excluido las fusariosis causadas por *Fusarium oxysporum* Schlechtendal: Fries f. sp. *melonis* W.C. Snyder et H.N. Hansen, que son bien conocidas y tienen una sintomatología claramente diferente (Martyn y Gordon, 1996).

^cCuando se indica un determinado continente nos referimos a que el patógeno en particular ha sido descrito en 3 o más países de dicho continente.

Tal y como se indica en la Tabla 1.3, aparte del MNSV, hay otros agentes asociados al “colapso” de cucurbitáceas, la mayoría de ellos de etiología fúngica, como hemos indicado anteriormente. Entre ellos podemos mencionar a *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., citado desde antiguo como el causante de marchitez en cultivos de melón en la India (Sen y Palodhi, 1979), así como también a *F. equiseti* (Corda) Sacc. y *F. javanicum* Koord, citados por Palti y Joffe (1971) como los responsables de producir una sintomatología similar a la anterior en cultivos de cucurbitáceas en Israel. Asimismo, otras especies de *Fusarium*, entre éstas, *F. oxysporum* Schlechtendal: Fries f. sp. *melonis* W.C. Snyder et H.N. Hansen, causante de la fusariosis vascular de melón y sandía, podría ocasionar también muerte de plantas. Sin embargo, los síntomas clásicos de fusariosis en melón son de tipo amarilleo intenso que se inicia en un sector lateral de las hojas y progresa acrópetamente en la planta, así como la presencia de una estría necrótica que avanza a lo largo del tallo y los pecíolos. Además, suelen observarse en el tallo secreciones gomosas de color rojizo a negro (González-Torres *et al.*, 1994). En el caso de *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rhem, en los

tallos, generalmente cerca del suelo, aparecen grandes zonas con un color pardo oscuro y acuoso al principio sobre las que suelen observarse gotitas de exudados. Estas zonas afectadas evolucionan a colores negruzcos debido a la presencia sobre el tejido enfermo de las formas reproductivas del hongo, peritecios y picnidios, también acompañadas a veces de exudados gomosos de un color marrón rojizo. En caso de fuertes ataques a ramas, las plantas de melón pueden llegar a marchitarse (Rodríguez *et al.*, 1994). Por otro lado, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. ha sido descrito como el causante de marchitez en plantas de melón en varias zonas meloneras de Estados Unidos (Bruton y Wann, 1994), así como también en otros países, por ejemplo, Israel (Reuveni *et al.*, 1982), con una sintomatología algo distinta a la encontrada en España (García-Jiménez, 1994). Este hongo afecta principalmente a melón en la zona del cuello de la planta y parte baja de las ramas. Los primeros síntomas de esta enfermedad son parecidos a los producidos por *D. bryoniae*: aparecen lesiones hidróticas de un color marrón claro sobre las que suelen aparecer gotitas de un exudado traslúcido de color marrón que al secarse toman una coloración más oscura. Posteriormente, esta zona afectada se va secando tomando un aspecto blanquecino y se ven aparecer grietas longitudinales en las que parece que la epidermis se separa del tallo. En una fase posterior se empieza a observar sobre este fondo blanquecino numerosos puntos negros muy pequeños que corresponden a los microesclerocios del hongo y se produce también un decaimiento de las ramas (García-Jiménez, 1994). Asimismo, *Diaporthe melonis* Baraha & O'Brien ha sido observado en plantas de melón con síntomas de "colapso" en Estados Unidos (Bruton, 1996). Sin embargo, este hongo se diferencia de los otros hongos que producen "colapso" en cucurbitáceas debido a que presenta una coloración púrpura característica en el tallo. En España se ha sido citado a *Rhizoctonia solani* Khün como el agente causal del "colapso" del melón (Cebolla, 1994). Según este autor, las plantas adultas de melón afectadas por este hongo manifiestan los síntomas comenzando por clorosis y posterior necrosis de las hojas viejas de la base, seguido de una marchitez rápida de la planta. En dichas plantas se aprecia la ausencia de raicillas o pelos absorbentes, necrosis y placas necróticas en raíces, a veces situadas a gran distancia del cuello de la planta. Sobre las raíces principales se aprecian abultamientos debidos a la cicatrización de los puntos de unión con raíces desaparecidas. En fases muy avanzadas de la enfermedad se puede llegar a producir la pudrición del cuello.

Otros autores, entre ellos, Munnecke *et al.* (1984) describen una marchitez súbita de melón en California, Estados Unidos, en la época de maduración de los frutos atribuyéndola a un ataque de *Pythium* sp. a la raíz. Asimismo, en prospecciones realizadas en cultivos de melón en España y donde fue observada una muerte masiva de las plantas de melón en plena producción, Tello *et al.* (1990) aislaron a *Pythium aphanidermatum* y *R. solani*. Sin embargo, estos autores indican que la presencia de estos hongos en las muestras de melón procedentes de dichas prospecciones fue relativamente baja. *Botryodiplodia theobromae* Pat. ha sido asociado, en menor medida, a plantas de cucurbitáceas con síntomas de “colapso” en Estados Unidos (Bruton, 1996). No obstante, este hongo está citado principalmente como patógeno de frutos. *Nodulisporium melonis* Watanabe & Sato ha sido observado en plantas de melón con síntoma de “colapso” en Japón, observándose en las raíces de las plantas enfermas una pudrición y una coloración marrón, colapsando las plantas justo antes de la cosecha (Sato *et al.*, 1995). Por otro lado, la verticilosis es una enfermedad vascular producida por *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berth y *V. dahliae* Klebahn. Dicha enfermedad se caracteriza por producir una obstrucción de los vasos conductores que impide la circulación de la savia, dando lugar a una marchitez de la planta, apreciándose en las hojas amarilleo y marchitez necrótica que progresa ascendentemente (Messiaen *et al.*, 1995). Otros patógenos de menor importancia tales como *Rhizopycnis vagum* D. F. Farr., sp. nov. y *Plectosporium tabacinum* (van Beyma) M. E. Palm, W. Gams & Nirenberg, recientemente identificados en España, son frecuentemente aislados de plantas sintomáticas y, según algunos autores, pueden también contribuir a la muerte de las plantas de melón (García-Jiménez *et al.*, 2000). Por otro lado, García-Jiménez *et al.* (1989), describen la secuencia de síntomas en el “colapso” del melón en España y citan a *Acremonium* sp. como el posible responsable de la enfermedad. Posteriormente, García-Jiménez *et al.* (2000) observaron que se trataba de *Acremonium cucurbitacearum* Alfaro-García, W. Gams *et J.* García-Jiménez y que la presencia del mismo en esta hortícola en España había sido citada previamente (García-Jiménez *et al.*, 1994b; Alfaro-García *et al.*, 1996). Aunque el síntoma más evidente causado por este hongo es la muerte rápida de plantas adultas, los síntomas de la enfermedad ya aparecen desde los primeros estados de desarrollo de la planta variando ligeramente según se trate de melón de siembra directa o de transplante. En el caso de melón sembrado directamente en terreno infestado con el patógeno, ya a

los 15–20 días de la siembra se puede observar en la zona de unión del hipocótilo y la raíz principal una coloración parda que toma un aspecto acorchado. Se observa también pérdida de raicillas, a la cual la plántula reacciona emitiendo nuevas raicillas por encima de la zona afectada. En plantas de melón de transplante los síntomas observados son similares a los descritos en plantas de melón de siembra directa (García-Jiménez *et al.*, 1994b). Todo ello hace que la raíz en sus últimos estadios tenga un aspecto característico con solo unas pocas raíces gruesas, hecho éste también observable en el parasitismo por *O. bornovanus* (Gómez, 1994), con abundantes zonas necróticas acorchadas y podridas y prácticamente sin ninguna raicilla. Por otro lado, el primer síntoma observado en la parte aérea de la planta comienza con un ligero amarilleo de las hojas, al inicio de la maduración de los frutos. Posteriormente, se observa una pérdida de turgencia, las hojas van tomando una coloración marrón y, por último, la planta se marchita y muere dentro de 5–10 días (García-Jiménez *et al.*, 1994b). Se ha descrito además a *Monosporascus eutypoides* (Petrak) v. Arx como causante del “colapso” de melón en Israel (Reuveni *et al.*, 1983), producido por el ataque del hongo a la raíz, mientras que *M. cannonballus* Pollack & Uecker ha sido aislado también a partir de raíces de plantas de melón enfermas (Martyn y Miller, 1996). El síntoma más evidente de este tipo de hongos es la aparición sobre las raíces de las plantas de unos puntos negros redondos, algo emergentes, observables a simple vista y que corresponden a la fructificación (peritecios) del hongo. No obstante, en España estos puntos negros sólo se presentan en plantas prácticamente muertas (García-Jiménez *et al.*, 1994a).

Aparte de los hongos descritos anteriormente, hemos encontrado en la literatura otros agentes que podrían estar implicados en el “colapso” de cucurbitáceas. Entre ellos, podemos mencionar las bacterias localizadas en el floema (Bacterium-like organisms, BLOs), presentando las plantas afectadas amarilleo de hojas y decoloración del floema (Bruton *et al.*, 1998). Asimismo, *Erwinia tracheiphila* produce marchitez y muerte súbita en las plantas afectadas (Ferreira y Boley, 1992), observándose daños importantes sobre todo en cultivos de melón y pepino, siendo la sandía la especie más resistente. Dicha bacteria alcanza rápidamente los vasos del tallo y su progresión es descendente, contrariamente a las otras enfermedades vasculares (Blancard *et al.*, 1991; Beltrá y López, 1994), caracterizándose, como indicamos anteriormente, por la aparición repentina de marchitez y arrugamiento de las hojas. Las lesiones

aparecen primeramente sobre las hojas como manchas blandas de color verde claro que se propagan rápidamente produciendo una marchitez general de las hojas y finalmente arrugamiento y desecamiento de los tallos. En algunas plantas, las hojas pueden estar marchitas durante el día y recuperarse parcialmente por la noche (Beltrá y López, 1994).

Recientemente, Egel y Adkins (2007) citan al virus de las venas amarillas de la calabaza (*Squash vein yellowing virus*, SqVYV) como el causante del “colapso” de la sandía en Estados Unidos, y cuya sintomatología más característica consiste en marchitez y “colapso” de las plantas, así como pudrición de raíces. Otros autores, entre ellos, Baker *et al.* (2008) describen la secuencia de síntomas en plantas de sandía afectadas por este virus, iniciándose con un ligero amarilleo del follaje, seguido de pardeamiento y, posteriormente, “colapso” de las plantas durante la primera semana de observarse los primeros síntomas, previo al inicio de la cosecha. Además, en el interior de los frutos, suelen aparecer manchas descoloridas.

En cualquiera de todos estos casos, la sintomatología presentada por todos estos agentes difiere de la observada para el MNSV, como hemos indicado anteriormente. No obstante, podemos indicar que en el “colapso” de cucurbitáceas se da una situación compleja (más propiamente se debería hablar de “colapsos”) que se podría definir, en unos casos, como un conjunto de enfermedades (cuando actúa cada patógeno individualmente) y, en otros, como una enfermedad de etiología compleja (cuando actúan varios agentes patógenos simultáneamente) (García-Jiménez, 2006). Una circunstancia que ha contribuido a esta complejidad ha sido confundir síntoma final con enfermedad, debido que para diagnosticar correctamente una enfermedad resulta fundamental el estudio completo de su síndrome y no ceñirse a la aparición de los síntomas finales, no olvidando la detección continuada del síntoma y la presencia del posible agente causal en los distintos campos afectados por el síndrome. Es importante indicar que en la actualidad parece existir consenso entre los distintos equipos de investigadores en considerar que el “colapso” del melón en España es un síndrome complejo. Las enfermedades descritas para el “colapso” del melón deben ser diagnosticadas de forma concienzuda y rutinaria abordando todos los posibles agentes causales citados y utilizando medios de diagnósticos sensibles y fiables que permitan establecer una relación constante de presencia del agente fitopatógeno y desarrollo de la enfermedad para de esa forma poder dilucidar la

causa de tal síndrome y en consecuencia tomar las medidas pertinentes e intentar evitarlas en el futuro.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams MJ, 1991. Transmission of plant viruses by fungi. *Annals of Applied Biology* **118**, 479–492.
- Aegerter BJ, Gordon TR, Davis RM, 2000. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. *Plant Disease* **84**, 224–230.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, 1979. Introductory Mycology. 3rd Edition. John Wiley & Sons. New York: USA, 632 p.
- Alfaro-García A, Armengol J, Bruton BD, Gams W, García-Jiménez J, Martínez-Ferrer G, 1996. The taxonomic position of the causal agent of *Acremonium* collapse of muskmelon. *Mycologia* **88**, 804–808.
- Álvarez JM, 1997. Tendencias en la mejora genética del melón. En: Namesny A, ed. *Melones*. Compendios de Horticultura 10. Ediciones de Horticultura. Reus, Tarragona: España, p. 25–34.
- Avgelis AD, 1985. Occurrence of *Melon necrotic spot virus* in Crete (Greece). *Phytopath. Z.* **114**, 365–372.
- Avgelis AD, 1989. Watermelon necrosis caused by a strain of *Melon necrotic spot virus*. *Plant Pathology* **38**, 618–622.
- Baker C, Webb S, Adkins S, 2008. *Squash vein yellowing virus*, causal agent of watermelon vine decline in Florida. Florida Department of Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry. *Plant Pathology circular* **407** (DACS-P-01579).
- Barr DJS, 1968. A new species of *Olpidium* parasitic on cucumber roots. *Canadian Journal of Botany* **46**, 1087–1091.
- Barr DJS, 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. *Canadian Journal of Botany* **58**, 2380–2394.
- Barr DJS, 2001. Chytridiomycota. In: McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA, eds. *The Mycota*. Vol. 7A. Springer-Verlag. New York: USA, p. 93–112.

- Beltrá R, López MM, 1994. Marchitamiento bacteriano (*Erwinia tracheiphila*). En: Díaz-Ruiz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 28–29.
- Blancard D, Lecoq H, Pitrat M, 1991. Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar, luchar. 1ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid: España, 301 p.
- Blystad DR, Nes B, 1995. Melon necrotic spot in cucumber. *Vaxtskyddsnotiser* **59**, 35–37.
- Bos L, Maat DZ, 1974. A strain of *Cucumber mosaic virus*, seed-transmitted in beans. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **80**, 113–123.
- Bos L, Van Dorst HJM, Huttinga H, Maat DZ, 1984. Further characterization of *Melon necrotic spot virus* causing severe disease in glasshouse cucumbers in the Netherlands and its control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **90**, 55–69.
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ, eds, 1996. *Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE Database* (Online Database). URL: <http://www.image.fs.uidaho.edu/vide/> (24-agosto-2008).
- Bruton BD, Wann EV, 1994. Vines declines of cantaloupe caused by *Macrophomina phaseolina*: epidemiology and control. *Phytopathology* **85**, 382.
- Bruton BD, 1996. Una perspectiva histórica del decaimiento de las cucurbitáceas en los Estados Unidos. En: *VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología*. Córdoba: España, p. 30.
- Bruton BD, Miller ME, 1997a. Occurrence of vine decline diseases of muskmelon in Guatemala. *Plant Disease* **81**, 694.
- Bruton BD, Miller ME, 1997b. Occurrence of vine decline diseases of melons in Honduras. *Plant Disease* **81**, 696.
- Bruton BD, Fletcher J, Pair SD, Shaw M, Sittertz-Bhatkar H, 1998. Association of a phloem-limited bacterium with yellow vine disease in cucurbits. *Plant Disease* **82**, 512–520.
- Büchen-Osmond C, 2002. ICTVdb: *The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Online Database). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm> (29-abril-2009).

- CABI, 2005. Crop protection compendium. Wallingford, UK: CAB International.
- Campbell RN, Lin MT, 1976. Morphology and thermal death point of *Olpidium brassicae*. *American Journal of Botany* **63**, 826–832.
- Campbell RN, 1985. Longevity of *Olpidium brassicae* in air-dry soil and the persistence of the lettuce big-vein agent. *Canadian Journal of Botany* **63**, 2288–2289.
- Campbell RN, 1988. Cultural characteristics and manipulative methods. In: Cooper JI, Asher MJC, eds. *Viruses with fungal vectors*. Association of Applied Biologists. Wellesbourne: UK, p. 153–165.
- Campbell RN, Sim ST, 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radiale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1136–1143.
- Campbell RN, Sim ST, Lecoq H, 1995. Virus transmission by host-specific strains of *Olpidium bornovanus* and *Olpidium brassicae*. *European Journal of Plant Pathology* **101**, 273–282.
- Campbell RN, 1996. Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 87–108.
- Campbell RN, Wipf-Scheibel C, Lecoq H, 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology* **86**, 1294–1298.
- Cañizares MC, Marcos JF, Pallás V, 2001. Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of *Carnation mottle virus* (CarMV) and phylogenetic relationships within the *Tombusviridae* family. *Archives of Virology* **146**, 2039–2051.
- Cássia-Souza-Dias R, 2003. Mejora de la resistencia al colapso del melón: control genético y desarrollo de líneas resistentes. *Tesis Doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 152 p.
- Cebolla V, 1994. Muerte de melón causada por *Rhizoctonia* (*R. solani*). En: Díaz-Ruiz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 44–46.
- Celix A, Luis-Arteaga M, Rodriguez-Cerezo E, 1996. First report of *Cucumber green mottle mosaic* Tobamovirus infecting greenhouse-grown cucumber in Spain. *Plant Disease* **80**, 1303.

- CONABIO, 2008. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). *Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad* (Online Database). URL:http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20912_sg7.pdf (24-agosto-2008).
- Cook WRI, Collins WB, 1935. The life-history of *Olpidium majus* sp. nov. with notes on *Olpidium radicale* Schwartz and Cook. *Annals of Mycology* **35**, 72–78.
- Coudriet DL, Kishaba AN, Carroll JE, 1979. Transmission of *Muskmelon necrotic spot virus* in muskmelons by cucumber beetles. *Journal of Economy Entomology* **72**, 560–561.
- Coudriet DL, Kishaba AN, Bohn GW, 1981. Inheritance of resistance to *Muskmelon necrotic spot virus* in a melon aphid-resistant breeding line of muskmelon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **106**, 789–791.
- Cuadrado IM, Gómez J, Moreno P, 1993. El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería. I. Importancia del MNSV como causa de la muerte súbita del melón. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **19**, 93–106.
- Cuadrado IM, Janssen D, Velasco L, Ruiz L, Segundo E, 2001. First report of *Cucumber vein yellowing virus* in Spain. *Plant Disease* **85**, 336.
- De Miguel A, 2007. Portainjertos. En: De Miguel A, De la Torre F, Baixauli C, Maroto JV, Jordá MC, López MM, García-Jiménez J, eds. *Injerto de Hortalizas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid: España, p. 55–64.
- Dias HF, 1970. Transmission of *Cucumber necrosis virus* by *Olpidium cucurbitacearum* Barr & Dias. *Virology* **40**, 828–839.
- Díaz JA, Nieto C, Moriones E, Aranda MA, 2002. Spanish *Melon necrotic spot virus* isolate overcomes the resistance conferred by the recessive *nsv* gene of melon. *Plant Disease* **86**, 694.
- Díaz JA, Bernal JJ, Moriones E, Aranda MA, 2003. Nucleotide sequence and infectious transcripts from a full-length cDNA clone of the Carmovirus *Melon necrotic spot virus*. *Archives of Virology* **148**, 599–607.

- Díaz JA, Nieto C, Moriones E, Truniger V, Aranda MA, 2004. Molecular characterization of a *Melon necrotic spot virus* strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 668–675.
- Dinant S, Lot H, 1992. Review: *Lettuce mosaic virus*. *Plant Pathology* **41**, 528–542.
- Doolittle SP, Walker MN, 1925. Further studies on the overwintering and dissemination of cucurbit mosaic. *Journal of Agricultural Research* **31**, 1–58.
- Dumas de Vaulx R, 1970. Étude de la transmission du virus de la criblure. In: *Rapport d'activité 1969-1970 Station D'Amélioration des Plantes Maraichères*. Montfavet, France: INRA, p. 46–50.
- Egel DS, Adkins S, 2007. *Squash vein yellowing virus* identified in watermelon (*Citrullus lanatus*) in Indiana. *Plant Disease* **91**, 1056.
- FAO, 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Base de datos estadísticos* (Online Database). URL: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (24-agosto-2008).
- Ferreira SA, Boley RA, 1992. *Erwinia tracheiphila*: bacterial wilt of cucurbits. *Department of Plant Pathology, CTAHR, University of Hawaii at Manoa* (Online Database). URL: http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/Type/e_trach.htm (24-agosto-2008).
- Ferrer-Gual, 2008. Caracterización molecular y desarrollo de métodos de diagnóstico del género Fabavirus. Evaluación del BTH como método de control. *Tesis Doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 122 p.
- Franken AAJM, Maat DZ, Kamminga GC, 1990. Detection of *Squash mosaic virus* in seeds of melon (*Cucumis melo*) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *European Journal of Plant Pathology* **96**, 91–102.
- García-Jiménez J, Velásquez MT, Alfaro A, 1989. Secuencia de síntomas en el colapso del melón. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **4**, 333–342.

- García-Jiménez J, Martínez-Ferrer G, Armengol J, Velázquez MT, Orts M, Juárez M, Ortega A, Jordá MC, Alfaro A, 1993. Agentes asociados al colapso del melón en distintas zonas españolas. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **19**, 401–423.
- García-Jiménez J, 1994. Decaimiento de ramas por *Macrophomina* (*M. phaseolina*). En: Díaz-Ruiz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 54–56.
- García-Jiménez J, Armengol J, Martínez-Ferrer G, 1994a. Puntos negros de las raíces de melón y sandía (*Monosporascus* spp.). En: Díaz-Ruiz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 38–42.
- García-Jiménez J, Velázquez MT, Jordá C, Alfaro-García A, 1994b. *Acremonium* species as the causal agent of muskmelon collapse in Spain. *Plant Disease* **78**, 416–419.
- García-Jiménez J, Armengol J, Sales R, Jordá C, Bruton BD, 2000. Fungal pathogens associated with melon collapse in Spain. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 169–173.
- García-Jiménez J, 2006. Colapso de plantas hortícolas de etiología compleja. En: *XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Murcia: España, p. 7.
- García-Jiménez J, López MM, Jordá C, 2007. Enfermedades más importantes que previene el injerto. En: De Miguel A, De la Torre F, Baixauli C, Maroto JV, Jordá MC, López MM, García-Jiménez J, eds. *Injerto de Hortalizas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid: España, p. 39–53.
- Genovés A, Navarro JA, Pallás V, 2006. Functional analysis of the five *Melon necrotic spot virus* genome-encoded proteins. *Journal of General Virology* **87**, 2371–2380.
- Genovés A, 2008. Análisis funcional y localización subcelular de las proteínas implicadas en el movimiento intra e intercelular del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV). *Tesis Doctoral*. Departamento de

- Biocología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 238 p.
- Giesman-Cookmeyer D, Silver S, Vaewhongs AA, Lommel SA, Deom CM, 1995. Tobamovirus and Dianthovirus movement proteins are functionally homologous. *Virology* **213**, 38–45.
- Gillings M, Broadbent P, Indsto J, Lee RF, 1993. Characterization of strains of *Citrus tristeza virus* by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology* **80**, 692–698.
- Gómez J, Cuadrado I, Velasco V, 1993a. El Virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería. II. Eficacia de la desinfección del suelo frente al MNSV. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **19**, 179–186.
- Gómez J, Cuadrado I, Velasco V, 1993b. El Virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería. III. Eficacia del injerto del melón para combatir el MNSV. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **19**, 187–192.
- Gómez J, 1994. Podredumbre radicular asociada a *Olpidium* (*O. radiale* y *O. brassicae*). En: Díaz-Ruiz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 31–32.
- Gómez J, Guirado ML, Serrano Y, Rodríguez J, Sáez E, 2005. Importancia, epidemiología y control de *Olpidium bornovanus*. *Boletín de la Sociedad Española de Fitopatología* **52**, 4–7.
- Gonzalez-Garza R, Gumpf DJ, Kishaba AN, Bohn GW, 1979. Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California isolate of *Melon necrotic spot virus*. *Phytopathology* **69**, 340–345.
- González-Torres R, Melero JM, Gómez-Vázquez J, Jiménez-Díaz RM, 1994. Fusariosis vasculares del melón y la sandía (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* y *F. oxysporum* f. sp. *niveum*). En: Díaz-Ruiz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 47–50.
- Gosalvez B, Navarro JA, Lorca A, Botella F, Sánchez-Pina MA, Pallás V, 2003. Detection of *Melon necrotic spot virus* in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods* **113**, 87–93.

- Gu QS, Bao WH, Tian YP, Prins M, Yang HX, Lu J, Liu LF, Peng B, 2008. *Melon necrotic spot virus* newly reported in China. *Plant Pathology* **57**, 765.
- Gug-Seoun C, Jae-Hyun K, Jeong-Soo K, 2003. Characterization of *Melon necrotic spot virus* isolated from muskmelon. *Plant Pathology Journal* **19**, 123–127.
- Hacker DL, Petty ITD, Wei N, Morris TJ, 1992. *Turnip crinkle virus* genes required for RNA replication and virus movement. *Virology* **186**, 1–8.
- Herrera JA, Cebrian MC, Jordá C, 2006. First report of *Melon necrotic spot virus* in Panama. *Plant Disease* **90**, 1261.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2007a. Molecular variability of different isolates of *Olpidium bornovanus*. In: *XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Sorrento: Italy, p. 275.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Roselló JA, Córdoba-Sellés C, Jordá C, 2007b. Molecular variability among isolates of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) from Spain, Mexico and Central America. In: *XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Sorrento: Italy, p. 281.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Jordá C, 2008. *Melon necrotic spot virus* (MNSV): nuevo virus en el cultivo de melón en Panamá. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* **79–80**, 40–48.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Córdoba-Sellés MC, Jordá C, 2009a. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. *Mycological Research* **113**, 602–610.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2009b. Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of seed-disinfection treatments. *Plant Pathology* **58**, 436–442.
- Huppert E, Szilassy D, Salánki K, Divéki Z, Balázs E, 2002. Heterologous movement protein strongly modifies the infection phenotype of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of Virology* **76**, 3554–3557.

- Iglesias-Culebras A, 2000. Resistencia genética al colapso del melón. *Tesis Doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 119 p.
- James TY, Letcher PM, Longcore JE, Mozley-Standridge SE, Porter D, Powell MJ, Griffith GW, Vilgalys R, 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* **98**, 860–871.
- Jian L, Hiruki C, 1996. Polymerase chain reaction amplification and restriction analysis of the ribosomal DNA of *Olpidium radicale* isolates. *Journal of Microbiological Methods* **26**, 87–93.
- Johansen E, Edwards MC, Hampton RO, 1994. Seed transmission of viruses: Current perspectives. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 363–386.
- Jordá-Gutiérrez C, Gómez-Guillamón ML, Juárez M, Alfaro-García A, 1993. Clostero-like particles associated with a yellows disease of melons in South-eastern Spain. *Plant Pathology* **42**, 722–727.
- Jordá C, 1997. Enfermedades virales del melón. En: Namesny A, ed. *Melones*. Compendios de Horticultura no. 10. Ediciones de Horticultura, S.L.. Reus, Tarragona: España, p. 141–152.
- Jordá C, Font MI, Martínez-Culebras P, 2005. Viral etiology of diseases detected in melon in Guatemala. *Plant Disease* **89**, 338.
- Juárez M, Ortega A, Jordá C, 1994. Variabilidad del virus del cribado: un enemigo de las cucurbitáceas en expansión en España. *Horticultura* **11**, 37–40.
- Juárez M, Truniger V, Aranda MA, 2004. First Report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Spain. *Plant Disease* **88**, 907.
- Karling JS, 1977. Chytridiomycetorum iconographia. Lubrecht and Cramer. Monticello, New York: USA.
- Kishi, K. 1966. Necrotic spot of melon, a new virus disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **32**, 363–386.
- 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 of the National Agricultural Research Center for Western Region* **4**, 39–59.

- Kubo C, Nakazono-Nagaoka E, Hagiwara K, Kajihara H, Takeuchi S, Matsuo K, Ichiki TU, Omura T, 2005. New severe strains of *Melon necrotic spot virus*: symptomatology and sequencing. *Plant Pathology* **54**, 615–620.
- Kularatne HAGC, Lawrie AC, Barber PA, Keane PJ, 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation *in planta* of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research* **108**, 1476–1493.
- Lange L, Insunza V, 1977. Root inhabiting *Olpidium* species: the *O. radiale* complex. *Transactions of the British Mycological Society* **69**, 377–384.
- León J, 1987. Botánica de los cultivos tropicales. San José, Costa Rica: IICA, 445 p.
- Li WZ, Qu F, Morris TJ, 1998. Cell-to-cell movement of *Turnip crinkle virus* is controlled by two small open reading frames that function in trans. *Virology* **244**, 405–416.
- Lovisol O, 1980. Virus and viroids disease of cucurbits. *Acta Horticulturae* **88**, 33–82.
- Lovisol O, Lecoq H, Pitrat M, 1982. Note sur les virus de cucurbitacées présents en France. Montfavet, France: INRA-CRA d'Avignon, 29 p.
- Luis-Arteaga M, 1991. Virosis de cucurbitáceas en España. *PHYTOMA-España* **25**, 9–16.
- Luis-Arteaga M, 1994. Enfermedades producidas por virus. En: Díaz-Ruiz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 73–91.
- Mallor C, Álvarez JM, Luis-Arteaga M, 2003. Inheritance of resistance to systemic symptom expression of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) in *Cucumis melo* L. “Doublon”. *Euphytica* **134**, 319–324.
- Mallor C, Álvarez JM, Luis-Arteaga M, 2004. Behaviour of *Cucumis melo* ‘Cantaloup Haogen’ against *Melon necrotic spot virus* (MNSV). In: *Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Olomouc: Czech Republic, p. 203–208.
- MAPA, 2008. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. *Anuario de Estadística Agroalimentaria 2007* (Online Database). URL: <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/introduccion.htm> (24-agosto-2008).

- Marcos JF, Vilar M, Perez-Paya E, Pallás V, 1999. In vivo detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from carnation mottle carmovirus. *Virology* **255**, 354–365.
- Maroto JV, 2002. Horticultura herbácea especial. 5ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid: España, 702 p.
- Martínez de Salinas J, Fraile A, Solís I, García-Arenal F, 1987. Characterization of Spanish isolate of *Melon necrotic spot virus*. In: *Proceedings of VII Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. Granada: Spain, p. 142.
- Martyn RD, Lovic BR, Maddox DA, Germash A, Miller ME, 1994. First report of *Monosporascus* root rot/vine decline of watermelon in Tunisia. *Plant Disease* **78**, 1220.
- Martyn RD, Batten JS, Park YJ, Miller ME, 1996. First report of *Monosporascus* root rot/vine decline of watermelon in Mexico. *Plant Disease* **80**, 1430.
- Martyn RD, Gordon TR, 1996. Fusarium wilt in melon. In: Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE, eds. *Compendium of cucurbits diseases*. American Phytopathological Society Press. Saint Paul, Minnesota: USA, p. 11–13.
- Martyn RD, Miller ME, 1996. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging disease of melons worldwide. *Plant Disease* **80**, 716–725.
- Matsuo K, Kameya-Iwaki M, Ota T, 1991. Two new strains of *Melon necrotic spot virus*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **57**, 558–567.
- Mertely JC, Martyn RD, Miller ME, Bruton BD, 1991. Role of *Monosporascus cannonballus* and other fungi in a root rot/vine decline disease of muskmelon. *Plant Disease* **75**, 1133–1137.
- Messiaen CM, Blancard D, Rouxel F, Lafon R, 1995. Enfermedades de las hortalizas. 3ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid: España, 576 p.
- MICOD, 2008. MICO Diversity: *Olpidium brassicae* (*Spizellomyces*, *Chytridiomycota*). Systematic Botany and Mycology. *University of Munich: Germany* (Online Database). URL: <http://www.botanik.biologie.uni-muenchen.de/botsyst/pdf/> (24-agosto-2008).
- MIDA, 2008. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Dirección Nacional de Agricultura, Programa Nacional de Cucurbitáceas, Panamá.

- Mochizuki T, Ohnishi J, Ohki T, Kanda A, Tsuda S, 2008. Amino acid substitution in the coat protein of *Melon necrotic spot virus* causes loss of binding to the surface of *Olpidium bornovanus* zoospores. *Journal of General Plant Pathology* **74**, 176–181.
- Munnecke DE, Laemmlen FF, Bricker J, 1984. Soil fumigation controls sudden wilt of melon. *California Agriculture*, p. 8–9.
- Naval-Merino MDM, 2005. Transformación genética de melón tipo Galia con los genes de la replicasa, proteína de cubierta y proteína de movimiento del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV). *Tesis Doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 202 p.
- OIRSA-PARSA, 1999. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria-Programa de Ayuda Regional de Salud Animal. Listado Oficial de Plagas y Enfermedades, Panamá.
- Palti J, Joffe AZ, 1971. Causes of the *Fusarium* wilts of cucurbits in Israel and conditions favoring their development. *Phytopathology* **70**, 31–42.
- Reuveni R, Krikun J, Nachmias A, Shlevin E, 1982. The role of *Macrophomina phaseolina* in a collapse of melon plants in Israel. *Phytoparasitica* **10**, 51–56.
- Reuveni R, Krikun J, Shani U, 1983. The role of *Monosporascus eutypoides* in a collapse of melon plants in an arid area of Israel. *Phytopathology* **73**, 1223–1226.
- Reuveni R, 1985. *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* spp. on melon roots in South Africa. *Phytophylactica* **17**, 109.
- Riviere CJ, Pot J, Tremaine JH, Rochon DM, 1989. Coat protein of melon necrotic spot carmovirus is more similar to those of tombusviruses than those of carmoviruses. *Journal of General Virology* **70**, 3033–3042.
- Riviere CJ, Rochon DM, 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of *Melon necrotic spot virus*. *Journal of General Virology* **71**, 1887–1896.
- Robertson NL, French R, Gray SM, 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of Luteoviruses. *Journal of General Virology* **72**, 1473–1477.

- Rochon DA, Kakani K, Robbins M, Reade R, 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and Plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 211–241.
- Rodríguez JM, ed., 2004. Melón. Vademécum de variedades hortícolas. El Ejido, Almería: España, p. 197–219.
- Rodríguez R, Gómez-Vásquez J, García-Jiménez J, 1994. Chancro gomoso del tallo (*Didymella bryoniae*). En: Díaz-Ruiz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 50–53.
- Rubio L, Soong J, Kao J, Falk BW, 1999. Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: *Lettuce infectious yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, and *Beet pseudo-yellows virus*. *Phytopathology* **89**, 707–711.
- Rubio-Huertos M, Peña-Iglesias A, 1973. Bacilliform particles in cortex cells of *Cucumis melo* fruits. *Plant Disease Reporter* **57**, 649–652.
- Ryden K, Persson P, 1986. *Melon necrotic spot virus*-a new virus disease in Sweden. *Vaxtskyddsnotiser* **50**, 4–5.
- Sahtiyanci, S. 1962. Studien über einige wurzelparasitäre Olpidiaceen. *Arch. Mikrobiol.* **41**, 187–228.
- Sales R, Bezerra do Nascimento IJ, De Souza Freitas L, Beltrán R, Armengol J, Vicent A, García-Jiménez J, 2004. First report of *Monosporascus cannonballus* on melon in Brazil. *Plant Disease* **88**, 84.
- 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**, 20–25.
- Sato M, Watanabe T, Furuki I, Morita H, 1995. Root rot of melon caused by *Nodulisporium melonis* in Japan. I: Occurrence, symptoms, isolation and pathogenicity. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **61**, 325–329.
- Segundo E, Janssen D, Velasco L, Ruiz L, Cuadrado IM, 2001. First report of *Cucumber leaf spot virus* in Spain. *Plant Disease* **85**, 1123.
- Sen B, Palodhi PR, 1979. A disease of muskmelon caused by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Current Science* **48**, 166–167.

- Serrano-Cermeño Z, 1996. Veinte cultivos de hortalizas en invernadero. 1ª Edición. Autor-Editor, 640 p.
- Sharma YR, Chohan JS, 1974. Transmission of cucumis viruses 1 and 3 through seeds of cucurbits. *Indian Phytopathology* **26**, 596–598.
- Sitterly WR, Keinath AP, 1996. Gummy stem blight. In: Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE, eds. *Compendium of cucurbits diseases*. American Phytopathological Society Press. Saint Paul, Minnesota: USA, p. 27–28.
- Solovyev AG, Zelenina DA, Savenkov EI, Grdzlishvili VZ, Morozov SY, Maiss E, Casper R, Atabekov JG, 1997. Host-controlled cell-to-cell movement of a hybrid *Barley stripe mosaic virus* expressing a Dianthovirus movement protein. *Intervirology* **40**, 1–6.
- Tello JC, Gómez J, Camporota P, Lacasa A. 1990. Capacidades parasitarias de *Phytium aphanidermatum* y de *Rhizoctonia solani* sobre pepino y melón. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **16**, 733–741.
- Tomassoli L, Siddu G, Carta A, Di Lernia G, Barba M, 1999. Infezione da *Melon necrotic spot virus* su melone in Sardegna. *Informatore Fitopatologico* **10**, 39–41.
- Tomlinson JA, Thomas BJ, 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.
- Tsay JG, Tung BK, 1995. The occurrence of *Monosporascus* root rot/vine decline of muskmelon in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* **4**, 25–29.
- Uematsu S, Onogi S, Watanabe T, 1985. Pathogenicity of *Monosporascus cannonballus* Pollack and Uecker in relation to melon root rot in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **51**, 272–276.
- USDA-ARS, 2008. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland (Online Database). URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?404410> (24-agosto-2008).

- Vilaseca JC, 2007. Papel biofumigante de los restos de cosecha en el control de *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Pepino mosaic virus* (PepMV) y *Oplidium brassicae* (Word.) Dang. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ecosistemas Agroforestales, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 433 p.
- Vilgalys R, 2008. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. *Department of Biology, Duke University, Durham, North Carolina: USA* (Online Database). URL: <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm> (24-agosto-2008).
- Walker GE, 1994. First report of *Macrophomina phaseolina* associated with vine decline of muskmelon in South Australia. *Plant Disease* **78**, 640.
- White KA, Nagy PD, 2004. Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **78**, 187–226.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. New York: USA, p. 315–322.
- Xing W, Hong N, Kun J, Ping G, 2006. Improving the sensitivity of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to study the variability of PLMVd. *Journal of Virological Methods* **135**, 276–280.
- Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H, Wipf-Scheibel C, Marrakchi M, Lecoq H, 2008. First report of *Melon necrotic spot virus* on melon in Tunisia. *Plant Pathology* **57**, 386.
- Yang Y, Kim KS, Anderson EJ, 1997. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in spinach. *Phytopathology* **87**, 924–931.
- Yoshida K, Goto T, Nemoto M, Tsuchizaki T, 1980. Five viruses isolated from melon (*Cucumis melo* L.) in Hokkaido. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **46**, 339–348.
- Zapata M, Cabrera P, Bañón S, Roth P, 1989. El melón. Mundi-Prensa. Madrid: España, 174 p.

Capítulo 2

Capítulo 2

Justificación y objetivos

Los virus de plantas constituyen una serie amenaza para numerosos cultivos y suponen, por tanto, un importante problema económico para la agricultura. En relación a las cucurbitáceas, están se ven afectadas a menudo por enfermedades producidas por virus, la mayoría de los cuales causan síntomas evidentes que habitualmente ocasionan importantes pérdidas económicas, como ya se ha indicado. El número de virus señalados como posibles causantes de enfermedades en este grupo de hortícolas es elevado, habiendo sido descritos en el mundo más de cincuenta virus y cuatro viroides capaces de infectar de forma natural o experimentalmente una o más especies de cucurbitáceas, aunque los virus que han sido verdaderamente asociados con enfermedades descubiertas de forma natural son del orden de los treinta. Uno de los virus más importantes que afectan a las cucurbitáceas en todo el mundo es el virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV), descrito por primera vez en Japón en 1966 sobre plantas de melón cultivadas en invernadero y posteriormente en otras especies de cucurbitáceas, incluyendo sandía y pepino. Según nuestro conocimiento, existe muy poca información disponible sobre la epidemiología de la mayoría de los *Carmovirus*, en particular del MNSV. En cuanto a la transmisión primaria de este virus, esta se realiza por semilla con su extensión posterior por el hongo vector *Ospidium bornovanus*. En relación a este tipo de transmisión, diversas controversias han surgido al respecto, entre ellas, los diferentes índices de transmisión por semilla obtenidos, siendo citados en algunos trabajos índices de transmisión tan amplios que van de 0 a 20%. Con estos antecedentes, diversos tratamientos de limpieza han sido ensayados, entre ellos, el tratamiento con ácido clorhídrico (HCL) y el secado de las semillas por 4 días o más, ambos tratamientos descritos en la literatura para la eliminación de este virus de las semillas de melón. Sin embargo, los resultados de estos estudios han sido basados en sintomatología y pruebas serológicas.

Todos estos estudios surgen ante la necesidad del uso de semilla libre de virus como una medida importante de control, aunque hay que hacer alusión nuevamente la dificultad que presenta la detección del MNSV en las semillas dado que suele presentar niveles de transmisión tan bajos que son difícilmente detectables mediante los métodos convencionales.

Otra importante forma de transmisión del MNSV, como ya se ha indicado, es a través de su hongo vector *O. bornovanus*. Así mismo, otras especies de *Olpidium*, entre ellas *O. brassicae* y *O. virulentus*, han sido descritas en la literatura como transmisoras de importantes virus que afectan a diversos cultivos hortícolas. Sin embargo, no se dispone de un método de diagnóstico sensible y eficaz para detectar y distinguir las distintas especies de *Olpidium*, ya que su diferenciación meramente por características morfológicas de las esporas de resistencia es claramente insuficiente, estudio que se aborda en esta tesis.

Por otro lado, la información genética del MNSV disponible en la literatura al comienzo de esta tesis consistía en la secuencia nucleotídica completa de 5 aislados del virus, lo cual era insuficiente para tener una idea de la diversidad genética del MNSV en el mundo. Así mismo, no se disponía de información de secuencias de su hongo vector *O. bornovanus*. Ante esta situación, se consideró necesario la obtención de secuencias correspondientes a todas las proteínas que componen el genoma del MNSV analizando para ello un gran número de aislados procedentes de diferentes especies de cucurbitáceas principalmente de América Latina y Europa, así como el análisis de la región ITS del DNA ribosómico (ITS-rDNA) de diferentes aislados de *O. bornovanus* y de otras especies de *Olpidium*, con la finalidad de diseñar nuevos y mejores métodos de diagnóstico que tuviesen en cuenta la diversidad genética del virus y de su hongo vector, aspectos importantes a la hora de establecer estrategias de control de la enfermedad.

Por último, en Panamá han sido citados algunos de los virus más importantes que afectan a las cucurbitáceas a nivel mundial. Entre estos podemos mencionar el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), mosaico de la calabaza (*Squash mosaic virus*, SqMV), manchas anilladas de la papaya-W (*Papaya ringspot virus-W*, PRSV-W), mosaico 2 de la sandía (*Watermelon mosaic virus-2*, WMV-2) y el virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV). Recientemente, han sido citados en este país el MNSV y *O. bornovanus*, binomio descrito por otros

autores como el causante del síndrome conocido como “colapso”, el cual produce importantes pérdidas económicas en los cultivos de cucurbitáceas. A pesar de esta situación, la distribución de todos estos virus y *O. bornovanus* en las principales zonas productoras de cucurbitáceas en Panamá no ha sido evaluada de momento, siendo sin duda alguna un aspecto muy importante a la hora de establecer medidas de control de las enfermedades producidas por este tipo de agentes infecciosos.

En este contexto, se plantean los siguientes objetivos en la presente tesis doctoral que serán desarrollados en capítulos independientes:

1. Desarrollar nuevas técnicas serológicas y moleculares de diagnóstico que permitan evaluar la transmisión del MNSV por semilla y la limpieza de éstas mediante tratamientos físicos y químicos.
2. Desarrollar un método multiplex PCR para detectar y diferenciar diferentes especies de *Olpidium*.
3. Evaluar la diversidad genética de aislados del MNSV y *Olpidium* procedentes de cultivos de cucurbitáceas, principalmente de América Latina y Europa.
4. Determinar la presencia, distribución y caracterización del MNSV y su hongo vector *O. bornovanus* en los cultivos de cucurbitáceas en Panamá, así como de otros virus que afectan este tipo de hortícolas en dicho país.

Capítulo 3

Capítulo 3

Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of seed-disinfection treatments

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

Plant Pathology **58**, 436–442 (2009)

ABSTRACT

Rates of seed transmission of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) were estimated in seedlings grown from commercial melon (*Cucumis melo*) cv. Galia F₁ seeds. Seedlings at the cotyledon stage and adult plants were assayed for MNSV by DAS-ELISA and RT-PCR. None of the seedling groups tested positive for MNSV by ELISA. The proportion of seedlings infected with MNSV was at least 7 and 8% in seed lots 05 and 06, respectively, as estimated from RT-PCR analysis of grouped seedlings. Fourteen and eight grouped samples (10 seedlings per group), of a total of 200 and 100 seedlings, respectively, grown from infected seeds were MNSV-positive in seed lots 05 and 06, respectively, corresponding to seed-to-seedling transmission rates of 11.3 and 14.8%, respectively. Several seed-disinfection treatments were evaluated for their ability to prevent seed transmission of MNSV. The results suggest that a treatment of 144 h at 70°C can be used to eradicate MNSV in melon seeds without hindering germination.

Keywords: *Carmovirus*, chemical seed treatment, *Cucumis melo*, ELISA, RT-PCR, thermic seed treatment

INTRODUCTION

Melon necrotic spot virus (MNSV), a member of the *Carmovirus* genus in the

Tombusviridae family (Riviere & Rochon, 1990), is a serious pathogen of greenhouse melons (*Cucumis melo*) and cucumbers (*Cucumis sativus*) worldwide, but it also causes problems in fields (Hibi & Furuki, 1985; Jordá *et al.*, 2005). MNSV has been reported in the Americas, Europe and Asia, and was recently detected in Tunisia (Yakoubi *et al.*, 2008). The symptoms in melon caused by this virus consist of stem necrosis at the crown level and, less frequently, small necrotic spots that sometimes abscise to leave holes on leaves and fruits. Wilting and plant death are also observed (Herrera *et al.*, 2006). MNSV is artificially transmissible by mechanical inoculation (Ohshima *et al.*, 2000). Additionally, the virus is both seedborne and soilborne, thus it is readily distributed through the seed market and becomes endemic in melon-growing areas, where it persists for a long period in association with its soilborne fungal vector *Olpidium bornovanus* (Kubo *et al.*, 2005). MNSV attaches itself to the outer covering of the fungal spores, but is not carried internally (Furuki, 1981). MNSV particles are very stable and can remain viable in the soil for several years. Campbell *et al.* (1996) used the term vector-assisted seed transmission (VAST) because this virus occurs either in or on the seed, irrespective of the presence of the vector, and may also infect at a low rate when the vector is absent. Gosalvez *et al.* (2003) indicated that the highest levels of MNSV were detected in roots at a very early infection stage (4 days post-inoculation) and before the melon plants were transplanted to production areas. At this early development stage, roots seem to act as a reservoir for MNSV, indicating that MNSV replicates in this tissue.

Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) (Campbell *et al.*, 1996) and immunosorbent electron microscopy (ISEM) (Tomlinson & Thomas, 1986) have been used to detect MNSV. Molecular hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) have also been used to obtain increased sensitivity (Gosalvez *et al.*, 2003), as observed in other viral systems (Sánchez-Navarro *et al.*, 1998).

Different physical and chemical treatments have been reported to eradicate or significantly reduce the incidence of a number of viruses without affecting seed quality, e.g. *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Laterrot & Pécaut, 1968) and *Pepino mosaic virus* (PepMV) (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007), which like MNSV, are carried on the seed surface. The use of virus-free seeds is an important measure to prevent introduction of the virus into production sites. To

date, the only method reported for MNSV-decontamination of melon seeds has been acid treatment and drying for 4 days or longer (Dumas de Vaulx, 1970). Although some seed companies currently utilize pretreatments for melon 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 MNSV by ELISA and RT-PCR, (ii) to test the efficacy of different chemical and physical seed treatments in eradicating MNSV from melon seeds, and (iii) to determine the effect of these treatments on melon seed germination.

MATERIALS AND METHODS

The melon seeds used in this study were from cv. Galia F₁ produced in Spain and known to be highly susceptible to MNSV (Naval-Merino, 2005). Two seed batches were used for comparison, lot 05 and lot 06, from 2005 and 2006, respectively.

Seed-to-seedling transmission of MNSV

To determine transmission rates from melon seeds to seedlings, 355 and 150 seeds from seed lots 05 and 06, respectively, were germinated in small sterile plastic trays containing paper towels and covered with transparent polyethylene film. After 15 days, 0.1-g root samples were taken from each seedling, which were then transferred individually into the wells of 24-well trays containing sterilized substrate (2 : 1 peat: sand) and placed in a climatic chamber with 60% relative humidity, a 12-h photoperiod, day and night temperatures of 26°C and 18°C, respectively, and irrigation with distilled water. Stringent sanitary measures were used to prevent any spurious virus spread. A total of 200 and 100 seedlings at the cotyledon stage from lots 05 and 06, respectively, were randomly selected and transferred to the trays. Forty-five days later, the plants, now considered to be adults, were taken individually from the tray with a shovel so as not to damage the root system. Roots were washed with distilled water to remove the substrate and 0.1-g root samples were again taken from each plant.

The root samples from every 10 plants were mixed and grouped into

plastic bags. From every composite sample of about 1 g, samples of 0.5 g and 0.1 g were taken to be analysed in parallel by DAS-ELISA and RT-PCR, respectively, to detect MNSV infection in melon plants at both developmental stages. All the plants were replanted for subsequent analysis.

DAS-ELISA analysis

The presence of MNSV was determined by DAS-ELISA with virus-specific antiserum (BIO-RAD) as recommended by the manufacturer. The 0.5-g samples were homogenized in a plastic bag in extraction buffer (2% PVP in PBS-Tween, 1 : 20, w/v). The homogenates were filtered through muslin and duplicate 100- μ L aliquots detected by DAS-ELISA with MNSV-specific antiserum. Healthy and virus-infected melon root samples were included as negative and positive controls, respectively. Absorbance values ($A_{405\text{nm}}$) were measured in a Titertek Multiskan immunoplate reader. Only samples with values more than twice those of healthy root-extract controls were recorded as infected (DAS-ELISA-positive).

RNA extraction and RT-PCR analysis

The 0.1-g root samples were ground in liquid nitrogen, and total RNAs extracted using the RNAwiz™ kit (Ambion) following the manufacturer's instructions. RT-PCR was carried out in a single step using the SuperScript™ II RT with Platinum® Taq kit (Invitrogen Life Technologies) and MNSV-specific primers, MNSV1 (5'-GGAGGCAACATTCGTACA-3') and MNSV2 (5'-AGAGACCAAGCGATCAAAC-3'), designed to amplify a 651-bp viral genome fragment corresponding to nucleotides 172–822 of the MNSV coat protein gene (p42). Total RNAs were denatured at 65°C for 5 min and cDNA synthesized at 50°C for 30 min in a reaction mix that included 0.4 μ M primers, 1 \times reaction buffer (containing 0.4 mM dNTPs and 2.4 mM MgSO₄) and 0.25 μ L of the enzyme mix, in a final reaction volume of 12.5 μ L. The PCR conditions were: 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C and 1 min at 72°C, with a final elongation step of 10 min at 72°C, using a Mastercycler personal 5332 thermocycler (Eppendorf). RT-PCR amplified products were

separated by electrophoresis on 1.2% agarose gel in $1 \times$ TAE buffer (40 mM Tris-acetate and 1 mM EDTA at pH 8.0) and stained with ethidium bromide. Fragment sizes were determined by comparison with a 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas).

Percentage viral incidence from the grouped samples was estimated using the formula of Gibbs & Gower (1960): $P = 1 - (1 - y/n)^{1/k}$, where P = probability of transmission by a single MNSV-infected seedling, y = number of RT-PCR-positive samples, n = total number of samples assayed and k = number of seedlings per sample ($k = 10$).

Seed-disinfection treatments

To determine the efficacy of seed-disinfection treatments in eradicating MNSV from melon seeds, the two seed batches were compared using seven treatments. The effect of high temperature on eradication of MNSV was evaluated by heating seeds in single layers in an incubator at 70°C for (i) 72 h (T72), (ii) 96 h (T96), (iii) 120 h (T120) or (iv) 144 h (T144). Two disinfectant solutions, proven effective with other viruses, were tested. Seeds were submerged in either (v) 10% trisodium phosphate solution for 3 h (TTP) or (vi) 0.1 N HCl for 30 min (THC). For each chemical treatment, a mesh tea strainer containing the seeds was immersed in 100 mL disinfectant solution in a 250-mL glass beaker, covered and placed on an orbital shaker at 220 r.p.m. for the specified duration at room temperature. A combined treatment (thermic and chemical) was also assayed in which seeds were (vii) heated for 120 h at 70°C and then submerged in 10% trisodium phosphate for 3 h (TTC). Following all treatments, seeds were triple-rinsed in sterile deionized water, dried on sterile paper towels, germinated in trays with paper towels and transferred to trays with substrate as described earlier. For all treatments, the germination rate was calculated by counting seedlings 15 days after depositing the seeds in trays and the effect of the treatments determined by comparing with the germination values obtained for untreated melon seeds. The numbers of seeds used for each batch/treatment are presented in Table 2.1. After counting, the germinated seedlings were selected and tested for MNSV by ELISA and RT-PCR at the cotyledon and adult stages, as previously described.

Table 2.1 Effect of disinfection treatments on melon seed germination rates

Treatment ^a	Lot 05			Lot 06		
	Number of seeds ^b	Germination rate (%) ^c	Variation rate ^d	Number of seeds ^b	Germination rate (%) ^c	Variation rate ^d
NT	355	86	-	150	83	-
T72	175	79	-7	150	82	-1
T96	175	76	-10	175	83	0
T120	175	80	-6	175	82	-1
T144	350	80	-6	175	84	1
TTC	175	77	-9	175	85	2
TTP	175	75	-11	175	84	1
THC	175	79	-7	175	82	-1

^aDisinfection treatments used: NT, no treatment; T72, T96, T120, T144, heat treatment at 70°C for 72, 96, 120 and 144 h, respectively; TTC, heat treatment at 70°C for 120 h followed by immersion in 10% trisodium phosphate for 3 h; TTP, immersion in 10% trisodium phosphate for 3 h; THC, immersion in 0.1 N HCl for 30 min.

^bTotal number of seeds put in the germination trays.

^cGermination rates recorded 15 days after seeds germinating.

^dDifference in germination rate between untreated and treated seeds.

Statistical analysis

In all experiments, ELISA absorbance data and the results of each RT-PCR assay were recorded and analysed using the multifactorial anova procedure in statgraphics plus for Windows (version 5.1; Manugistics Inc). The ‘growth stage at the time of analysis’ in the untreated seeds and ‘seed lot assayed’ were considered fixed effects in the MNSV infection rate detected by ELISA or RT-PCR. Fisher’s protected least significance difference (LSD; $P < 0.05$) procedure was used to determine which means significantly differed from the others. The same statistical procedure was used with the germination data obtained. In this case, ‘seed treatment’ and ‘seed lot assayed’ were considered fixed effects.

Sequencing and analysis

To confirm the identity of the virus detected in infected seedlings grown from the commercial melon seeds, the RT-PCR product was purified using a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics) and directly sequenced with MNSV1 primer using a Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit in a 3100 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems). The nucleotide sequence was compared by BLAST (basic local alignments search tool) (Altschul *et al.*, 1997) with MNSV sequences available from the National Centre of Biotechnology Information (NCBI).

RESULTS

Seed-to-seedling transmission of MNSV

DAS-ELISA analysis

None of the composite samples tested, corresponding to 200 and 100 plants from lots 05 and 06, respectively, were positive for MNSV by DAS-ELISA at either the cotyledon or adult stage. Absorbance values for duplicate samples of 12 negative controls ranged from -0.078 to 0.162 (mean 0.022), and for duplicate samples of 12 positive controls from 0.195 to 2.368 (mean 1.452). The mean

absorbances of the cotyledon and adult stages were 0.039 ± 0.004 and 0.003 ± 0.008 , respectively, in seed lot 05, and 0.038 ± 0.004 and 0.007 ± 0.015 , respectively, in seed lot 06. The plant growth stage at the time of the DAS-ELISA analysis significantly affected the absorbance values obtained in the ELISA test of the untreated melon lots ($P = 0.0001$). However, there were no significant differences in absorbance between the two seed lots ($P = 0.6593$).

RT-PCR analysis

Fourteen and eight of the composite samples tested at the cotyledon stage from lots 05 and 06, respectively, were positive for MNSV by RT-PCR (Table 2.2). The expected DNA fragment of 651 bp was amplified from extracts of infected seedlings, but not from healthy root extracts (Fig. 2.1). The data confirmed that MNSV was seed transmitted in these seed lots.

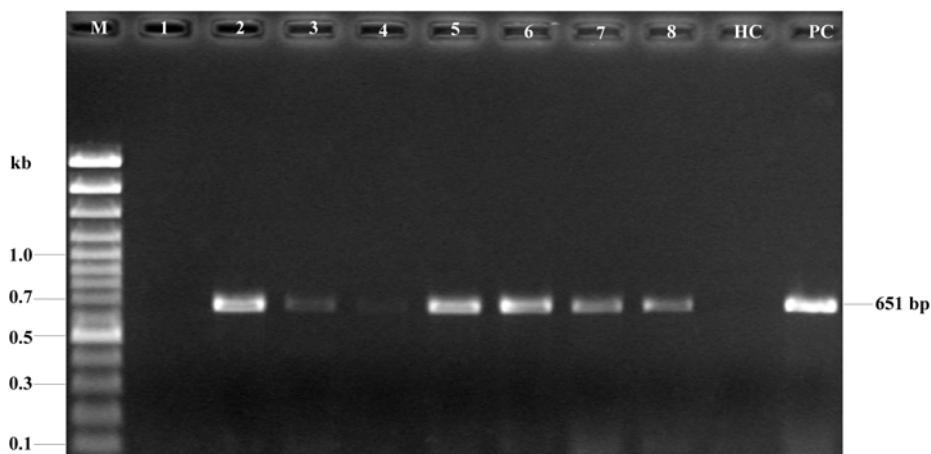


Figure 2.1 RT-PCR amplification of a 651-bp fragment representing the partial sequence of the *Melon necrotic spot virus* (MNSV) coat protein gene (p42). Lanes 1–8, composite root samples from 10 seedlings at the cotyledon stage germinated from untreated seeds; HC, healthy control; PC, MNSV-positive control (MNSV-PAN2); M, 100-bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas).

Table 2.2 Efficacy of seven disinfection treatments for eradication of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) from infected melon seed, infection rates obtained after each seed treatment, and probability of seedling infection, using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Growth stage ^a	Lot 05						Lot 06					
	Treatment ^b	Seedlings			Seedlings			Positive samples ^d	Range of seedling infection (%)	Probability of infection ^e	Range of seedling infection (%)	Probability of infection ^e
		Tested ^c	Positive Samples ^d	Range of seedling infection (%)	Probability of infection ^e	Tested ^c	Positive samples ^d					
Cotyledon	NT	200	14	7-70	11.3	100	8	8-80	14.8			
Adult		200	0	0	0.0	100	0	0	0.0			
Coty/ledon	T72	100	7	7-70	11.3	100	7	7-70	11.3			
	T96	100	4	4-40	4.9	100	4	4-40	4.9			
	T120	100	4	4-40	4.9	100	0	0	0.0			
	T144	200	0	0	0.0	100	0	0	0.0			
	TTC	100	1	1-10	1.0	100	0	0	0.0			
	TTP	100	6	6-60	8.7	100	6	6-60	8.7			
THC		70	4	6-57	8.1	70	4	6-57	8.1			

^aGrowth stage at time of RT-PCR test: cotyledon or adult stage (45 days after transplanting). Only roots were tested.

^bDisinfection treatments used: NT, no treatment; T72, T96, T120, T144, heat treatment at 70°C for 72, 96, 120 and 144 h, respectively; TTC, heat treatment at 70°C for 120 h followed by immersion in 10% trisodium phosphate for 3 h; TTP, immersion in 10% trisodium phosphate for 3 h; THC, immersion in 0.1 N HCl for 30 min.

^cNumber of seedlings tested by RT-PCR after each disinfection treatment.

^dNumber of MNSV-positive grouped root samples (each containing roots from 10 melon seedlings).

^eProbability of infected seedlings grown from infected seeds (i.e. rate of seed-to-seedling MNSV transmission) calculated using the formula of Gibbs & Gower (1960) to estimate proportions from grouped samples.

The probability of infection was 11.3 and 14.8% in seed lots 05 and 06, respectively, as indicated in Table 2.2. None of the RT-PCR positive melon seedlings showed obvious symptoms of MNSV infection. At the adult stage, no composite sample was MNSV-positive by RT-PCR (Table 2.2). As with the ELISA results, significant differences ($P = 0.0000$) in the RT-PCR results were noted between the analyses performed at either the cotyledon or adult stage. However, there were no significant differences ($P = 0.7548$) between seed lots.

Seventy of the seedlings that gave positive results as grouped samples were individually analysed by DAS-ELISA and RT-PCR. None of the plants were MNSV-positive by DAS-ELISA. However, 12 individual seedlings were MNSV-positive by RT-PCR, but only at the cotyledon stage.

Efficacy of seed-disinfection treatments

Effects of seed treatments on melon seed germination

For all treatments (but not controls), the germination rate of seed lot 06 was significantly higher ($P > 0.0002$) than that of lot 05 (Table 2.1). Disinfection treatment did not have a significant effect ($P > 0.7636$) on the germination rate of either seed lot. Treatment T96 did not affect the germination of seed lot 06 compared with that of untreated seeds. TTP had the greatest affect on germination rate in seed lot 05, reducing it to 75%, compared with 86% for untreated seeds, but did not have this effect in lot 06. Reduction in germination of seeds from lot 06 relative to untreated seeds was seen in treatments T72, T120 and THC, while treatments T144, TTC and TTP increased the germination rate; TTC had the most favorable effect on seed germination, an increase of 2% compared to untreated seeds (Table 2.1).

Detection of MNSV in seedlings by DAS-ELISA

No MNSV infection was detected by ELISA in melon plants at either the cotyledon or adult stages after various seed-disinfection treatments in both seed lots. In all treatments, however, a significant reduction ($P = 0.0000$) in background ELISA absorbance values was detected compared with the values for untreated seeds.

Detection of MNSV in seedlings by RT-PCR

Results for RT-PCR detection of MNSV infection in seedlings after various seed-disinfection treatments, as well as the transmission rates of MNSV from treated and untreated seeds to seedlings, are provided in Table 2.2. Only treatment T144 totally eradicated MNSV infection in the seedling assay in both seed lots. With other treatments, the incidence of infection ranged from 1 to 70% in seed lot 05 and from 4 to 70% in seed lot 06, compared to 70 and 80% in untreated seeds of lots 05 and 06, respectively. Reduced incidence of MNSV compared to untreated seeds was evident in seedlings following all seed treatments, except for T72, which remained in the same range as that of seedlings from untreated seeds in seed lot 05. Seed treatments T96 and T120 reduced seedling infection by 42.9% in seed lot 05, and by 50 and 100%, respectively, in seed lot 06. Treatment TTC reduced seedling infection by 85.7 and 100% in seed lots 05 and 06, respectively, while TTP and THC reduced infection by only 14.3 and 18.6%, respectively, in seed lot 05, and 25 and 28.8%, respectively, in seed lot 06, compared with seedlings from untreated seeds. Treatments T120 and TTC in seed lot 06 and T144 in both seed lots presented a probability of infection of 0.0 at the cotyledon stage (Table 2.2); otherwise, the probability of detecting an infected seedling after treating seeds ranged from 1.0 to 11.3 in seed lot 05 and from 4.9 to 11.3 in seed lot 06, compared with 11.3 and 14.8 in seed lots 05 and 06, respectively, for seedlings from untreated seeds. Disinfection treatments of seeds significantly affected ($P = 0.0000$) the incidence of MNSV infection of seedlings, as detected by RT-PCR. However, there were no significant differences ($P = 0.6439$) between seed lots.

All plants from seeds of treatments T72, TTP and THC (those with the highest probabilities of seedling infection) were tested at the adult stage for MNSV by DAS-ELISA and RT-PCR, but no positive results were obtained.

Sequence analysis of the MNSV isolate

The sequence of the MNSV isolate (MNSV-SEED1) (GenBank accession No. DQ443545) detected in infected seedlings grown from commercial melon seeds had 100% sequence homology in the genome region studied with several MNSV isolates obtained from different geographic regions (Herrera-Vásquez *et al.*,

2007), including the MNSV-PAN2 isolate from Panama (DQ443547) used as an MNSV-positive control in this study.

DISCUSSION

Previous studies indicated that MNSV is seed-transmitted in commercial melons (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979), while others found limited evidence of infection in the absence of the vector, *O. bornovanus* (Campbell *et al.*, 1996). In the present study, ELISA did not detect MNSV in any seedling groups grown from commercial seeds, yet MNSV was detected in at least 14 composite samples by RT-PCR. This was most likely a result of the low sensitivity of ELISA for detection of MNSV in symptomless plants (Gómez *et al.*, 2005). In the future, a larger number of seedlings should be tested to confirm the absence of transmission, as should an amplified ELISA, different sources of antibodies and decreasing the dilution of root material in the extraction buffer.

RT-PCR was previously used to detect MNSV (Gosalvez *et al.*, 2003), and is used for large-scale routine testing for the presence of other viruses in seeds, e.g. *Cucumber mosaic virus* (CMV) in lupins (Wylie *et al.*, 1993). In this study, MNSV was detected by RT-PCR in seedlings at the cotyledon stage, but not at the adult stage, which may indicate potential resistance of the melon cultivar used to the virus. Although the virus may initially be present in the roots, its movement may be restricted as a result of plant resistance and it may not be able to multiply. This reduced concentration was also observed in the case of PepMV (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007). Therefore, there is a risk that the virus could be acquired from infected seedlings by the fungal vector once they have been transplanted into the field, and subsequently transmitted to adult plants.

With MNSV infection, which largely depends on environmental conditions, the subsequent behaviour of a seedling from an infected seed is not predictable. A high incidence of MNSV was observed by RT-PCR in the small sample analysed, higher than that obtained by Campbell *et al.* (1996) using MNSV-infected fruits and a higher sample size, but with a less sensitive method, ELISA. However, more testing of melon seed lots from MNSV-infected melon fruits by RT-PCR is required before a general recommendation regarding the routine use of this technique can be made.

MNSV could be controlled by preventing the causal agent from entering

the field, either by the resistance to the disease found in some muskmelon cultivars (Mallor *et al.*, 2004), *O. bornovanus* control by applying Agral surfactant, which affects the zoospores of this fungal vector (Tomlinson & Thomas, 1986), or the use of virus-free seeds (Dumas de Vaulx, 1970). As the testing of all seedlings is impractical, legislation should regulate treatments to ensure that melon seeds are MNSV-free. Thermic treatment was used to eliminate TMV (Laterrot & Pécaut, 1968), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV; Sang-Min *et al.*, 2003) and (PepMV; Córdoba-Sellés *et al.*, 2007) by heating seeds at least 82°C for 72 h, without affecting the germination of seeds. The results of the present study suggest that treatment for 144 h at 70°C (T144) is effective enough to eliminate MNSV and to increase the germination rate of treated seeds relative to untreated seeds. However, this was the most prolonged of all the treatments assayed, and should only be applied by qualified laboratory personnel.

Seedling transmission rates were progressively reduced with treatments T72, T96 and T120 in relation to untreated seeds. The high stability of MNSV may be the reason why T72 was so ineffective. Trisodium phosphate treatment was used to eliminate other viruses located in the seed coat, without affecting seed germination rates (Green *et al.*, 1987). In the present study, treatment TTP reduced but did not eliminate MNSV infection, because the virus was not only in the seed coat. Inactivation of contaminating MNSV, either located in the paper layer or enclosed in the seed coat (Campbell *et al.*, 1996), was previously demonstrated by hydrochloric acid treatment (Dumas de Vaulx, 1970), although the results were probably based on symptomatology. In this work, THC treatment did not effectively eradicate MNSV from seeds. Thermic treatment at 80°C for 24 h combined with immersion in a 10% trisodium phosphate solution for 3 h was previously successful in deactivating viruses located in the same part of the seed as MNSV (Dinant & Lot, 1992; Córdoba-Sellés *et al.*, 2007). TTC treatment strongly reduced but did not completely eradicate the incidence of the MNSV in seedlings in this study, and a low presence of the virus can pose a danger to production as the fungal vector spreads.

The sequence of the MNSV isolate obtained in this work is not fully disseminated in countries where the seeds are obtained, e.g. Spain. However, in Latin American countries, where seeds are mostly imported, several MNSV isolates with 100% nucleotide sequence identity with this sequence have been

reported (Herrera-Vásquez *et al.*, 2007). The dissemination of MNSV with this sequence into these countries through commercial seeds is possible.

A legislated protocol for seed treatment and testing is desirable. More research needs to be undertaken to optimize seed-testing protocols against MNSV infection, with a view to controlling and eradicating the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

José Angel Herrera-Vásquez was supported by a predoctoral fellowship from the Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID, Spain, 2004–2007 period), and the Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos and the Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (IFARHU-SENACYT, Panamá, 2007–2010 period).

REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Campbell RN, Wipf-Scheibel C, Lecoq H, 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology* **86**, 1294–1298.
- Córdoba-Sellés MC, 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**, 1250–1254.
- Dinant S, Lot H, 1992. Review: *Lettuce mosaic virus*. *Plant Pathology* **41**, 528–542.
- Dumas de Vaulx R, 1970. Étude de la transmission du virus de la criblure. In: *Rapport d'activité 1969–1970 Station D'Amélioration des Plantes Maraichères*. Montfavet, France: INRA, p. 46–50.
- Furuki I, 1981. *Epidemiological studies on melon necrotic spot*. Shizuokaken, Japan: Shizuoka Agricultural Experiment Station: Technical Bulletin 14.

- Gibbs AJ, Gower JC, 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.
- Gómez J, Guirado ML, Serrano Y, Rodríguez J, Sáez E, 2005. Importancia, epidemiología y control de *Olpidium bornovanus*. *Boletín de la Sociedad Española de Fitopatología* **52**, 4–7.
- Gonzalez-Garza R, Gumpf DJ, Kishaba AN, Bohn GW, 1979. Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California isolate of *Melon necrotic spot virus*. *Phytopathology* **69**, 340–345.
- Gosalvez B, Navarro JA, Lorca A, Botella F, Sánchez-Pina MA, Pallás V, 2003. Detection of *Melon necrotic spot virus* in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods* **113**, 87–93.
- Green SK, Hwang LL, Kuo YK, 1987. Epidemiology of *Tomato mosaic virus* in Taiwan and identification of strains. *Journal of Plant Diseases and Protection* **94**, 386–387.
- Herrera JA, Cebrián MC, Jordá C, 2006. First report of *Melon necrotic spot virus* in Panama. *Plant Disease* **90**, 1261.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Roselló JA, Córdoba-Sellés C, Jordá C, 2007. Molecular variability among isolates of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) from Spain, Mexico and Central America. In: *XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Sorrento: Italy, p. 281.
- Hibi T, Furuki I, 1985. *Melon necrotic spot virus*. In: *Descriptions of Plants Viruses* 302. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists.
- Jordá C, Font MI, Martínez-Culebras P, 2005. Viral etiology of diseases detected in melon in Guatemala. *Plant Disease* **89**, 338.
- Kubo C, Nakazono-Nagaoka E, Hagiwara K, Kajihara H, Takeuchi S, Matsuo K, Ichiki TU, Omura T, 2005. New severe strains of *Melon necrotic spot virus*: symptomatology and sequencing. *Plant Pathology* **54**, 615–620.
- Laterrot H, Pécaut P, 1968. Incidence du traitement thermique des semences de tomate sur la transmission du virus de la mosaïque du tabac. *Études de Virologie, Annales des Épiphyties* **19**, 159–164.

- Mallor C, Álvarez JM, Luis-Arteaga M, 2004. Behaviour of *Cucumis melo* ‘Cantaloup Haogen’ against *Melon necrotic spot virus* (MNSV). In: *Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Olomouc: Czech Republic, p. 203–208.
- Naval-Merino MDM, 2005. Transformación genética de melón tipo Galia con los genes de la replicasa, proteína de cubierta y proteína de movimiento del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV). *Tesis Doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 202 p.
- Ohshima K, Ando T, Motomura N, Matsuo K, Sako N, 2000. Nucleotide sequences of protein genes of two Japanese *Melon necrotic spot virus* isolates. *Acta Virologica* **44**, 309–314.
- Riviere CJ, Rochon DM, 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of *Melon necrotic spot virus*. *Journal of General Virology* **71**, 1887–1896.
- Sánchez-Navarro JA, Aparicio F, Rowhani A, Pallás V, 1998. Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of *Prunus necrotic spot virus* in herbaceous and *Prunus* hosts. *Plant Pathology* **47**, 780–786.
- Sang-Min K, Sang-Hyun N, Jung-Myung L, Kyu-Ock Y, Kook-Hyung K, 2003. Destruction of *Cucumber green mottle mosaic virus* by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR. *Molecules and Cells* **16**, 338–342.
- Tomlinson JA, Thomas BJ, 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.
- Wylie S, Wilson CR, Jones RAC, Jones MGK, 1993. A polymerase chain reaction assay for *Cucumber mosaic virus* in lupin seeds. *Australian Journal of Agricultural Research* **44**, 41–51.
- Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H, Wipf-Scheibel C, Marrakchi M, Lecoq H, 2008. First report of *Melon necrotic spot virus* on melon in Tunisia. *Plant Pathology* **57**, 386.

Capítulo 4

Capítulo 4

Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*

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

Mycological Research **113**, 602–610 (2009)

ABSTRACT

A multiplex PCR method has been developed to detect, differentiate, and confirm the morphological identification of three root infecting *Olpidium* spp.: *O. bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. Of the 132 root samples examined, 101 samples were infected by *Olpidium* spp.. Based on the morphology of resting spores, the presence of *O. bornovanus* was confirmed in 20.5 % of the samples, whereas species identity could not be determined for the remaining samples because they failed to reproduce sexually. With multiplex PCR, it was possible to determine the *Olpidium* identity of all the infected samples, even when resting spores were not formed. This method was also effective for detecting *Olpidium* spp. in water samples. In addition, the specificity and sensitivity of multiplex PCR were evaluated. The multiplex PCR method was validated with samples of 9 different crops from 11 countries of America, Europe, and Africa.

Keywords: Chytrid species, molecular identification, morphological identification, sensitivity, specificity

INTRODUCTION

The chytrid species *Olpidium bornovanus* (Sahtiyanci) Karling and *Olpidium brassicae* (Woronin) P.A. Dang. sensu lato (sl), are root-infecting plant parasites which seldom induce obvious symptoms in infected host plants. These species are economically important because they act as vectors of several destructive plant viruses (Rochon *et al.*, 2004; Sasaya & Koganezawa, 2006). The term *O. brassicae* sl is used to denote both *O. brassicae* (a crucifer strain) which is a heterothallic species and *Olpidium virulentus* (Sahtiyanci) Karling (a non crucifer strain of *O. brassicae*), which is a homothallic species (Koganezawa *et al.*, 2005). Reproduction in *Olpidium* spp. involves the production of zoosporangia which discharge zoospores via exit tubes as a means of dispersal in water, along with the production of in situ resting spores that enable long-term survival in the soil, and which, my also play a crucial role in the survival of their associated viruses (Hiruki, 1987; Rochon *et al.*, 2004).

Olpidium spp. is an obligate plant parasite that cannot be grown in pure culture and species identification is not possible without undertaking long and tedious bioassays (Jiang & Hiruki, 1996). Significant differences in host range, host specificity and virus transmissibility are recognized as the most important characteristics for discriminating *O. bornovanus* from *O. brassicae* sl (Campbell & Sim, 1994; Sasaya & Koganezawa, 2006). However, microscopic observation of roots is generally the method used to identify these species based on the morphology of resting spores (Tomlinson & Thomas, 1986). Heterothallic *Olpidium* spp. require both mating (sexual) types to be present before resting spores can be formed (Koganezawa *et al.*, 2005) and in many isolations only the asexual zoosporangia are observed (Herrera-Vásquez *et al.*, 2007). It is therefore essential to have a suitable detection method available for the regular and reliable diagnosis of *Olpidium* spp. in plants and in environmental samples such as the irrigation water or in the hydroponic nutrient solution.

The internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA (rDNA) have proved to be good targets for the identification and differentiation of fungi using molecular techniques (White *et al.*, 1990; Lee & Taylor, 1992; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Crous *et al.*, 2001; Dunne *et al.*, 2002). These regions are less well conserved sequences nested between the highly conserved 18S, 5.8S and 28S rDNA genes (Kularatne *et al.*, 2004). Polymerase chain

reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis has proved useful for the detection and differentiation of different *Olpidium* spp. (Jiang & Hiruki, 1996) and other fungi, even at the subspecies level (Cubeta *et al.*, 1991; Ward & Akrofi, 1994). Nevertheless in the case of *Olpidium* spp., Jiang & Hiruki (1996) reported that in addition to the fungus-specific rDNA, a host specific rDNA had been amplified from the zoospore collection of *O. bornovanus*, and that the fungus-specific rDNA had not been amplified from the roots of the infected compatible host. The main factor involved in this phenomenon might be the incomplete specificity of the primers used. rDNA-ITS is limited in that it can only be used with pure cultures of fungi because plant DNA also produces bands. Therefore, in order to detect the fungi in infected plant tissue, specific primers with no homology to plant DNA are required (Kularatne *et al.*, 2004). Our multiplex PCR assay is a novel study in the detection of *Olpidium* because it detects three *Olpidium* spp. (*O. bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*) in a single step using species-specific primers which amplify only fungus-specific rDNA from both zoospore and root plants. It is very necessary to distinguish between roots infected with one species or the other given the differences in host range, host specificity, and virus transmissibility that these species present.

The objectives of this study were (i) to develop a multiplex PCR assay to detect and distinguish the three different *Olpidium* spp. in root and water samples, (ii) to investigate the specificities and sensitivities of this test to see whether they could potentially be used to detect the *Olpidium* spp. in zoospores suspension and directly from roots, (iii) and to use this method to confirm the morphological identification of *Olpidium* spp.

MATERIALS AND METHODS

Soil sampling and preparation of samples

One hundred and thirty-two soil samples were collected from different locations in Brazil, Guatemala, Honduras, Mexico, Panama, Portugal, Spain, the Netherlands, Tunisia, Uruguay, and the USA over a 10-y period (1999 to 2008). Soil samples were collected from the root zone of field-grown cucurbit crops

[cucumber, *Cucumis sativus* L.; melon, *Cucumis melo* L.; watermelon, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai; zucchini (*Cucurbita pepo* L.)], broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck.), cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* Zenk., *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C., and *Brassica campestris* L.), escarole (*Cichorium endivia* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants that were all showing virus like-symptoms and were used as sources of *Olpidium* spp. Approximately 100 g of soil were put into a tray and covered with filter paper to avoid airborne contamination. These were air-dried for 1 week, and sifted through a 2-mm sieve to remove soil clods prior to processing. The presence of *Olpidium* in these sifted soil samples was then determined using seedlings of the above crops as baits.

Isolation of *Olpidium* spp. with bait plants and mycelial fungal species

Olpidium spp. were isolated on homologous (same species that was growing in the sample soil) bait plants as follows. Seeds of the crop species listed above were germinated in sterile Petri plates containing paper towels and irrigated with Milli-Q water (Milli-Q[®] Ultrapure Water Purification System, MilliporeTM). Three seedlings per soil sample were transplanted at the cotyledon stage into pots (0.5 L) containing a mixture of field soil:sterilized sand (1:10, wt:wt), and incubated in a climate-controlled chamber with 60% relative humidity, a 12 h day/night period at 26⁰C and 18⁰C respectively, and irrigated with Milli-Q water. The same procedure was used with pots containing a sterilized mixture of field soil from a source where host plants did not contain *Olpidium* spp. and sand in the same proportions as above. These pots were used as negative controls of the experiment which interspersed amongst the pots of bait plants, remained free from *Olpidium* infection. Thirty days after transplanting the seedlings into the sample soil mix, 1 plant per pot was carefully removed with a spatula so as not to damage the root system. The roots were washed with distilled water and, examined both microscopy and molecularly in order to test the effectiveness of the multiplex PCR method in detecting and identifying *Olpidium* spp. Approximately nine centimeters of root were taken from each bait plant and examined by microscopic observation. Approximately 0.1 g of roots of this same bait plant was used for the multiplex PCR assay. The two remaining bait plants were maintained for subsequent analyses.

Fungal mycelia were included in the analysis because they, like *Olpidium* spp., are common root-inhabiting fungi and usually are present in hydroponic systems. These fungi included *Pythium intermedium* (Carrotech 54 isolate), *P. sulcatum* (Carrotech 122B), *P. violae* (Carrotech 383), *P. sylvaticum* (Carrotech 86A), *Phytophthora cactorum* (10300), *P. ramorum* (8895), *Fusarium foetens* (10183), *F. graminearum* (KIS-ISH 67/07) from the culture collection at Bioforsk, Plant Health and Plant Protection Division, Norway, kindly provided in the form of DNA extracts by Dr. M. L. Herrero. *Pythium deliense* (MIT2S isolate), *Phytophthora cactorum* (Phy126), *Fusarium oxysporum* fsp. *melonis* strain 1 (Fom4) were from the culture collection at the Plant Production Department, University of Almeria, Spain, kindly provided in the form of mycelium on Petri plates containing PDA (potato dextrose agar) medium by Dr. J. C. Tello.

Morphological identification of *Olpidium* spp.

Root samples were clarified using the method of Jordá *et al.* (2002), placed in water, and observed under a Nikon-YS-100 light microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) to record the presence or absence of resting spores. *O. bornovanus* has smooth-walled resting spores with a honeycomb-like pattern, whilst *O. brassicae* sl has resting spores which are stellate (Lange & Insunza, 1977).

DNA preparations and extractions: *Olpidium* spp. detection in roots

Two DNA extraction procedures were tested in order evaluate the optimum detection conditions of *Olpidium* spp. by multiplex PCR. In the first procedure, zoospores of *Olpidium* spp. were stimulated to be released by placing approximately 0.05 g of the roots into 1.5 mL microcentrifuge tubes containing GS solution (0.05 M glycine and 1% sucrose at 4⁰C) for 45 min at room temperature. After incubation the roots were removed from the tubes and the zoospore suspension centrifuged at 10000 r.p.m. for 15 min before approximately nine-tenths of the supernatant fluid were discarded (modified from Tomlinson & Thomas, 1986). The remaining liquid containing the zoospores was stored at -20⁰C for further use. The number of zoospores in the suspension thus obtained

varied from 1×10^5 to 1×10^6 per mL, estimated by the method of Campbell (1988). In the second procedure, approximately 0.05 g of the roots were placed into small plastic bags and ground with a pestle. For other soil and aquatic fungi, the mycelia (either harvested directly or scraped from the surface of the agar) was transferred directly into microcentrifuge tubes and ground with micropestles. Total DNA was then directly extracted from these preparations using the E.Z.N.A.[®] Plant DNA Miniprep Kit (OMEGA Biotech, Doraville, USA) following the manufacturer's instructions, with some modifications. Extracts were kept at -20°C until analyzed.

***Olpidium* spp. detection in water**

A pot (2.5 L) containing a mixture of soil from a melon field and sterilized substrate (1:10, wt/wt) was irrigated with 2000 mL Milli-Q water at a rate of 500 ml every eight days. Eight days after the last irrigation, 750 mL of this soil leachate were collected, filtered with Whatman paper no. 4, and 250 ml were incorporated into the recirculating nutritive solution used for hydroponic melon culture. The remaining 500 mL of leachate were stored at $4-8^{\circ}\text{C}$ and gradually incorporated into the circulating nutrient solution at a rate of 100 mL every 4 d. Control seedlings were grown in hydroponic culture, without added soil leachate. Ten days after the final application of leachate, 1.5 mL samples of the recirculated solution were centrifuged at 10000 r.p.m. for 15 min, and approximately nine-tenths of the supernatant fluid were discarded. Total DNA from the resulting liquid (which contained a range of 1×10^5 to 1×10^6 zoospores/mL) and from the roots of the harvested melon plants was extracted as described previously. The roots of these plants were also observed microscopically to determine the presence of resting spores of *Olpidium* spp.

Primers design

The rDNA-ITS sequences of *O. bornovanus* (GenBank accession Nos. AB205214–AB205215), *O. brassicae* (GenBank accession Nos. AB205209 to AB205213), and *O. virulentus* (GenBank accession Nos. AB205203 to AB205208), which have been deposited in the National Center of Biotechnology

Information (NCBI) database and published elsewhere (Sasaya & Koganezawa, 2006), were aligned using the CLUSTAL X program version 1.83 (Jeanmougin *et al.*, 1998), and examined for designing species-specific primers using the primer design software OLIGO version 4.0 (National Bioscience Inc., Plymouth, MA). Three primer sets, consisting of one common reverse primer for these species and three species-specific forward primers, were obtained (Table 3.1)

Multiplex PCR amplification

Roots and water extracts were analyzed by the multiplex PCR assay to confirm the morphological identification of *Olpidium* spp. Multiplex PCR reactions were performed with final concentrations of 1 × PCR buffer (containing 2 mM MgCl²), 0.4 mM dNTP mix, 1 × PVP-40, 1 × primers mix (at a final concentration of 0.2 mM for each primer), 5 U of NETZYME[®] DNA polymerase (NEED S.L., Valencia, Spain), approximately 0.01–0.05 µg µL⁻¹ of total DNA extracts, and sterile PCR water to make up the volume to 50 µL. DNA amplifications were performed in a Mastercycler personal 5332 thermocycler (Eppendorf, Germany) programmed for a 5-min initial denaturation at 94⁰C, followed by 35 cycles of denaturation at 94⁰C for 45 s, annealing at 55⁰C for 1 min, extension at 72⁰C for 1 min, and a final extension at 72⁰C for 10 min was introduced to finish incomplete PCR fragments, followed by cooling at 10⁰C until samples were recovered. Negative control tubes contained the total DNA extracts from healthy roots of the different host plant species and the mycelium of different soil fungi, and sterile PCR water, were incubated in each amplification experiment of test specimens under the same conditions. PCR-amplified products (5 µL) were electrophoresed on 1.2% agarose gel in 1 × TAE buffer (40 mM Tris-acetate, and 1 mM EDTA at pH 8.0) at 100 V for approximately 1 h, and stained with 0.2 µg ml⁻¹ ethidium bromide. Fragment sizes were determined by making comparisons with a Gene Ruler[™] 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Table 3.1 Nucleotide sequences of species-specific primers designed for *O. bornovanus*, *O. virulentus*, and *O. brassicae* based on rDNA-ITS sequences

Species	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Location in the sequence (nt)	Expected fragment size (bp)	GenBank accession No.
<i>O. bornovanus</i>	OLPborF ^a	CCGAGGAAATGAGAGATGACA	160-1137	977	AB205215
	OLPR ^b	TCCTCCGCTTATTGATATGCTTA			
<i>O. virulentus</i>	OLPvirF ^a	AACCCAAAGACCTGCCCCCAAAAAG	53-632	579	AB205208
	OLPR	TCCTCCGCTTATTGATATGCTTA			
<i>O. brassicae</i>	OLPbraF ^a	AGCTATAGCTCACCCCTCTTT	396-600	204	AB205213
	OLPR	TCCTCCGCTTATTGATATGCTTA			

^aSpecies-specific forward primers.

^bCommon reverse primer.

Determination of DNA concentration

The spectrophotometric DNA concentration from the root extracts of infected bait plants, individually with *O. bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*, was estimated. Determinations were done in this way because total root plus fungus DNA is the relevant unit of sampling and because these fungi cannot be cultivated on synthetic media (Gerik, 1992). The DNA concentration from the zoospore extracts of these plants was also estimated to obtain a more accurate measure of fungal DNA.

Sequencing and analysis

To confirm the identity of the three species (*O. bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*), two amplified PCR products for each species were purified using a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and directly sequenced with the species-specific forward primers using a Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit in a 3100 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The nucleotide sequences were compared by BLAST (Basic Local Alignments Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) with *Olpidium* sequences which are available from the NCBI database. The DNA sequence variation among the three *Olpidium* spp. and within a single species was calculated with the DNAMAN program version 4.02 Lynnon Biosoft[©] 1994–98 (Institute of Plant Pathology, BBA, Germany). The sequences obtained for *O. bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus* have been submitted to the NCBI database under accession numbers EU934039/EU937731, EU981906/EU981907, EU981901/EU981902, respectively.

RESULTS

Morphological identification of *Olpidium* spp.

Microscopy was used to identify which *Olpidium* species were associated with infected root bait plants (Table 3.2). *Olpidium* spp. were observed in roots of 52 plants (39.4% of all the plants analyzed). Based on resting spore morphology *O.*

bornovanus (Fig 3.1A) and *O. brassicae* sl (Fig 3.1B) were observed in 27 (20.5%) and 25 (18.9%) plants, respectively (Table 3.2). Stellate resting spores were referred to as *O. brassicae* sl because *O. brassicae* cannot be distinguished from *O. virulentus* using this morphological characteristic (Koganezawa *et al.*, 2005). Mixed infections, *O. bornovanus*/*O. brassicae* sl (Table 3.2), were observed in 4 plants (3.0%). However, in these homologous hosts, *Olpidium* spp. did not always develop resting spores. In forty-nine samples (37.1%) only zoosporangia were observed (Fig. 3.2) and were characterized as infection by *Olpidium* spp. (Table 3.2) as species specific identification cannot be made in the absence of resting spores.

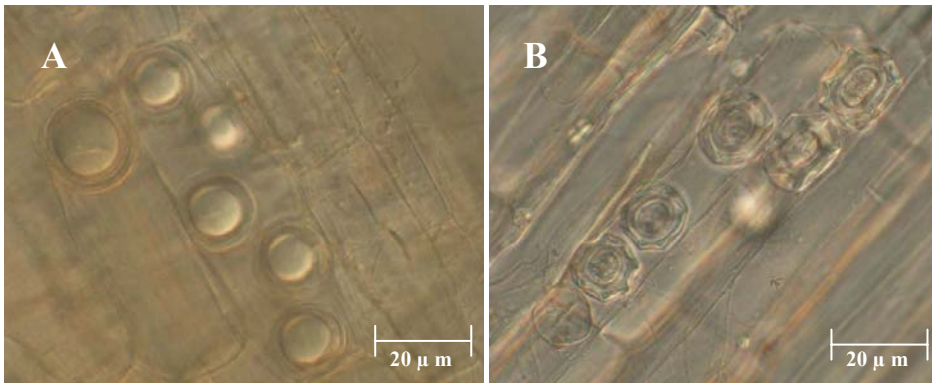


Figure 3.1 Resting spores of *Olpidium bornovanus* (A) and *Olpidium brassicae* sl (B). 40× magnifier.



Figure 3.2 Zoosporangia of *Olpidium* sp. 40× magnifier.

Table 3.2 Morphological and molecular identification of *Olpidium* spp.

Soil	Original host	Country	Bait plant ^a	Morphological identification by microscopic observation						Molecular detection by multiplex PCR				
				<i>O. bor</i> ^b	<i>O. bra</i> sl ^c	<i>O. bra</i> sl ^d	<i>O. bor/ O. bra</i> sl ^d	<i>Olpidium</i> spp. ^e	<i>O. bor</i> ^f	<i>O. vir</i> ^g	<i>O. bra</i> ^h	<i>O. bor/ O. vir</i> ⁱ		
	Cucumber	Spain	3	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
	Melon	Brazil	4	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0
		Guatemala	15	3	0	0	0	11	13	1	0	0	1	1
		Honduras	8	4	1	1	1	2	6	1	0	0	1	1
		Mexico	5	0	1	0	0	5	4	2	0	0	1	1
		Panama	11	8	0	0	0	1	9	0	0	0	0	0
		Spain	28	6	3	2	2	6	12	3	0	0	2	2
		Tunisia	2	0	2	0	0	2	2	2	0	0	2	2
		Uruguay	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
		USA	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0
	Watermelon	Guatemala	3	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0
		Honduras	3	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0
		Mexico	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0
		Spain	10	2	2	1	1	6	8	2	0	0	1	1
	Zucchini	Spain	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Broccoli	Spain	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	Cabbage	Portugal	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0
		Spain	4	0	1	0	0	2	0	0	0	3	0	0
		The Netherlands	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Escarole	Spain	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lettuce	Portugal	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		Spain	7	0	4	0	0	1	0	0	5	0	0	0
	Tomato	Portugal	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		Spain	13	0	5	0	0	1	0	0	6	0	0	0
	Total		132	27	25	4	4	49	70	25	6	6	9	9

^aBait plants are equal to the original host (homologous host). The number of bait plants analyzed corresponds with the number of soil samples collected in the field.

^bRoot samples with resting spores of *Olpidium bornovanus*.

^cRoot samples with resting spores of *Olpidium brassicae* sl.

^dRoot samples with resting spores of *O. bornovanus* and *O. brassicae* sl.

^eRoot samples with zoosporangia of *Olpidium* spp.

^f*O. bornovanus*-positive root samples.

^g*Olpidium virulentus*-positive root samples.

^h*O. brassicae*-positive root samples.

ⁱRoot samples dually infected with *bornovanus* and *O. virulentus*.

Molecular detection of *Olpidium* spp. in roots samples

Both the root and zoospore DNA extraction procedures were used in all the plants analyzed, while the multiplex PCR was used to generate the data summarized in Table 3.2. Three *Olpidium* spp. were detected in 101 plants (76.5% of all the plants analyzed), regardless of the extraction procedure used (Table 3.2). *O. bornovanus*, *O. virulentus*, and *O. brassicae* single infections were detected in 70 (53.0%), 25 (18.9%), and 6 (4.5%) plants, respectively. The only mixed infections found were of *O. bornovanus/O. virulentus* (Fig. 3.3, Table 3.2) in 9 plants (6.8%). Samples identified as only infected by *Olpidium* sp. using microscopy could be identified at the species level by multiplex PCR (Table 3.2). *O. bornovanus* was detected exclusively in cucurbits plants from all the geographical regions studied. In contrast, *O. virulentus* was detected in some cucurbits (melon and watermelon), lettuce, and tomato plants from most of countries. The most restricted distribution was found for *O. brassicae* which was only detected in broccoli and cabbage plants from Portugal and Spain. Escarole plants from Spain were not infected with any *Olpidium* spp. (Table 3.2).

***Olpidium* spp. detection in water samples**

Only *O. bornovanus* was detected in water samples from melon hydroponic culture into which soil leachate had been added from a field of melons with a history of *Olpidium* infection. Roots of melon plants from this culture were also analyzed by multiplex PCR to evaluate if these plants had become infected with *Olpidium* spp. As with the water samples only *O. bornovanus* was detected in

root samples (Fig 3.4). Only the resting spores of *O. bornovanus* were observed when roots were checked microscopically. No amplified DNA bands were observed in any of the control samples.

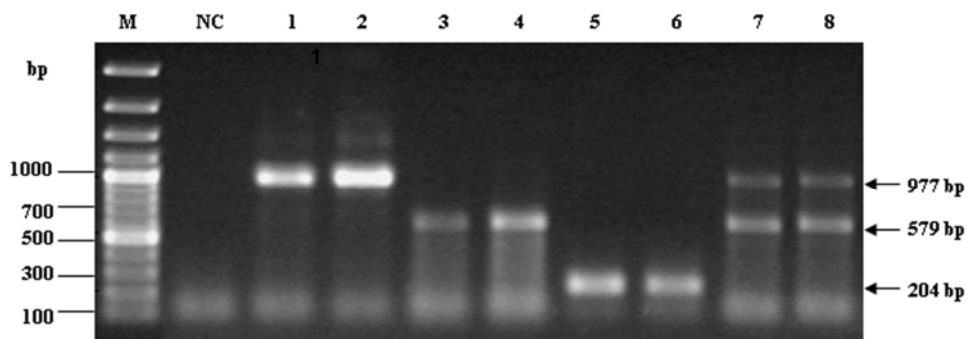


Figure 3.3 Multiplex PCR amplified DNA of three *Olpidium* spp. from root bait plants. Lanes 1–2, *O. bornovanus*; 3–4, *O. virulentus*; 5–6, *O. brassicae*; 7–8, *O. bornovanus*-dual infection detection with *O. virulentus*; NC, Negative control (sterile water); M, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

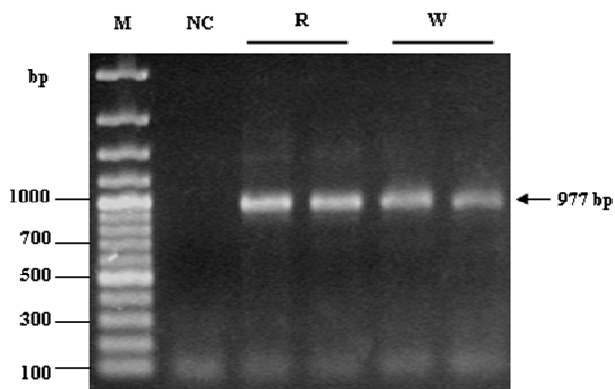


Figure 3.4 Multiplex PCR amplified DNA of *O. bornovanus* from roots (R) or water (W) samples of melon hydroponic culture; NC, Negative control (sterile water); M, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Specificity of the multiplex PCR

In order to confirm the primer specificities in the multiplex PCR, single infection root extracts for each *Olpidium* spp. were mixed equally and subjected to multiplex PCR, as described before. The four different patterns expected from these combinations are shown in Fig. 3.5. When DNA from all three species were added, three bands were observed (Fig. 3.5). *O. bornovanus* was identified by the 977 bp band, *O. virulentus* by the 579 bp band and *O. brassicae* by the 204 bp band (Fig. 3.5). When only two species were added to the mixture, the two predicted species-specific bands were observed (Fig. 3.5) indicating that each band was species specific. No amplified DNA bands were observed in any of the control samples, including those of the other common root-inhabiting fungi or the fungi usually present in hydroponic systems indicating these bands were diagnostic for the *Olpidium* species.

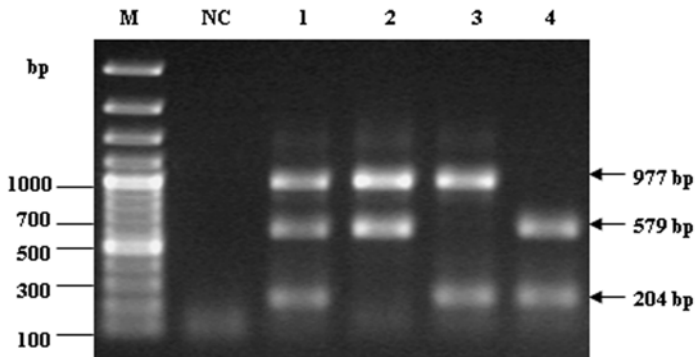
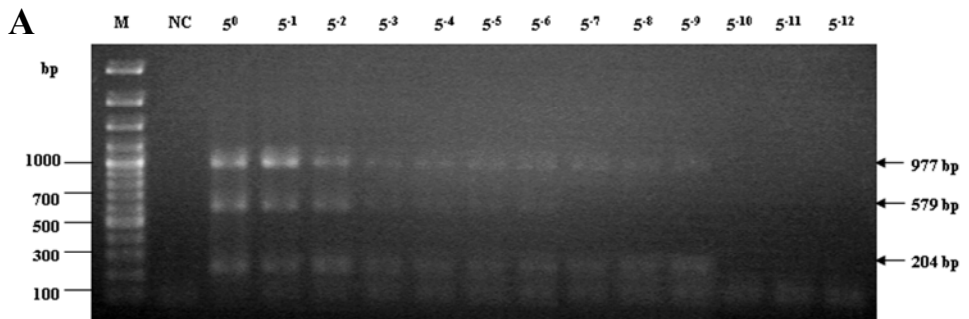


Figure 3.5 Specificity of the multiplex PCR amplified DNA of *Olpidium* spp. artificial mixed infections from single infection root extracts. Lane 1, *O. bornovanus*/*O. virulentus*/*O. brassicae*-triple infection detection; 2, *O. bornovanus*/*O. virulentus*-dual infection detection; 3, *O. bornovanus*/*O. brassicae*-dual infection detection; *O. virulentus*/*O. brassicae*-dual infection detection; NC, Negative control (sterile water); M, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Sensitivity of the multiplex PCR

In order to check whether the presence of the primer cocktail in the multiplex PCR reaction mixture could affect the detection limit of *Olpidium* spp., the sensitivity of this method with artificial mixed infections of *O. bornovanus*/*O. virulentus*/*O. brassicae* was assessed. The DNA concentration of the same aforementioned extracts was estimated first. To determine the minimum amount of total root plus fungus DNA needed to produce a visible band after PCR and gel electrophoresis, approximately $0.137 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ was quantified equally for each infected extract. These extracts were equally mixed, serially diluted in five-fold dilutions in sterile water, and the multiplex PCR was performed as previously described. Twelve serial dilutions of this extract mix were assessed and *O. bornovanus* and *O. brassicae* were clearly observed until dilution 5^{-9} (approximately $7.0 \times 10^{-8} \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ of total DNA). However, *O. virulentus* was observed until dilution 5^{-6} (approximately $8.8 \times 10^{-6} \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ of total DNA) (Fig 3.6A). The minimum amount of zoospores DNA needed to produce a visible band was also estimated. Approximately $0.137 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ was quantified equally under the same aforementioned conditions. *O. bornovanus* was observed until dilution 5^{-2} (approximately $5.5 \times 10^{-3} \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ of zoospores DNA). However, *O. virulentus* and *O. brassicae* were observed until dilution 5^{-1} (approximately $2.7 \times 10^{-2} \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ of zoospores DNA) (Fig 3.6B).



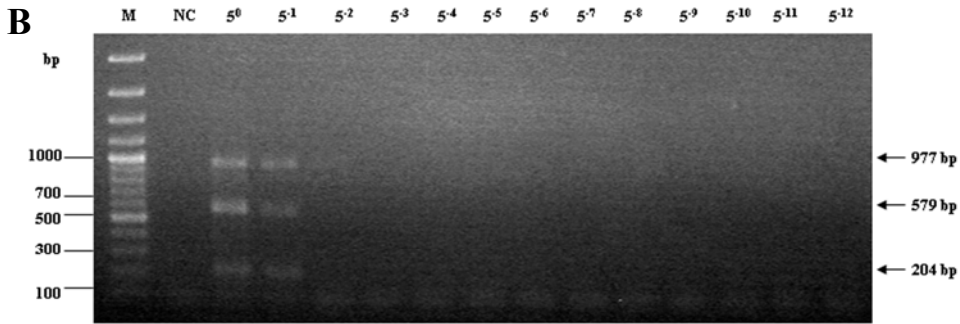


Figure 3.6 Sensitivity of the multiplex PCR amplified DNA of *Olpidium* spp. artificial mixed infections from single infection root extracts (A) and single infection zoospore extracts (B). Lane 5⁰, approximately 0.137 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ of total DNA (root + fungus) (A) and zoospore DNA (B); In both figures, 5⁻¹ to 5⁻¹², are serial twelve-time dilution from 5⁰; NC, Negative control (sterile water); Bands of 977, 579, and 204 bp corresponding to *O. bornovanus*, *O. virulentus*, and *O. brassicae*, respectively; M, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Sequence analysis of the *Olpidium* spp.

The sequences obtained in this work for each *Olpidium* spp. were compared with the sequences published in the NCBI database. In all cases, the obtained DNA sequence was as expected. The sequence nucleotide homology among isolates within single species of *O. bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus* was 97.3%, 99.4%, and 99.8% in the genome zone studied, respectively, although the homology between *O. virulentus* and *O. brassicae* was 81.7%–82.3%. The sequence homology between these species and *O. bornovanus* was 50.0%–50.6% and 39.1%–42.3%, respectively. The *Olpidium* sp. identified by microscopy in melon and cabbage samples (Table 3.2) was determined by multiplex PCR as *O. bornovanus* and *O. brassicae*, respectively. Both samples showed a sequence similarity of 100% with *O. bornovanus* (GenBank accession No. EU934039) and *O. brassicae* (GenBank accession No. EU981906) (sequences obtained in this work), respectively. Therefore, these sequences were not submitted to the NCBI database.

DISCUSSION

The zoosporangia of *O. bornovanus* also differ slightly from those of *O. brassicae* sl, although this morphological difference does not permit morphotype discrimination with absolute certainty (Herrera-Vásquez *et al.*, 2007). The morphology of the resting spores is acknowledged to be the most important morphological characteristic to differentiate these species (Campbell & Sim, 1994). However, the study of these characteristics is completely dependent on the skilled and tedious microscopic examination of root plants for fungal infection (Jiang & Hiruki, 1996). The data provided in this work show that resting spores of *Olpidium* spp. were often not observed in the root samples examined, as reported by Koganezawa *et al.*, (2005). Therefore very often, morphological identification of *Olpidium* is not possible.

The role of *Olpidium* spp. as a vectors of certain plant viruses (Rochon *et al.*, 2004; Sasaya & Koganezawa, 2006) makes it important to have a detection method available that allows for species identification. Multiplex PCR assay has been used for the detection of many different fungal species e.g., *Monilinia* and *Monilia* in apple (Côté *et al.*, 2004), *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in grapevine (Catal *et al.*, 2007), *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata* and *P. graminis* f. sp. *tepida* in barley and wheat (Vaïanopoulos *et al.*, 2007). Our laboratory has developed a novel multiplex PCR assay for the rapid and simultaneous detection and differentiation of three *Olpidium* spp. Some samples tested in this study were found to be dually infected with *O. bornovanus* and *O. virulentus*. To our knowledge, no previous studies have reported natural mixed infections of *Olpidium* spp. Indeed, we have been able to identify *Olpidium* to the species level even when resting spores were not observed.

Distribution of the *Olpidium* spp. in the root plants is uneven. However, the sampling method used in this study allowed both the morphological observation and the molecular detection of *Olpidium* spp. to be undertaken. The fungal template DNA was extracted from both zoospore suspensions and plant roots, and successfully amplified. Using zoospores however, only weak PCR bands of the correct fragment length were observed compared with the comparable root extractions. This is probably because, in the second procedure, fungal DNA is mainly extracted from zoosporangia and resting spores which are present in the root plants. Although both protocols were, sufficiently good to

detect *Olpidium* spp. in general root extractions are recommended because they are much simpler to carry out and usually produce stronger PCR bands. In samples from Almeria (Spain) *O. bornovanus* had been successfully identified by microscopically examining melons root that had been irrigated with water from pools destined to irrigation of cucurbit crops but it had never been detected directly in water samples (Gómez & Velasco, 1991). Using molecular methods were we to detect fungus in water samples for the first time.

The specificity of the multiplex PCR assay was demonstrated with the amplification of a single PCR fragment in single-infected roots compared with the amplification of several PCR fragments in natural and artificially mixed infections using a cocktail of all the primers. These results were verified by DNA sequencing. We have also tested other common root-inhabiting fungi and fungi usually present in hydroponic systems, as well as different host plant species, to determine whether any other fungi besides *Olpidium* spp., can be amplified using our primers. Our results clearly show that the multiplex primers only amplify *Olpidium* spp. in the assay. This method was successful in all samples tested, irrespective of host plant and geographic origin. Therefore, our primers will work on the global population of *O. bornovanus*, *O. virulentus*, and *O. brassicae*. This work only considered the three species spp., which are known fungal vectors of plant viruses (Rochon *et al.*, 2004; Sasaya & Koganezawa, 2006). The sensitivity of this assay was very difficult to determine because of the obligate host dependency of the pathogen which means the fungal DNA cannot be measured directly (Jiang & Hiruki, 1996). The detection limit of the multiplex PCR assay using total root plus fungus DNA was greater than when zoospore DNA was used because, as explained before, zoosporangia and resting spores DNA were also present in the roots. In both cases, sensitivity was not the same in the three *Olpidium* spp. analyzed, probably because, as discussed above, DNA concentration varies among *Olpidium* spp. in the artificially mixed infection. Jiang & Hiruki (1996) also reported DNA contamination caused by the release of host root tissue remnants (such as fragment epidemic cells) into zoospore preparations. Therefore, measurement of zoospore DNA may not be very accurate. The precise quantification of *Olpidium* zoospores is also very difficult (Campbell, 1988) and most authors give a range of values for zoospore concentrations (Tomlinson & Faithfull, 1979; Tomlinson & Thomas, 1986; Koganezawa *et al.*, 2005).

The multiplex PCR assay presented in this study represents a significant advance for routine diagnosis of *Olpidium* spp. as it reduces time and handling without the need for a morphological analysis and the consequent risks of misidentification. The multiplex PCR technology, combined with an easy and fast total nucleic acid extraction procedure, could permit the routine and reliable analysis of a larger number of samples for the presence of the *Olpidium* spp. that sometimes elude the detection methods usually performed. Furthermore, since single and multiple infections are present in both the field and the hydroponic culture, this methodology will facilitate further studies of the correlation among host range, host specificity, and virus transmissibility by *Olpidium* spp.

ACKNOWLEDGMENTS

José Angel Herrera-Vásquez was supported by a predoctoral fellowship from the Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID, Spain, 2004–2007 period), and the Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos and the Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (IFARHU-SENACYT, Panamá, 2007–2010 period). We thank the Dirección Nacional de Sanidad Vegetal-Ministerio de Desarrollo Agropecuario (DNSV-MIDA, Panamá) for their technical assistance. We also thank Dr. M. L. Herrero (Bioforsk, Plant Health and Plant Protection Division, Norway) and Dr. J. C. Tello (Plant Production Department, University of Almeria, Spain) for providing the fungal isolates used in the specificity assays, and Dr. R. Beltrán for providing the soil samples from Brazil. This work was supported by grants AGL 2005-06682-C03-01 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología CICYT, Spain.

REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.

- Campbell RN, 1988. Cultural characteristics and manipulative methods. In: Cooper JI, Asher MJC, eds. *Viruses with fungal vectors*. Association of Applied Biologists. Wellesbourne: UK, p. 153–165.
- Campbell RN, Sim ST, 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radicale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1136–1143.
- Catal M, Jordan SA, Butterworth SC, Schilder AMC, 2007. Detection of *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in grapevine by nested multiplex polymerase chain reaction. *Phytopathology* **97**, 737–747.
- Côté MJ, Tardif MC, Meldrum AJ, 2004. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease* **88**, 1219–1225.
- Crous PW, Hong L, Wingfield BD, Wingfield MJ, 2001. ITS rDNA phylogeny of selected *Mycosphaerella* species and their anamorphs occurring on *Myrtaceae*. *Mycological Research* **105**, 425–431.
- Cubeta MA, Echardi E, Abernethy T, Vilgalys R, 1991. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology* **81**, 1395–1400.
- Dunne CP, Glen M, Tommerup IC, Shearer BL, Hardy GEST J, 2002. Sequence variation in the rDNA ITS of Australian *Armillaria* species and intra-specific variation in *A. luteobubalina*. *Australasian Plant Pathology* **31**, 241–251.
- Gerik JS, 1992. Zoosporic obligate parasites of roots. In: Singleton LL, Mihail JD, Rush CM, eds. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. American Phytopathological Society Press. Saint Paul, Minnesota: USA, p. 18–24.
- Gómez J, Velasco V, 1991. Presencia de *Olpidium radicale* en los embalses para riego en Almería. *PHYTOMA-Spain* **33**, 23–27.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá, C, 2007. Molecular variability of different isolates of *Olpidium bornovanus*. In: *XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Sorrento: Italy, p. 275.

- Hiruki C, 1987. Recovery and identification of *Tobacco stunt virus* from air-dried resting spores of *Olpidium brassicae*. *Plant Pathology* **36**, 224–228.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gibson TJM, Gouy M, Higgins DG, 1998. Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 403–405.
- Jiang L, Hiruki C, 1996. Polymerase chain reaction amplification and restriction analysis of the ribosomal DNA of *Olpidium radicale* isolates. *Journal of Microbiological Methods* **26**, 87–93.
- Jordá C, Armengol J, Gisbert J, Osca JM, Lacasa A, Velásquez B, 2002. El tratamiento con microondas para la desinfección de suelos. *PHYTOMA-Spain* **138**, 118–121.
- 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 of the National Agricultural Research Center for Western Region* **4**, 39–59.
- Kularatne HAGC, Lawrie AC, Barber PA, Keane PJ, 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation in planta of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research* **108**, 1476–1493.
- Lange L, Insunza V, 1977. Root inhabiting *Olpidium* species: the *O. radicale* complex. *Transactions of the British Mycological Society* **69**, 377–384.
- Lee SB, Taylor JW, 1992. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 636–653.
- Rochon DA, Kakani K, Robbins M, Reade R, 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and Plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 211–241.
- 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**, 20–25.
- Sreenivasaprasad S, Mills PR, Meehan BM, Brown AE, 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* **39**, 499–512.

- Tomlinson JA, Faithfull EM, 1979. Effects of fungicides and surfactants on the zoospores of *Olpidium brassicae*. *Annals of Applied Biology* **93**, 13–19.
- Tomlinson JA, Thomas BJ, 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.
- Vaïanopoulos C, Bragard C, Moreau V, Maraite H, Legrève A, 2007. Identification and quantification of *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata* and *P. graminis* f. sp. *tepida* on barley and wheat. *Plant Disease* **91**, 857–864.
- Ward E, Akrofi AY, 1994. Identification of fungi in the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. *Mycological Research* **98**, 219–224.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. New York: USA, p. 315–322.

Capítulo 5

Capítulo 5

Genetic diversity of *Melon necrotic spot virus* and *Olpidium* isolates from different origins

**J. A. Herrera-Vásquez, M. C. Córdoba-Sellés, M. C. Cebrián,
J.A Rosselló and C. Jordá**

Plant Pathology, Accept (11-Sep-2009)

ABSTRACT

The geographic incidence, genetic diversity and phylogenetic relationships of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) and *Olpidium* isolates were studied in three cucurbit species from several Latin American and European countries on different collecting dates. Of the 112 cucurbit samples analysed, 69 from Guatemala, Honduras, Mexico, Panama, and Spain were DAS-ELISA-positive for MNSV. *Olpidium bornovanus* and *O. virulentus* infections, and MNSV infections mixed with these *Olpidium* species, were observed for all these countries. Twenty-nine MNSV isolates from all the origins where the virus was detected were selected and amplified by RT-PCR. The resulting RT-PCR of the p29, p89, p7A, p7B and p42 proteins was used to estimate the genetic diversity and the phylogenetic relationships of the MNSV population. The sequences obtained in this study were compared with the MNSV sequences of the NCBI database, and three groups were recovered by nucleotide composition according to geographical origins: the EU-LA genotype group (with two subgroups: EU and LA, European and Latin American isolates, respectively), the JP melon genotype group (Japanese melon reference isolates) and the JP watermelon genotype group (Japanese watermelon reference isolates). The genetic diversity in the entire p7A and p7B proteins of MNSV suggests that these coding regions are under strong selective pressure. Additionally, the rDNA-ITS region was analysed in 40 *O. bornovanus* and *O. virulentus* isolates associated with each geographical location and host examined. Phylogenetic analysis showed two

groups for each *Olpidium* species, and these groups were related according to the host from which they were originally isolated.

Keywords: *Carmovirus*, Chytrid, cucurbits, rDNA-ITS region, viral proteins.

INTRODUCTION

Melon necrotic spot virus (MNSV), a species of the *Carmovirus* genus in the *Tombusviridae* family (Riviere & Rochon, 1990), is an endemic virus in greenhouse and open field crops of melon (*Cucumis melo* L.), cucumber (*Cucumis sativus* L.) and watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai] (Hibi & Furuki, 1985). This virus has been reported in several countries of the Americas, Africa, Asia and Europe (Yakoubi *et al.*, 2008). The MNSV host range is limited almost exclusively to the species of the family *Cucurbitaceae*, in which the symptoms in melon caused by this virus consist of stem necrosis at the crown level and, less frequently, of small necrotic spots that sometimes abscise to leave holes on leaves and fruits. Wilting and plant death were also observed (Herrera *et al.*, 2006). Experimentally, this virus can be transmitted by mechanical inoculation (Yakoubi *et al.*, 2008). In nature however, MNSV is transmitted by the chytrid fungus *Olpidium bornovanus* (Sahtiyanci) Karling (Campbell *et al.*, 1995) and through seeds (Herrera-Vásquez *et al.*, 2009b). Fungus plays an important role in melon seeds by acquiring and transmitting the virus to plant roots to not only initiate primary infection, but to also continue secondary infection cycles (Campbell *et al.*, 1996).

MNSV is a small (~30 nm) isometric plant virus with a single-stranded, positive-sense RNA genome of approximately 4.3-kb (Hibi & Furuki, 1985; Riviere & Rochon, 1990). A sequence analysis of the MNSV genome revealed the presence of at least five open reading frames (ORFs) (Riviere & Rochon, 1990). The 5'-proximal ORF terminates in an amber codon so that the translation of this ORF would yield a 29-kDa protein and an 89-kDa read-through product (the putative RNA-dependent RNA polymerase, RdRp). Two small centrally located ORFs both encode a 7-kDa protein (p7A and p7B), which is essential for MNSV cell-to-cell movement (Genovés *et al.*, 2006). The 3'-proximal ORF encodes the 42-kDa coat protein (CP) which is involved in the fungal transmission process (Mochizuki *et al.*, 2008). These genome regions allow not

only the design of specific primers for the accurate identification of MNSV by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Herrera *et al.*, 2006), but also the differentiation of new strains in countries where serious outbreaks of the disease have been reported (Díaz *et al.*, 2003; Kubo *et al.*, 2005). However, these studies have been mostly confined to a low number of isolates from restricted geographical locations.

The chytrid species *O. bornovanus* and *Olpidium virulentus* (Sahtiyanci) Karling, are root-infecting plant parasites which seldom induce obvious symptoms in infected host plants. These species are of economic importance because they act as vectors of several destructive plant viruses (Rochon *et al.*, 2004; Sasaya & Koganezawa, 2006). *O. virulentus* has recently been separated as a non-crucifer strain of *O. brassicae* (Woronin) P.A. Dang. sensu lato (sl) (Koganezawa *et al.*, 2005). Reproduction in *Olpidium* species involves the production of zoosporangia which discharge zoospores via exit tubes as a means of dispersal in water along with the production of *in situ* resting spores that enable long-term survival in soil, and which may also play a crucial role in the survival of their associated viruses (Hiruki, 1987; Rochon *et al.*, 2004). The internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA (rDNA) of the *Olpidium* species has been analysed in only non-cucurbit crops (Sasaya & Koganezawa, 2006). The rDNA-ITS region not only proves to be a good target for the identification and differentiation of fungi using molecular techniques, but typically proves most useful for the molecular systematics at the fungal species level, and even within species (e.g., to identify geographic races) (White *et al.*, 1990). These regions are less well conserved sequences nesting between the highly conserved 18S, 5.8S and 28S rDNA genes (Kularatne *et al.*, 2004). The geographic incidence, genetic diversity and phylogenetic relationships of all the proteins of a large number of MNSV isolates, and the rDNA-ITS region of the *Olpidium* isolates from cucurbit crops associated with each geographical location examined in this study, are novel and would provide interesting data on this important virus and viral vector.

The objectives of this study are to (i) assess the geographic incidence of MNSV and the *Olpidium* species in 112 samples of three cucurbit species from various geographical sites collected at different times, (ii) analyse the genetic diversity and phylogenetic relationships of the p29, p89, p7A, p7B, and p42

proteins of 29 MNSV isolates, and (iii) analyse the rDNA-ITS region of 40 *O. bornovanus* and *O. virulentus* isolates.

MATERIALS AND METHODS

Collection and preparation of samples

One hundred and twelve cucurbit samples were collected from different locations of Brazil, Guatemala, Honduras, Mexico, Panama, Spain, Tunisia, and the USA over a 10-year period (1999 to 2008). Root samples were collected from field-grown cucurbit crops [cucumber, *Cucumis sativus* L.; melon, *Cucumis melo* L.; watermelon, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai] plants which showed MNSV-like necrosis symptoms, as well as wilting and plant death (collapse), and were used as sources of both MNSV and the *Olpidium* species. We herein defined a virus and *Olpidium* isolate as the virus and *Olpidium* preparation, respectively, obtained from one field-infected plant. The root samples from each plant were washed with distilled water to remove soil, dried on paper towels and transferred to plastic bags. From each sample of approximately 1 g, samples of 0.5 g and 0.1 g were taken to be analysed by double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) and RT-PCR, respectively, to detect MNSV infection in the cucurbit plants. Approximately 9 cm and 0.05 g of feeder roots were taken from each plant to be examined microscopically and by multiplex PCR, respectively, to identify the *Olpidium* species. In 36 samples (of all the cucurbit samples analysed), it was impossible to obtain feeder roots from field-disease plants. The remaining root samples were preserved at -20°C until further use.

Determination of the presence of MNSV

The presence of MNSV was determined by DAS-ELISA with virus-specific antiserum (BIO-RAD Phyto-Diagnostics, Marnes-La Coquette, France), as recommended by the manufacturer. Then 0.5 g samples were homogenised in a plastic bag in extraction buffer [2% PVP in PBS-Tween, 1:20 (w/v)]. Homogenates were filtered through muslin, and duplicate 100- μ L aliquots were

detected by DAS-ELISA with MNSV-specific antiserum. Healthy and virus-infected melon, cucumber and watermelon root samples were included as negative and positive controls, respectively. Absorbance values (A_{405} nm) were measured in a Titertek Multiskan immunoplate reader (Flow Laboratories, Finland). Only those samples with values of more than twice those of healthy root-extract controls were recorded as infected (DAS-ELISA-positive).

Primers design for MNSV

The MNSV sequences, GenBank accession Nos. DQ922807, AB044291, AB044292, DQ339157, AY330700, AY122286, D12536, which have been deposited in the National Center of Biotechnology Information (NCBI) database, were aligned using the CLUSTAL X, version 1.83 (Jeanmougin *et al.*, 1998). They were also examined to design MNSV-specific primers using the OLIGO primer design software, version 4.0 (National Bioscience Inc., Plymouth, MN). Three primer sets based on p29 and p89 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), p7A and p7B (movement proteins, MP), and p42 (coat protein, CP) proteins of MNSV were obtained (Table 4.1).

RNA extraction, RT-PCR analysis and sequencing of MNSV

MNSV-positive cucurbit samples were determined by DAS-ELISA at all the collecting times and from all the geographical locations where the virus was detected, and were selected and analysed by RT-PCR to study the genetic diversity and the phylogenetic relationships of MNSV. Two isolates obtained in infected seedlings grown from commercial melon seeds, and one isolate from Italy (Table 4.2), which was kindly provided in the form of dried infected leaves by Dr. Laura Tomassoli (Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome, Italy), were included. The 0.1-g root samples were ground in liquid nitrogen, and total RNAs were extracted using the RNAwizTM kit (Ambion, Huntingdon, United Kingdom) following the manufacturer's instructions. RT-PCR was carried out in a single step using the SuperScriptTM II RT with Platinum® *Taq* kit (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, Spain) and the MNSV-specific primers listed in Table 4.1.

Table 4.1 Nucleotide sequences of MNSV-specific primers based on the p29, p89, p7A, p7B, and p42 proteins

Genome zone	Primer name	Nucleotide sequence (5'–3')	Location in the sequence (nt)	Expected fragment size (bp)	GenBank accession No. ^a
p29/89 (RdRp)	MNSV5 ^b	AGGTTAGCAATGGATACTGG	79–654	575	DQ922807
	MNSV6 ^c	TCTCGTTTGATGTGGAAGAC			
p7A/p7B (MP)	MNSV3 ^b	CAGGGAAATCCTAGAAATACAG ^d	2414–2839	425	DQ339157
	MNSV4 ^c	ATTAATGCCGTCTAACCATCG ^d			
p42 (CP)	MNSV1 ^b	GGAGGCAACATTTTCGTACA	2985–3635	650	D12536
	MNSV2 ^c	AGAGACCAAGCGATCAAAC			

^aSequences in which the primers are located.

^bSpecific forward primers.

^cSpecific reverse primers.

^dSequences kindly provided by Dr. José Antonio Navarro, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Valencia, Spain.

Table 4.2 MNSV isolates obtained in this study

Name of isolate ^a	Date	Original host	Country of origin	GenBank accession Nos. ^b			
				p29/p89 (RdRp)	p7A/p7B (MP)	p42 (CP)	
GT-1	2004	Melon	Zacapa-Guatemala				
GT-2	2004	Melon	Zacapa-Guatemala	FJ619626 ^(d)			
HN-1	2004	Melon	Choluteca-Honduras	FJ619627	FJ621515	EU848551	
HN-2	2004	Melon	Choluteca-Honduras				
MX	2003	Melon	Colima-Mexico				
PA-1	2006	Melon	Cocle-Panama				
PA-2	2008	Melon	Los Santos-Panama	FJ619628	FJ621516	FJ621529	
PA-3	2005	Melon	Los Santos-Panama	FJ619629	FJ621517	DQ443546	
IT	1998	Melon	Sardinia-Italy	FJ619630 ^(e)	FJ621518 ^(l)	FJ621530	
SP-1	2005	Melon seed	Spain	FJ619631 ^(c)	FJ621519 ⁽ⁱ⁾	DQ443545 ^(o)	
SP-2	2004	Melon seed	Spain	FJ619632	FJ621520 ^(k)		
SP-3	2005	Melon	Alicante-Spain	FJ619633	FJ621521 ^(l)	EU848554 ^(p)	
SP-4	2005	Melon	Alicante-Spain	FJ619634 ^(f)			
SP-5	2004	Melon	Almeria-Spain				
SP-6	1999	Melon	Almeria-Spain	FJ619635	FJ621522	EU848556 ^(q)	
SP-7	2003	Melon	Ciudad Real-Spain	FJ619636			
SP-8	2008	Melon	Murcia-Spain		FJ621523	FJ628163	
SP-9	2008	Melon	Murcia-Spain	FJ619637	FJ621524	FJ628164	
SP-10	2006	Melon	Murcia-Spain				
SP-11	2002	Melon	Murcia-Spain	FJ619638 ^(g)	FJ621525 ^(m)	EU848553	
SP-12	2001	Cucumber	Murcia-Spain			FJ628165	
SP-13	2001	Cucumber	Murcia-Spain	FJ619639	FJ621526		
SP-14	2008	Watermelon	Murcia-Spain				
SP-15	2008	Watermelon	Murcia-Spain				
SP-16	2001	Watermelon	Murcia-Spain	FJ619640 ^(h)	FJ621527 ⁽ⁿ⁾	FJ628166 ^(r)	
SP-17	2001	Melon	Valencia-Spain				
SP-18	2000	Melon	Valencia-Spain				
SP-19	2000	Melon	Valencia-Spain		FJ621528		
SP-20	2000	Watermelon	Valencia-Spain			EU848555	

^aIsolates were named using the initials of the country of origin; if there was more than one isolate for each country, a number followed the initials.

^bSequences showing the same letter (in parentheses) are identical (100% nucleotides homology).

Total RNAs were denatured at 65°C for 5 min and cDNA synthesised at 50°C for 30 min in a reaction mix that included 1 × primers mix (at a final concentration of 0.5 µM for each primer), 1 × reaction buffer (containing 0.4 mM dNTPs and 2.4 mM MgSO₄), 1 × PVP-40 (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 0.1 µL RNaseOUT™ (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, Spain) and 0.4 µL of the enzyme mix with a final reaction volume of 10 µL. The PCR conditions were: 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 55°C and 45 s at 72°C, with a final elongation step of 10 min at 72°C, using a Mastercycler personal 5332 Thermocycler (Eppendorf, Germany). RT-PCR-amplified products were separated by electrophoresis on 1.2% agarose gel in 1 × TAE buffer (40 mM Tris-acetate and 1 mM EDTA at pH 8.0) and stained with ethidium bromide. Fragment sizes were determined by comparison with a 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). To confirm the identity of the virus detected in the infected cucurbit plants, RT-PCR products were purified using a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and were sequenced in both directions with the specific primers listed in Table 4.1 using a Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit in a 3100 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Complete (or almost complete) sequences of the MNSV strains available from the NCBI database were added to the analysis: DQ922807, AB044291, AB044292, AB250684-AB250687, AB232925, AB232926, DQ339157, AY330700, AY122286, D12536. Sequence alignments were obtained with the CLUSTAL X, version 1.83 (Jeanmougin *et al.* 1998). Sequence variation (similarity/identity) was calculated with the MatGAT (Matrix Global Alignment Tool), version 2.01 (Campanella *et al.*, 2003). Pairwise synonymous (d_N) and nonsynonymous (d_S) substitutions were calculated according to the method of Pamilo, Bianchi and Li (PBL) and phylogenetic relationships [based on Kimura-2 parameters (K2P) and the neighbor-joining (NJ) method, with bootstrap analyses with 1000 replicates] were performed with MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

Determination of the presence of the *Olpidium* species

Feeder roots were clarified using the method of Jordá *et al.* (2002), that is, they were placed in water, and 9-cm samples were observed under a Nikon-YS-100 light microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) to record the presence or absence of resting spores. *O. bornovanus* has smooth-walled resting spores with a honeycomb-like pattern, while *O. virulentus* has resting spores which are stellate (Lange & Insunza 1977; Koganezawa *et al.*, 2005).

DNA extraction, multiplex PCR analysis and sequencing of *Olpidium* species

The cucurbit samples which were positively identified by microscopy from all the origins studied were selected for the molecular analysis of the variation and the phylogenetic relationships of the *Olpidium* species. Four single-sporangial cultures of *O. bornovanus* (SS-205, SS-207, SS-234, SS-239) from Almería (Spain) (Table 4.3), kindly provided in the form of dried infected roots by Dr. J. Gómez (Centro de Investigación y Formación Agraria, La Mojonera, Almería, Spain), were included. Approximately 0.05 g of the feeder root samples were placed into small plastic bags and ground with a pestle. Then total DNA was directly extracted from these preparations using the E.Z.N.A® Plant DNA Miniprep Kit (OMEGA Biotech, Doraville, USA), following the manufacturer's instructions. Total DNA was amplified by multiplex PCR with species-specific primers using the method and primers described by Herrera-Vásquez *et al.* (2009a). To confirm the identity of the *Olpidium* species detected in these samples, PCR products were purified and sequenced in both directions with species-specific primers, as described above. Sequences were compared with the *Olpidium* species sequences available from the NCBI database: AB205214, AB205215, AB205203-AB205208, EU981901, EU981902. Sequence alignments, variation (similarity/identity) and the phylogenetic relationships of the sequences were conducted under the same conditions and with the same previously mentioned programs.

Table 4.3 *Olpidium* isolates obtained in this study

Name of isolate ^a	Date	Original host	Country of origin	GenBank
				accession Nos. ^b
				rDNA-ITS
<i>O. bornovanus</i>				
BR-01	2005	Melon	Rio Grande do Norte-Brazil	EU934040 ^(e)
BR-02	2005	Melon	Rio Grande do Norte-Brazil	EU934039 ^(d)
GT-01	2007	Melon	Zacapa-Guatemala	EU937728 ^(e)
GT-02	2005	Melon	Zacapa-Guatemala	(e)
GT-03	2004	Melon	Zacapa-Guatemala	(d)
GT-04	2004	Melon	Zacapa-Guatemala	(d)
GT-05	2003	Melon	Zacapa-Guatemala	(d)
GT-06	1999	Melon	Zacapa-Guatemala	(c)
GT-07	2007	Watermelon	Zacapa-Guatemala	(c)
HN-01	2007	Melon	Choluteca-Honduras	(d)
HN-02	2004	Melon	Choluteca-Honduras	EU937729
HN-03	2004	Melon	Choluteca-Honduras	(d)
HN-04	2007	Watermelon	Choluteca-Honduras	(c)
MX-01	2006	Melon	Colima-Mexico	EU937730 ^(f)
MX-02	2003	Melon	Sinaloa-Mexico	(d)
MX-03	1999	Melon	Sinaloa-Mexico	(c)
MX-04	2007	Watermelon	Colima-Mexico	(f)
PA-01	2006	Melon	Cocle-Panama	(d)
PA-02	2006	Melon	Herrera-Panama	(d)
PA-03	2006	Melon	Los Santos-Panama	(d)
PA-04	2005	Melon	Los Santos-Panama	(c)
TN-01	2007	Melon	Monastir-Tunisia	(c)
TN-02	2007	Melon	Monastir-Tunisia	(c)
USA-O	2007	Melon	California-USA	(c)
SP-01	2005	Melon	Ciudad Real-Spain	(c)
SP-02	2003	Melon	Ciudad Real-Spain	(d)
SP-03	2003	Melon	Ciudad Real-Spain	(c)
SP-04	2004	Melon	Valencia-Spain	(c)
SP-05	2007	Watermelon	Seville-Spain	EU937731
SS-205	1988	Melon	Almeria-Spain	(c)
SS-207	1989	Cucumber	Almeria-Spain	EU937732
SS-234	2001	Watermelon	Almeria-Spain	(c)
SS-239	2001	Squash	Almeria-Spain	(c)
<i>O. virulentus</i>				
GT-08	2003	Melon	Zacapa-Guatemala	EU981898
MX-05	2003	Melon	Colima-Mexico	EU981900
MX-06	1999	Melon	Sinaloa-Mexico	EU981899 ^(g)
TN-03	2007	Melon	Monastir-Tunisia	(g)
TN-04	2007	Melon	Monastir-Tunisia	(g)
SP-06	2007	Melon	Seville-Spain	EU981905
SP-07	2007	Watermelon	Alicante-Spain	EU981903

^aIsolates were named using the initials of the country of origin followed by the initial of the *Olpidium* (shown in italics), and a number if there was more than one isolate for each country.

^bSequences showing the same letter (in parentheses) are identical (100% nucleotides homology).

RESULTS

Identification and geographic incidence of MNSV and *Olpidium* species

MNSV was detected in 69 cucurbit samples (61.6% of all the samples analysed) from Guatemala, Honduras, Mexico, Panama, and Spain. No MNSV-positive sample was recorded from Brazil, Tunisia, and the USA (Table 4.4). On the other hand, only 76 of all the samples analysed from field-diseased plants contained feeder roots and could be examined for the *Olpidium* species infection and the mixed MNSV/*Olpidium* species infection (Table 4.4). Based on the resting spore morphology, *O. bornovanus* was observed in most of the cucurbits species samples (46/76 samples, or 60.5%) analysed and from all the geographical origins studied. *O. virulentus* was observed in only 8 samples (10.5%) of melon from Guatemala, Mexico, Spain, and Tunisia, and in watermelon from Spain. The *O. bornovanus* and *O. virulentus* mixed infections were observed in 4 melon samples (5.3%) (Table 4.4). In addition, the mixed infections MNSV/*O. bornovanus*, MNSV/*O. virulentus*, and MNSV/*O. bornovanus/O. virulentus* were observed in 30 (39.5%), 3 (3.9%), and 2 (2.6%) of these samples, respectively. Additionally, 18 samples containing feeder roots were MNSV-positive, but were not infected with *O. bornovanus* (Table 4.4).

Genetic diversity and phylogenetic relationships of MNSV

The nucleotide sequence of the represented overlapping portion of the p29 and p89 (RdRp, 539 nt), the entire p7A (MP, 198 nt) and p7B (MP, 186 nt), and the represented non-overlapping portion of the p42 (CP, 591 nt) proteins was determined for a set of 29 MNSV isolates (sampled between 1998 and 2008) from three cucurbits species (melon, cucumber, and watermelon) from several Latin American and European countries (Table 4.2). These genomic regions were chosen to represent the viral genes that encode proteins with distinct functions.

Table 4.4 Identification and geographic incidence of MNSV and the *Olpidium* species

Original host	Country	Total samples ^a	MNSV infection ^b	Feeder root samples ^c	<i>Olpidium</i> species				MNSV/ <i>Olpidium</i> species				
					Single infection		Mixed infection		Single infection		Mixed infection		
					<i>O. bor</i> ^d	<i>O. vir</i> ^d	<i>O. bor</i> / <i>O. vir</i>	MNSV / <i>O. vir</i>	MNSV	MNSV / <i>O. bor</i>	MNSV / <i>O. vir</i>	MNSV / <i>O. bor</i> / <i>O. vir</i>	
Cucumber	Spain	11	3	3	1	0	0	0	1	1	0	0	
Melon	Brazil	4	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	
	Guatemala	10	10	10	8	1	1	1	10	8	1	1	
	Honduras	8	6	5	4	0	0	0	5	4	0	0	
	Mexico	8	7	5	3	2	0	0	4	3	1	0	
	Panama	12	4	11	10	0	0	0	4	4	0	0	
	Spain	41	34	24	9	1	1	1	21	8	1	1	
	Tunisia	2	0	2	2	2	2	2	0	0	0	0	
	USA	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	
	Watermelon	Guatemala	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		Honduras	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
Mexico		1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
Spain		11	4	7	1	2	0	0	2	1	0	0	
Total		112	69	76	46	8	4	48	30	3	2		

^aTotal samples analyzed for the MNSV infection.

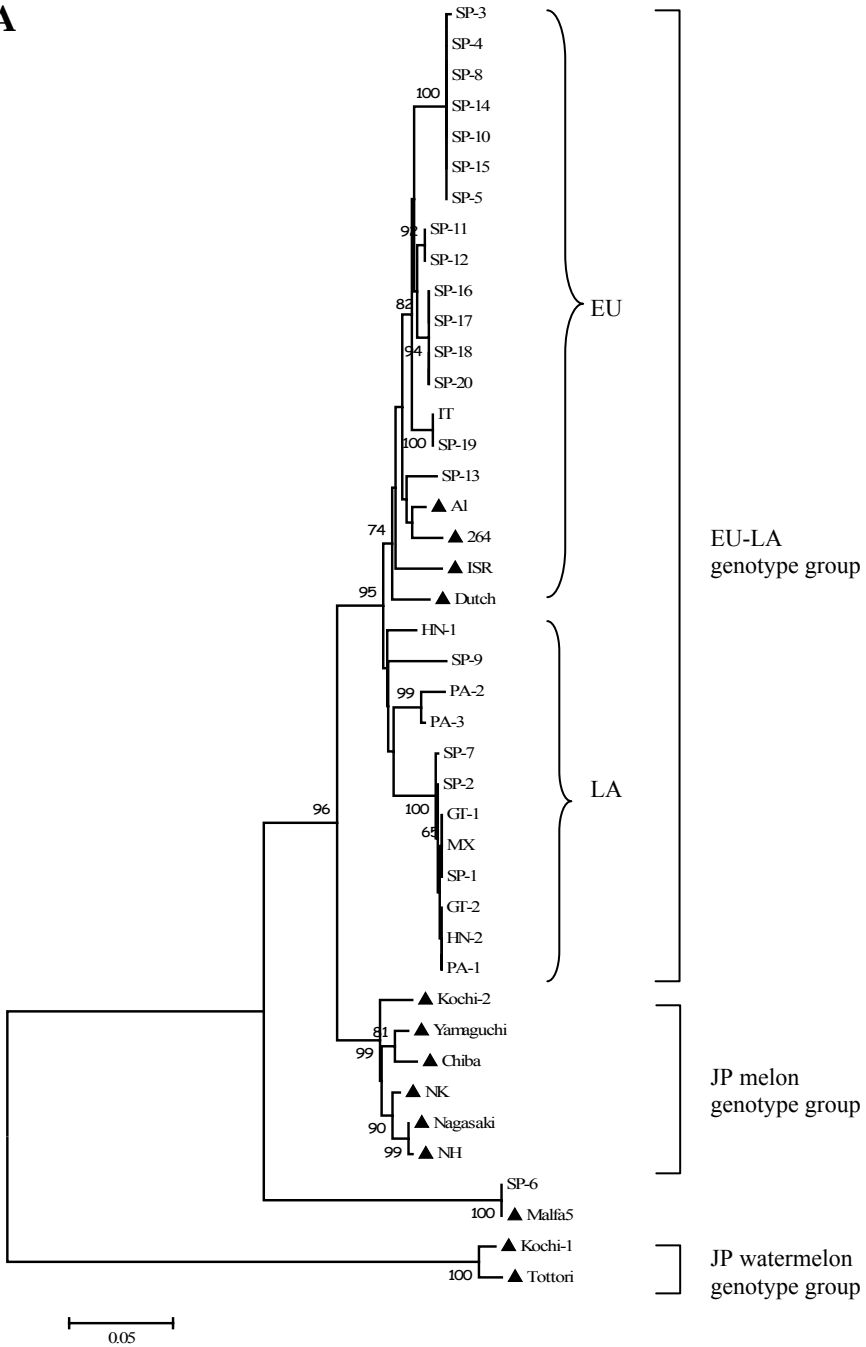
^bMNSV-positive samples of the total samples analyzed.

^cSamples that contained feeder roots of the total samples analyzed. These feeder root samples were analyzed for the *Olpidium* species infection and for the MNSV/*Olpidium* species infection.

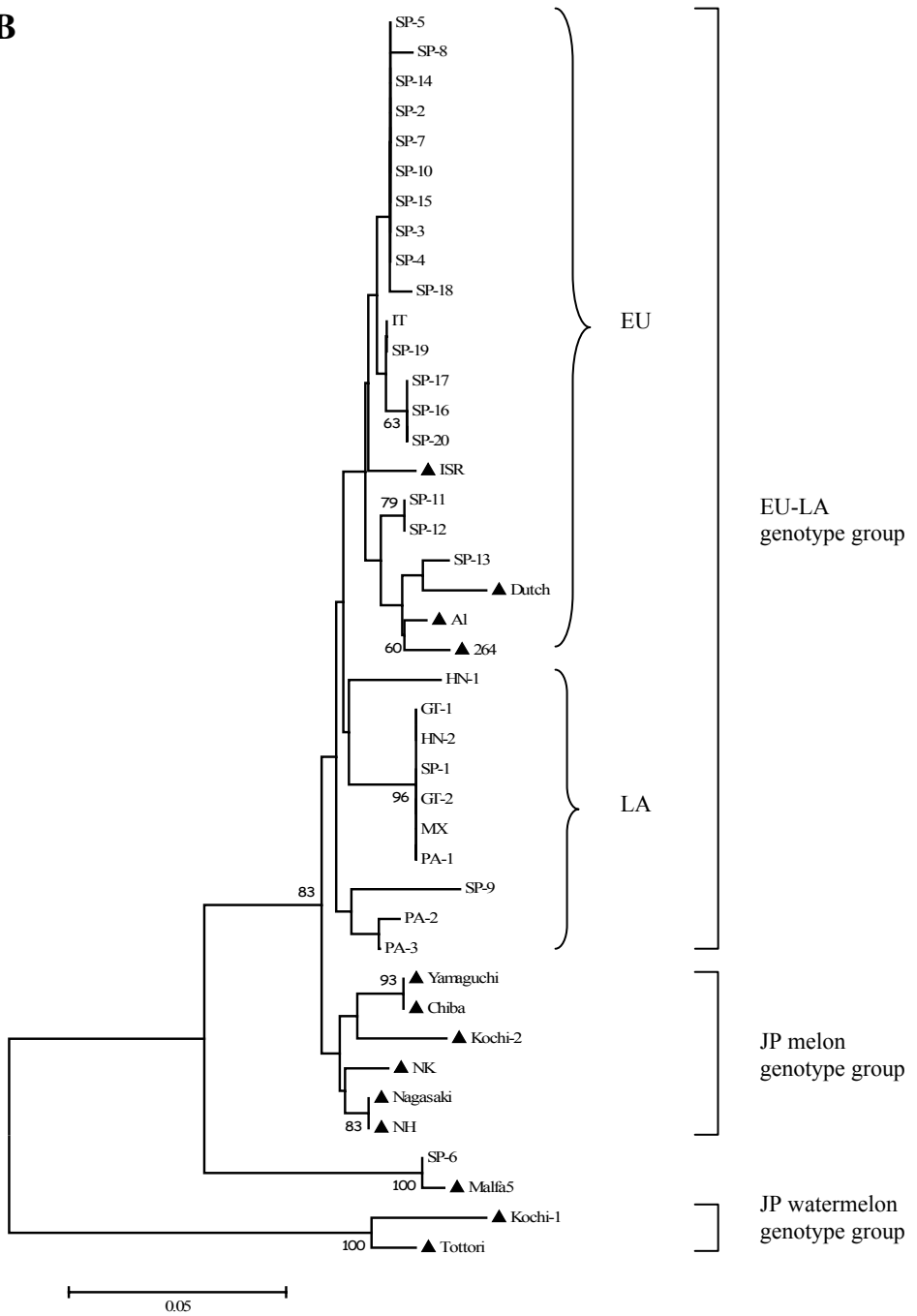
^d*O. bor*: *O. bornovanus*; *O. vir*: *O. virulentus*.

All the cucumber and watermelon isolates, and most of the melon isolates, were from different regions of Spain. Hence, two overlapping data sets were analysed: one sampled the MNSV Spanish population and another sampled the MNSV worldwide population. In both sets, sequences were compared with the MNSV sequences from the NCBI database. In the MNSV Spanish population, isolates were not apparently grouped according to the Spanish region, year of collection, or host from which the virus was originally isolated. However, the SP-6 (the 'oldest' Spanish isolate obtained in this study) and the Malfa5 reference isolate were the most distantly related to the other Spanish isolates in almost all proteins (Fig. 4.1: A, B, C, D). Both isolates were collected from naturally infected melon plants grown in Almería (south Spain). In addition, several Spanish isolates showed the same nucleotide sequence in all the genomic regions analysed. In the MNSV worldwide population, three groups were recovered by the nucleotide composition of the p29/p89, p7A, p7B, and p42 proteins: the EU-LA genotype group, formed by European and Latin American isolates (a reference isolate from Israel was also present in this group). All the European isolates clustered in a subgroup, as do the Latin American isolates (all except two Spanish isolates). Therefore, we divided the EU-LA genotype group into two subgroups (EU and LA, respectively). The other two genotype groups were the JP melon genotype group which includes Japanese melon reference isolates, and the JP watermelon genotype group which includes Japanese watermelon reference isolates (Fig. 4.1: A, B, C, D). The JP melon genotype group was intermediate and sister to both the EU-LA genotype (formed by EU and LA subgroups) and the JP watermelon genotype groups (Fig. 4.1: A, B, D). However, the JP melon genotype group clustered in the LA subgroup for the p7B protein (Fig. 4.1C). The JP watermelon genotype group was basal to all the groups in the proteins analysed. In general, all the groups were confidently supported by the bootstrap technique (Fig. 4.1: A, B, C, D). In the p29/89, p7A, and p7B proteins, the only Spanish isolate that did not fit the EU-LA genotype group was SP-6; interestingly, it was the 'oldest' isolate characterised, but the same isolate appeared within this group, specifically in the EU subgroup, for the p42 protein (Fig. 4.1D).

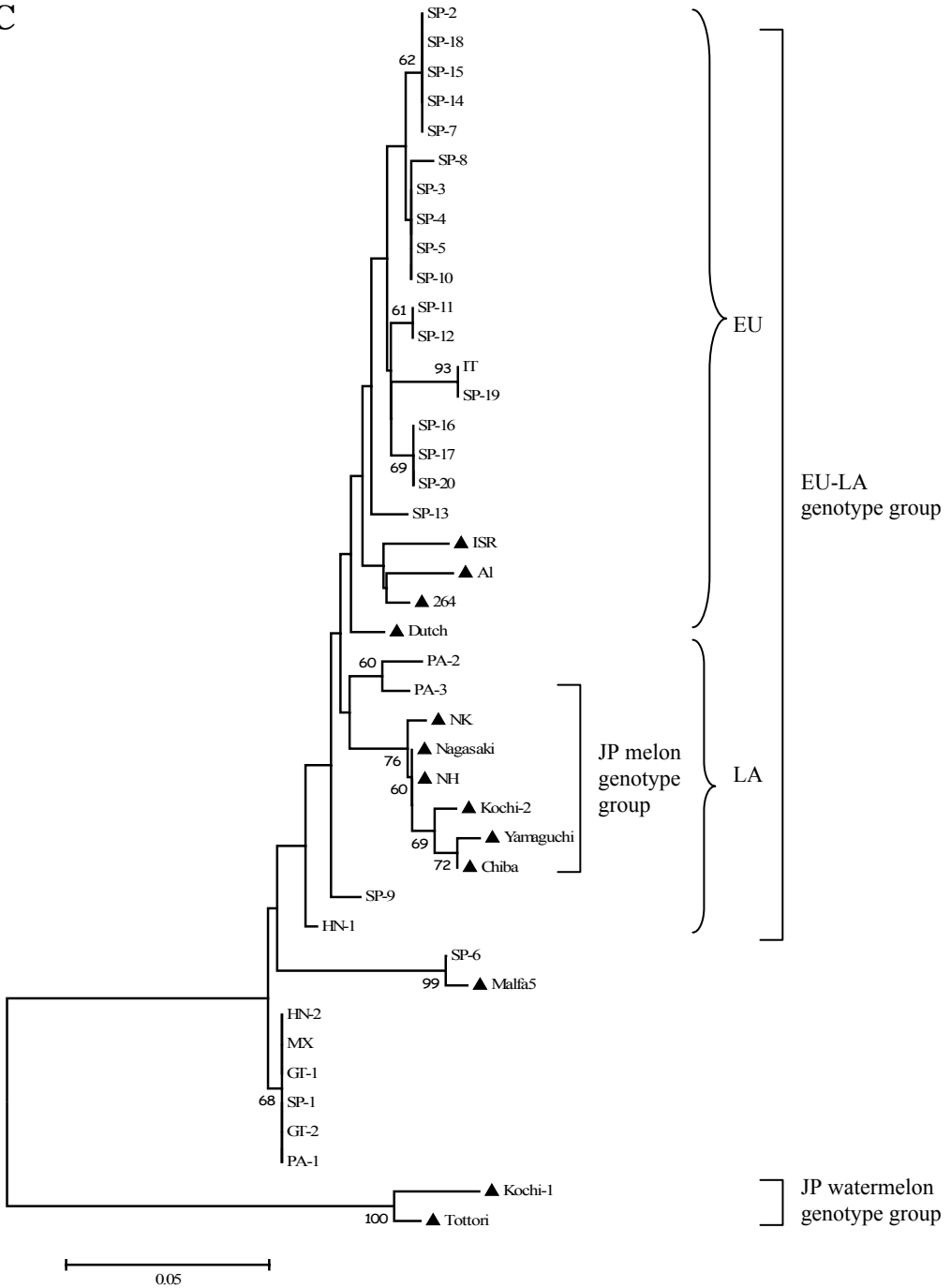
A



B



C



D

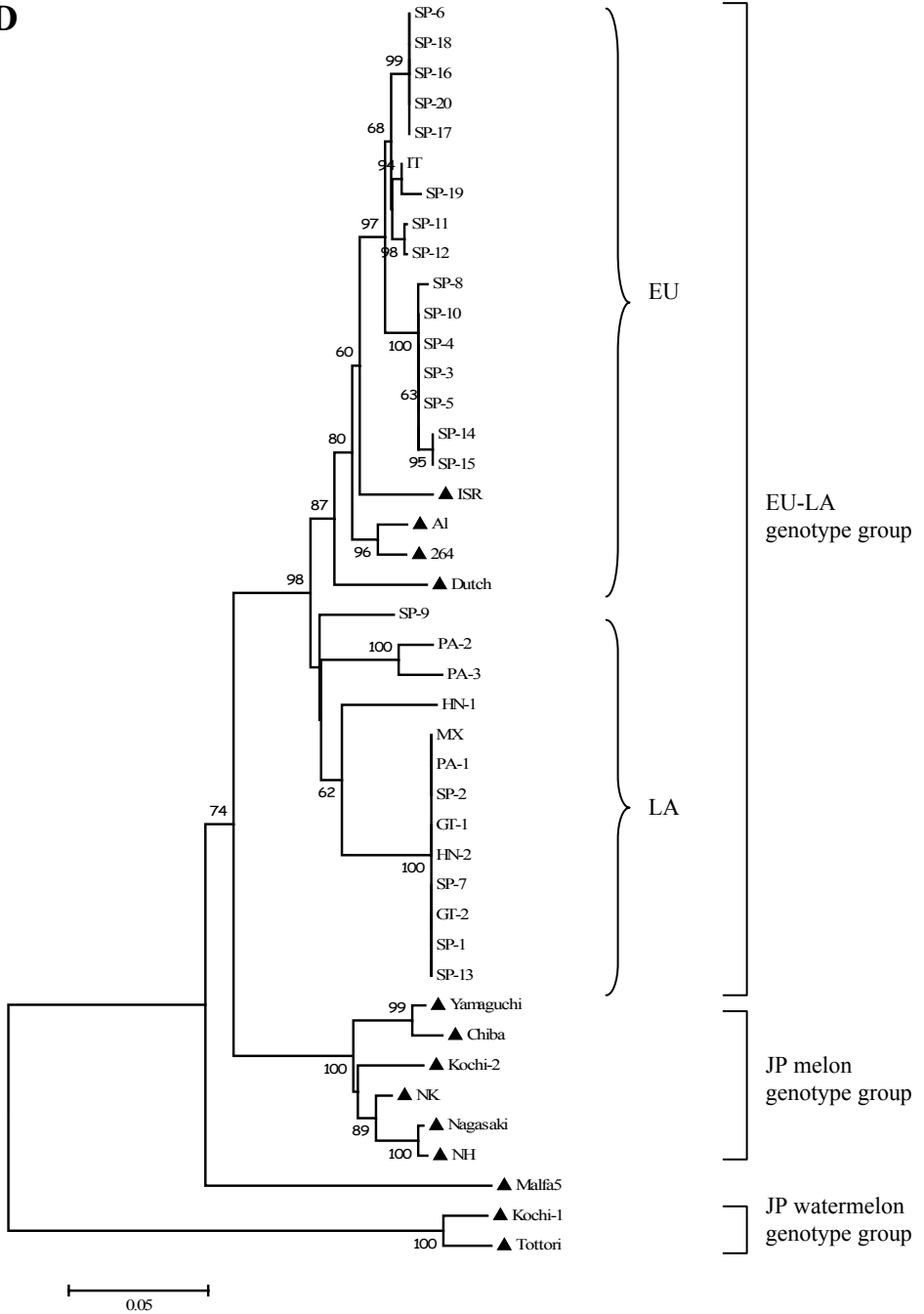


Figure 4.1 Neighbor-joining phylogenetic trees of 1000 bootstrap replicates obtained from the distance matrix (Kimura 2-parameters) with MEGA from the nucleotide sequences coding for the p29/p89 (RdRp) **(A)**, p7A (MP) **(B)**, p7B (MP) **(C)**, and p42 (CP) **(D)** proteins of 29 *Melon necrotic spot virus* (MNSV) isolates from three cucurbit species from Latin America and Europe. Sequences for the other MNSV isolates obtained from the NCBI database (indicated with a triangle) were included: melon isolates were from Israel (ISR, GenBank accession No. DQ922807), Japan (Chiba, AB250684; Kochi, AB250685; Nagasaki, AB250686; Yamaguchi, AB250687; NH, AB044291; NK, AB044292), and Spain (Al, DQ339157; 264, AY330700; Malfa5, AY122286), from cucumber from the Netherlands (Dutch, D12536), or from watermelon from Japan (Tottori, AB232925; Kochi, AB232926). Bootstrap values >60 are shown. The scale bar represents a genetic distance of 0.05.

In addition, most of the Latin American isolates, as well as the SP-1 isolate from Spain, did not appear within the EU-LA genotype group for the p7B protein. Noteworthy, the SP-1 isolate detected in the infected seedlings grown from commercial melon seeds presented a 100% sequence homology in all the genome regions studied with two MNSV Latin American isolates (GT-1 and MX). On the other hand, the percentages of amino acid similarity/identity of the p29/p89 (179 aa), p7A (65 aa), p7B (61 aa), and p42 (196 aa) proteins were 78.2–100/60.3–100, 90.8–100/84.6–100, 85.2–100/75.4–100, 89.3–100/78.6–100, respectively. Additionally, comparisons of the amino acid-deduced sequences for the all MNSV isolates obtained in this study included 13 MNSV reference isolates, showing that most of the non-conservative changes occurred in p29/p89 and p7B, and that they were less abundant in p7A and p42 (data not shown). Functional constraints on the evolution of the entire p7A and p7B proteins were analysed by the genetic diversity ratio at the nonsynonymous (d_N) and synonymous (d_S) sites (Table 4.5). d_N/d_S was lower for p7A than for p7B, indicating that the p7A protein was under tighter functional constraints than the p7B protein. Therefore, p7A was the most constrained protein, as shown by both the d_N/d_S ratios and the lower diversity at the d_N sites compared with the p7B protein. Furthermore, p7B was a lesser constrained protein owing to a lower diversity at the d_S sites than the p7A protein. d_S was similar to and higher than d_N for both genomic regions, indicating a negative selection (Table 4.5).

Table 4.5 Nucleotide diversity for two entire genomic regions of the 29 MNSV isolates (this study), including 13 reference isolates

Genome zone ^a	d_N^b	d_S^b	d_N/d_S^b
p7A	0.0152 ± 0.0045	0.1705 ± 0.0406	0.0891
p7B	0.0215 ± 0.0061	0.1456 ± 0.0314	0.1476

^aGenomic regions analyzed: p7A and p7B, regions corresponding to the movement proteins of MNSV.

^b d_N and d_S : nucleotide diversity of nonsynonymous and of synonymous substitutions, respectively, according to the PBL method; d_N/d_S , ratios between nonsynonymous and synonymous substitutions.

Molecular analysis of the variation and phylogenetic relationships of the *Olpidium* species

The nucleotide sequence for the rDNA-ITS region was determined for a set of 40 *Olpidium* isolates from all the cucurbits species and geographical locations examined (Table 4.3). In all cases, the DNA sequence obtained was as expected. The sequences obtained in this work for each *Olpidium* species were compared with the those published in the NCBI database. The sequence nucleotide similarity among the isolates within single *O. bornovanus* and *O. virulentus* species was 96.6%–100.0% and 98.1%–100.0% in the genome zone studied, respectively. However, the similarity between these species was 42.7%–44.8%. The percentages of identity were highly congruent with the percentages of similarity; therefore, these data are not shown. The phylogenetic analysis of the rDNA-ITS region between *O. bornovanus* and *O. virulentus* showed the same general trend as with the sequence similarity percentage (Fig. 4.2). The phylogenetic tree showed that *O. bornovanus* and *O. virulentus* clearly differed as an *Olpidium* species. In addition, two groups were observed for each species (Fig. 4.2). *O. bornovanus* isolates were not related in terms of location or year of collection. However, these isolates were partially grouped according to the host from which they were originally isolated. All the watermelon and squash isolates, and several melon isolates, were included in the *O. bor-A* group. The *O. bor-B* group was formed by most melon isolates and by one cucumber isolate.

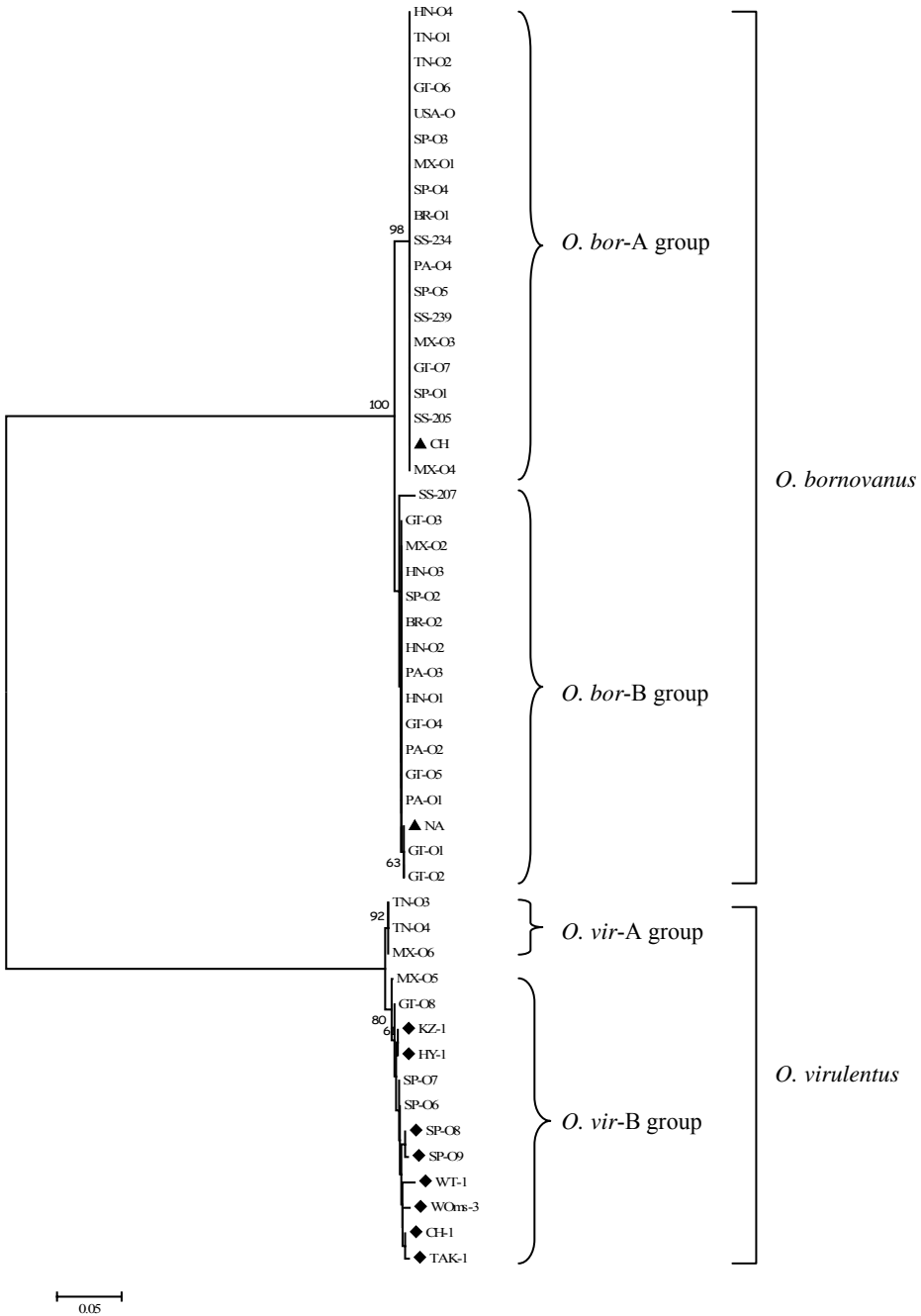


Figure 4.2 Neighbor-joining phylogenetic tree of 1000 bootstrap replicates obtained from the distance matrix (Kimura 2-parameters) with MEGA from the nucleotide sequences of the rDNA-ITS region of 33 *Olpidium bornovanus* and 7 *Olpidium virulentus* isolates from three cucurbit species from Latin America and Europe. Sequences for other *Olpidium* isolates obtained from the NCBI database were included: *O. bornovanus* isolates of melon (indicated with a triangle) were from Japan (CH, AB205214; NA, AB205215); *O. virulentus* isolates of non-cucurbit species (shown with a rhomb) were from Japan (WT-1, AB205203; HY-1, AB205204; KZ-1, AB205205; TAK-1, AB205206; CH-1, AB205207; Woms-3, AB205208), and Spain (SP-O8, EU981901; SP-O9, EU981902). Bootstrap values >60 are shown. The scale bar represents a genetic distance of 0.05.

The *O. virulentus* isolates did not group according to geographical locations or collecting times. However, *O. virulentus* partially grouped according to the host in the same way as *O. bornovanus* did. The *O. vir-A* group was formed by only three melon isolates. However, most melon isolates and one watermelon isolate, plus the non-cucurbit reference isolates, were included in the *O. vir-B* group. In general, all the groups were confidently supported by the bootstrap technique (Fig. 2). Additionally, several *O. bornovanus* isolates from different geographical regions showed identical sequences (100% nucleotides homology) in the genome zone analysed. A similar situation was observed in the *O. virulentus* isolates.

DISCUSSION

This research work indicates that MNSV and the *Olpidium* species are more geographically widespread than previously reported. The data provided in this study show that MNSV occurs in all the cucurbit species and geographic origins studied, except for Brazil, Tunisia, and the USA where MNSV was not recovered from any of the samples analysed. This is probably due to the small number of samples collected from these countries. However, MNSV has been previously detected in the USA (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979) and recently in Tunisia (Yakoubi *et al.*, 2008). A remarkable result is that *O. bornovanus* is present in the roots of many diseased plants. This fungus has been found, often with MNSV, in most field melon samples analysed in previous studies (De Cara *et al.*, 2008). Additionally, several of the MNSV-positive plants in our study were not infected with *O. bornovanus*. We suggest that these plants were seed infected, since Herrera-Vásquez *et al.* (2009b) recently reported a high seed transmission rate of MNSV. We also observe mixed MNSV/*O. virulentus* and MNSV/*O.*

bornovanus/O. virulentus infections in melons for the first time. However, recent studies by Mochizuki *et al.* (2008) indicate that *O. virulentus* cannot transmit MNSV because MNSV particles were not detected over the entire surface of the *O. virulentus* zoospore by immunofluorescence microscopy; MNSV particles were detected on *O. bornovanus* which can transmit MNSV.

Since genetic variability reports are lacking for *Carmovirus* (Cañizares *et al.*, 2001), we also chose the p29, p89, p7A, p7B, and p42 proteins of MNSV to study the genetic diversity and phylogenetic relationships of the Spanish and worldwide population of this virus. The MNSV Spanish population was not separated in terms of space or host, and only the SP-6 isolate (this work) and the Malfa5 reference isolate were partially separated in time. Thus, our results are similar to those found for other viruses, such as *Pepino mosaic virus* (PepMV. *Potexvirus*, *Flexiviridae*) for which no genetic differentiation according to the Spanish region has been observed (Pagán *et al.*, 2006). One possible hypothesis considers the negative selection to variation that would limit the variable sites in the *Carmovirus* genome among the smallest plant viruses known to date (Cañizares *et al.*, 2001). We also note how several Spanish isolates share the same nucleotide sequence in all the genome zones studied. The limited genetic diversity observed in these isolates may either correlate with a rapid evolution of the virus shortly after a single or limited number of introductions or be due to multiple introductions of variable strains with a narrow genetic base which probably originate from the same region, similarly to the *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV. *Potyvirus*, *Potyviridae*) (Desbiez *et al.*, 1996).

In the worldwide MNSV population, the phylogenetic analysis of all the proteins shows three clearly defined groups which we suggest to be the following: the EU-LA genotype group with two subgroups (EU and LA, formed by European and Latin American isolates, respectively), the JP melon genotype group (Japanese melon reference isolates), and the JP watermelon genotype group (Japanese watermelon reference isolates). They are predominantly associated with a specific geographic origin, while the reference isolates of Japan are associated with the cucurbit species. The MNSV isolates are unrelated to the year of collection, and the European and Latin American isolates probably share a common origin. In addition, the JP melon genotype group falls within the LA subgroup for the p7B protein. Furthermore, the aforementioned SP-6 Spanish isolate falls outside all the groups for all the proteins, except the p42 protein for

which this isolate is present in the EU subgroup. Additionally, the host range, sequence analysis, genomic structure and transmission by *O. bornovanus* all show that the Japanese watermelon reference isolates have a high level of identity with the MNSV melon reference isolates. Consequently, Ohki *et al.* (2008) propose the watermelon isolates to be classified as a new MNSV watermelon strain. Collectively, the data indicate that speciation has evolved as a result of different selection pressures on different genomic regions, similarly to the *Carnation mottle virus* (CarMV) and to other viruses of the family *Tombusviridae* (Cañizares *et al.*, 2001). One alternative may be the presence of recombinant isolates which exchange portions of these genome zones. Therefore, the worldwide MNSV population does not appear to be highly conserved in space, similarly to other viruses such as the *Turnip mosaic virus* (TuMV, *Potyvirus*, *Potyviridae*) for which a genetic differentiation to geography has been observed (Korkmaz *et al.*, 2008). We also note that the genomic regions corresponding to p29/p89 and p7B appear to be more prone to variation than those corresponding to p7A and p42. Stronger genetic and/or functional constraints may limit variability (Díaz *et al.*, 2003). Interestingly, the SP-1 isolate from Spain, obtained in seedlings grown from the commercial melon seed, is not fully disseminated in the countries from where the seeds were obtained, e.g., Spain. In Latin American countries however, where seeds are mostly imported, we observe several MNSV isolates with a 100% nucleotide sequence homology with this sequence in all the genome zones analysed. Therefore, the dissemination of MNSV with this sequence into these countries through commercial seeds is possible. MNSV is both seedborne and soilborne, so it is readily distributed through the seed market and becomes endemic in melon-growing areas where it persists for long periods in association with its soilborne fungal vector, *O. bornovanus* (Kubo *et al.*, 2005). In addition, Campbell *et al.* (1996) used the term vector-assisted seed transmission (VAST) because the vector plays an important role in seed transmission. These authors found that some transmission to seedlings could occur in the absence of the vector, that the seedborne virus was not always externally borne, that the incidence of MNSV was often <2%, and that the incidence of MNSV ranged from 0.5 to >50% when *O. bornovanus* was present.

Additionally, selective constraints in the MNSV genome have been evaluated by comparing the rates of synonymous and nosynonymous

substitutions across codon sites. Thus, the small d_N/d_S value obtained for the entire p7A and p7B proteins indicates a strong negative selection pressure for amino acid change, which is in range for the corresponding proteins of other *Carmovirus* species such as CarMV (Cañizares *et al.*, 2001) and *Pelargonium flower break virus* (PFBV) (Rico *et al.*, 2006). For these coding regions, d_N is significantly smaller than d_S , which supports the notion that purifying selection acts as a major force during the diversification of the MNSV isolates. In general, we have shown that a negative selection is a major evolutionary force that shapes the nucleotide diversity of the two coding regions under study.

On the other hand, the rDNA-ITS region analysed in this study indicates that *O. bornovanus* and *O. virulentus* are separate species and that these *Olpidium* species differ in terms of morphology, host range, host specificity, and virus transmissibility (Campbell & Sim, 1994; Sasaya & Koganezawa, 2006). Several destructive viruses are transmitted by *O. bornovanus* and *O. virulentus*. Therefore, virus transmissibility is a very important property of these *Olpidium* species (Rochon *et al.*, 2004; Sasaya & Koganezawa, 2006). In addition, our data suggest that the DNA sequence variation within a single species does not appear to be highly variable in terms of space or year of collection. However, we observe that two phylogenetic groups (*O. bornovanus* and *O. virulentus*) are possibly related with the cucurbit species. Previous studies indicate that the difference of MNSV transmission efficiency can be attributed to compatibility between the vector and the virus, but not between the vector and the host plant (Ohki *et al.*, 2008). It is important to note in this respect that the recent studies by Mochizuki *et al.* (2008) indicate that the amino acid substitution Ile → Phe at position 300 in the MNSV coat protein results in the loss of both specific binding and fungal transmission. Therefore, a future analysis of this position, which is implicated in MNSV transmission, could help determine whether or not differences in the viral sequences between the MNSV isolates found in *O. bornovanus* or *O. virulentus* infected roots and if the viral isolates group are associated with the *Olpidium* species.

Since serious outbreaks of the disease have been associated with new strains of MNSV and the *Olpidium* species and have occurred at various sites in the world, the accurate identification of the strains of this virus and the *Olpidium* species, as well as the determination of their genetic variation, are the first necessary steps to be taken in order to design effective disease control strategies.

ACKNOWLEDGEMENTS

José Ángel Herrera-Vásquez was supported by a predoctoral fellowship from the Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID, Spain, 2004–2007 period), and the Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos and the Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (IFARHU-SENACYT, Panamá, 2007–2010 period). We thank the Dirección Nacional de Sanidad Vegetal-Ministerio de Desarrollo Agropecuario (DNSV-MIDA, Panamá) for its technical assistance. We also thank Dr. L. Tomassoli (Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome, Italy) for providing the MNSV isolate from Italy, Dr. J. Gómez (Centro de Investigación y Formación Agraria, La Mojonera, Almería, Spain) for providing the single-sporangial cultures of *O. bornovanus*, Dr. R. Beltrán for providing the samples from Brazil, and Dr. J. A. Navarro (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Valencia, Spain) for providing the sequences of one pair of MNSV-specific primers based on p7A and p7B movement proteins and for his helpful suggestions with this manuscript.

REFERENCES

- Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J, 2003. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* **4**, 29–33.
- Campbell RN, Sim ST, 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radicale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1136–1143.
- Campbell RN, Sim ST, Lecoq H, 1995. Virus transmission by host-specific strains of *Olpidium bornovanus* and *Olpidium brassicae*. *European Journal of Plant Pathology* **101**, 273–282.
- Campbell RN, Wipf-Scheibel C, Lecoq H, 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology* **86**, 1294–1298.

- Cañizares MC, Marcos JF, Pallás V, 2001. Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of *Carnation mottle virus* (CarMV) and phylogenetic relationships within the *Tombusviridae* family. *Archives of Virology* **146**, 2039–2051.
- De Cara M, López V, Córdoba MC, Santos M, Jordá C, Tello JC, 2008. Association of *Olpidium bornovanus* and *Melon necrotic spot virus* with vine decline of melon in Guatemala. *Plant Disease* **92**, 709–713.
- Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Grnier F, Robaglia C, Delaunay T, Lecoq H, 1996. Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* on the island of Martinique. *Plant Disease* **80**, 203–207.
- Díaz JA, Bernal JJ, Moriones E, Aranda MA, 2003. Nucleotide sequence and infectious transcripts from a full-length cDNA clone of the Carmovirus *Melon necrotic spot virus*. *Archives of Virology* **148**, 599–607.
- Genovés A, Navarro JA, Pallás V, 2006. Functional analysis of the five *Melon necrotic spot virus* genome-encoded proteins. *Journal of General Virology* **87**, 2371–2380.
- Gonzalez-Garza R, Gumpf DJ, Kishaba AN, Bohn GW, 1979. Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California isolate of *Melon necrotic spot virus*. *Phytopathology* **69**, 340–345.
- Herrera JA, Cebrian MC, Jordá C, 2006. First report of *Melon necrotic spot virus* in Panama. *Plant Disease* **90**, 1261.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Córdoba-Sellés MC, Jordá C, 2009a. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. *Mycological Research* **113**, 602–610.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2009b. Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of seed-disinfection treatments. *Plant Pathology* **58**, 436–442.
- Hibi T, Furuki I, 1985. *Melon necrotic spot virus*. In: *Descriptions of Plants Viruses* 302. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists.
- Hiruki C, 1987. Recovery and identification of *Tobacco stunt virus* from air-dried resting spores of *Olpidium brassicae*. *Plant Pathology* **36**, 224–228.

- Jeanmougin F, Thompson JD, Gibson TJM, Gouy M, Higgins DG, 1998. Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 403–405.
- Jordá C, Armengol J, Gisbert J, Osca JM, Lacasa A, Velásquez B, 2002. El tratamiento con microondas para la desinfección de suelos. *PHYTOMA-Spain* **138**, 118–121.
- 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 of the National Agricultural Research Center for Western Region* **4**, 39–59.
- Korkmaz S, Tomitaka Y, Onder S, Ohshima K, 2008. Occurrence and molecular characterization of Turkish isolates of *Turnip mosaic virus*. *Plant Pathology* **57**, 1155–1162.
- Kubo C, Nakazono-Nagaoka E, Hagiwara K, Kajihara H, Takeuchi S, Matsuo K, Ichiki TU, Omura T, 2005. New severe strains of *Melon necrotic spot virus*: symptomatology and sequencing. *Plant Pathology* **54**, 615–620.
- Kularatne HAGC, Lawrie AC, Barber PA, Keane PJ, 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation in planta of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research* **108**, 1476–1493.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150–163.
- Lange L, Insunza V, 1977. Root inhabiting *Olpidium* species: the *O. radiale* complex. *Transactions of the British Mycological Society* **69**, 377–384.
- Mochizuki T, Ohnishi J, Ohki T, Kanda A, Tsuda S, 2008. Amino acid substitution in the coat protein of *Melon necrotic spot virus* causes loss of binding to the surface of *Olpidium bornovanus* zoospores. *Journal of General Plant Pathology* **74**, 176–181.
- Ohki T, Sako I, Kanda A, Mochizuki T, Honda Y, Tsuda S, 2008. A new strain of *Melon necrotic spot virus* that is unable to systematically infect *Cucumis melo*. *Virology* **98**, 1165–1170.

- Pagán I, Córdoba-Sellés MC, Martínez-Priego L, Fraile A, Malpica JM, Jordá C, García-Arenal F, 2006. Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology* **96**, 274–279.
- Rico P, Ivars P, Elena SF, Hernández C, 2006. Insights into the selective pressures restricting *Pelargonium flower break virus* genome variability: evidence for host adaption. *Journal of Virology* **80**, 8124–8132.
- Riviere CJ, Rochon DM, 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of *Melon necrotic spot virus*. *Journal of General Virology* **71**, 1887–1896.
- Rochon DA, Kakani K, Robbins M, Reade R, 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and Plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 211–241.
- 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**, 20–25.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. New York: USA, p. 315–322.
- Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H, Wipf-Scheibel C, Marrakchi M, Lecoq H, 2008. First report of *Melon necrotic spot virus* on melon in Tunisia. *Plant Pathology* **57**, 386.

Capítulo 6

Capítulo 6

Occurrence, distribution and characterization of viruses in cucurbit crops in Panama

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

Journal of Plant Pathology, Accept (05-Sep-2009)

ABSTRACT

The main areas of field-grown cucurbit production in Panama were surveyed for the occurrence, distribution and molecular analysis of the variation of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) and its fungal vector *Olpidium bornovanus* in the growing seasons of 2006 and 2008. MNSV was detected after analysing 43 cucurbit samples by double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *O. bornovanus* was found after examining 29 soil samples by resting spores morphology and multiplex PCR. MNSV and *O. bornovanus* were identified in 12% and 45% of the samples tested, respectively, but only in melon samples. *O. bornovanus* was observed in all the regions in which MNSV had been detected. A molecular analysis of the variation of MNSV and *O. bornovanus* was conducted, but only the viral isolates were separated geographically. In addition, the occurrence and distribution of *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) were analysed. The occurrence and distribution of these viruses in open-field cucurbit crops of Panama were determined. PRSV was the most frequently found virus in terms of the number of fields and samples analysed, followed by ZYMV and WMV. CMV and SqMV were not found in this study. Single and double virus infection was detected in 67% and 17% of the samples tested, respectively.

The occurrence and distribution of each virus varied according to the region and cucurbit species.

Keywords: *Carmovirus*, Chytrid, *Cucurbitaceae*, mixed infection, virus disease

INTRODUCTION

Cultivated cucurbit species (melon, cucumber, squash and watermelon) are important vegetable crops worldwide, especially in developing countries. Panama ranks eighth in melon production in the American continent (FAO, 2008), and most of its production is exported, mainly to the USA and Europe. In Panama, melon is the most cultivated cucurbit species (2,379 ha; 41,769 t/year) (MIDA, 2008). Virtually the whole of the Panamanian melon production originates from field-grown crops, mainly in the central regions of Panama. The Los Santos central region is one of the most intensive cucurbit cultivation areas, and its melon production accounts for 68% of Panama's total production (1,530 ha; 28,403 t/year) (MIDA, 2008).

Virus-induced diseases are a worldwide problem for cucurbit production and cause severe economic losses. Of the approximately 35 different viruses reported in *Cucurbitaceae* worldwide (Provvidenti, 1996), *Cucumber mosaic virus* (CMV, genus *Cucumovirus*), *Squash mosaic virus* (SqMV, genus *Comovirus*) and the potyviruses *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) are known to occur in field-grown melons in Panama (García, 1997; Herrera *et al.*, 2006b). These viruses are naturally transmitted by aphids in a non-persistent manner (Pirone & Harris, 1970); CMV is transmitted by seeds (Sharma & Chohan, 1974) and SqMV is transmitted by beetles and seeds (Franken *et al.*, 1990). They cause considerable losses in production when plants become infected during early growth stages (Nameth *et al.*, 1986). Common foliar symptoms of infected plants are mosaic, mottling, chlorotic mottle, veinclearing or veinbanding, as well as leaf distortion and malformation. These viruses may also cause a reduction of plant growth and flower abortion, and fruits can present depressed areas discoloration and abnormal shapes that render them unmarketable.

Recently, *Melon necrotic spot virus* (MNSV, genus *Carmovirus*) has been detected in Panamanian field-grown melons (Herrera *et al.*, 2006a) and

reported in several American, African, Asian and European countries (Yakoubi *et al.*, 2008). MNSV is transmitted by the chytrid fungus *Oplidium bornovanus* (Sahtiyanci) Karling (Campbell *et al.*, 1995) and by seeds (Herrera-Vásquez *et al.*, 2009b). In melon, symptoms caused by MNSV include stem necrosis at the crown level and, less frequently, small necrotic spots that sometimes abscise, leaving holes on leaves and fruits. Wilting and plant death have also been observed (Herrera *et al.*, 2006a).

Despite the importance of field-grown cucurbits in Panama, only limited and local information about the occurrence and distribution of viral diseases is available (García, 1997; Herrera *et al.*, 2008). Thus, a survey was conducted in the growing seasons of 2006 and 2008 which encompassed all the regions of Panama where cucurbits are field-grown.

The main objectives of this study are to (i) assess the occurrence, distribution and characterization of MNSV and its fungal vector *O. bornovanus* in the cucurbit growing seasons of 2006 and 2008, and (ii) determine the occurrence and distribution of CMV, SqMV, PRSV, WMV and ZYMV only in the growing season of 2008 because similar symptoms to those produced by these viruses were observed in this season.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and preparation

Surveys were conducted in the growing seasons of 2006 and 2008 in five regions in which melons (*Cucumis melo* L.), watermelons [(*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai)] and squashes (*Cucurbita moschata* Duch. ex Lam.) are field-grown in Panama (Fig. 5.1). In this country, although melon and watermelon crops are grown during the dry season, which starts from December and continues until April, squash is grown all year long. In each region, fields were arbitrarily selected and inspected from January to April. Twelve melon samples from plants showing the characteristic necrotic symptoms of MNSV infection (Fig. 5.2A), or no symptoms, were obtained from 11 fields in the growing season of 2006, while 31 samples of melon, watermelon and squash from plants showing virus like-symptoms, including mosaic, mottling, mottle, vein-clearing or

veinbanding, leaf lamina distortions, and necrotic leaves, flowers, and stems (Fig. 5.2B), were collected from 26 fields in the growing season of 2008. Sometimes fruits were distorted and showed distortion on their surfaces (Fig. 5.2C).

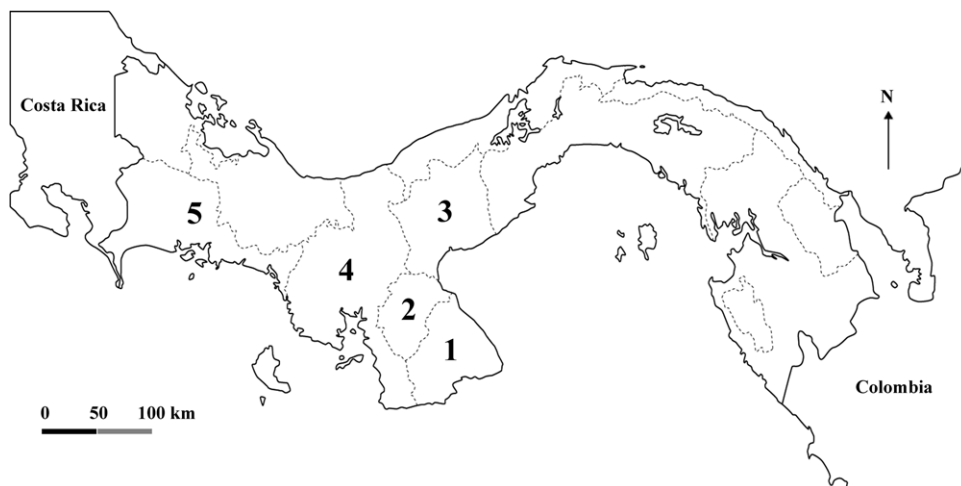


Figure 5.1 Map of Panama showing the location of Regions 1 to 5 where field-grown cucurbit crops were surveyed for MNSV, *Ospidium bornovanus* and mosaic viruses in the growing seasons of 2006 and 2008. Regions 1: Los Santos, 2: Herrera, 3: Coclé, 4: Veraguas, 5: Chiriquí.

Melon cultivars included Estoril and Solarnet (of the “Galia” type), Dorado (of the “Tendral” type), Natal (of the “Amarillo” type), Cassandra (of the “Honey Dew” type), and other cultivars of the “Cantaloupe” and “Tam Dew Improved” types. Watermelon included Triploid, Quetzali, Mickey Lee and Sangria. Squash cultivars included Atlas (of the “Butternut” type). Each field was visited and surveyed prior to harvest.

A sample consisted of two symptomatic leaves and roots per plant. Leaf samples were placed separately into plastic bags, dried using the silica gel method and kept at room temperature, while root samples were stored in a freezer (-20°C) until analysed. Each leaf sample was tested to identify CMV, SqMV, PRSV, WMV and ZYMV infection by double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA), while each root sample was tested to identify MNSV infection by DAS-ELISA and RT-PCR.

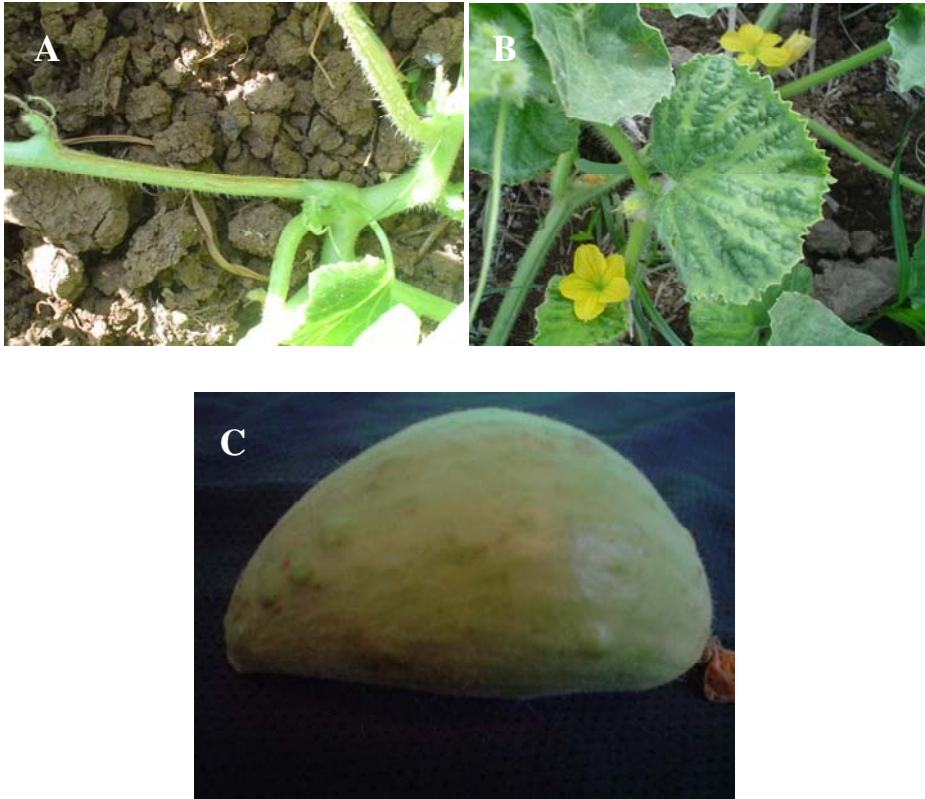


Figure 5.2 Symptoms of stem necrosis at the crown level (A), mosaic, mottling and distortion on a leaf (B), and mottling, distortion and abnormal growth on a fruit (C) of virus-infected melon plants.

Soil samples (approximately 100 g of soil per sample) were collected from the root zone of field-grown cucurbit crops, air-dried for 1 week, and sifted through a 2-mm sieve to remove soil clods prior to processing. The presence of *O. bornovanus* in these sifted soil samples was then determined using seedlings of the cucurbit crops as baits. The procedure described by Herrera-Vásquez *et al.* (2009a) was followed. The bait plant roots were washed with distilled water, dried on paper towels, and examined by microscopy and multiplex PCR to identify *O. bornovanus* infection.

Identification of MNSV and mosaic viruses by DAS-ELISA

The presence of MNSV, CMV, SqMV, PRSV, WMV and ZYMV was determined in cucurbit samples by DAS-ELISA. SqMV-specific antiserum was obtained from LOEWE Biochemica GmbH (Sauerlach, Germany), while the specific antisera for the rest of the viruses were obtained from SEDIAG SAS (Longvic, France). The analyses were done as recommended by both manufacturers. The 0.5 g samples were homogenised in a plastic bag in extraction buffer [2% PVP in PBS-Tween, 1:20 (w/v)]. Healthy and virus-infected cucurbit leaves or root samples were included as negative and positive controls, respectively. ELISA reactions were measured spectrophotometrically at 405 nm in a Titertek Multiskan immunoplate reader (Flow Laboratories, Finland). A sample was considered virus-positive if the absorbance value (A_{405} nm) exceeded the mean of the negative controls by at least a factor of two.

Identification of MNSV by RT-PCR and sequence analysis

Cucurbit samples were analysed by RT-PCR to confirm MNSV serological identification. The 0.1 g root samples were ground in liquid nitrogen, and total RNAs were extracted using the RNAwiz™ kit (Ambion, Huntingdon, United Kingdom) following the manufacturer's instructions. RT-PCR was carried out in a single step using SuperScript™ II RT with the Platinum® *Taq* kit (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, Spain) and the MNSV-specific primers designed by Herrera-Vásquez *et al.* (2009b) to amplify a 650-bp viral genome fragment of the p42 protein of MNSV (coat protein, CP). Total RNAs were denatured at 65°C for 5 min, and RT-PCR was run according to the procedure described by the aforementioned authors. RT-PCR-amplified products were separated by electrophoresis on 1.2% agarose gel in 1 × TAE buffer (40 mM Tris-acetate and 1 mM EDTA at pH 8.0) and stained with ethidium bromide. To study the molecular variation of the Panamanian MNSV isolates, RT-PCR-positive samples were selected and analysed by RT-PCR with two primer sets designed by Herrera-Vásquez *et al.* (2009c) based on both the p29/p89 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) and the p7A/p7B (movement proteins, MP) genes to amplify a 575-bp and a 425-bp viral genome fragment, respectively, following the procedure described by these authors. To confirm the identity of the virus

detected in infected plants, RT-PCR products were purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and were sequenced in both directions with specific primers using the Big Dye Terminator Version 3.1 Cycle Sequencing Kit in a 3100 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Nucleotide sequences were compared by the basic local alignments search tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997) with sequences of MNSV from the National Centre of Biotechnology Information (NCBI), and other sequences were added to the analysis: DQ922807 (ISR isolate from Israel), AB044291 (NH isolate from Japan), AB044292 (NK isolate from Japan), AB232926 (Kochi isolate from Japan), AY330700 (264 isolate from Spain), AY122286 (Malfa 5 isolate from Spain) and D12536 (Dutch isolate from The Netherlands). Sequence alignments were obtained with CLUSTAL X, version 1.83 (Jeanmougin *et al.*, 1998), and the sequence variation (similarity/identity) was calculated with the Matrix Global Alignment Tool (MatGAT), version 2.01 (Campanella *et al.*, 2003).

Identification of *Olpidium bornovanus* by morphology

Root samples were clarified using the method of Jordá *et al.* (2002). Nine centimetres of root were placed in water and observed under a Nikon-YS-100 light microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) to record the presence or absence of the resting spores of *O. bornovanus*. Resting spores of this fungus were smooth-walled with a honeycomb-like pattern (Lange & Insunza, 1977).

Identification of *Olpidium bornovanus* by multiplex PCR and sequence analysis

Root samples were analysed by multiplex PCR to confirm the morphological identity of *O. bornovanus*. Approximately 0.05 g of roots were placed into small plastic bags and ground with a pestle. Total DNA was directly extracted from these preparations using the E.Z.N.A® Plant DNA Miniprep Kit (OMEGA Biotech, Doraville, USA), following the manufacturer's instructions. In order to study the molecular variation of the Panamanian *O. bornovanus* isolates, total DNA was amplified by multiplex PCR with the species-specific primers designed

by Herrera-Vásquez *et al.* (2009a) following the method described by these authors. PCR products were purified and sequenced in both directions with the species-specific primers, as described above. Nucleotide sequences were compared using BLAST with *O. bornovanus* sequences, which are available at the NCBI database: AB205214 (NA isolate) and AB205215 (CH isolate), both isolates from Japan. The alignments and variation (similarity/identity) of the sequences were conducted under the same conditions and with the aforementioned programs.

RESULTS

Identification of MNSV and *Olpidium bornovanus* (survey of 2006)

In 2006, surveys were conducted in 11 commercial melon fields distributed in Regions 1, 2 and 3 in Panama (Fig. 5.1). The results of this survey are summarised in Table 5.1. Typical MNSV infection symptoms were seen only in samples from the fields of Regions 1 and 3. MNSV was discovered in 25% of all the samples analysed by DAS-ELISA from only these regions (Table 5.1). Twelve samples were analyzed by RT-PCR to identify MNSV, and only those that reacted positive in DAS-ELISA were found to be positive by this molecular method. Amplicons of the expected size (650-bp), corresponding to the p42 protein gene of MNSV (CP) were generated from affected plant tissue, but were not produced from either healthy plants or the negative PCR controls (Fig. 5.3).

The *Olpidium* species associated with infected root bait plants were identified by microscopy. Based on resting spore morphology, *O. bornovanus* (Fig. 5.4) was observed in roots of 11 melon plants (91% of all the plants analysed) from all the regions studied (Table 5.2). Multiplex PCR confirmed the morphological identification of *O. bornovanus*. A specific band (977-bp) corresponding to *O. bornovanus* was observed only in those samples in which this fungus was identified by microscopy. No amplified DNA band was observed in any of the control samples, including those of the healthy plants or the water used as negative controls (Fig. 5.5), indicating that this band was diagnostic for *O. bornovanus*.

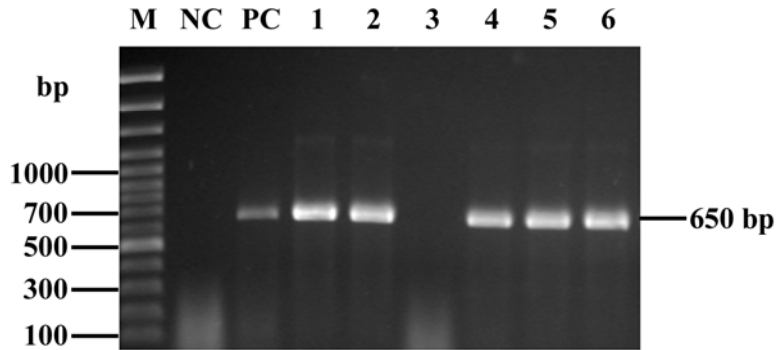


Figure 5.3 RT-PCR amplification of a 650-bp fragment representing the partial sequence of the p42 protein of MNSV (coat protein, CP). Lanes 1 to 6, root samples from field-grown melon plants; NC, Negative control; PC, MNSV-Positive control; M, 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).



Figure 5.4 Resting spores of *Olpidium bornovanus*. 40× magnifier.

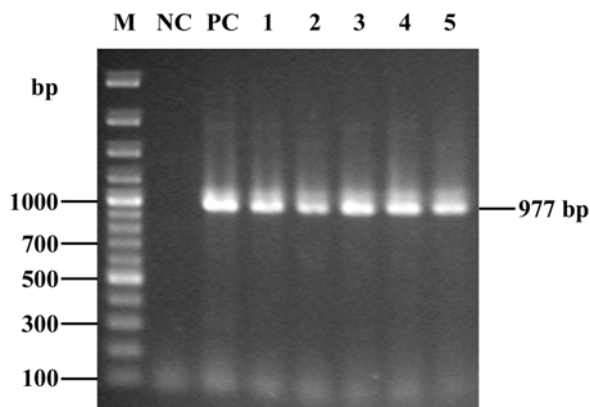


Figure 5.5 Multiplex PCR amplification of a 977-bp fragment representing the partial sequence of the *Olpidium bornovanus* rDNA-ITS region. Lanes 1 to 5, root samples from infected bait melon plants. NC, Negative control; PC, *O. bornovanus*-Positive control; M, 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Identification of MNSV, *Olpidium bornovanus* and mosaic viruses (survey of 2008)

In 2008, surveys were conducted in 26 commercial cucurbit fields from all the regions in which cucurbits are field-grown in Panama (Fig. 5.1). Apart from MNSV and *O. bornovanus*, mosaic viruses including CMV, SqMV, PRSV, WMV and ZYMV were analysed in 31 cucurbit samples from these fields. Twenty-eight plants (90% of all the cucurbit samples collected) from 23 fields (88% of all the fields surveyed) showed symptoms of virus infection. The occurrence of viruses in the samples and fields of commercially grown cucurbit plants is shown in Table 5.1. In melon, ZYMV was the most prevalent virus and was found in 33% of all the samples analysed, followed by PRSV (26%), WMV (26%) and MNSV (13%). PRSV and WMV were distributed in three regions, while ZYMV and MNSV were distributed in only Region 1. In watermelon, PRSV was the most common virus and was found in 46% of all the samples analysed, followed by WMV (15%) and ZYMV (15%). PRSV was distributed in four regions, while WMV and ZYMV were distributed in one and two region(s), respectively. MNSV was not found in this cucurbit species.

Table 5.1 Occurrence and distribution of MNSV (surveys of 2006 and 2008) and mosaic viruses (survey of 2008) as determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on cucurbit samples with virus-like symptoms

Year of survey	Crop	Region	Fields ^a	No. samples analyzed	ELISA detection ^b										% single infections ^c	% double infections ^c
					MNSV	CMV	SqMV	PRSV	WMV	ZYMV	Negative					
2006	Melon	1. Los Santos	2/7	8	2 (2)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6	100	0		
		2. Herrera	0/3	3	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	100	0		
		3. Coeló	1/1	1	1 (1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	100	0		
		Subtotal	3/11	12	3 (3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9	100	0		
		Total														
2008	Melon	1. Los Santos	4/4	6	2 (2)	0	0	0	0	0	5 (4)	1	60	40		
		2. Herrera	2/2	2	0	0	2 (2)	1 (1)	0	0	0	0	50	50		
		3. Coeló	0/1	2	0	0	0	0	1 (1)	0	0	1	100	0		
		4. Veraguas	1/1	1	0	0	1 (1)	0	0	0	0	0	100	0		
		5. Chiriquí	3/3	4	0	0	1 (1)	2 (2)	0	0	1	1	100	0		
Subtotal	10/11	15	2 (2)	0	4 (4)	4 (4)	0	3	5 (4)	3	75	25				
Watermelon		1. Los Santos	1/1	1	0	0	0	0	0	0	1 (1)	0	100	0		
		2. Herrera	2/2	3	0	0	1 (1)	0	0	0	2	0	100	0		
		3. Coeló	2/2	2	0	0	1 (1)	0	0	0	1	0	100	0		
		4. Veraguas	4/4	4	0	0	1 (1)	2 (2)	0	0	1 (1)	1	67	33		
		5. Chiriquí	3/3	3	0	0	3 (3)	0	0	0	0	0	100	0		
Subtotal	12/12	13	0	0	6 (6)	2 (2)	0	4	2 (2)	4	89	11				
Squash		1. Los Santos	1/1	1	0	0	0	1 (1)	0	0	1 (1)	0	0	100		
		3. Coeló	0/1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
		4. Veraguas	0/1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
		Subtotal	1/3	3	0	0	1 (1)	0	1 (1)	0	1 (1)	2	0	100		
		Total														
Total			23/26	31	2 (2)	0	0	11 (11)	6 (6)	8 (7)	9	55	45			

^aFields with plants showing virus-like symptoms/fields surveyed.

^bNumber of plants found to be positive. The number of fields from which positive samples were collected is provided in parentheses; ND= not determined.

^cPercentage was calculated over the total number of virus-infected plants.

For squash, both PRSV and ZYMV were found in 33% of all the samples analysed, and both viruses were detected in only Region 1. WMV and MNSV were not detected in this cucurbit species. CMV and SqMV were not detected in any of the melon, watermelon or squash samples analysed in this study (Table 5.1).

On the other hand, PRSV, ZYMV, WMV and MNSV were found in 11 (42%), 7 (26%), 6 (23%) and 2 (7%) of the fields surveyed of all the cucurbits and regions studied, respectively (Table 5.1). Seventeen fields (65% of all the fields surveyed) were infected with at least one of these viruses. Single infections were prevalent in each region and accounted for 75% and 89% of virus-infected melon and watermelon plants, respectively. Double infections (ZYMV + PRSV; ZYMV + MNSV; PRSV + WMV) were the only mixed infections found in Regions 1, 2 and 4, and accounted for 25%, 11% and 100% of virus-infected melon, watermelon, and squash plants, respectively. Furthermore, six melon and watermelon samples from these symptomatic plants were found to be healthy for all six antisera. These healthy samples originate from all the regions studied. Three plants (one melon plant from Region 3 and two squash plants from Regions 3 and 4), in which no virus symptoms were observed, were negative for all the viruses analysed (Table 5.1).

Additionally, only the resting spores of *O. bornovanus* (Fig. 5.4) were observed when roots were examined microscopically. Only 2 melon plants (11% of all the plants analysed) from Regions 1 and 2 proved positive by resting spores morphology (Table 5.2). The roots of cucurbit plants were also analysed by multiplex PCR to evaluate whether these plants were infected with *Olpidium* species. Only *O. bornovanus* was detected by multiplex PCR in the same melon plants which proved positive by morphology. No amplified DNA band was observed in the negative controls (Fig. 5.5).

Table 5.2 Occurrence and distribution of *Olpidium bornovanus* as determined by resting spores morphology on cucurbit samples collected from the fields surveyed in 2006 and 2008

Year of survey	Soil				Morphological identification ^b	
	Original host	Region	Fields	Bait plant ^a	<i>O. bornovanus</i>	Negative
2006	Melon	1. Los Santos	7	8	7 (6)	1
		2. Herrera	3	3	3 (3)	0
		3. Coclé	1	1	1 (1)	0
		Total	11	12	11 (10)	1
2008	Melon	1. Los Santos	3	3	1 (1)	2
		2. Herrera	2	2	1 (1)	1
		3. Coclé	1	1	0	1
		4. Veraguas	1	1	0	1
		5. Chiriquí	1	1	0	1
		Subtotal	8	8	2 (2)	6
	Watermelon	1. Los Santos	1	1	0	1
		2. Herrera	2	2	0	2
		3. Coclé	2	2	0	2
		4. Veraguas	1	1	0	1
		5. Chiriquí	2	2	0	2
	Subtotal	8	8	0	8	
	Squash	3. Coclé	1	1	0	1
Subtotal		1	1	0	1	
Total			17	17	2 (2)	15

^aBait plants are equal to the original host (homologous host). The number of bait plants analyzed corresponds to the number of soil samples collected in the fields.

^bNumber of plants found to be positive. The number of fields from which the positive samples were collected is provided in parentheses.

Molecular analysis of the variation of MNSV and *Olpidium bornovanus*

The nucleotide sequences of the represented overlapping portion of p29 and p89 (RdRp, 539 nt), the entire p7A (MP, 198 nt) and p7B (MP, 186 nt), and the represented non-overlapping portion of the p42 (CP, 591 nt) proteins, were determined for 3 MNSV isolates (PA-1, PA-2, PA-3) from all the regions where this virus was detected. These genomic regions were chosen to represent the viral genes which encode proteins with distinct functions. Sequences were compared with seven MNSV sequences from the NCBI database. The percentage of nucleotide similarity/identity for the coding region among isolates ranged from

67.2–99.5 to 66.8–99.5 in ORFs (data not shown). The amino acid similarities/identities of proteins for p29/p89 (179 aa), p7A (65 aa), p7B (61 aa) and p42 (196 aa) were 78.2–100/60.3–99.4, 90.8–100/84.6–100, 85.2–100/75.4–100, 89.8–100/78.6–100, respectively (Table 5.3). The comparisons made of the amino acid-deduced sequences for the MNSV isolates showed that most non-conservative changes occur in p29/p89 and p7B, and are less abundant in p7A and p42.

The rDNA-ITS region was determined in four *O. bornovanus* isolates (PA-O1, PA-O2, PA-O3, PA-O4) from all the regions in which this fungus was found. Sequences were compared with the two unique *O. bornovanus* sequences published in the NCBI database. In all cases, the obtained DNA sequence was as expected. The sequence nucleotide similarity/identity among the isolates was 97.5–100.0%/97.1–100.0% in the genome region studied.

Table 5.3 Percentage of amino acid identity (above the diagonal) and similarity (below the diagonal) in the p29, p89, p7A, p7B and p42 proteins by two-way comparisons between the isolates of *Melon necrotic spot virus* obtained in this work (PA-1, PA-2, PA-3) and the isolates in the NCBI database

Isolate	p29/p89									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. PA-1		97.8	98.3	96.1	88.3	97.8	97.2	96.6	95.5	62.6
2. PA-2	98.3		99.4	97.2	89.4	98.9	97.2	96.6	95.5	62.6
3. PA-3	98.3	100.0		97.8	89.4	99.4	97.8	97.2	96.1	63.1
4. 264	97.8	99.4	99.4		88.3	98.3	96.6	97.2	96.1	62.0
5. Malfa5	95.0	96.6	96.1	95.5		89.9	89.9	90.5	89.9	60.3
6. Dutch	98.3	100.0	100.0	99.4	96.1		98.3	97.8	96.6	62.6
7. ISR	97.8	98.3	98.3	97.8	95.5	98.3		97.2	96.1	62.6
8. NK	98.3	98.9	98.9	98.3	96.6	98.9	98.3		98.9	62.0
9. NH	97.8	98.3	98.3	97.8	96.6	98.3	97.8	99.4		61.5
10. Kochi	78.8	79.9	79.9	79.9	78.2	79.9	79.3	79.9	79.9	

Isolate	p7A									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. PA-1		100.0	100.0	98.5	93.8	98.5	98.5	98.5	100.0	86.2
2. PA-2	100.0		100.0	98.5	93.8	98.5	98.5	98.5	100.0	86.2
3. PA-3	100.0	100.0		98.5	93.8	98.5	98.5	98.5	100.0	86.2
4. 264	98.5	98.5	98.5		92.3	96.9	96.9	96.9	98.5	84.6
5. Malfa5	95.4	95.4	95.4	93.8		92.3	95.4	92.3	93.8	86.2
6. Dutch	98.5	98.5	98.5	96.9	93.8		96.9	96.9	98.5	84.6
7. ISR	98.5	98.5	98.5	96.9	96.9	96.9		96.9	98.5	84.6
8. NK	98.5	98.5	98.5	96.9	93.8	96.9	96.9		98.5	84.6
9. NH	100.0	100.0	100.0	98.5	95.4	98.5	98.5	98.5		86.2
10. Kochi	92.3	92.3	92.3	90.8	90.8	90.8	90.8	90.8	92.3	

Isolate	p7B									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. PA-1		98.4	96.7	98.4	93.4	96.7	100.0	100.0	100.0	82.0
2. PA-2	100.0		98.4	96.7	91.8	95.1	98.4	98.4	98.4	80.3
3. PA-3	100.0	100.0		96.7	90.2	95.1	96.7	96.7	96.7	78.7
4. 264	98.4	98.4	98.4		91.8	98.4	98.4	98.4	98.4	80.3
5. Malfa5	96.7	96.7	96.7	95.1		90.2	93.4	93.4	93.4	75.4
6. Dutch	98.4	98.4	98.4	100.0	95.1		96.7	96.7	96.7	78.7
7. ISR	100.0	100.0	100.0	98.4	96.7	98.4		100.0	100.0	82.0
8. NK	100.0	100.0	100.0	98.4	96.7	98.4	100.0		100.0	82.0
9. NH	100.0	100.0	100.0	98.4	96.7	98.4	100.0	100.0		82.0
10. Kochi	88.5	88.5	88.5	86.9	85.2	86.9	88.5	88.5	88.5	

Isolate	p42									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. PA-1		99.5	99.5	99.0	95.4	98.0	98.5	99.5	99.0	81.1
2. PA-2	99.5		100.0	98.5	95.9	97.4	98.0	99.0	98.5	81.1
3. PA-3	99.5	100.0		98.5	95.9	97.4	98.0	99.0	98.5	81.1
4. 264	99.5	99.0	99.0		95.9	96.9	99.0	99.0	98.5	80.6
5. Malfa5	97.4	98.0	98.0	97.4		94.4	95.4	95.4	95.4	78.6
6. Dutch	99.0	98.5	98.5	98.5	97.4		96.4	97.4	96.9	80.1
7. ISR	99.5	99.0	99.0	99.5	96.9	98.5		98.5	98.0	80.1
8. NK	100.0	99.5	99.5	99.5	97.4	99.0	99.0		99.5	80.6
9. NH	99.5	99.0	99.0	99.0	97.4	98.5	98.5	99.5		80.1
10. Kochi	91.3	91.3	91.3	90.8	90.8	89.8	90.8	91.3	90.8	

The sequences obtained in this work for the MNSV isolates have been submitted to the NCBI database under accession numbers GQ228388, GQ228387, GQ228386 (PA-1 isolate); FJ619628, FJ621516, FJ621529 (PA-2 isolate); FJ619629, FJ621517, DQ443546 (PA-3 isolate). The PA-01, PA-02 and PA-03 isolates showed the same nucleotide sequence in relation to *O. bornovanus*. Therefore, only one sequence has been submitted to the NCBI database, GQ228389 (PA-01 isolate), while the sequence of the PA-04 isolate of *O. bornovanus* has been submitted under accession number GQ228390.

DISCUSSION

The occurrence and distribution of MNSV changed from 2006 to 2008 in the cucurbit-growing regions of Panama, and a similar situation was also observed in Spain (Kassem *et al.*, 2007). MNSV was detected in the growing season of 2006 in melon samples from Regions 1 and 3, while this virus was detected in only Region 1 in the growing season of 2008. This is probably because most of the samples collected in 2008 did not show typical MNSV symptoms. In the cucurbit-growing regions of Panama, the temperature range varies between 26°C

and 30°C all year long. Therefore, the absence of symptoms may be due to the incidence of plants expressing systemic symptoms caused by MNSV being greater at temperatures less than 20°C (Kido *et al.*, 2008). However, MNSV was not detected in any of the watermelon and squash samples analysed in our study, which is likely to be due to the small number of samples analysed. A larger number of samples should be tested in a future study to confirm the absence of this virus in these cucurbit species from Panama because MNSV infections were detected in squash in previous studies by Kassem *et al.* (2007), but at much lower rate than in melon (only one infected sample of the 224 squash samples (0.4%) analysed). Interestingly, *O. bornovanus* is found in all the study regions where MNSV was detected in both growing seasons. Therefore, although MNSV is not detected in all the regions, its incidence may increase given the presence of the fungal vector *O. bornovanus* in soil.

Apart from MNSV and *O. bornovanus*, we analysed melon, squash, and watermelon samples in the growing season of 2008 to determine the occurrence and distribution of other cucurbit viruses: CMV, SqMV, PRSV, WMV and ZYMV. The data of this study show that PRSV is the most prevalent and widespread virus in most of the study regions. Previous studies by García (1997) found that PRSV was the most prevalent virus among the four viruses (CMV, SQMV, WMV and ZYMV) present in Panamanian melons from Region 1. Other studies by Fernández (1987) indicated that the incidence of PRSV was high (80% to 90%) in cucurbits from this region, which could result in yield losses of more than 75%. However, our study is the first to show the occurrence and distribution of cucurbit viruses in all the regions in which cucurbits are field-grown in Panama. The cucurbits of most of the regions studied in the present work are also infected by ZYMV and WMV, which are the second and third most widespread viruses, respectively, in infected plants found in this work. The data provided here indicate that CMV and SqMV are detected in neither the cucurbit species nor the regions studied, which is probably due to the small number of samples analysed. However, both viruses have been previously detected in Panamanian melons (García, 1997). In addition, our study often shows double infections (ZYMV + PRSV; ZYMV + MNSV; PRSV + WMV), which could have a significant effect on yields since synergistic effects have been reported between these viruses (Poolpol & Inouye, 1986). These infections have also been observed in Spain (Kassen *et al.*, 2007). Some samples that show virus-like

symptoms do not react with the six antisera used in the serological tests. This could be explained by the presence of other mosaic-causing agents, such as *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV, genus *Tobamovirus*). Therefore, we may suspect the presence of either CGMMV or other mosaic viruses, and this matter should be further investigated.

Since genetic variability reports are lacking for *Carmoviruses* (Cañizares *et al.*, 2001), we also chose the p29, p89, p7A, p7B, and p42 protein genes of MNSV to study the molecular variation of the Panamanian isolates characterized in this study. These isolates were apparently separated geographically. The PA-2 and PA-3 isolates sporadically occur in Region 1 and, in each case, isolates have almost the same genomic sequence (they share at least 97% of the nucleotides in the whole genomic regions analysed) and they probably share a common origin. However, the PA-1 isolate from Region 3 shares at least 91% of the nucleotides with these isolates. This isolate also shows a 100% nucleotide sequence similarity/identity with the MNSV sequence obtained in seedlings grown from the commercial melon seed by Herrera-Vásquez *et al.* (2009b). This strongly suggests that the PA-1 isolate spreads by seeds because the aforementioned authors recently reported a very high MNSV transmission rate by seeds which may become endemic in melon-growing areas where it persists for long periods in association with its soilborne fungal vector, *O. bornovanus* (Kubo *et al.*, 2005). Campbell *et al.* (1996) used the term vector-assisted seed transmission (VAST) because the vector plays an important role in seed transmission. Additionally, we also observed how the genomic regions corresponding to p29/p89 and p7B are apparently more prone to variation than those corresponding to p7A and p42. Stronger genetic and/or functional constraints may limit variability (Díaz *et al.*, 2003).

Our data also suggest that the DNA sequence variation within *O. bornovanus* does not appear to be highly variable in terms of space. Three melon isolates of this fungus, PA-O1, PA-O2, and PA-O3, from Regions 3, 2, and 1, respectively, show a 100% nucleotide sequence similarity/identity. However, the PA-O4 isolate from Region 1 shares at least 97% of the nucleotides with these isolates. Similar results were obtained by Sasaya & Koganezawa (2006) for *O. bornovanus* of melon and other *Olpidium* species of non-cucurbit species at various sites in Japan, where no significant differences were observed at the nucleotide level in terms of geographical locations.

Future research into the relationships involved in the transmissibility of the different MNSV isolates by the *O. bornovanus* isolates characterised in this work may well be necessary, as may the molecular variation of a large number of MNSV and *O. bornovanus* isolates from cucurbit crops associated with each geographical location examined in this study. The two yearly surveys of field-grown cucurbits in Panama revealed that MNSV infection is of special concern in Regions 1 and 3, while its fungal vector, *O. bornovanus*, for occurs in Regions 1, 2 and 3. In contrast, mosaic virus infections are of special concern in all Panamanian regions. Therefore, the data reported herein provide essential basic information to establish a basis to control viral epidemics in Panamanian cucurbits.

ACKNOWLEDGEMENTS

José Ángel Herrera-Vásquez was supported by a predoctoral fellowship from the Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID, Spain, 2004–2007 period), and the Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos and the Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (IFARHU-SENACYT, Panama, 2007–2010 period). We thank the Dirección Nacional de Sanidad Vegetal-Ministerio de Desarrollo Agropecuario (DNSV-MIDA, Panama) for its technical and economical assistance in part of the work sampling.

REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J, 2003. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* **4**, 29–33.
- Campbell RN, Sim ST, Lecoq H, 1995. Virus transmission by host-specific strains of *Olpidium bornovanus* and *Olpidium brassicae*. *European Journal of Plant Pathology* **101**, 273–282.

- Campbell RN, Wipf-Scheibel C, Lecoq H, 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology* **86**, 1294–1298.
- Cañizares MC, Marcos JF, Pallás V, 2001. Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of *Carnation mottle virus* (CarMV) and phylogenetic relationships within the *Tombusviridae* family. *Archives of Virology* **146**, 2039–2051.
- Díaz JA, Bernal JJ, Moriones E, Aranda MA, 2003. Nucleotide sequence and infectious transcripts from a full-length cDNA clone of the Carmovirus *Melon necrotic spot virus*. *Archives of Virology* **148**, 599–607.
- FAO, 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Base de datos estadísticos* (Online Database). URL: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (24-agosto-2008).
- Fernández O, 1987. Enfermedades de algunos cultivos importantes en Panamá. In: *Curso de áfidos*. Panamá: CATIE-UP-IDIAP, p. 45–50.
- Franken AAJM, Maat DZ, Kamminga GC, 1990. Detection of *Squash mosaic virus* in seeds of melon (*Cucumis melo*) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *European Journal of Plant Pathology* **96**, 91–102.
- García JC, 1997. Evaluación de estrategias para el manejo integrado de virosis en melón de exportación (*Cucumis melo* L.). *Trabajo Final de Carrera*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá. Panamá, 76 p.
- Herrera JA, Cebrian MC, Jordá C, 2006a. First report of *Melon necrotic spot virus* in Panama. *Plant Disease* **90**, 1261.
- Herrera JA, Osorio JM, Salazar LC, Fernández O, 2006b. Hospedantes de los potyvirus del melón (*Cucumis melo* L.) en la provincia de Los Santos, Panamá. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **32**, 95–107.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Jordá C, 2008. *Melon necrotic spot virus* (MNSV): nuevo virus en el cultivo de melón en Panamá. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* **79–80**, 40–48.

- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Córdoba-Sellés MC, Jordá C, 2009a. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. *Mycological Research* **113**, 602–610.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2009b. Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of seed-disinfection treatments. *Plant Pathology* **58**, 436–442.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Rosselló JA, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2009c. Genetic diversity of *Melon necrotic spot virus* and *Olpidium* isolates from different origins. *Plant Pathology*, Accept (05-Jun-2009).
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gibson TJM, Gouy M, Higgins DG, 1998. Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 403–405.
- Jordá C, Armengol J, Gisbert J, Osca JM, Lacasa A, Velásquez B, 2002. El tratamiento con microondas para la desinfección de suelos. *PHYTOMA-Spain* **138**, 118–121.
- Kassem MA, Sempere RN, Juárez M, Aranda MA, Truniger V, 2007. *Cucurbit aphid-borne yellows virus* is prevalent in field-grown cucurbits crops of southeastern Spain. *Plant Disease* **91**, 232–238.
- Kido K, Tanaka C, Mochizuki T, Kubota K, Ohki T, Ohnishi J, Knight LM, Tsuda S, 2008. High temperatures active local viral multiplication and cell-to-cell movement of *Melon necrotic spot virus*, but restrict expression of systemic symptoms. *Phytopathology* **98**, 181–186.
- Kubo C, Nakazono-Nagaoka E, Hagiwara K, Kajihara H, Takeuchi S, Matsuo K, Ichiki TU, Omura T, 2005. New severe strains of *Melon necrotic spot virus*: symptomatology and sequencing. *Plant Pathology* **54**, 615–620.
- Lange L, Insunza V, 1977. Root inhabiting *Olpidium* species: the *O. radiale* complex. *Transactions of the British Mycological Society* **69**, 377–384.
- MIDA, 2008. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Dirección Nacional de Agricultura, Programa Nacional de Cucurbitáceas, Panamá.
- Nameth ST, Dodds JA, Paulus AO, Laemmlen FF, 1986. Cucurbit viruses of California. *Plant Disease* **70**, 8–12.
- Pirone TP, Harris KF, 1970. Nonpersistent transmission of plant viruses by aphids. *Annual Review of Phytopathology* **15**, 55–73.

- Poolpol P, Inouye T, 1986. Enhancement of *Cucumber mosaic virus* multiplication by *Zucchini yellow mosaic virus* in double infected cucumber plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **52**, 22–30.
- Provvidenti R, 1996. Diseases caused by viruses. In: Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE, eds. *Compendium of Cucurbit Diseases*. American Phytopathological Society Press. Saint Paul, Minnesota: USA, p. 37–45.
- 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**, 20–25.
- Sharma YR, Chohan JS, 1974. Transmission of cucumis viruses 1 and 3 through seeds of cucurbits. *Indian Phytopathology* **26**, 596–598.
- Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H, Wipf-Scheibel C, Marrakchi M, Lecoq H, 2008. First report of *Melon necrotic spot virus* on melon in Tunisia. *Plant Pathology* **57**, 386.

Capítulo 7

Capítulo 7

First report of *Melon necrotic spot virus* in Panama

J. A. Herrera-Vásquez, M. C. Cebrián and C. Jordá

Plant Disease **90**, 1261 (2006)

Melon (*Cucumis melo* L.) represents an important crop in Panama where 1,449 ha were cultivated in 2005 with 920.4 ha of this crop planted in Los Santos Province (southeast region of Panama). During April 2005 and January 2006, several melon plants in commercial fields in that area showed stem necrosis at the crown level, and less frequently, small necrotic spots on leaves. In some cases, wilting and plant death were observed. Symptoms were similar to those caused by the carmovirus *Melon necrotic spot virus* (MNSV). Cysts of *Olpidium bornovanus* also were observed in the roots of all affected melon plants. Roots from eight symptomatic plants collected in seven fields were positive using double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) with an antiserum specific for MNSV (BIO-RAD, Life Sciences, Barcelona, Spain). To confirm these results, total RNA was extracted from symptomatic plants and used in one-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with Platinum *Taq* (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, Spain). MNSV specific primers designed to amplify a region of the coat protein gene were used in the assays. Amplicons of the expected size (651 bp) were generated from symptomatic plant tissue, but were not produced from healthy plants or the water used as negative controls. To establish the authenticity of this virus, RT-PCR products were purified with the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and directly sequenced. Nucleotide sequences were analyzed by using the basic local alignment search tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997). The primers produced two amplicons with different but similar sequences. One sequence (GenBank accession No. DQ443546) showed 92% identity to the coat protein gene of the MNSV Spanish isolate (GenBank accession No. AY330700) and the MNSV Dutch isolate (GenBank accession No.

M29671) and 88% identity to the Japanese isolate (GenBank accession No. AB189944). The second sequence (GenBank accession No. DQ443547) was 93% identical with the Spanish and Dutch MNSV isolates, 88% identical with the Japanese isolate, and 100% identical with sequences from commercial melon seed previously isolated in our laboratory (GenBank accession No. DQ443545). Infected seed may be a concern with regard to long distance spread of the virus independent of the vector (Campbell *et al.*, 1996) and should be considered in disease management strategies. MNSV has been previously reported in Japan, the Netherlands, the United Kingdom, the United States (Brunt *et al.*, 1996), Guatemala (Jordá *et al.*, 2005), Mexico, Honduras, and Uruguay (C. Jordá, *unpublished*). To our knowledge, this is the first report of MNSV in Panama.

REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ, eds, 1996. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database* (Online Database). URL: <http://www.image.fs.uidaho.edu/vide/> (24-agosto-2008).
- Campbell RN, Wipf-Scheibel C, Lecoq H, 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology* **86**, 1294–1298.
- Jordá C, Font MI, Martínez-Culebras P, 2005. Viral etiology of diseases detected in melon in Guatemala. *Plant Disease* **89**, 338.

Capítulo 8

Capítulo 8

***Melon necrotic spot virus* (MNSV): nuevo virus en el cultivo de melón en Panamá**

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

Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)

79–80, 40–48 (2008)

RESUMEN

Recientemente se detectó en Panamá una nueva enfermedad en el melón causada por la infección de un *Carmovirus*, el virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV). En abril de 2005 y enero de 2006, se detectaron en campos comerciales plantas de melón con estrías necróticas en cuello y tallo y, menos frecuentemente, manchas necróticas en las hojas. En algunos casos, se observó marchitez y muerte de las plantas. La distribución de la enfermedad se ha estudiado en campos de melón de las provincias de Coclé y Los Santos, en la región central y sureste de Panamá, respectivamente. En el 91.6% de las muestras de suelo analizadas, procedentes de los campos de melón de estas provincias, se detectó la presencia de *Olpidium bornovanus*, hongo vector del MNSV. La identificación del virus se llevó a cabo mediante serología (DAS-ELISA), y los resultados obtenidos fueron confirmados mediante RT-PCR y posterior secuenciación. Las secuencias nucleotídicas obtenidas (GenBank accession Nos. DQ443546 y DQ443547) fueron comparadas con otras secuencias publicadas en el NCBI GenBank. El presente es el primer estudio sobre la distribución del MNSV en Panamá.

Palabras clave: *Cucumis melo*, *Carmovirus*, ELISA, RT-PCR, *Olpidium bornovanus*

ABSTRACT

Melon necrotic spot virus (MNSV): A new virus in melon crop in Panama. A new melon disease has been recently detected in melon in Panama, caused by the Carmovirus *Melon necrotic spot virus* (MNSV). During April 2005 and January 2006, several melon plants in commercial fields showed stem necrosis at the crown level and, less frequently, necrotic spots on leaves. In some cases, wilting and plant death were observed. The disease distribution has been reported in melon fields in Cocle and Los Santos provinces, in the Central and Southeast regions of Panama, respectively. Moreover, 91.6% of the soil samples analysed from fields of these provinces showed the presence of the fungus *Olpidium bornovanus*, the vector of MNSV. The identification of MNSV was carried out by serology (DAS-ELISA) and the results were confirmed by RT-PCR. In order to establish the authenticity of this virus, RT-PCR products were purified and directly sequenced. These sequences (GenBank accession Nos. DQ443546 and DQ443547) were compared with other sequences published in the NCBI GenBank. This is the first report of the MNSV distribution in Panama.

Keywords: *Cucumis melo*, Carmovirus, ELISA, RT-PCR, *Olpidium bornovanus*

INTRODUCCIÓN

El melón (*Cucumis melo* L.) representa un importante cultivo en Panamá, con una extensión de 1449 ha cultivadas en 2005, ocupando la provincia de Los Santos, en la región sureste de Panamá, el 63.5% de la superficie total cultivada del país (MIDA, 2005). Otras importantes áreas productoras de melón de exportación en Panamá se concentran en las provincias de Coclé y Herrera, en la región central y sureste del país, respectivamente.

Las pérdidas directas por rechazo de la fruta para su venta en el mercado exterior ascienden al 16% pero, además, existen otras pérdidas indirectas debido a la fruta que queda en el campo sin recolectar y que se estima en el 24%. Uno de los principales factores de rechazo es el daño ocasionado por enfermedades virales (MIDA, 1998).

En Panamá, los primeros síntomas de la enfermedad causada por el *Melon necrotic spot virus* (MNSV; Fig. 6.1: A, B) se observaron en el año 2005, en campos de melón del área de Los Santos. Las plantas presentaban estrías necróticas en cuello y tallo y, en ocasiones, manchas necróticas en las hojas. En algunos casos, se observó marchitez y muerte de las plantas. En el año 2006 se identificó al agente causal de ésta sintomatología (Herrera *et al.*, 2006).



Figura 6.1 Sintomatología del MNSV en melón. Estrías necróticas en tallo de planta de melón de campo (A) y manchas necróticas en hojas cotiledonares de melón (B).

El MNSV es un patógeno común en melón, pepino y sandía en cultivo protegido (Tomlinson y Thomas, 1986), pero también ha sido relacionado con problemas aparecidos en cultivo al aire libre (Hibi y Furuki, 1985; Avgelis, 1989; Jordá *et al.*, 2005). El MNSV, una de las especies pertenecientes al género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae* (Riviere y Rochon, 1990), está constituido de RNA monocatenario de polaridad positiva [(+) ssRNA], unipartito y lineal, y se presenta al microscopio electrónico en forma de partículas isométricas de ~30 nm de diámetro (Riviere y Rochon, 1990).

Este virus ha sido citado en América, Japón, y Europa (Brunt *et al.*, 1996; Herrera-Vásquez *et al.*, 2007), y recientemente en Túnez (Yakoubi *et al.*, 2008) y China (Gu *et al.*, 2008).

Esta enfermedad fue asociada únicamente a cultivos protegidos y posteriormente comenzó a detectarse también al aire libre; desde entonces, se ha extendido considerablemente, llegando a constituir un factor limitante para la producción de melón si se presentan condiciones ambientales favorables para su desarrollo (Juárez *et al.*, 1994).

Los hospedantes naturales del MNSV están restringidos a especies de la familia *Cucurbitaceae* (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979). Este virus es transmitido de forma natural por semilla en melón (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979) y por el hongo quítrido *Ospidium bornovanus* (Sahtiyanci) Karling (Campbell *et al.*, 1996). Experimentalmente es fácilmente transmisible de forma mecánica, estando citada en Francia la transmisión mecánica durante la poda y por contacto entre hojas (Blancard *et al.*, 1991). El MNSV sobrevive en las esporas de resistencia de *O. bornovanus* durante años; por lo tanto, sin excluir la transmisión por semilla, el inóculo del hongo que queda en el suelo podría ser la causa de la ineficacia de las desinfecciones para luchar contra la virosis (Gómez *et al.*, 1993). La transmisión por semilla puede proporcionar un mecanismo para mantener el virus, probablemente por varios años, además de transportarlo a largas distancias independientemente del vector (Campbell, 1996; Campbell *et al.*, 1996).

En el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos: (i) identificar el agente causal de la sintomatología observada inicialmente en 2005 en cultivos de melón de la provincia de Los Santos; (ii) determinar la distribución del MNSV en las principales áreas productoras de melón de exportación en Panamá; y (iii) determinar la presencia y distribución del hongo vector del virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreos de melón: localización geográfica del estudio

En abril de 2005 y enero de 2006 se realizaron prospecciones en campos de melón de exportación de las provincias de Los Santos, Coclé y Herrera (Panamá) (Fig. 6.2, Tabla 6.1).

Los campos prospectados se georreferenciaron con un Sistema de Posicionamiento Global (GPS) portátil MAGELLAN SporTrak. Se obtuvieron datos de latitud, longitud, y altitud en todos los campos muestreados. Estos datos fueron analizados y mapeados con el programa ArcGIS® 9 ArcMAP™ versión 9.1 (1999–2005, disponible en <http://www.geographynetwork.com/explorer/explorer.jsp?mode=arcmapi>).

Se recolectaron muestras de raíces y cuello de plantas de melón que mostraban o no los síntomas típicos del MNSV: estrías necróticas en cuello y

tallo, marchitez y muerte de las plantas. Dichas muestras fueron conservadas a – 20°C hasta su análisis. También se recolectaron muestras de suelo de la zona del sistema radicular de estas plantas, las cuales fueron secadas al aire durante 1 semana y almacenadas a temperatura ambiente hasta su análisis para determinar la presencia o ausencia de *O. bornovanus*.

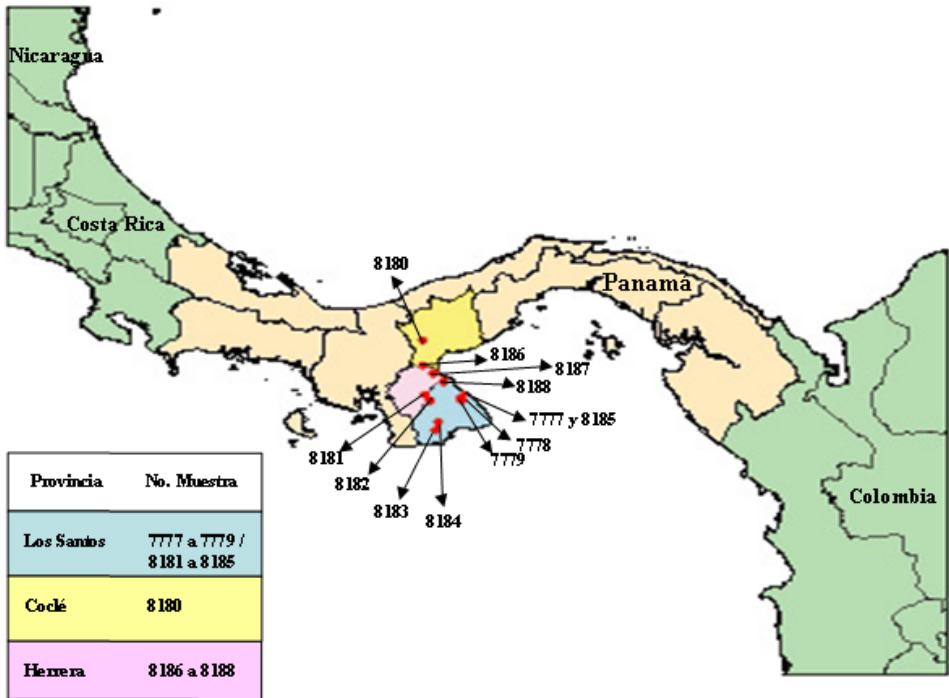


Figura 6.2 Localización geográfica del estudio. El mapeo de los datos obtenidos se realizó con el programa ArcGIS® 9 ArcMAP™ versión 9.1 (1999–2005). Esc.: 1:10,000,000.

Análisis mediante DAS-ELISA

En la detección serológica del virus se utilizó la técnica DAS-ELISA (double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay) según lo descrito por Clark y Adams (1977), utilizando un antisuero comercial específico para el MNSV (Código 355–1467), proporcionado por BIO-RAD (Life Sciences, Montfavet, Francia).

Tabla 6.1 Muestras de melón recolectadas en 2005 y 2006 durante las prospecciones realizadas en campos de melón de exportación de Panamá

No. Muestra	Cultivar de melón	Edad del cultivo	Localidad	Distrito-Provincia	Sistema de Posicionamiento Global (GPS)			Fecha de muestreo
					Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m) ^x	
7777	Galia	102 d.p.t. ^y	El Higuierón	Las Tablas-Los Santos	07044°33N	080014°27O	39	Abril, 2005
7778	Estoril Galia	111 d.p.t.	Palma Grande	Las Tablas-Los Santos	07047°01N	080013°44O	32	Abril, 2005
7779	Solarnet Galia	106 d.p.t.	Palma Chiquita	Las Tablas-Los Santos	07045°46N	080013°22O	36	Abril, 2005
8180	Solarnet Tam Dew Improved	36 d.p.s. ^z	Cumbirilla	Olá-Coelé	08025°58N	080034°43O	59	Enero, 2006
8181	Tam Dew Improved	41 d.p.s.	Chupá	Macaracas-Los Santos	07048°32N	080034°32O	98	Enero, 2006
8182	Tam Dew Improved	33 d.p.s.	Botello	Macaracas-Los Santos	07044°17N	080031°39O	97	Enero, 2006
8183	Tam Dew Improved	20 d.p.s.	El Joaquín	Tonosí-Los Santos	07029°37N	080026°39O	50	Enero, 2006
8184	Tam Dew Improved	23 d.p.s.	Buenos Aires	Tonosí-Los Santos	07023°39N	080028°45O	55	Enero, 2006
8185	Galia Solarnet	10 d.p.t.	Palma Grande	Las Tablas-Los Santos	07047°01N	080013°44O	32	Enero, 2006
8186	Tam Dew Improved	27 d.p.s.	El Torno	Santa María-Herrera	08008°28N	080035°24O	16	Enero, 2006
8187	Tam Dew Improved	65 d.p.s.	Los Gurullos	Parita-Herrera	08002°33N	080030°19O	30	Enero, 2006
8188	Tam Dew Improved	35 d.p.s.	Juan Gómez	Chitré-Herrera	07057°19N	080024°15O	19	Enero, 2006

Notas: ^xm.s.n.m., metros sobre el nivel del mar; ^yd.p.t., días post-transplante; ^zd.p.s., días post-siembra.

Se tapizaron placas de poliestireno (NUNCTM Maxisorp) con 100 μ L por pocillo del anticuerpo IgG del MNSV diluido en 50 mM de tampón carbonato pH 9.6, incubadas por 2 h a 37°C, y lavadas 3 veces durante 3 min con tampón 1 \times PBS-T pH 7.4, con 0.8% NaCl y 0.05% Tween-20. Las raíces y el cuello de las plantas de melón fueron maceradas en proporción 1:10 (p/v) en tampón de extracción 1 \times PBS-T pH 7.4, con 2% de polivinilpirrolidona (PVP). Se emplearon controles positivos (Código 355–1905) y negativos (Código 355–1959) para el MNSV, proporcionados por BIORAD (Life Sciences, Montfavet, Francia), además de tampón 1 \times PBS-T como blanco. Alícuotas de 100 μ L del extracto de cada muestra y de los controles fueron añadidas en cada pocillo. Se colocaron 2 repeticiones de cada una de las muestras, incluyendo los controles. Las placas fueron incubadas toda la noche a 4°C, y lavadas 3 veces durante 3 min con tampón de lavado. Posteriormente, las placas fueron incubadas por 2 h a 37°C con 100 μ L por pocillo de IgG del MNSV conjugado con fosfatasa alcalina diluido en tampón 1 \times PBS-T pH 7.4, con 0.2% de albúmina de suero bovino (BSA) y 2% de PVP. Las placas se lavaron nuevamente de la manera descrita anteriormente, e incubadas por 60 min con *p*-nitrofenilfosfato (1 mg mL⁻¹) en tampón al 9.7% de dietanolamina pH 9.8 para su revelado. Las lecturas de absorbancia se hicieron a los 30, 45 y 60 min de incubación con el sustrato. Los valores de absorbancia ($A_{405\text{nm}}$) se obtuvieron en un ELISA Multiskan® EX Modelo 355 (Flow laboratories, Finlandia). Las muestras fueron consideradas positivas cuando los valores de absorbancia de ambas repeticiones fueron al menos el doble del valor de absorbancia de ambas repeticiones del control negativo.

Extracción de RNA, transcripción reversa y amplificación por PCR

En la detección molecular del virus por RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) se procedió a la extracción del RNA total a partir de aproximadamente 0.1 g de raíces, cuello o tallo de las plantas de melón mediante el empleo de RNAwiz™ Kit (Ambion, Huntingdon, Reino Unido) con ayuda de N₂ líquido siguiendo las instrucciones del fabricante. La RT-PCR se llevo a cabo en un solo paso mediante el empleo de la SuperScript™ One Step II RT with Platinum® Taq Mix (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España). Se diseñó una pareja de cebadores específicos para el MNSV: MNSV1

(5'GGAGGCAACATTTTCGTACA3') y MNSV2 (5'AGAGACCAAGCGATCAAAC3'), a partir de la secuencia nucleotídica completa de la proteína de cubierta (p42) del MNSV (GenBank accession No. D12536) con el programa DNAMAN versión 4.02 Lynnon Biosoft© 1994–98 (Institute for Plant Pathology, BBA, Alemania). Estos cebadores amplifican un fragmento del gen de la proteína de cubierta (p42) de 651 pb equivalente a las posiciones 172–822 de dicha proteína. Se llevó a cabo la pre-desnaturalización del RNA total a 65°C por 5 min, seguido de un paso de síntesis de cDNA a 50°C por 30 min. Las condiciones de la PCR fueron 94°C por 2 min, y 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de hibridación a 50°C y 1 min de extensión a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C, utilizando un termociclador Mastercycler personal 5332 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La mezcla de reacción fue preparada con 0.4 µM de cada primer, tampón de reacción 1 × (0.4 mM dNTPs, 2.4 mM MgSO₄) y 1 U µL⁻¹ de la enzima descrita anteriormente, en un volumen final de reacción de 12.5 µL. Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% en tampón 1 × TAE (40 mM trisacetato, 1 mM EDTA pH 8.0) a 100 V durante 60 min, y posteriormente teñido con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹). El tamaño de amplicón esperado se determinó por comparación con un marcador de peso molecular conocido (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder Plus, Fermentas Life Sciences, Opelstrasse, Alemania).

Secuenciación y análisis

Los productos de la RT-PCR de las muestras positivas se purificaron con el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y directamente secuenciados a partir del cebador MNSV1 (secuencia descrita anteriormente) con el Big Dye Terminator versión 3.1 Cycle Sequencing Kit en un secuenciador 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias obtenidas en este trabajo fueron analizadas mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997), con el objetivo de identificar y comparar los aislados del MNSV obtenidos. Las secuencias del MNSV usadas para comparación fueron 264 (Díaz *et al.*, 2004), Dutch (Riviere y Rochon, 1990), y YS (Kubo *et al.*, 2005). La traducción de secuencias nucleotídicas a secuencias de aminoácidos se hizo con el programa

TRANSLATE (ExPASy Proteomics tools, <http://www.expasy.org/tools/>). El análisis de homología de secuencias se llevó a cabo con el programa DNAMAN versión 4.02 Lynnon Biosoft© 1994–98 (Institute of Plant Pathology, BBA, Alemania).

Ensayo de detección de *Olpidium bornovanus* en suelo

Se trasplantaron plántulas de melón en estado cotiledonal procedentes de semilla comercial de la variedad cultivada Galia F₁ a macetas individuales (450 cm³) que contenían una mezcla de arena fina de sílice lavada y previamente autoclavada, y suelo procedente de la zona del sistema radicular de las plantas de melón recolectadas en 2005 y 2006 en los campos de cultivo de Panamá, en proporción 3:1, respectivamente. Se utilizaron macetas con arena como control sano. Se transplantó una plántula/maceta, realizando tres repeticiones por muestra y control sano. Las plantas se mantuvieron en ambiente controlado y fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad con temperaturas de 26°C y 18°C, respectivamente, y un 60% de humedad relativa. El riego durante el ensayo fue realizado con H₂O Milli-Q (Fig. 6.3: A, B).



Figura 6.3 Ensayo de detección de *O. bornovanus* en los suelos muestreados. Macetas con una mezcla 3:1 de arena:suelo (A) y macetas con arena solamente (400 g) usadas como control sano (B). Una planta/maceta, y tres repeticiones por muestra y control sano.

A los 30 días post-transplante (d.p.t.), las raíces fueron clarificadas siguiendo el método descrito por Jordá *et al.* (2002) en una solución de KOH al 10% durante 24 h. Transcurrido este tiempo se lavaron con HCl al 10% para su neutralización,

y posteriormente se eliminó la solución ácida después de tres lavados con H₂O destilada, donde se mantuvieron hasta su análisis. Se observaron secciones de aproximadamente 1 cm de longitud de las raíces secundarias con un microscopio óptico binocular compuesto, Nikon-YS-100 (Nikon Corporation, Tokio, Japón), con el objetivo de determinar la presencia o ausencia de *O. bornovanus* en las muestras de suelo analizadas. El diámetro de las esporas de resistencia fue determinado con un microscopio Olympus VANOX-T, observación 40×.

Se analizaron raíces no clarificadas de cada una de las muestras mediante RT-PCR a los 45 y 60 d.p.t. para determinar el éxito de la transmisión del MNSV por el hongo traído en los suelos procedentes de los distintos campos de cultivo de melón de Panamá.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestreos y síntomas en plantas de melón

Es importante indicar que en el momento de la toma de muestras en el segundo año no se observó una incidencia significativa de la enfermedad en el campo; por lo tanto, no todas las plantas recolectadas mostraban los síntomas típicos del MNSV. Sin embargo, se debía corroborar la presencia de la enfermedad causada por este virus durante el primer año para adoptar las medidas de control pertinentes, dado el peligro potencial que ha supuesto este virus para el cultivo de melón en la zona de Almería, en España, y en otras regiones dedicadas al cultivo de esta hortícola en el mundo (Juárez *et al.*, 1994). Es importante mencionar que en estudios de transmisión del MNSV por semilla, plántulas de melón asintomáticas han resultado positivas al virus por RT-PCR (Herrera-Vásquez *et al.*, 2009). Además, nueve de las doce muestras analizadas fueron recolectadas entre los 20 y 65 d.p.s. (Tabla 6.1), concordando con los estudios realizados por Gonzalez-Garza *et al.* (1979), quienes no observaron plantas sintomáticas sino hasta 64 d.p.t., y con los de Gómez *et al.* (2005), quienes sostienen que los síntomas generalizados más característicos de la enfermedad se presentan poco antes o cuando las plantas entran en producción, capacidad que se observa cuando la infección se produce a través de *O. bornovanus*. Por otra parte, la disparidad de síntomas que pueden presentarse, siendo en algunas ocasiones

similares a los originados por otros agentes fitopatógenos, tales como el marchitamiento y muerte súbita de las plantas, plantea la necesidad de un método de diagnóstico fiable para poder actuar frente a esta enfermedad que ha ocasionado importantes pérdidas económicas en otros países.

Análisis de plantas de melón de campo: DAS-ELISA y RT-PCR

Las plantas muestreadas fueron analizadas mediante DAS-ELISA y RT-PCR, esta última técnica para confirmar los análisis serológicos, dado que varios autores, entre ellos, Gómez *et al.* (2005) subrayan la baja sensibilidad que presenta la técnica ELISA para detectar el MNSV. Así, Gosalvez *et al.* (2003) citan que en la detección del MNSV a partir de plantas de melón infectadas, la RT-PCR ha resultado ser 625 veces más sensible que la técnica ELISA, e indican que la RT-PCR es un método alternativo al ELISA en el diagnóstico, debido a la limitada sensibilidad de esta última. En 2005 se detectaron mediante ELISA dos muestras positivas de las tres analizadas, 7777 y 7779, procedentes ambas de las provincias de Los Santos (Fig. 6.4, Tabla 6.1). En 2006 solamente se detectó mediante DAS-ELISA una muestra positiva de las nueve analizadas, la 8180, procedente de la provincia de Coclé (Fig. 6.4, Tabla 6.1). Mediante RT-PCR de las muestras positivas por DAS-ELISA se obtuvo una amplificación del tamaño esperado, 651 pb, no obteniéndose dicha banda en los controles sanos (Fig. 6.4). Dado que la detección de este virus presenta ciertas dificultades, obtener dos muestras positivas de tres ensayadas en 2005 sería indicativo de un alto nivel de infección.

En el 2006 la enfermedad no se presentó de forma tan patente; además, la recolección de las muestras se hizo en un estado muy temprano del cultivo, como ya se ha indicado, y por ello no mostraban síntomas característicos de la infección, lo que implicó que la toma de muestras fuera al azar. La recolección se hizo en campos de melón distintos a los muestreados en el 2005 y que dieron resultados positivos.

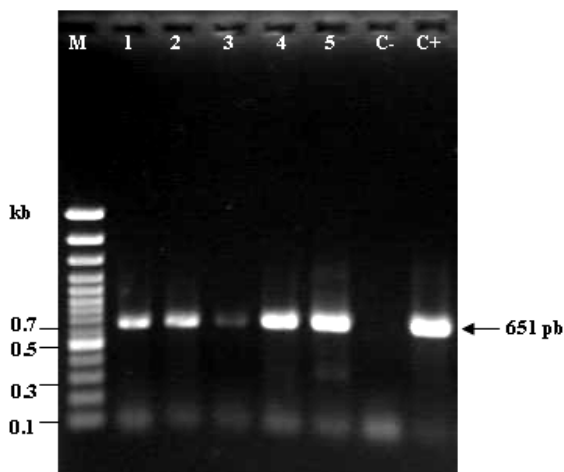


Figura 6.4 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RT-PCR de los aislados del MNSV amplificados a partir de plantas de melón de campo. Líneas 1 y 2 = muestra 7777 dilución 1:100 y 1:500, respectivamente; líneas 3 y 4 = muestra 7779 dilución 1:100 y 1:500, respectivamente; línea 5 = muestra 8180 dilución 1:200; C- = control sano; C+ = control positivo del MNSV; M = 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas Life Sciences, Opelstrasse, Alemania).

Secuenciación y análisis

Las bandas amplificadas por RT-PCR correspondientes a las muestras 7777 (aislado PAN1, GenBank accession No. DQ443546), 7779 (aislado PAN2, GenBank accession No. DQ443547) y 8180 (Fig. 6.4) fueron purificadas y secuenciadas. Las secuencias obtenidas se compararon con otras secuencias del MNSV publicadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank: 264 (GenBank accession No. AY330700); Dutch (GenBank accession No. M29671); y YS (GenBank accession No. AB189944), caracterizando molecularmente de esta manera los aislados del MNSV usados en nuestro estudio. Dichos aislados presentaron una homología nucleotídica del 88 al 94% en un fragmento del gen de la proteína de cubierta (p42), siendo el aislado YS el más distante en comparación con los demás (Tabla 6.2).

Tabla 6.2 Porcentaje de homología de nucleótidos y aminoácidos de un fragmento del gen de la proteína de cubierta (p42) de aislados del MNSV (aislados descritos anteriormente)

Aislados del MNSV	Porcentaje de homología de nucleótidos					Porcentaje de homología de aminoácidos				
	PAN1	PAN2	264	Dutch	YS	PAN1	PAN2	264	Dutch	YS
PAN1	100	92	92	92	88	100	99	99	97	96
PAN2		100	93	93	88		100	99	97	96
264			100	94	88			100	97	96
Dutch				100	88				100	96
YS					100					100

La homología de aminoácidos se mantuvo en el rango del 96 al 99%, siendo también el aislado YS el más distante en comparación con los demás (Tabla 6.2). Cabe indicar que Díaz *et al.* (2003) determinaron poca variabilidad, a nivel de aminoácidos, en la proteína de cubierta (p42) de diferentes aislados del MNSV.

La secuencia obtenida a partir de la muestra 8180 no fue introducida en la base de datos del NCBI GenBank, debido a que resultó idéntica a la secuencia obtenida de la muestra 7779 (aislado PAN2). Es importante indicar que el aislado PAN2 presentó un 100% de homología con dos aislados del MNSV provenientes de plántulas procedentes de semilla comercial de melón (Herrera-Vásquez *et al.*, 2009). Ante esto, es probable la implicación de la semilla comercial en la introducción del MNSV en los campos de melón muestreados.

Detección de *Olpidium bornovanus*

En todas las muestras de suelo procedentes de los campos de melón muestreados de las provincias descritas anteriormente se detectó la presencia de *O. bornovanus*, con excepción del suelo procedente de la zona radicular de la muestra 8181 (Tabla 6.1), encontrándose el hongo en el 91.6% de las muestras de suelo analizadas. En las raíces analizadas, se observaron esporangios mayormente redondeados (Fig. 6.5A), y el diámetro medio aproximado de 100 esporas de resistencia fue de 18.61 μm (Fig. 6.5B), estando dentro del rango de tamaños descrito por otros autores para *O. bornovanus* (Tomlinson y Thomas, 1986; Campbell y Sim, 1994).

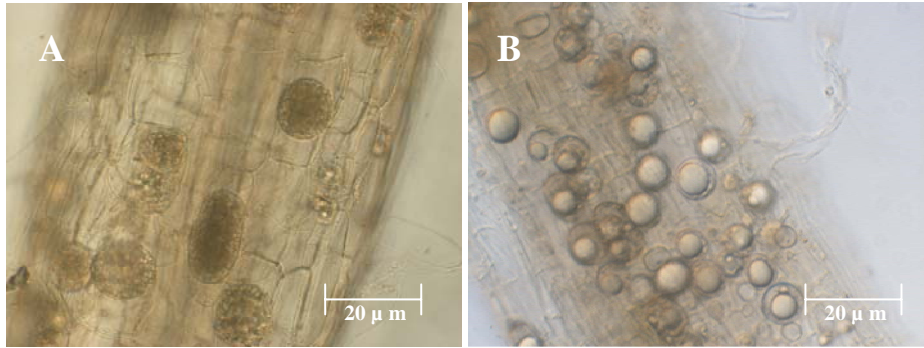


Figura 6.5 *Olpidium bornovanus*. Esporangios (A) y esporas de resistencia (B). Observación 40×.

A pesar de la detección de *O. bornovanus* en casi la totalidad de las muestras de suelo, no se obtuvo transmisión del virus a partir de las muestras de suelo ensayadas, bien porque las esporas del hongo no fueron virulíferas o porque el tiempo de contacto de las plantas con el suelo no fue suficiente para que se produjera el contagio. Gómez *et al.* (1993) indican que el MNSV sobrevive en las esporas de resistencia de *O. bornovanus*, sin embargo, no mencionan el tiempo de persistencia del virus en estas. No obstante, trabajos previos indican una importante persistencia, pero no se han realizado estudios precisos al respecto. Estudios realizados con otros virus transmitidos por *Olpidium*, como es el caso del *Tobacco stunt virus* (TSV) y el *Lettuce big-vein virus* (LBVV), indican que estos pueden persistir hasta 20 años en las esporas de resistencia de *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang, siendo las partículas infectivas después de este tiempo (Campbell, 1985; Hiruki, 1987).

En los países donde ha sido detectado el MNSV se da importancia a la transmisión por *O. bornovanus*, así como a su transmisión por semilla. Campbell *et al.* (1996) afirman que el MNSV se transmite por semilla independientemente del vector, pero se ve reforzada su extensión con la presencia de éste. Estos mismos autores presentan el término “*vector-assisted seed transmission*”, la transmisión por semilla asistida por el vector (VAST), comprobando que el MNSV raramente infectó plántulas de melón salvo que el vector estuviera presente. *O. bornovanus* desempeña un papel importante en la epidemiología del MNSV, ya que adquiere y transmite el virus a las raíces de las plántulas procedentes de semilla infectada, iniciándose así la infección primaria y

continuando con los ciclos de infección secundaria mediante el vector (Campbell *et al.*, 1996).

El presente trabajo aporta a este respecto la detección y caracterización del MNSV en el área de Los Santos y Coclé (Panamá), así como de su vector en el suelo, binomio que puede causar y desencadenar importantes pérdidas en el cultivo de melón. Dada la importancia que tiene la incidencia de este virus en los cultivos de melón, sandía y pepino en diversos países, y la implicación de la semilla en la introducción del virus en nuevas áreas de cultivo, futuros objetivos de estudio incluyen (i) la determinación de la distribución del MNSV en otras cucurbitáceas y áreas no muestreadas a la fecha en Panamá; (ii) el estudio de la variabilidad molecular de los aislados del MNSV obtenidos en Panamá y en otros países; (iii) y el estudio de la implicación de la semilla comercial de melón en la introducción y diseminación del virus en las áreas estudiadas y en otras áreas.

AGRADECIMIENTOS

José Angel Herrera-Vásquez fue apoyado con una beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID), durante el periodo 2004–2007. Actualmente es becario del Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos y la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (IFARHU-SENACYT, Panamá, periodo 2007–2010). Los autores agradecen a Orlando Osorio y a José Angel Herrera (Padre) su colaboración en los muestreos de melón, y a Ariel Espino, Olehg Aguilar, Roberto Samaniego y Juan Pablo Soriano de la Dirección Nacional de Sanidad Vegetal-Ministerio de Desarrollo Agropecuario (DNSV-MIDA, Panamá) su apoyo para la toma de datos en los campos de melón muestreados.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Avgelis AD, 1989. Watermelon necrosis caused by a strain of *Melon necrotic spot virus*. *Plant Pathology* **38**, 618–622.

- Blancard D, Lecoq H, Pitrat M, 1991. Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar, luchar. 1ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid: España, 301 p.
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ, eds, 1996. *Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE Database* (Online Database). URL: <http://www.image.fs.uidaho.edu/vide/> (24 de Agosto de 2008).
- Campbell RN, 1985. Longevity of *Olpidium brassicae* in air-dry soil and the persistence of the lettuce big-vein agent. *Canadian Journal of Botany* **63**, 2288–2289.
- Campbell RN, Sim ST, 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radicale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1136–1143.
- Campbell RN, 1996. Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 87–108.
- Campbell RN, Wipf-Scheibel C, Lecoq H, 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology* **86**, 1294–1298.
- Clark MF, Adams AN, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475–483.
- Díaz JA, Bernal JJ, Moriones E, Aranda MA, 2003. Nucleotide sequence and infectious transcripts from a full-length cDNA clone of the Carmovirus *Melon necrotic spot virus*. *Archives of Virology* **148**, 599–607.
- Díaz JA, Nieto C, Moriones E, Truniger V, Aranda MA, 2004. Molecular characterization of a *Melon necrotic spot virus* strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 668–675.
- Gómez J, Cuadrado I, Velasco V, 1993. El Virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería. II. Eficacia de la desinfección del suelo frente al MNSV. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **19**, 179–186.
- Gómez J, Guirado ML, Serrano Y, Rodríguez J, Sáez E, 2005. Importancia, epidemiología y control de *Olpidium bornovanus*. *Boletín de la Sociedad Española de Fitopatología* **52**, 4–7.

- Gonzalez-Garza R, Gumpf DJ, Kishaba AN, Bohn GW, 1979. Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California isolate of *Melon necrotic spot virus*. *Phytopathology* **69**, 340–345.
- Gosalvez B, Navarro JA, Lorca A, Botella F, Sánchez-Pina MA, Pallás V, 2003. Detection of *Melon necrotic spot virus* in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods* **113**, 87–93.
- Gu QS, Bao WH, Tian YP, Prins M, Yang HX, Lu J, Liu LF, Peng B, 2008. *Melon necrotic spot virus* newly reported in China. *Plant Pathology* **57**, 765.
- Herrera JA, Cebrian MC, Jordá C, 2006. First report of *Melon necrotic spot virus* in Panama. *Plant Disease* **90**, 1261.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Roselló JA, Córdoba-Sellés C, Jordá C, 2007. Molecular variability among isolates of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) from Spain, Mexico and Central America. In: *XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Sorrento: Italy, p. 281.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2009. Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of seed-disinfection treatments. *Plant Pathology* **58**, 436–442.
- Hibi T, Furuki I, 1985. *Melon necrotic spot virus*. In: *Descriptions of Plants Viruses* 302. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists.
- Hiruki C, 1987. Recovery and identification of *Tobacco stunt virus* from air-dried resting spores of *Olpidium brassicae*. *Plant Pathology* **36**, 224–228.
- Jordá C, Armengol J, Gisbert J, Osca JM, Lacasa A, Velázquez B, 2002. El tratamiento con microondas para la desinfección de suelos. *PHYTOMA-España* **138**, 118–121.
- Jordá C, Font MI, Martínez-Culebras P, 2005. Viral etiology of diseases detected in melon in Guatemala. *Plant Disease* **89**, 338.
- Juárez M, Ortega A, Jordá C, 1994. Aspectos epidemiológicos del virus del cribado (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) y variabilidad de aislados. En: *VII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Sitges, Barcelona: España, p. 71.

- Kubo C, Nakazono-Nagaoka E, Hagiwara K, Kajihara H, Takeuchi S, Matsuo K, Ichiki TU, Omura T, 2005. New severe strains of *Melon necrotic spot virus*: symptomatology and sequencing. *Plant Pathology* **54**, 615–620.
- MIDA, 1998. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Dirección Nacional de Desarrollo Agrícola, Sección de Cultivos de Exportación, Panamá.
- MIDA, 2005. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Dirección Ejecutiva Regional (Región 8), Departamento de Planificación y Agricultura, Unidad de Agroexportación, Panamá.
- Riviere CJ, Rochon DM, 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of *Melon necrotic spot virus*. *Journal of General Virology* **71**, 1887–1896.
- Tomlinson JA, Thomas BJ, 1986. Studies on *Melon necrotic spot virus* disease of cucumber and on the control of the fungus vector (*Olpidium radiale*). *Annals of Applied Biology* **108**, 71–80.
- Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H, Wipf-Scheibel C, Marrakchi M, Lecoq H, 2008. First report of *Melon necrotic spot virus* on melon in Tunisia. *Plant Pathology* **57**, 386.

Capítulo 9

Capítulo 9

Discusión general

En la familia de las cucurbitáceas hay citadas más de 50 virosis diferentes que de forma natural o artificial las afectan (Lovisoló, 1980), la mayoría de las cuales causan síntomas muy manifiestos que normalmente se traducen en pérdidas económicas considerables (Luis-Arteaga, 1994). Sin embargo, nos hemos centrado solamente en esta tesis en el virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV), el cual es considerado como una de las enfermedades virales más importantes que afectan este tipo de hortalizas a nivel mundial. Por lo tanto, en este trabajo se ha abordado el estudio de: i) la transmisión por semilla del MNSV y la eficacia de diferentes tratamientos para la eliminación del virus de las mismas, ii) el diagnóstico mediante técnicas moleculares de *Ospidium bornovanus*, hongo vector del MNSV, así como de otras especies de *Ospidium* transmisoras de distintos tipos de virus en diversos cultivos hortalizas, iii) la diversidad genética de aislados del MNSV y *Ospidium* obtenidos en diferentes especies de cucurbitáceas, principalmente de América Latina y Europa, iv) la presencia y distribución del MNSV y *O. bornovanus* en los cultivos de cucurbitáceas en Panamá, así como de otros virus que afectan a este tipo de hortalizas en este país. Debido a que dichos estudios ya fueron discutidos de manera específica en los capítulos anteriores, los mismos son discutidos de manera general y de forma independiente a continuación.

Como ya se ha indicado, la transmisión por semilla ha sido, sin duda alguna, una de las más importantes formas de transmisión del MNSV (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979), aunque dicha transmisión está condicionada a la presencia del hongo quitrido *O. bornovanus* (Campbell *et al.*, 1996). No obstante, este tipo de estudios han sido evaluados mediante la sintomatología que podrían mostrar las plantas procedentes de semilla infectada, así como también mediante técnicas serológicas, dentro de las limitaciones de sensibilidad propias del método empleado y del posible serotipo presente. Por el contrario, en este trabajo se ha estudiado la determinación de la transmisión por semilla del MNSV mediante técnicas serológicas y moleculares, caracterizando molecularmente un aislado

viral obtenido a partir de plántulas procedentes de semilla comercial de melón infectada (Herrera-Vásquez *et al.*, 2009). En el caso de la técnica serológica DAS-ELISA (double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay), en este estudio no fue posible detectar el MNSV a partir de plantas, ni en estado de cotiledón ni en estado adulto [45 días post-transplante (d.p.t.)], procedentes de semilla infectada, posiblemente por la baja sensibilidad que presentan estas técnicas en plantas asintomáticas (Gómez *et al.*, 2005), como ya se ha indicado. En cambio, mediante la técnica molecular RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), fue posible detectar el virus a partir de plántulas en estado de cotiledón, no así en estado adulto, lo cual podría indicar una resistencia potencial del cultivar de melón utilizado en el estudio como posible hipótesis, aunque también podría ser atribuido a diferencias en las condiciones de desarrollo de la plántula y del virus. A pesar de que el MNSV pudiera estar presente inicialmente en las raíces de las plántulas, este virus siempre se ha mostrado en su manifestación y agresividad muy dependiente de determinadas condiciones ambientales. No obstante, existe la posibilidad de que el virus pueda ser adquirido por el hongo vector a partir de plántulas infectadas una vez que éstas hayan sido trasplantadas en el campo y posteriormente ser transmitido a plantas adultas mediante éste. Es importante indicar en este sentido, que los índices de transmisión obtenidos por diversos autores mediante técnicas convencionales resultan mucho más bajos que los obtenidos en nuestro estudio mediante el uso de la RT-PCR, incluso utilizando en nuestro caso menor número de muestras, debido principalmente a la mayor sensibilidad que presenta esta última técnica en la detección del MNSV (Gosalvez *et al.*, 2003). Debido a la importancia que adquiere la semilla como vehículo primario de introducción del agente viral se plantea la posibilidad de encontrar un método adecuado que permita la limpieza de las semillas respetando su poder germinativo. Ante esta situación, se probaron en este estudio diferentes tratamientos de semillas, incluyendo tratamientos químicos, físicos y combinación de ambos. Diversos tratamientos han sido usados por otros autores para tratar de eliminar el MNSV de las semillas infectadas, entre los cuales podemos destacar tratamientos químicos con ácido clorhídrico (HCL) o físicos mediante el secado de las semillas por 4 días o más (Dumas de Vaulx, 1970). No obstante, los resultados obtenidos se basan solamente en la sintomatología que podrían mostrar las plántulas procedentes de las semillas tratadas, como ya se ha indicado.

Asimismo, otros autores, entre ellos Campbell *et al.* (1996), indican que el HCL fue capaz de inactivar el MNSV de la cubierta de las semillas, no así del endospermo, situación que fue corroborada mediante ELISA. En nuestro caso, el tratamiento de las semillas con HCL 0.1 N durante 30 minutos (min), siguiendo las indicaciones de este tratamiento de los autores citados, no fue capaz de inactivar por completo el MNSV de las semillas, debido a que seguían obteniéndose plántulas positivas procedentes de las semillas tratadas tras la RT-PCR, resultado esperado debido a la mayor sensibilidad que presenta esta técnica en comparación con las técnicas convencionales, como ya se ha indicado. En este estudio, utilizamos además el tratamiento con fosfato trisódico (Na_3PO_4), debido a que dicho tratamiento ha sido utilizado por diversos autores para la eliminación de distintos tipos de virus localizados en la cubierta de las semillas, sin afectar la germinación de las mismas, por ejemplo, en el caso del virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007) y el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) (Green *et al.*, 1987), ambos virus en semilla de tomate. En nuestro caso, el tratamiento con Na_3PO_4 al 10% durante 3 horas (h) no fue eficaz en la eliminación del MNSV de las semillas debido a que este virus, a diferencia de los virus indicados anteriormente, además de localizarse en la cubierta, se encuentra en el endospermo (Campbell *et al.*, 1996), por lo cual, los tratamientos superficiales no son efectivos en la eliminación del mismo. En cuanto a los tratamientos físicos, la termoterapia ha sido utilizada comúnmente para la eliminación de diferentes virus en semillas, por ejemplo, el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Laterrot y Pécaut, 1968), el ToMV (Green *et al.*, 1987), el virus del mosaico moteado verde del pepino (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) (Sang-Min *et al.*, 2003) y el PepMV (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007). Así pues, en este estudio se utilizó el tratamiento a 70°C durante 72 h, 96 h, 120 h y 144 h con la finalidad de eliminar el MNSV de las semillas. No obstante, ninguno de estos tratamientos fue capaz de erradicar por completo el virus de las semillas, a excepción del tratamiento a 70°C durante 144 h, resultando en una eliminación total del virus tras dicho tratamiento, no afectando el mismo la germinación de las semillas. La alta estabilidad del MNSV fue posiblemente la razón por la cual el resto de tratamientos no fueron efectivos en la eliminación de este virus. Asimismo, se realizó una combinación de ambos tipos de tratamientos, físico y químico, sumergiendo las semillas en una solución de Na_3PO_4 al 10%

durante 3 h tras haber tratado las mismas a 70°C durante 120 h. Esta combinación de tratamientos no eliminó totalmente el virus de las semillas, sin embargo, redujo considerablemente su presencia en las mismas. Por todo lo anterior, resulta imprescindible desarrollar y poner a punto un protocolo internacional que incluya, además de los métodos de diagnóstico rutinarios del MNSV en semilla, los tratamientos para la eliminación del virus de las mismas, con el fin de controlar y erradicar la enfermedad producida por este virus en los cultivos de cucurbitáceas a nivel mundial.

Otro de los aspectos importantes que hemos abordado en este trabajo es el diagnóstico de diferentes especies de *Olpidium*, entre éstas, *O. bornovanus*, *O. brassicae* y *O. virulentus*, debido a que dichas especies están citadas en la literatura como vectores de virus que causan enfermedades importantes en varias especies hortícolas (Rochon *et al.*, 2004; Sasaya y Koganezawa, 2006). Es importante indicar en relación a la taxonomía de *Olpidium* que, anteriormente a esta tesis, este hongo se encuadraba taxonómicamente en el Orden *Spizellomycetales*, dentro del Phylum *Chytridiomycota* (quítridos) (Barr, 1980), como hemos indicado previamente. No obstante, estudios filogenéticos posteriores de los genes del RNA ribosómico (18S+5.8S+28S) de diferentes especies de quítridos, entre ellos, *O. brassicae*, demuestran que esta especie de *Olpidium* no se encuadra taxonómicamente dentro del citado Orden (James *et al.*, 2006). Sin embargo, en dichos estudios solamente se analiza un aislado de *O. brassicae*, por lo cual, futuras investigaciones analizando un mayor número de aislados de diferentes especies de *Olpidium* serán necesarios para determinar la posición filogenética de éste (James *et al.*, 2006). Anteriormente a este estudio, la identificación rutinaria de las especies de *Olpidium* indicadas anteriormente estaba basada principalmente en la observación microscópica directa de las raíces de las plantas, determinando de esta manera la especie de *Olpidium* presente en las mismas, mediante la morfología de las esporas de resistencia, siendo éste el carácter taxonómico más importante para distinguirlas (Campbell y Sim, 1994). *O. bornovanus* se caracteriza por presentar esporas de resistencia de pared exterior lisa e interior con apariencia de panal de abejas, mientras que *O. brassicae* sensu lato (sl) presenta esporas de resistencia de forma estrellada (Lange e Insunza, 1977). El término *O. brassicae* sl ha englobado tanto a *O. brassicae* (especie heterotática que afecta a las crucíferas), como a *O. virulentus* (Sahtiyanci) Karling (especie homotática que no afecta a las crucíferas)

(Koganezawa *et al.*, 2005). En el caso particular de estas dos especies, las esporas de resistencia son similares y podrían, por lo tanto, no ser diferenciadas por esta característica morfológica (Koganezawa *et al.*, 2005). Asimismo, las esporas de resistencia no siempre son observadas en condiciones naturales, y debido a que las otras fases que presentan estos hongos durante su ciclo de vida, zoosporas y zoosporangios, resultan muy similares, sería muy difícil realizar una identificación precisa de la especie en cuestión utilizando para ello estos caracteres morfológicos. Con todos estos antecedentes, en este trabajo se ha desarrollado y puesto a punto un método multiplex PCR para la detección y diferenciación de las especies de *Olpidium* indicadas anteriormente. Así pues, dicho método fue capaz de detectar y diferenciar, además de infecciones simples de las distintas especies de *Olpidium*, infecciones mixtas no reportadas previamente, según la literatura consultada. Es importante indicar en este sentido que este método molecular está basado en una combinación de cebadores específicos para cada una de las especies de *Olpidium*, como ya se ha indicado, obteniéndose tras la PCR bandas específicas que corresponden a dichas especies, situación que fue corroborada mediante la secuenciación de los productos amplificados. En este mismo sentido, otros autores, entre ellos Jiang e Hiruki (1996), han empleado técnicas moleculares para la detección y diferenciación de *O. bornovanus* y *O. brassicae* sl, mediante el uso de la PCR con los cebadores universales ITS4-ITS5 (White *et al.*, 1990), logrando amplificar dichas especies solamente a partir de suspensiones de zoosporas, no así a partir de raíces infectadas, debido probablemente a la inespecificidad de los cebadores utilizados. De la misma forma, dichos autores amplificaron además DNA del hospedante, por la misma razón indicada anteriormente, y posiblemente, debido a la contaminación de las suspensiones de zoosporas con células de la epidermis de las raíces del hospedante. Por el contrario, en nuestro caso fue posible detectar estas especies de *Olpidium* a partir de suspensiones de zoosporas y raíces infectadas, gracias a la especificidad de nuestros cebadores, como ya se ha indicado. Adicionalmente, nuestro método fue capaz de detectar *O. bornovanus* directamente de muestras de agua, siendo ésta la primera cita de dicha situación, según la literatura consultada. Al respecto, diversos autores, entre ellos Gómez y Velasco (1991), indican que *O. bornovanus* ha sido observado mediante microscopía en raíces de plantas de melón las cuales han sido regadas con agua procedente de embalses de riego de Almería (España), lo cual sustenta aún más el

interés de nuestro método de diagnóstico. En relación a la sensibilidad de la multiplex PCR, ésta resultó muy difícil de determinar, debido a que *Olpidium* es un parásito obligado y, por lo tanto, no puede ser cultivado en medio artificial (Jian e Hiruki, 1996), como ya se ha indicado. Así pues, la sensibilidad de éste método resultó mucho mayor a partir de raíces infectadas que a partir de suspensiones de zoosporas, debido probablemente a que en las raíces, además de zoosporas, están presentes zoosporangios y esporas de resistencia y, por lo tanto, se obtiene mayor cantidad de DNA tras la extracción. Por todo lo anterior, el método multiplex PCR presentado en este estudio representa un avance significativo en el diagnóstico rutinario de *Olpidium*, sin la necesidad de realizar un análisis morfológico y el consiguiente riesgo de identificar de forma errónea la especie de *Olpidium* en cuestión, por las razones ya descritas. La utilización de éste método combinado con un procedimiento de extracción rápido y sencillo, podría permitir el análisis de *Olpidium* en un gran número de muestras, situación esta que se dificultaría si utilizáramos los métodos convencionales usualmente disponibles. Asimismo, debido a que las infecciones simples y mixtas de *Olpidium* han sido identificadas tanto en campo como en cultivos hidropónicos, la metodología presentada en este trabajo podría facilitar los estudios relacionados con el rango y la especificidad de hospedantes, así como con la transmisión de virus mediante *Olpidium*.

Con el objetivo de determinar la presencia y distribución del MNSV y de diferentes especies de *Olpidium* en muestras de cucurbitáceas procedentes de diferentes partes del mundo, se analizaron 112 muestras de este tipo de hortícolas las cuales presentaban síntomas necróticos similares a la infección causada por el MNSV, así como marchitez y muerte de plantas (colapso). Así pues, además de determinar las diferentes entidades de manera individual en dichas muestras, se observaron también infecciones mixtas MNSV/*O. bornovanus*, MNSV/*O. virulentus* y MNSV/*O. bornovanus/O. virulentus*, infecciones estas dos últimas no reportadas previamente según la literatura consultada. No obstante, según nuestro conocimiento, solamente *O. bornovanus* ha sido citado como transmisor del MNSV (Mochizuki *et al.*, 2008). Adicionalmente, se realizó una selección de las muestras positivas a cada una de estas entidades y, mediante estudios moleculares, se caracterizó un total de 29 aislados del MNSV y 40 de *Olpidium* obtenidos de diferentes especies de cucurbitáceas procedentes principalmente de Latinoamérica y Europa. A partir de estas investigaciones, y debido a que la

literatura consultada sobre aspectos relacionados con la diversidad genética de *Carmovirus*, género al cual pertenece el MNSV, es escasa (Cañizares *et al.*, 2001), se han estudiado en este trabajo las 5 proteínas que componen el genoma del MNSV, siendo éstas las siguientes: p29, p89 (RNA polimerasa dependiente de RNA, RdRp), p7A, p7B (proteínas de movimiento, MP) y p42 (proteína de cubierta o proteína de la cápsida, CP). Otros autores, entre ellos, Díaz *et al.* (2004) y Kubo *et al.* (2005), han realizado varios estudios del MNSV a nivel molecular. Sin embargo, a diferencia de nuestro trabajo, estos autores caracterizaron un reducido número de aislados procedentes de un limitado número de regiones geográficas. Adicionalmente, análisis filogenéticos realizados en nuestro estudio agruparon los aislados del MNSV en 3 grupos predominantemente asociados con un origen geográfico específico. Por lo tanto, y según los resultados obtenidos, la población mundial del MNSV analizada en este trabajo no parece estar muy conservada en términos geográficos, de manera similar a otros virus como el virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV), para los cuales la diferenciación genética asociada a un determinado sitio geográfico ha sido observada previamente (Korkmaz *et al.*, 2008). Sin embargo, dichos aislados aparentemente no estuvieron relacionados ni con la especie de cucurbitácea ni con el año en el cual fueron colectados los mismos. Adicionalmente, la diversidad genética de las proteínas completas p7A y p7B fue evaluada mediante el índice de sustituciones sinónimas y nosinónimas. El pequeño valor d_N/d_S obtenido para estas regiones codificantes indica una fuerte presión de selección negativa en ambas regiones, similar a lo que ocurre con otros *Carmovirus* como el virus del moteado del clavel (*Carnation mottle virus*, CarMV) (Cañizares *et al.*, 2001) y el virus de la rotura de la flor del pelargonio (*Pelargonium flower break virus*, PFBV) (Rico *et al.*, 2006). En adición, un resultado interesante es el hecho de que varios aislados del MNSV procedentes de Latinoamérica mostraron 100% de similaridad/identidad de secuencia nucleotídica con el aislado del MNSV obtenido a partir de plántulas procedentes de semilla comercial de melón, aislado indicado anteriormente. Por lo tanto, existe la posibilidad de que la introducción del MNSV en estos países se haya producido a través de la semilla comercial. Por otro lado, tras los análisis filogenéticos realizados a los 40 aislados de *Olpidium*, 33 correspondieron a *O. bornovanus* y 7 a *O. virulentus*, obteniendo así dos grupos filogenéticos claramente definidos (*O. bornovanus* y *O. virulentus*). Sin embargo, tras el

análisis de la región ITS del DNA ribosómico (rDNA-ITS) de estas especies de manera independiente, las secuencias de DNA de las mismas no parecieran mostrar una gran variabilidad en tiempo y espacio, en contraste con la aparente variabilidad observada respecto a la especie de cucurbitácea. Futuros estudios relacionados con la transmisión de los diferentes genotipos del MNSV mediante los aislados de *Olpidium* caracterizados en este trabajo serían, sin duda alguna, de gran interés. Por último, hemos encontrado en la literatura que varios aislados del MNSV han sido asociados con nuevos brotes de la enfermedad en cultivos de cucurbitáceas del mundo entero, por lo cual la identificación y caracterización genética de estos aislados así como de *Olpidium*, son los primeros pasos a adoptar en el diseño de estrategias de control para luchar contra la enfermedad producida por este tipo de entidades.

Por último, es importante indicar que ni el MNSV ni su hongo vector *O. bornovanus* habían sido citados en Panamá anteriormente a esta tesis. La presencia de ambas entidades fue publicada en el año 2006 como resultado de este trabajo (Herrera *et al.*, 2006). Posteriormente, con la finalidad de determinar la distribución de dichas entidades en las principales zonas productoras de cucurbitáceas en Panamá, se realizaron dos prospecciones (2006 y 2008) en este grupo de hortalizas. Como cabía esperar, el MNSV fue detectado solamente en las zonas donde *O. bornovanus* fue observado. Así pues, este hongo ha sido descrito, como ya se ha indicado, vector del MNSV (Campbell *et al.*, 1995). Es importante indicar en este aspecto que la transmisión primaria del virus es por semilla; sin embargo, sólo presenta dificultades cuando está presente su vector, es la llamada transmisión por semilla asistida por el vector (VAST) (Campbell *et al.*, 1996). Adicionalmente, se realizó un análisis molecular con los aislados del MNSV y *O. bornovanus* obtenidos en dichas prospecciones. De manera interesante, uno de los aislados del MNSV mostró 100% de similaridad/identidad nucleotídica en todas las proteínas que componen el genoma de éste virus (p29, p89, p7A, p7B y p42), con un aislado obtenido de plántulas procedentes de semilla comercial de melón, previamente caracterizado por Herrera-Vásquez *et al.* (2009). Por lo tanto, y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, existe la posibilidad de que por lo menos uno de los aislados obtenidos en este estudio haya sido introducido en Panamá a través de semilla comercial. Por otro lado, en relación al análisis molecular de *O. bornovanus*, los aislados obtenidos en este estudio no parecen presentar una gran variabilidad molecular en términos

geográficos. Otros autores, entre ellos Sasaya y Koganezawa (2006), obtuvieron resultados similares a los encontrados en nuestro estudio tras haber analizado aislados de *O. bornovanus* de melón así como también aislados de *O. brassicae* y *O. virulentus* procedentes de diferentes tipos de cultivos hortícolas. En adición, en 2008 se analizaron otros virus que afectan a las cucurbitáceas en Panamá, y que según la sintomatología observada, podrían estar presentes en las diferentes zonas prospectadas, siendo estos los siguientes: virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), mosaico de la calabaza (*Squash mosaic virus*, SqMV), manchas anilladas de la papaya-W (*Papaya ringspot virus-W*, PRSV), mosaico 2 de la sandía (*Watermelon mosaic virus-2*, WMV-2) y el virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV). Así pues, el virus con mayor prevalencia y el encontrado con mayor regularidad en las regiones estudiadas fue el PRSV, seguido de WMV-2 y ZYMV. Otros autores, entre ellos Guerra *et al.* (1995) y García (1997), obtuvieron resultados similares a los nuestros en prospecciones realizadas en cucurbitáceas en Panamá. El CMV y el SqMV no fueron detectados en este trabajo, probablemente debido al pequeño número de muestras analizadas. Sin embargo, ambos virus han sido identificados previamente en cultivos de melón en Panamá (García, 1997). Adicionalmente, en este trabajo fueron observadas infecciones dobles (ZYMV + PRSV; ZYMV + MNSV; PRSV + WMV-2), las cuales podrían causar importantes pérdidas en la producción debido a un posible efecto sinérgico entre ellas, ya citado por otros autores para este tipo de infecciones (Poolpol e Inouye, 1986). Por todo lo descrito anteriormente, se deberían tomar las medidas de control pertinentes para hacerle frente a las infecciones encontradas en los cultivos de cucurbitáceas en Panamá causadas, como ya se ha indicado, por el MNSV en combinación con *O. bornovanus*, así como las infecciones virales producidas por los otros virus indicados previamente, ya que de lo contrario podrían dar lugar a importantes pérdidas económicas.

BIBLIOGRAFÍA

Barr DJS, 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. *Canadian Journal of Botany* **58**, 2380–2394.

- Campbell RN, Sim ST, 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radiale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1136–1143.
- Campbell RN, Sim ST, Lecoq H, 1995. Virus transmission by host-specific strains of *Olpidium bornovanus* and *Olpidium brassicae*. *European Journal of Plant Pathology* **101**, 273–282.
- Campbell RN, Wipf-Scheibel C, Lecoq H, 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology* **86**, 1294–1298.
- Cañizares MC, Marcos JF, Pallás V, 2001. Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of *Carnation mottle virus* (CarMV) and phylogenetic relationships within the *Tombusviridae* family. *Archives of Virology* **146**, 2039–2051.
- Córdoba-Sellés MC, 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**, 1250–1254.
- Díaz JA, Nieto C, Moriones E, Truniger V, Aranda MA, 2004. Molecular characterization of a *Melon necrotic spot virus* strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 668–675.
- Dumas de Vaulx R, 1970. Étude de la transmission du virus de la criblure. In: *Rapport d'activité 1969-1970 Station D'Amélioration des Plantes Maraichères*. Montfavet, France: INRA, p. 46–50.
- García JC, 1997. Evaluación de estrategias para el manejo integrado de virosis en melón de exportación (*Cucumis melo* L.). *Trabajo final de carrera*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá. Panamá, 76 p.
- Gómez J, Velasco V, 1991. Presencia de *Olpidium radiale* en los embalses para riego en Almería. *PHYTOMA-Spain* **33**, 23–27.
- Gómez J, Guirado ML, Serrano Y, Rodríguez J, Sáez E, 2005. Importancia, epidemiología y control de *Olpidium bornovanus*. *Boletín de la Sociedad Española de Fitopatología* **52**, 4–7.
- Gonzalez-Garza R, Gumpf DJ, Kishaba AN, Bohn GW, 1979. Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California isolate of *Melon necrotic spot virus*. *Phytopathology* **69**, 340–345.

- Gosalvez B, Navarro JA, Lorca A, Botella F, Sánchez-Pina MA, Pallás V, 2003. Detection of *Melon necrotic spot virus* in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods* **113**, 87–93.
- Green SK, Hwang LL, Kuo YK, 1987. Epidemiology of *Tomato mosaic virus* in Taiwan and identification of strains. *Journal of Plant Diseases and Protection* **94**, 386–387.
- Guerra JA, Fernández O, Osorio N, 1995. Uso de aceite agrícola y de insecticida en el control de virus no persistente en melón (WMV-1). Panamá: IDIAP, 7 p.
- Herrera JA, Cebrian MC, Jordá C, 2006. First report of *Melon necrotic spot virus* in Panama. *Plant Disease* **90**, 1261.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2009. Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of seed-disinfection treatments. *Plant Pathology* **58**, 436–442.
- James TY, Letcher PM, Longcore JE, Mozley-Standridge SE, Porter D, Powell MJ, Griffith GW, Vilgalys R, 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* **98**, 860–871.
- Jian L, Hiruki C, 1996. Polymerase chain reaction amplification and restriction analysis of the ribosomal DNA of *Olpidium radicale* isolates. *Journal of Microbiological Methods* **26**, 87–93.
- 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 of the National Agricultural Research Center for Western Region* **4**, 39–59.
- Korkmaz S, Tomitaka Y, Onder S, Ohshima K, 2008. Occurrence and molecular characterization of Turkish isolates of *Turnip mosaic virus*. *Plant Pathology* **57**, 1155–1162.
- Kubo C, Nakazono-Nagaoka E, Hagiwara K, Kajihara H, Takeuchi S, Matsuo K, Ichiki TU, Omura T, 2005. New severe strains of *Melon necrotic spot virus*: symptomatology and sequencing. *Plant Pathology* **54**, 615–620.
- Lange L, Insunza V, 1977. Root inhabiting *Olpidium* species: the *O. radicale* complex. *Transactions of the British Mycological Society* **69**, 377–384.

- Laterrot H, Pécaut P, 1968. Incidence du traitement thermique des semences de tomate sur la transmission du virus de la mosaïque du tabac. *Études de Virologie, Annales des Épiphyties* **19**, 159–164.
- Lovisol O, 1980. Virus and viroids disease of cucurbits. *Acta Horticulturae* **88**, 33–82.
- Luis-Arteaga M, 1994. Enfermedades producidas por virus. En: Díaz-Ruíz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 73–91.
- Mochizuki T, Ohnishi J, Ohki T, Kanda A, Tsuda S, 2008. Amino acid substitution in the coat protein of *Melon necrotic spot virus* causes loss of binding to the surface of *Ospidium bornovanus* zoospores. *Journal of General Plant Pathology* **74**, 176–181.
- Poolpol P, Inouye T, 1986. Enhancement of *Cucumber mosaic virus* multiplication by *Zucchini yellow mosaic virus* in double infected cucumber plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **52**, 22–30.
- Rico P, Ivars P, Elena SF, Hernández C, 2006. Insights into the selective pressures restricting *Pelargonium flower break virus* genome variability: evidence for host adaption. *Journal of Virology* **80**, 8124–8132.
- Rochon DA, Kakani K, Robbins M, Reade R, 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by *Ospidium* and Plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 211–241.
- Sang-Min K, Sang-Hyun N, Jung-Myung L, Kyu-Ock Y, Kook-Hyung K, 2003. Destruction of *Cucumber green mottle mosaic virus* by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR. *Molecules and Cells* **16**, 338–342.
- Sasaya T, Koganezawa H, 2006. Molecular analysis and virus transmission tests place *Ospidium virulentus*, a vector of *Mirafiori lettuce big-vein virus* and *Tobacco stunt virus*, as a distinct species rather than a strain of *Ospidium brassicae*. *Journal of General Plant Pathology* **72**, 20–25.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. New York: USA, p. 315–322.

Capítulo 10

Capítulo 10

Conclusiones

TRANSMISIÓN POR SEMILLA DEL MNSV Y EFICACIA DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

1. La transmisión por semilla del MNSV fue estudiada mediante técnicas serológicas (DAS-ELISA) y moleculares (RT-PCR), obteniéndose resultados positivos y altos índices de transmisión solamente mediante RT-PCR, no así mediante DAS-ELISA, debido posiblemente a la baja sensibilidad que presenta esta técnica en plantas asintomáticas.
2. El tratamiento de termoterapia a 70°C durante 144 h fue el único que mostró una eficacia del 100% en la eliminación del MNSV de las semillas de melón, no afectando dicho tratamiento la germinación de las mismas.
3. El tratamiento combinado (químico y físico) a 70°C durante 120 h y posterior inmersión de las semillas en una solución de fosfato trisódico al 10% durante 3 h, redujo considerablemente la infección del virus de las semillas sin afectar su germinación, aunque no la controló totalmente.
4. Los tratamientos a base de fosfato trisódico al 10% durante 3 h, de ácido clorhídrico al 0.1 N durante 30 min, así como la termoterapia a 70°C durante 72 h, 96 h y 120 h, aplicados cada uno de ellos de manera independiente, no fueron efectivos en la desinfección de las semillas, debido a que seguían obteniéndose altos índices de transmisión del virus tras dichos tratamientos, afectando ligeramente la germinación de las semillas, a excepción de los tratamientos de fosfato trisódico y termoterapia a 70°C durante 96 h.

5. La secuencia del MNSV obtenida a partir de plántulas procedentes de semilla comercial de melón de España mostró 100% de identidad nucleotídica con las secuencias de varios aislados del MNSV procedentes de América Latina, por lo cual, se plantea la hipótesis de la posible introducción de esta secuencia en dichos países a través de la semilla.

ENSAYO MULTIPLEX PCR PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA Y DIFERENCIACIÓN DE *OLPIDIUM BORNOVANUS*, *O. BRASSICAE* Y *O. VIRULENTUS*

1. Los zoosporangios de *O. bornovanus* y *O. brassicae* sl son muy similares y, por lo tanto, estas especies no pueden ser distinguidas mediante esta característica morfológica.
2. La morfología de las esporas de resistencia es la característica más importante para diferenciar *O. bornovanus* de *O. brassicae* sl, sin embargo, *O. brassicae* y *O. virulentus* no son diferenciados mediante esta característica.
3. La multiplex PCR fue efectiva en la detección y diferenciación de *O. bornovanus*, *O. brassicae* y *O. virulentus*, incluso cuando las esporas de resistencia no fueron observadas.
4. Mediante la multiplex PCR fue posible detectar infecciones mixtas de *O. bornovanus* y *O. virulentus* en condiciones naturales, infecciones no descritas con anterioridad a esta tesis.
5. Mediante la multiplex PCR fue posible detectar *O. bornovanus* directamente de muestras de agua, siendo ésta la primera cita de dicha situación.

6. Con el método de extracción de *Olpidium* a partir de una suspensión de zoosporas se obtiene menor cantidad de DNA en comparación con el método de extracción directa a partir de raíces, obteniéndose bandas de mayor intensidad con este último método tras la multiplex PCR.
7. La multiplex PCR resultó ser específica y sensible a las especies de *Olpidium* analizadas en este estudio, resultados comprobados mediante secuenciación de los productos obtenidos, así como también mediante el análisis de diferentes especies de hongos que usualmente están presentes en raíces de distintos tipos de hortícolas y sistemas hidropónicos, en el caso de la especificidad de la multiplex PCR, y mediante cuantificación espectrofotométrica de DNA, en el caso de la sensibilidad de dicho método.

DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DEL MNSV Y *OLPIDIUM* PROCEDENTES DE DIFERENTES ORÍGENES

1. El MNSV fue detectado en todas las especies de cucurbitáceas y orígenes geográficos estudiados, tales como Guatemala, Honduras, México, Panamá y España, no así en muestras procedentes de Brasil, Túnez y Estados Unidos.
2. *O. bornovanus*, hongo vector del MNSV, fue observado constantemente en las raíces de las plantas enfermas, en combinación con el citado virus.
3. Las infecciones mixtas MNSV/*O. virulentus* y MNSV/*O. bornovanus*/*O. virulentus*, infecciones no descritas con anterioridad, fueron observadas en un reducido número de muestras.
4. Las proteínas p29, p89, p7A, p7B y p42 fueron analizadas en una población española y mundial del MNSV de manera independiente, para establecer la diversidad genética que presenta este virus. A nivel español, no parece haber una gran variabilidad en términos geográficos, hospedante y año de recolección, mientras que a nivel mundial se

observa una mayor variabilidad geográfica, debido a que los aislados europeos se separan filogenéticamente de los aislados de Latinoamérica, y estos a su vez de los aislados de referencia de Japón. Adicionalmente, los aislados de Japón varían a nivel filogenético en relación al hospedante en el cual fueron obtenidos.

5. Las regiones genómicas correspondientes a las proteínas p29/p89 y p7B parecen ser más propensas a la variabilidad que las correspondientes a las proteínas p7A y p42. Asimismo, la diversidad genética observada en las proteínas completas p7A y p7B sugiere que estas regiones codificantes se encuentran bajo una fuerte presión de selección.
6. Algunos aislados del MNSV procedentes de varios países de América Latina donde las semillas de cucurbitáceas son mayormente importadas, mostraron 100% de identidad nucleotídica, en todas las zonas del genoma analizadas, con la secuencia obtenida en plántulas procedentes de semilla comercial de melón de España, por lo cual, es posible la introducción y diseminación de esta secuencia en dichos países a través de la semilla.
7. El análisis de la región ITS del DNA ribosómico de diferentes aislados de *O. bornovanus* revela que dichos aislados aparentemente no muestran una gran variabilidad en términos geográficos y año de recolección. Asimismo, una situación similar ocurre con los aislados de *O. virulentus*. No obstante, dos grupos filogenéticos independientes (*O. bornovanus* y *O. virulentus*) fueron obtenidos, los cuales posiblemente estén relacionados con la especie de cucurbitácea.

PRESENCIA, DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS EN CULTIVOS DE CUCURBITÁCEAS EN PANAMÁ

1. El MNSV fue detectado por primer vez en los cultivos de melón de las regiones centrales de Panamá, específicamente en Los Santos y Coclé, siendo su hongo vector, *O. bornovanus*, observado también por primera vez en esta hortícola y en las mismas regiones geográficas.

2. Otros virus analizados en este estudio fueron el CMV, SqMV, PRSV-W, WMV-2 y ZYMV, detectándose solamente los tres últimos como resultado de este estudio, siendo esta la primera cita sobre la distribución de estos virus en las principales regiones del cultivo de cucurbitáceas en Panamá.
3. El PRSV-W fue el virus mayormente encontrado en las regiones estudiadas, seguido del ZYMV, WMV-2 y MNSV.
4. Las infecciones dobles ZYMV + PRSV, ZYMV + MNSV y PRSV + WMV-2 encontradas en este estudio podrían llegar a producir importantes pérdidas en la producción debido a un posible efecto sinérgico entre las mismas.
5. Los aislados del MNSV procedentes de la región de Los Santos presentaron similar secuencia genómica, por lo cual, dichos aislados probablemente compartan un origen común, mientras que el aislado procedente de la región de Coclé se mostró mucho más alejado a nivel molecular que estos aislados.
6. El aislado del MNSV de Coclé presenta la misma secuencia genómica que el aislado de semilla indicado anteriormente, por lo cual, se plantea su posible introducción en esta región mediante esta vía.
7. Los aislados *O. bornovanus* no parecen mostrar una gran variabilidad a nivel de secuencia de DNA en términos de región geográfica y año de recolección.

Capítulo 11

Capítulo 11

Bibliografía general

- Adams MJ, 1991. Transmission of plant viruses by fungi. *Annals of Applied Biology* **118**, 479–492.
- Aegerter BJ, Gordon TR, Davis RM, 2000. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. *Plant Disease* **84**, 224–230.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, 1979. *Introductory Mycology*. 3rd Edition. John Wiley & Sons. New York: USA, 632 p.
- Alfaro-García A, Armengol J, Bruton BD, Gams W, García-Jiménez J, Martínez-Ferrer G, 1996. The taxonomic position of the causal agent of *Acremonium* collapse of muskmelon. *Mycologia* **88**, 804–808.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Álvarez JM, 1997. Tendencias en la mejora genética del melón. En: Namesny A, ed. *Melones*. Compendios de Horticultura 10. Ediciones de Horticultura. Reus, Tarragona: España, p. 25–34.
- Avgelis AD, 1985. Occurrence of *Melon necrotic spot virus* in Crete (Greece). *Phytopath. Z.* **114**, 365–372.
- Avgelis AD, 1989. Watermelon necrosis caused by a strain of *Melon necrotic spot virus*. *Plant Pathology* **38**, 618–622.
- Baker C, Webb S, Adkins S, 2008. *Squash vein yellowing virus*, causal agent of watermelon vine decline in Florida. Florida Department of Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry. *Plant Pathology circular* **407** (DACS-P-01579).
- Barr DJS, 1968. A new species of *Olpidium* parasitic on cucumber roots. *Canadian Journal of Botany* **46**, 1087–1091.
- Barr DJS, 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. *Canadian Journal of Botany* **58**, 2380–2394.

- Barr DJS, 2001. Chytridiomycota. In: McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA, eds. *The Mycota*. Vol. 7A. Springer-Verlag. New York: USA, p. 93–112.
- Beltrá R, López MM, 1994. Marchitamiento bacteriano (*Erwinia tracheiphila*). En: Díaz-Ruíz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 28–29.
- Blancard D, Lecoq H, Pitrat M, 1991. Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar, luchar. 1ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid: España, 301 p.
- Blystad DR, Nes B, 1995. Melon necrotic spot in cucumber. *Vaxtskyddsnotiser* **59**, 35–37.
- Bos L, Maat DZ, 1974. A strain of *Cucumber mosaic virus*, seed-transmitted in beans. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **80**, 113–123.
- Bos L, Van Dorst HJM, Huttinga H, Maat DZ, 1984. Further characterization of *Melon necrotic spot virus* causing severe disease in glasshouse cucumbers in the Netherlands and its control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **90**, 55–69.
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ, eds, 1996. *Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE Database* (Online Database). URL: <http://www.image.fs.uidaho.edu/vide/> (24-agosto-2008).
- Bruton BD, Wann EV, 1994. Vines declines of cantaloupe caused by *Macrophomina phaseolina*: epidemiology and control. *Phytopathology* **85**, 382.
- Bruton BD, 1996. Una perspectiva histórica del decaimiento de las cucurbitáceas en los Estados Unidos. En: *VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología*. Córdoba: España, p. 30.
- Bruton BD, Miller ME, 1997a. Ocurrence of vine decline diseases of muskmelon in Guatemala. *Plant Disease* **81**, 694.
- Bruton BD, Miller ME, 1997b. Ocurrence of vine decline diseases of melons in Honduras. *Plant Disease* **81**, 696.
- Bruton BD, Fletcher J, Pair SD, Shaw M, Sittertz-Bhatkar H, 1998. Association of a phloem-limited bacterium with yellow vine disease in cucurbits. *Plant Disease* **82**, 512–520.

- Büchen-Osmond C, 2002. ICTVdb: *The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Online Database). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm> (29-abril-2009).
- CABI, 2005. Crop protection compendium. Wallingford, UK: CAB International.
- Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J, 2003. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* **4**, 29–33.
- Campbell RN, Lin MT, 1976. Morphology and thermal death point of *Olpidium brassicae*. *American Journal of Botany* **63**, 826–832.
- Campbell RN, 1985. Longevity of *Olpidium brassicae* in air-dry soil and the persistence of the lettuce big-vein agent. *Canadian Journal of Botany* **63**, 2288–2289.
- Campbell RN, 1988. Cultural characteristics and manipulative methods. In: Cooper JI, Asher MJC, eds. *Viruses with fungal vectors*. Association of Applied Biologists. Wellesbourne: UK, p. 153–165.
- Campbell RN, Sim ST, 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radicale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1136–1143.
- Campbell RN, Sim ST, Lecoq H, 1995. Virus transmission by host-specific strains of *Olpidium bornovanus* and *Olpidium brassicae*. *European Journal of Plant Pathology* **101**, 273–282.
- Campbell RN, 1996. Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 87–108.
- Campbell RN, Wipf-Scheibel C, Lecoq H, 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology* **86**, 1294–1298.
- Cañizares MC, Marcos JF, Pallás V, 2001. Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of *Carnation mottle virus* (CarMV) and phylogenetic relationships within the *Tombusviridae* family. *Archives of Virology* **146**, 2039–2051.
- Cássia-Souza-Dias R, 2003. Mejora de la resistencia al colapso del melón: control genético y desarrollo de líneas resistentes. *Tesis Doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 152 p.

- Catal M, Jordan SA, Butterworth SC, Schilder AMC, 2007. Detection of *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in grapevine by nested multiplex polymerase chain reaction. *Phytopathology* **97**, 737–747.
- Cebolla V, 1994. Muerte de melón causada por *Rhizoctonia* (*R. solani*). En: Díaz-Ruíz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 44–46.
- Celix A, Luis-Arteaga M, Rodriguez-Cerezo E, 1996. First report of *Cucumber green mottle mosaic* Tobamovirus infecting greenhouse-grown cucumber in Spain. *Plant Disease* **80**, 1303.
- Clark MF, Adams AN, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475–483.
- CONABIO, 2008. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). *Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad* (Online Database). URL:http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20912_sg7.pdf (24-agosto-2008).
- Cook WRI, Collins WB, 1935. The life-history of *Olpidium majus* sp. nov. with notes on *Olpidium radicale* Schwartz and Cook. *Annals of Mycology* **35**, 72–78.
- Córdoba-Sellés MC, 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**, 1250–1254.
- Côté MJ, Tardif MC, Meldrum AJ, 2004. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease* **88**, 1219–1225.
- Coudriet DL, Kishaba AN, Carroll JE, 1979. Transmission of *Muskmelon necrotic spot virus* in muskmelons by cucumber beetles. *Journal of Economy Entomology* **72**, 560–561.

- Coudriet DL, Kishaba AN, Bohn GW, 1981. Inheritance of resistance to *Muskmelon necrotic spot virus* in a melon aphid-resistant breeding line of muskmelon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **106**, 789–791.
- Crous PW, Hong L, Wingfield BD, Wingfield MJ, 2001. ITS rDNA phylogeny of selected *Mycosphaerella* species and their anamorphs occurring on *Myrtaceae*. *Mycological Research* **105**, 425–431.
- Cuadrado IM, Gómez J, Moreno P, 1993. El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería. I. Importancia del MNSV como causa de la muerte súbita del melón. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **19**, 93–106.
- Cuadrado IM, Janssen D, Velasco L, Ruiz L, Segundo E, 2001. First report of *Cucumber vein yellowing virus* in Spain. *Plant Disease* **85**, 336.
- Cubeta MA, Echardi E, Abernethy T, Vilgalys R, 1991. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology* **81**, 1395–1400.
- De Cara M, López V, Córdoba MC, Santos M, Jordá C, Tello JC, 2008. Association of *Olpidium bornovanus* and *Melon necrotic spot virus* with vine decline of melon in Guatemala. *Plant Disease* **92**, 709–713.
- De Miguel A, 2007. Portainjertos. En: De Miguel A, De la Torre F, Baixauli C, Maroto JV, Jordá MC, López MM, García-Jiménez J, eds. *Injerto de Hortalizas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid: España, p. 55–64.
- Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Grnier F, Robaglia C, Delaunay T, Lecoq H, 1996. Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* on the island of Martinique. *Plant Disease* **80**, 203–207.
- Dias HF, 1970. Transmission of *Cucumber necrosis virus* by *Olpidium cucurbitacearum* Barr & Dias. *Virology* **40**, 828–839.
- Díaz JA, Nieto C, Moriones E, Aranda MA, 2002. Spanish *Melon necrotic spot virus* isolate overcomes the resistance conferred by the recessive *nsv* gene of melon. *Plant Disease* **86**, 694.
- Díaz JA, Bernal JJ, Moriones E, Aranda MA, 2003. Nucleotide sequence and infectious transcripts from a full-length cDNA clone of the Carnovirus *Melon necrotic spot virus*. *Archives of Virology* **148**, 599–607.

- Díaz JA, Nieto C, Moriones E, Truniger V, Aranda MA, 2004. Molecular characterization of a *Melon necrotic spot virus* strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 668–675.
- Dinant S, Lot H, 1992. Review: *Lettuce mosaic virus*. *Plant Pathology* **41**, 528–542.
- Doolittle SP, Walker MN, 1925. Further studies on the overwintering and dissemination of cucurbit mosaic. *Journal of Agricultural Research* **31**, 1–58.
- Dumas de Vaulx R, 1970. Étude de la transmission du virus de la criblure. In: *Rapport d'activité 1969-1970 Station D'Amélioration des Plantes Maraichères*. Montfavet, France: INRA, p. 46–50.
- Dunne CP, Glen M, Tommerup IC, Shearer BL, Hardy GEST J, 2002. Sequence variation in the rDNA ITS of Australian *Armillaria* species and intra-specific variation in *A. luteobubalina*. *Australasian Plant Pathology* **31**, 241–251.
- Egel DS, Adkins S, 2007. *Squash vein yellowing virus* identified in watermelon (*Citrullus lanatus*) in Indiana. *Plant Disease* **91**, 1056.
- FAO, 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Base de datos estadísticos* (Online Database). URL: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (24-agosto-2008).
- Fernández O, 1987. Enfermedades de algunos cultivos importantes en Panamá. In: *Curso de áfidos*. Panamá: CATIE-UP-IDIAP, p. 45–50.
- Ferreira SA, Boley RA, 1992. *Erwinia tracheiphila*: bacterial wilt of cucurbits. *Department of Plant Pathology, CTAHR, University of Hawaii at Manoa* (Online Database). URL: http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/Type/e_trach.htm (24-agosto-2008).
- Ferrer-Gual, 2008. Caracterización molecular y desarrollo de métodos de diagnóstico del género Fabavirus. Evaluación del BTH como método de control. *Tesis Doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 122 p.

- Franken AAJM, Maat DZ, Kamminga GC, 1990. Detection of *Squash mosaic virus* in seeds of melon (*Cucumis melo*) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *European Journal of Plant Pathology* **96**, 91–102.
- Furuki I, 1981. *Epidemiological studies on melon necrotic spot*. Shizuokaken, Japan: Shizuoka Agricultural Experiment Station: Technical Bulletin 14.
- García JC, 1997. Evaluación de estrategias para el manejo integrado de virosis en melón de exportación (*Cucumis melo* L.). *Trabajo Final de Carrera*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá. Panamá, 76 p.
- García-Jiménez J, Velásquez MT, Alfaro A, 1989. Secuencia de síntomas en el colapso del melón. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **4**, 333–342.
- García-Jiménez J, Martínez-Ferrer G, Armengol J, Velásquez MT, Orts M, Juárez M, Ortega A, Jordá MC, Alfaro A, 1993. Agentes asociados al colapso del melón en distintas zonas españolas. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **19**, 401–423.
- García-Jiménez J, 1994. Decaimiento de ramas por *Macrophomina* (*M. phaseolina*). En: Díaz-Ruíz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 54–56.
- García-Jiménez J, Armengol J, Martínez-Ferrer G, 1994a. Puntos negros de las raíces de melón y sandía (*Monosporascus* spp.). En: Díaz-Ruíz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 38–42.
- García-Jiménez J, Velásquez MT, Jordá C, Alfaro-García A, 1994b. *Acremonium* species as the causal agent of muskmelon collapse in Spain. *Plant Disease* **78**, 416–419.
- García-Jiménez J, Armengol J, Sales R, Jordá C, Bruton BD, 2000. Fungal pathogens associated with melon collapse in Spain. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 169–173.
- García-Jiménez J, 2006. Colapso de plantas hortícolas de etiología compleja. En: *XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Murcia: España, p. 7.

- García-Jiménez J, López MM, Jordá C, 2007. Enfermedades más importantes que previene el injerto. En: De Miguel A, De la Torre F, Baixauli C, Maroto JV, Jordá MC, López MM, García-Jiménez J, eds. *Injerto de Hortalizas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid: España, p. 39–53.
- Genovés A, Navarro JA, Pallás V, 2006. Functional analysis of the five *Melon necrotic spot virus* genome-encoded proteins. *Journal of General Virology* **87**, 2371–2380.
- Genovés A, 2008. Análisis funcional y localización subcelular de las proteínas implicadas en el movimiento intra e intercelular del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV). *Tesis Doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 238 p.
- Gerik JS, 1992. Zoosporic obligate parasites of roots. In: Singleton LL, Mihail JD, Rush CM, eds. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. American Phytopathological Society Press. Saint Paul, Minnesota: USA, p. 18–24.
- Gibbs AJ, Gower JC, 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.
- Giesman-Cookmeyer D, Silver S, Vaewhongs AA, Lommel SA, Deom CM, 1995. Tobamovirus and Dianthovirus movement proteins are functionally homologous. *Virology* **213**, 38–45.
- Gillings M, Broadbent P, Indsto J, Lee RF, 1993. Characterization of strains of *Citrus tristeza virus* by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology* **80**, 692–698.
- Gómez J, Velasco V, 1991. Presencia de *Olpidium radicale* en los embalses para riego en Almería. *PHYTOMA-Spain* **33**, 23–27.
- Gómez J, Cuadrado I, Velasco V, 1993a. El Virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería. II. Eficacia de la desinfección del suelo frente al MNSV. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **19**, 179–186.
- Gómez J, Cuadrado I, Velasco V, 1993b. El Virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería. III. Eficacia del injerto del melón para combatir el MNSV. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **19**, 187–192.

- Gómez J, 1994. Podredumbre radicular asociada a *Olpidium* (*O. radicale* y *O. brassicae*). En: Díaz-Ruíz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 31–32.
- Gómez J, Guirado ML, Serrano Y, Rodríguez J, Sáez E, 2005. Importancia, epidemiología y control de *Olpidium bornovanus*. *Boletín de la Sociedad Española de Fitopatología* **52**, 4–7.
- Gonzalez-Garza R, Gumpf DJ, Kishaba AN, Bohn GW, 1979. Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California isolate of *Melon necrotic spot virus*. *Phytopathology* **69**, 340–345.
- González-Torres R, Melero JM, Gómez-Vázquez J, Jiménez-Díaz RM, 1994. Fusariosis vasculares del melón y la sandía (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* y *F. oxysporum* f. sp. *niveum*). En: Díaz-Ruíz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 47–50.
- Gosalvez B, Navarro JA, Lorca A, Botella F, Sánchez-Pina MA, Pallás V, 2003. Detection of *Melon necrotic spot virus* in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods* **113**, 87–93.
- Green SK, Hwang LL, Kuo YK, 1987. Epidemiology of *Tomato mosaic virus* in Taiwan and identification of strains. *Journal of Plant Diseases and Protection* **94**, 386–387.
- Gu QS, Bao WH, Tian YP, Prins M, Yang HX, Lu J, Liu LF, Peng B, 2008. *Melon necrotic spot virus* newly reported in China. *Plant Pathology* **57**, 765.
- Guerra JA, Fernández O, Osorio N, 1995. Uso de aceite agrícola y de insecticida en el control de virus no persistente en melón (WMV-1). Panamá: IDIAP, 7 p.
- Gug-Seoun C, Jae-Hyun K, Jeong-Soo K, 2003. Characterization of *Melon necrotic spot virus* isolated from muskmelon. *Plant Pathology Journal* **19**, 123–127.
- Hacker DL, Petty ITD, Wei N, Morris TJ, 1992. *Turnip crinkle virus* genes required for RNA replication and virus movement. *Virology* **186**, 1–8.

- Herrera JA, Cebrian MC, Jordá C, 2006a. First report of *Melon necrotic spot virus* in Panama. *Plant Disease* **90**, 1261.
- Herrera JA, Osorio JM, Salazar LC, Fernández O, 2006b. Hospedantes de los potyvirus del melón (*Cucumis melo* L.) en la provincia de Los Santos, Panamá. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **32**, 95–107.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2007a. Molecular variability of different isolates of *Olpidium bornovanus*. In: *XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Sorrento: Italy, p. 275.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Roselló JA, Córdoba-Sellés C, Jordá C, 2007b. Molecular variability among isolates of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) from Spain, Mexico and Central America. In: *XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Sorrento: Italy, p. 281.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Jordá C, 2008. *Melon necrotic spot virus* (MNSV): nuevo virus en el cultivo de melón en Panamá. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* **79–80**, 40–48.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Córdoba-Sellés MC, Jordá C, 2009a. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. *Mycological Research* **113**, 602–610.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2009b. Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of seed-disinfection treatments. *Plant Pathology* **58**, 436–442.
- Herrera-Vásquez JA, Córdoba-Sellés MC, Cebrián MC, Roselló JA, Alfaro-Fernández A, Jordá C, 2009c. Genetic diversity of *Melon necrotic spot virus* and *Olpidium* isolates from different origins. *Plant Pathology*, Accept (05-Jun-2009).
- Hibi T, Furuki I, 1985. *Melon necrotic spot virus*. In: *Descriptions of Plants Viruses* 302. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists.
- Hiruki C, 1987. Recovery and identification of *Tobacco stunt virus* from air-dried resting spores of *Olpidium brassicae*. *Plant Pathology* **36**, 224–228.

- Huppert E, Szilassy D, Salánki K, Divéki Z, Balázs E, 2002. Heterologous movement protein strongly modifies the infection phenotype of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of Virology* **76**, 3554–3557.
- Iglesias-Culebras A, 2000. Resistencia genética al colapso del melón. *Tesis Doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 119 p.
- James TY, Letcher PM, Longcore JE, Mozley-Standridge SE, Porter D, Powell MJ, Griffith GW, Vilgalys R, 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* **98**, 860–871.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gibson TJM, Gouy M, Higgins DG, 1998. Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 403–405.
- Jian L, Hiruki C, 1996. Polymerase chain reaction amplification and restriction analysis of the ribosomal DNA of *Olpidium radicale* isolates. *Journal of Microbiological Methods* **26**, 87–93.
- Johansen E, Edwards MC, Hampton RO, 1994. Seed transmission of viruses: Current perspectives. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 363–386.
- Jordá-Gutiérrez C, Gómez-Guillamón ML, Juárez M, Alfaro-García A, 1993. Clostero-like particles associated with a yellows disease of melons in South-eastern Spain. *Plant Pathology* **42**, 722–727.
- Jordá C, 1997. Enfermedades virales del melón. En: Namesny A, ed. *Melones*. Compendios de Horticultura 10. Ediciones de Horticultura. Reus, Tarragona: España, p. 141–152.
- Jordá C, Armengol J, Gisbert J, Osca JM, Lacasa A, Velásquez B, 2002. El tratamiento con microondas para la desinfección de suelos. *PHYTOMA-Spain* **138**, 118–121.
- Jordá C, Font MI, Martínez-Culebras P, 2005. Viral etiology of diseases detected in melon in Guatemala. *Plant Disease* **89**, 338.
- Juárez M, Ortega A, Jordá C, 1994a. Aspectos epidemiológicos del virus del cribado (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) y variabilidad de aislados. En: *VII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Sitges, Barcelona: España, p. 71.

- Juárez M, Ortega A, Jordá C, 1994b. Variabilidad del virus del cribado: un enemigo de las cucurbitáceas en expansión en España. *Horticultura* **11**, 37–40.
- Juárez M, Truniger V, Aranda MA, 2004. First Report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Spain. *Plant Disease* **88**, 907.
- Karling JS, 1977. Chytridiomycetorum iconographia. Lubrecht and Cramer. Monticello, New York: USA.
- Kassem MA, Sempere RN, Juárez M, Aranda MA, Truniger V, 2007. *Cucurbit aphid-borne yellows virus* is prevalent in field-grown cucurbits crops of southeastern Spain. *Plant Disease* **91**, 232–238.
- Kido K, Tanaka C, Mochizuki T, Kubota K, Ohki T, Ohnishi J, Knight LM, Tsuda S, 2008. High temperatures active local viral multiplication and cell-to-cell movement of *Melon necrotic spot virus*, but restrict expression of systemic symptoms. *Phytopathology* **98**, 181–186.
- Kishi, K. 1966. Necrotic spot of melon, a new virus disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **32**, 363–386.
- 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 of the National Agricultural Research Center for Western Region* **4**, 39–59.
- Korkmaz S, Tomitaka Y, Onder S, Ohshima K, 2008. Occurrence and molecular characterization of Turkish isolates of *Turnip mosaic virus*. *Plant Pathology* **57**, 1155–1162.
- Kubo C, Nakazono-Nagaoka E, Hagiwara K, Kajihara H, Takeuchi S, Matsuo K, Ichiki TU, Omura T, 2005. New severe strains of *Melon necrotic spot virus*: symptomatology and sequencing. *Plant Pathology* **54**, 615–620.
- Kularatne HAGC, Lawrie AC, Barber PA, Keane PJ, 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation *in planta* of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research* **108**, 1476–1493.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150–163.
- Lange L, Insunza V, 1977. Root inhabiting *Olpidium* species: the *O. radicale* complex. *Transactions of the British Mycological Society* **69**, 377–384.

- Laterrot H, Pécaut P, 1968. Incidence du traitement thermique des semences de tomate sur la transmission du virus de la mosaïque du tabac. *Études de Virologie, Annales des Épiphyties* **19**, 159–164.
- Lee SB, Taylor JW, 1992. Phylogeny of five fungus-like protocystan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 636–653.
- León J, 1987. Botánica de los cultivos tropicales. San José, Costa Rica: IICA, 445 p.
- Li WZ, Qu F, Morris TJ, 1998. Cell-to-cell movement of *Turnip crinkle virus* is controlled by two small open reading frames that function in trans. *Virology* **244**, 405–416.
- Lovisollo O, 1980. Virus and viroids disease of cucurbits. *Acta Horticulturae* **88**, 33–82.
- Lovisollo O, Lecoq H, Pitrat M, 1982. Note sur les virus de cucurbitacées présents en France. Montfavet, France: INRA-CRA d'Avignon, 29 p.
- Luis-Arteaga M, 1991. Virosis de cucurbitáceas en España. *PHYTOMA-España* **25**, 9–16.
- Luis-Arteaga M, 1994. Enfermedades producidas por virus. En: Díaz-Ruíz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 73–91.
- Mallor C, Álvarez JM, Luis-Arteaga M, 2003. Inheritance of resistance to systemic symptom expression of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) in *Cucumis melo* L. “Doublon”. *Euphytica* **134**, 319–324.
- Mallor C, Álvarez JM, Luis-Arteaga M, 2004. Behaviour of *Cucumis melo* ‘Cantaloup Haogen’ against *Melon necrotic spot virus* (MNSV). In: *Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Olomouc: Czech Republic, p. 203–208.
- MAPA, 2008. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. *Anuario de Estadística Agroalimentaria 2007* (Online Database). URL: <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/introduccion.htm> (24-agosto-2008).

- Marcos JF, Vilar M, Perez-Paya E, Pallás V, 1999. In vivo detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from carnation mottle carmovirus. *Virology* **255**, 354–365.
- Maroto JV, 2002. Horticultura herbácea especial. 5ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid: España, 702 p.
- Martínez de Salinas J, Fraile A, Solís I, García-Arenal F, 1987. Characterization of Spanish isolate of *Melon necrotic spot virus*. In: *Proceedings of VII Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. Granada: Spain, p. 142.
- Martyn RD, Lovic BR, Maddox DA, Germash A, Miller ME, 1994. First report of *Monosporascus* root rot/vine decline of watermelon in Tunisia. *Plant Disease* **78**, 1220.
- Martyn RD, Batten JS, Park YJ, Miller ME, 1996. First report of *Monosporascus* root rot/vine decline of watermelon in Mexico. *Plant Disease* **80**, 1430.
- Martyn RD, Gordon TR, 1996. Fusarium wilt in melon. In: Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE, eds. *Compendium of cucurbits diseases*. American Phytopathological Society Press. Saint Paul, Minnesota: USA, p. 11–13.
- Martyn RD, Miller ME, 1996. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging disease of melons worldwide. *Plant Disease* **80**, 716–725.
- Matsuo K, Kameya-Iwaki M, Ota T, 1991. Two new strains of *Melon necrotic spot virus*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **57**, 558–567.
- Mertely JC, Martyn RD, Miller ME, Bruton BD, 1991. Role of *Monosporascus cannonballus* and other fungi in a root rot/vine decline disease of muskmelon. *Plant Disease* **75**, 1133–1137.
- Messiaen CM, Blancard D, Rouxel F, Lafon R, 1995. Enfermedades de las hortalizas. 3ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid: España, 576 p.
- MICOD, 2008. MICO Diversity: *Olpidium brassicae* (*Spizellomyces*, *Chytridiomycota*). Systematic Botany and Mycology. University of Munich: Germany (Online Database). URL: <http://www.botanik.biologie.uni-muenchen.de/botsyst/pdf/> (24-agosto-2008).
- MIDA, 1998. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Dirección Nacional de Desarrollo Agrícola, Sección de Cultivos de Exportación, Panamá.

- MIDA, 2005. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Dirección Ejecutiva Regional (Región 8), Departamento de Planificación y Agricultura, Unidad de Agroexportación, Panamá.
- MIDA, 2008. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Dirección Nacional de Agricultura, Programa Nacional de Cucurbitáceas, Panamá.
- Mochizuki T, Ohnishi J, Ohki T, Kanda A, Tsuda S, 2008. Amino acid substitution in the coat protein of *Melon necrotic spot virus* causes loss of binding to the surface of *Olpidium bornovanus* zoospores. *Journal of General Plant Pathology* **74**, 176–181.
- Munnecke DE, Laemmlen FF, Bricker J, 1984. Soil fumigation controls sudden wilt of melon. *California Agriculture*, p. 8–9.
- Nameth ST, Dodds JA, Paulus AO, Laemmlen FF, 1986. Cucurbit viruses of California. *Plant Disease* **70**, 8–12.
- Naval-Merino MDM, 2005. Transformación genética de melón tipo Galia con los genes de la replicasa, proteína de cubierta y proteína de movimiento del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV). *Tesis Doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 202 p.
- Ohki T, Sako I, Kanda A, Mochizuki T, Honda Y, Tsuda S, 2008. A new strain of *Melon necrotic spot virus* that is unable to systematically infect *Cucumis melo*. *Virology* **98**, 1165–1170.
- Ohshima K, Ando T, Motomura N, Matsuo K, Sako N, 2000. Nucleotide sequences of protein genes of two Japanese *Melon necrotic spot virus* isolates. *Acta Virologica* **44**, 309–314.
- OIRSA-PARSA, 1999. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria-Programa de Ayuda Regional de Salud Animal. Listado Oficial de Plagas y Enfermedades, Panamá.
- Pagán I, Córdoba-Sellés MC, Martínez-Priego L, Fraile A, Malpica JM, Jordá C, García-Arenal F, 2006. Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology* **96**, 274–279.
- Palti J, Joffe AZ, 1971. Causes of the *Fusarium* wilts of cucurbits in Israel and conditions favoring their development. *Phytopathology* **70**, 31–42.
- Pirone TP, Harris KF, 1970. Nonpersistent transmission of plant viruses by aphids. *Annual Review of Phytopathology* **15**, 55–73.

- Poolpol P, Inouye T, 1986. Enhancement of *Cucumber mosaic virus* multiplication by *Zucchini yellow mosaic virus* in double infected cucumber plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **52**, 22–30.
- Provvidenti R, 1996. Diseases caused by viruses. In: Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE, eds. *Compendium of Cucurbit Diseases*. American Phytopathological Society Press. Saint Paul, Minnesota: USA, p. 37–45.
- Reuveni R, Krikun J, Nachmias A, Shlevin E, 1982. The role of *Macrophomina phaseolina* in a collapse of melon plants in Israel. *Phytoparasitica* **10**, 51–56.
- Reuveni R, Krikun J, Shani U, 1983. The role of *Monosporascus eutypoides* in a collapse of melon plants in an arid area of Israel. *Phytopathology* **73**, 1223–1226.
- Reuveni R, 1985. *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* spp. on melon roots in South Africa. *Phytophylactica* **17**, 109.
- Rico P, Ivars P, Elena SF, Hernández C, 2006. Insights into the selective pressures restricting *Pelargonium flower break virus* genome variability: evidence for host adaptation. *Journal of Virology* **80**, 8124–8132.
- Riviere CJ, Pot J, Tremaine JH, Rochon DM, 1989. Coat protein of melon necrotic spot carmovirus is more similar to those of tombusviruses than those of carmoviruses. *Journal of General Virology* **70**, 3033–3042.
- Riviere CJ, Rochon DM, 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of *Melon necrotic spot virus*. *Journal of General Virology* **71**, 1887–1896.
- Robertson NL, French R, Gray SM, 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of Luteoviruses. *Journal of General Virology* **72**, 1473–1477.
- Rochon DA, Kakani K, Robbins M, Reade R, 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and Plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 211–241.
- Rodríguez JM, 2004. Melón. Vademécum de variedades hortícolas. El Ejido, Almería: España, p. 197–219.

- Rodríguez R, Gómez-Vásquez J, García-Jiménez J, 1994. Chancro gomoso del tallo (*Didymella bryoniae*). En: Díaz-Ruíz JR, García-Jiménez J, eds. *Enfermedades de las cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 50–53.
- Rubio L, Soong J, Kao J, Falk BW, 1999. Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: *Lettuce infectious yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, and *Beet pseudo-yellows virus*. *Phytopathology* **89**, 707–711.
- Rubio-Huertos M, Peña-Iglesias A, 1973. Bacilliform particles in cortex cells of *Cucumis melo* fruits. *Plant Disease Reporter* **57**, 649–652.
- Ryden K, Persson P, 1986. *Melon necrotic spot virus*-a new virus disease in Sweden. *Vaxtskyddsnotiser* **50**, 4–5.
- Sahtiyanci, S. 1962. Studien über einige wurzelparasitäre Olpidiaceen. *Arch. Mikrobiol.* **41**, 187–228.
- Sales R, Bezerra do Nascimento IJ, De Souza Freitas L, Beltrán R, Armengol J, Vicent A, García-Jiménez J, 2004. First report of *Monosporascus cannonballus* on melon in Brazil. *Plant Disease* **88**, 84.
- Sánchez-Navarro JA, Aparicio F, Rowhani A, Pallás V, 1998. Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of *Prunus necrotic spot virus* in herbaceous and *Prunus* hosts. *Plant Pathology* **47**, 780–786.
- Sang-Min K, Sang-Hyun N, Jung-Myung L, Kyu-Ock Y, Kook-Hyung K, 2003. Destruction of *Cucumber green mottle mosaic virus* by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR. *Molecules and Cells* **16**, 338–342.
- 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**, 20–25.
- Sato M, Watanabe T, Furuki I, Morita H, 1995. Root rot of melon caused by *Nodulisporium melonis* in Japan. I: Occurrence, symptoms, isolation and pathogenicity. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **61**, 325–329.

- Segundo E, Janssen D, Velasco L, Ruiz L, Cuadrado IM, 2001. First report of *Cucumber leaf spot virus* in Spain. *Plant Disease* **85**, 1123.
- Sen B, Palodhi PR, 1979. A disease of muskmelon caused by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Current Science* **48**, 166–167.
- Serrano-Cermeño Z, 1996. Veinte cultivos de hortalizas en invernadero. 1^a Edición. Autor-Editor, 640 p.
- Sharma YR, Chohan JS, 1974. Transmission of cucumis viruses 1 and 3 through seeds of cucurbits. *Indian Phytopathology* **26**, 596–598.
- Sitterly WR, Keinath AP, 1996. Gummy stem blight. In: Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE, eds. *Compendium of cucurbits diseases*. American Phytopathological Society Press. Saint Paul, Minnesota: USA, p. 27–28.
- Solovyev AG, Zelenina DA, Savenkov EI, Grdzlishvili VZ, Morozov SY, Maiss E, Casper R, Atabekov JG, 1997. Host-controlled cell-to-cell movement of a hybrid *Barley stripe mosaic virus* expressing a Dianthovirus movement protein. *Intervirology* **40**, 1–6.
- Sreenivasaprasad S, Mills PR, Meehan BM, Brown AE, 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* **39**, 499–512.
- Tello JC, Gómez J, Camporota P, Lacasa A. 1990. Capacidades parasitarias de *Phytium aphanidermatum* y de *Rhizoctonia solani* sobre pepino y melón. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **16**, 733–741.
- Tomassoli L, Siddu G, Carta A, Di Lernia G, Barba M, 1999. Infezione da *Melon necrotic spot virus* su melone in Sardegna. *Informatore Fitopatologico* **10**, 39–41.
- Tomlinson JA, Faithfull EM, 1979. Effects of fungicides and surfactants on the zoospores of *Olpidium brassicae*. *Annals of Applied Biology* **93**, 13–19.
- Tomlinson JA, Thomas BJ, 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.
- Tsay JG, Tung BK, 1995. The occurrence of *Monosporascus* root rot/vine decline of muskmelon in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* **4**, 25–29.
- Uematsu S, Onogi S, Watanabe T, 1985. Pathogenicity of *Monosporascus cannonballus* Pollack and Uecker in relation to melon root rot in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **51**, 272–276.

- USDA-ARS, 2008. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN). *National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland* (Online Database). URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?404410> (24-agosto-2008).
- Vañanopoulos C, Bragard C, Moreau V, Maraite H, Legrève A, 2007. Identification and quantification of *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata* and *P. graminis* f. sp. *tepida* on barley and wheat. *Plant Disease* **91**, 857–864.
- Vilaseca JC, 2007. Papel biofumigante de los restos de cosecha en el control de *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Pepino mosaic virus* (PepMV) y *Olpidium brassicae* (Word.) Dang. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ecosistemas Agroforestales, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia: España, 433 p.
- Vilgalys R, 2008. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. *Department of Biology, Duke University, Durham, North Carolina: USA* (Online Database). URL: <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm> (24-agosto-2008).
- Walker GE, 1994. First report of *Macrophomina phaseolina* associated with vine decline of muskmelon in South Australia. *Plant Disease* **78**, 640.
- Ward E, Akrofi AY, 1994. Identification of fungi in the Gaeumannomyces-*Phialophora* complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. *Mycological Research* **98**, 219–224.
- White KA, Nagy PD, 2004. Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **78**, 187–226.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. New York: USA, p. 315–322.
- Wylie S, Wilson CR, Jones RAC, Jones MGK, 1993. A polymerase chain reaction assay for *Cucumber mosaic virus* in lupin seeds. *Australian Journal of Agricultural Research* **44**, 41–51.

- Xing W, Hong N, Kun J, Ping G, 2006. Improving the sensitivity of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to study the variability of PLMVd. *Journal of Virological Methods* **135**, 276–280.
- Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H, Wipf-Scheibel C, Marrakchi M, Lecoq H, 2008. First report of *Melon necrotic spot virus* on melon in Tunisia. *Plant Pathology* **57**, 386.
- Yang Y, Kim KS, Anderson EJ, 1997. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in spinach. *Phytopathology* **87**, 924–931.
- Yoshida K, Goto T, Nemoto M, Tsuchizaki T, 1980. Five viruses isolated from melon (*Cucumis melo* L.) in Hokkaido. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **46**, 339–348.
- Zapata M, Cabrera P, Bañón S, Roth P, 1989. El melón. Mundi-Prensa. Madrid: España, 174 p.

Anexos
