

Transmisión por semilla del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) y eficacia de tratamientos de desinfección de semilla

J. A. HERRERA VÁSQUEZ, M. C. CÓRDOBA SELLÉS, M. C. CEBRIÁN, A. A. FERNÁNDEZ, C. JORDÁ

Los índices de transmisión por semilla del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), fueron evaluados en plántulas procedentes de semillas comerciales de melón (*Cucumis melo* L.) cv. Galia F₁. Las plántulas en estado de cotiledón y las plantas en estado adulto fueron analizadas para el MNSV por DAS-ELISA y RT-PCR. Ninguno de los grupos de plántulas analizados resultó positivo para el MNSV por ELISA. Sin embargo, la proporción de plántulas infectadas con el MNSV por RT-PCR fue de al menos 7 y 8% en los lotes de semillas 05 y 06, respectivamente. En este sentido, 14 y 8 grupos de plántulas (10 plántulas por cada grupo), de un total de 200 y 100 plántulas, respectivamente, procedentes de semillas infectadas resultaron positivas para el MNSV en los lotes de semillas 05 y 06, respectivamente, correspondiente a índices de transmisión de semilla a plántula de 11.3 y 14.8%, respectivamente. Por otro lado, varios tratamientos de desinfección de semilla fueron evaluados por su capacidad para prevenir la transmisión por semilla del MNSV. En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento de 144 h a 70 °C podría ser utilizado para erradicar el MNSV en semillas de melón sin afectar su germinación.

J. A. HERRERA VÁSQUEZ, M. C. CÓRDOBA SELLÉS, M. C. CEBRIÁN, A. A. FERNÁNDEZ, C. JORDÁ. Grupo de Virología, Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM), Universidad Politécnica de Valencia (UPV), Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia, España. Dirección actual de J. A. HERRERA VÁSQUEZ: Laboratorio de Protección Vegetal (LPV), Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC), Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Ctra. Panamericana, Los Canelos-Santa María, Herrera, Panamá, 0601 Chitré, Herrera, Panamá. Tel.: +507 9761265; fax: +507 9761349; e-mail: joshervs11@gmail.com

Palabras clave: *Carmovirus*, *Cucumis melo*, ELISA, RT-PCR, semillas.

INTRODUCCIÓN

Entre los virus transmisibles por semilla en la familia Cucurbitácea está citado el virus que nos ocupa, virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), pero la enfermedad se extiende por su vector *Olpidium bornovanus*. Tiene importancia, sin embargo esta forma de transmisión, por constituir el inóculo primario de la enfermedad y facilitar la introducción de la misma en zonas libres del virus (JORDÁ *et al.*, 2005).

En la bibliografía podemos encontrar diferentes valores de índices de transmisión por semilla de este virus que van desde la no transmisión hasta un 20% (KISHI, 1966; GONZÁLEZ-GARZA *et al.*, 1979; YOSHIDA *et al.*, 1980; AVGELIS, 1985), aunque hay que puntualizar que la mayoría de los trabajos sobre la transmisión o no del MNSV están basados en los aspectos sintomatológicos que podrían mostrar las plántulas procedentes de semillas infectadas, sin utilizar ningún método analí-

tico de detección del virus y no teniendo en cuenta el papel que podía jugar *O. bornovanus* en la transmisión de la misma. En contraste, CAMPBELL *et al.* (1996), reportaron índices de transmisión superiores al 50% cuando estuvo presente *O. bornovanus*, utilizando la técnica serológica ELISA para la detección del MNSV. Estos autores relacionan la transmisión por la semilla a la presencia del hongo vector aplicando un método de diagnóstico no sólo visual, y proponen llamar a este tipo de transmisión como “transmisión por semilla asistida por el vector” (“vector-assisted seed transmission-VAST”). No obstante, otros autores (GÓMEZ *et al.*, 2005) alertan sobre la falta de sensibilidad del ELISA, como método de detección, para determinar la presencia del MNSV en la semilla, teniendo en cuenta que la proporción de virus en semilla es generalmente baja para la mayoría de los virus.

Los únicos métodos empleados antiguamente para evaluar la transmisión por semilla del MNSV, según hemos citado, eran la observación de síntomas y posteriormente las técnicas serológicas, un gran avance aunque insuficiente para este tipo de detección. Ante las limitaciones de estas técnicas se plantea la utilización de las técnicas moleculares (hibridación molecular y RT-PCR), ya que podrían superar la sensibilidad de estos métodos y mejorar la eficiencia en el diagnóstico (SÁNCHEZ-NAVARRO *et al.*, 1998).

En el caso de este virus, un punto importante a tomar en cuenta en su diagnóstico, es elegir la zona de la planta apropiada para realizar el análisis, ya que hemos podido comprobar que no se distribuye por igual en todas las partes de la misma. En este sentido, el virus ha sido detectado en las raíces de plántulas de melón previamente del trasplante de éstas a campo, por lo tanto, en esta etapa temprana de desarrollo las raíces parecen actuar como reservorio del MNSV, lo que indica que este virus se replica en dicho tejido y el mismo podría ser usado en su diagnóstico rutinario (GOSALVEZ *et al.*, 2003).

El uso de semilla libre de virus es una medida importante para prevenir su introducción en

las áreas de producción, así como su extensión si las condiciones ambientales son propicias y siempre en presencia del vector. Ante esta situación, diferentes tratamientos físicos y químicos han sido reportados para erradicar o reducir significativamente la incidencia de virus sin afectar la germinación de las semillas, en aquellas virosis que presentan este tipo de transmisión, basta citar como ejemplos, los tratamientos por termoterapia para erradicar el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (LATERROT y PÉCAUT, 1968) o el virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) (CÓRDOBA-SELLÉS *et al.*, 2007), ambos virus localizados en la superficie de las semillas. En el caso del MNSV, el único método citado desde antiguo para erradicar el virus de las semillas de melón era el tratamiento con ácido clorhídrico (HCL) y posterior secado de éstas durante 4 días o más (DUMAS DE VAULX, 1970). Es importante indicar en este sentido que algunas empresas de semillas utilizan tratamientos para su desinfección, sin embargo, los detalles de los protocolos de dichos tratamientos son propiedad de la empresa y, por ende, confidenciales.

Todos estos tratamientos surgen ante la necesidad del uso de semilla libre de virus como una medida importante de control, como indicamos previamente, aunque hay que hacer alusión nuevamente 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.

Los objetivos del estudio eran estimar el porcentaje de plántula enferma a partir de semilla, comparando dos métodos de diagnóstico, ELISA y RT-PCR, y analizar diversos tratamientos, físicos y químicos, de la semilla para erradicar el virus de la misma, determinando el efecto de estos tratamientos en la germinación de la semilla de melón.

MATERIALES Y METODOS

En este estudio se utilizó una semilla de melón tipo Galia F, producida en España, por

considerarse altamente susceptible al MNSV (NAVAL-MERINO, 2005), utilizando dos lotes de semillas, uno obtenido en el año 2005 (lote 05) y el otro lote del 2006 (lote 06). De forma comparada se utilizaron dos técnicas de detección, ELISA y RT-PCR.

Transmisión del MNSV de semilla infectada a plántula

Un número elevado de semillas, 350 y 150 del lote 05 y 06, respectivamente, fueron germinadas en bandejas estériles, sobre celulosa estéril y humedecidas con agua también estéril (Figura 1). A los 15 días, se tomaron muestras de 0.1 g de las raicillas de las plántulas y luego se trasplantaron de forma individual a mace-

tas estériles con sustrato (2:1, turba:arena) así mismo estéril, colocándose en cámara climática con 60% de humedad, un fotoperiodo de 12 horas luz y otro tanto de oscuridad, a temperatura de 26°C y 18°C, respectivamente, regándose con agua estéril y guardándose medidas estrictas de sanidad y de aislamiento. Cuarenta y cinco días más tarde, se recogieron raíces de estas plantas, lavándolas cuidadosamente con agua destilada estéril para retirar los restos del sustrato y se dividieron en muestras de 0.1 g de cada planta. Se agruparon las muestras correspondientes a diez plantas, obteniéndose una muestra compuesta de 1 g, del cual se tomaba 0.5 g y 0.1 g analizándose por DAS-ELISA y RT-PCR, respectivamente.



Figura 1. Ensayo de transmisión del MNSV de semilla infectada a plántula: (A) Germinación de semillas, (B) Emergencia de plántulas.

Análisis DAS-ELISA

Para la técnica serológica se utilizó un antisuero específico del virus suministrado por BIO-RAD, siguiendo la metodología que marcaba la casa suministradora. En este sentido, muestras de 0.5 g de raíces fueron trituradas en una bolsa plástica en tampón de extracción (2% PVP en PBS-Tween, 1:20, p/v). Posteriormente, los extractos fueron filtrados a través de muselina y alícuotas de 100 µl de cada extracto fueron analizadas por duplicado por DAS-ELISA con el antisuero específico del MNSV. Se incluyó testigo positivo y ne-

gativo del virus, considerándose en la lectura del espectrofotómetro Multiskan EX Modelo 355 (Flow laboratories, Finlandia) muestra positiva aquella muestra que superara en el doble la lectura de su absorbancia ($A_{405\text{ nm}}$) de la correspondiente al testigo negativo.

Extracción del ARN y análisis por RT-PCR

Muestras de 0.1 g de raíces se trituraron utilizando nitrógeno líquido y se extrajeron los ARN totales utilizando un kit de extracción, RNAwiz™ (Ambion), siguiendo las instrucciones del producto suministrado. La

RT-PCR se realizó en un solo paso usando SuperScript™ II RT con Platinum®Taq kit (Invitrogen Life Technologies) y cebadores específicos del MNSV, MNSV1 (5'-GGA-GGCAACATTCGTACA-3') y MNSV2 (5'-AGAGACCAAGCGATCAAAC-3'), diseñados para amplificar un fragmento de genoma de 650-pb, correspondiente a los nucleótidos 172-822 del gen de la proteína de cubierta del virus (p42). Los ARN totales fueron desnaturalizados a 65°C durante 5 minutos y el cDNA fue sintetizado a 50°C por 30 minutos en una mezcla de reacción que incluía 0.4 µM de los cebadores, 1x tampón de reacción (conteniendo 0.4 mM de dNTPs y 2.4 mM MgSO₄) y 0.25 µL del enzima, en un volumen final de reacción de 12.5 µL. Las condiciones de la PCR fueron: 94 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto a 72°C, con un paso final de extensión de 10 minutos a 72°C, utilizando un termociclador Mastercycler personal 5332 (Eppendorf).

Los productos amplificados por RT-PCR se separaron por electroforesis en gel de 1.2% de agarosa, en tampón 1x TAE (40 mM Tris-acetato y 1mM EDTA a pH 8.0) tiñéndose con bromuro de etidio. Los tamaños de los fragmentos se determinaron por comparación con un marcador de peso molecular conocido DNA Ladder Plus de 100-pb (MBI Fermentas). El porcentaje de incidencia viral en las muestras agrupadas fue estimado utilizando la formula de GIBBS y GOWER (1960):

$$P = 1 - (1 - y/n)^{1/k}$$

Donde P= Probabilidad de transmisión de una sola plántula infectada por MNSV

y = Número de muestras positivas por RT-PCR

n = Número total de muestras analizadas

k = Número de plántulas por muestra (k=10)

Tratamientos de desinfección de semilla

Para determinar la eficacia de los tratamientos de desinfección de la semilla en la erradicación del MNSV en semilla de melón comercial, se utilizaron los dos lotes de semillas anteriormente citados y se sometieron a siete tratamientos diferentes que fueron comparados. Se evaluó el efecto de la temperatura, tratando las semillas en una incubadora a 70°C durante 72 horas (T72), 96 horas (T96), 120 horas (T102) y 144 horas (T144). Por otro lado, dos soluciones desinfectantes que habían sido efectivas con otras virosis, fueron utilizadas. En este caso, las semillas fueron sumergidas en una solución de fosfato trisódico al 10% durante 3 horas (TTP), o en ácido clorhídrico 0.1 N durante 30 minutos (THC). Un tratamiento combinado (térmico y químico) se ensayó también, en el cual las semillas primero se sometieron a 70°C durante 120 horas y luego fueron sumergidas en fosfato trisódico al 10% durante 3 horas. Después de someter las semillas a los diferentes tratamientos citados, se lavaron con agua desionizada, se secaron y se colocaron en celulosa para su germinación. Una vez germinadas se transfirieron como se indicó anteriormente. En todos los tratamientos, la germinación fue evaluada mediante el conteo de las plántulas 15 días después de colocar las semillas en las bandejas de germinación, y el efecto de los tratamientos en la germinación se comparó con la germinación de semillas no tratadas. El número de semillas usadas en cada lote/tratamiento se recogen en la Tabla 1. Las plántulas fueron analizadas por DAS-ELISA y RT-PCR siguiendo la técnica descrita anteriormente, en estado de cotiledones y adultas.

Análisis estadístico

En todos los experimentos, los valores de la absorbancia obtenidos por ELISA y los resultados de la RT-PCR fueron analizados mediante ANOVA multifactorial con la ayuda del programa STATGRAPHICS Plus para Windows (versión 5.1; Manugistics Inc). El "estado de crecimiento al momento del análisis" en las semillas no tratadas y el

“lote de semilla evaluado” fueron considerados efectos fijos en el índice de infección del MNSV obtenido por ELISA o RT-PCR. En este sentido, la diferencia mínima significativa protegida de Fisher (LSD; $P < 0.05$) se utilizó para determinar cuál de ellos difiere significativamente de los otros. Por otro lado, se utilizó el mismo procedimiento estadístico con los datos obtenidos de la germinación. En este caso, el “tratamiento de semilla” y el “lote de semilla evaluado” fueron considerados efectos fijos.

Secuenciación y análisis

Para confirmar la identidad del virus detectado en las plántulas infectadas de los estudios anteriormente citados, el fragmento obtenido por RT-PCR fue purificado utilizando el kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics) y directamente secuenciado utilizando un kit Big Dye Terminator versión 3.1 Cycle Sequencing en un secuenciador 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La secuencia fue comparada con ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignments Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) con secuencias depositadas en el NCBI (National Center of Biotechnology Information).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transmisión del MNSV de semilla infectada a plántula

La transmisión por semilla del MNSV ha sido estudiada por diversos autores, tal y como describimos previamente. No obstante, en la mayoría de los casos las semillas utilizadas procedían de frutos infectados, a diferencia de GONZÁLEZ-GARZA *et al.* (1979), los cuales utilizaron semilla comercial para evaluar mediante la observación de síntomas dicha transmisión.

Para realizar un estudio sobre esta transmisión, en nuestro caso, se utilizó semilla comercial de la que se expendía a los productores, con la finalidad de determinar si éstas

podían constituir la vía de introducción del MNSV en las áreas de cultivo.

Análisis DAS-ELISA

En el caso del ELISA, el MNSV no fue detectado en ningún grupo de raicillas de 200 y 100 plántulas procedentes de semilla comercial de los lotes 05 y 06, respectivamente, ni las analizadas en estado de cotiledón o en estado adulto. En este sentido, los valores de la absorbancia de alícuotas analizadas por duplicado para 12 testigos negativos estuvieron en el rango de 0.078 a 0.162 (con una media de 0.022), mientras que para 12 testigos positivos analizados bajo las mismas condiciones los valores de la absorbancia estuvieron en el rango de 0.195 a 2.368 (con una media de 1.452). A lo anterior, las absorbancias medias en el estado de cotiledón y en el estado adulto fueron de 0.039 ± 0.004 y 0.003 ± 0.008 , respectivamente, en el lote de semilla 05, y 0.038 ± 0.004 y 0.007 ± 0.015 , respectivamente, en el lote de semilla 06. Por lo tanto, el estado de crecimiento de las plantas al momento del análisis por DAS-ELISA afectó significativamente los valores de la absorbancia obtenidos por esta técnica en los lotes de semillas no tratadas ($P = 0.0001$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la absorbancia entre ambos lotes de semillas ($P = 0.6593$).

Análisis RT-PCR

Mediante RT-PCR si fue posible detectar el MNSV en plántulas. En este caso, 14 y 8 de las muestras compuestas por diez plántulas, correspondientes a los lotes 05 y 06, respectivamente, fueron positivas al MNSV (Tabla 1). El fragmento esperado de 650-pb fue amplificado de los extractos de las muestras positivas, pero no de los extractos sanos, testigos negativos (Figura 2). Estos datos confirman que el MNSV se transmitía por semilla en los lotes comerciales ensayados. De nuevo se determinaba la baja sensibilidad de la técnica serológica ELISA en la detección de este virus en plantas asintomáticas (GÓMEZ *et al.*, 2005).

Tabla 1. Eficacia de siete tratamientos de desinfección para la eliminación del MNSV de semilla de melón infectada, rangos de infección en plántulas obtenidos tras cada tratamiento, y probabilidad de infección, mediante RT-PCR.

Estado de crecimiento ^a	Tratamiento ^b	Lote-05				Lote-06			
		Plántulas		Plántulas		Plántulas		Plántulas	
		Analizadas ^c	Muestras positivas ^d	Rango de infección en plántulas (%)	Probabilidad de infección ^e	Analizadas ^c	Muestras positivas ^d	Rango de infección en plántulas (%)	Probabilidad de infección ^e
Cotiledón	NT	200	14	7-70	11.3	100	8	8-80	14.8
		200	0	0	0.0	100	0	0	0.0
Cotiledón	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

^a Estado de crecimiento en el que se realizó el análisis RT-PCR a las raíces de las plantas: cotiledón o estado adulto (45 días después del transplante).

^b Tratamientos de desinfección: NT, semillas no tratadas; T72, T96, T120, T144, tratamientos de termoterapia a 70°C durante 72, 96, 120 y 144 h, respectivamente; TTC, tratamiento de termoterapia a 70°C durante 120 h seguido de inmersión en 10% de fosfato trisódico (Na₃PO₄) durante 3 h; TTP, inmersión en 10% de fosfato trisódico durante 3 h; THC, inmersión en 0.1 N de ácido clorhídrico (HCl) durante 30 min.

^c Número de plántulas analizadas mediante RT-PCR después de cada tratamiento de desinfección.

^d Número de muestras agrupadas (raíces de 10 plántulas) positivas al MNSV.

^e Probabilidad de obtener plántulas infectadas procedentes de semillas infectadas (=índice de transmisión del MNSV de semilla infectada a plántula) calculada mediante la fórmula de Gibbs y Gower (1960) utilizada para estimar la proporción de muestras agrupadas.

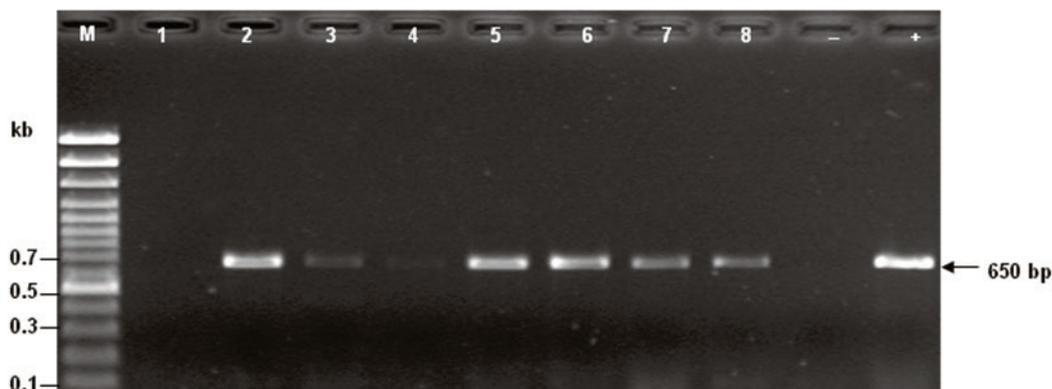


Figura 2. Amplificación mediante RT-PCR de un fragmento de 650-pb correspondiente a la secuencia parcial de la proteína de cubierta del MNSV. Líneas 1–8, muestras compuestas (raíces de 10 plántulas en estado de cotiledón) procedentes de semilla comercial no tratada; –, testigo negativo; +, testigo positivo del MNSV; M, marcador de peso molecular de 100-pb DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilna, Lituania).

La probabilidad de infección fue de 11.3 y 14.8% en los lotes de semilla 05 y 06, respectivamente, tal y como se indica en la Tabla 1. No obstante, ninguna de las plántulas de melón que fueron positivas al MNSV por RT-PCR mostraron síntomas de este virus. Por otro lado, en estado adulto ninguna muestra compuesta por diez plantas fue positiva al MNSV por RT-PCR (Tabla 1). En este sentido, al igual que ocurrió con el ELISA, en los resultados de la RT-PCR también se observaron diferencias significativas ($P = 0.0000$) entre el análisis realizado en estado de cotiledón o en estado adulto. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P = 0.7548$) entre ambos lotes de semilla.

Adicionalmente, setenta de las plántulas que fueron positivas como muestras agrupadas se analizaron individualmente por DAS-ELISA y RT-PCR. Ninguna de las plantas fueron positivas al MNSV por DAS-ELISA. Sin embargo, 12 plántulas fueron positivas al MNSV por RT-PCR, pero solo en estado de cotiledón.

La técnica RT-PCR ya había sido utilizada para detectar el MNSV en melón (GOSALVEZ *et al.*, 2003), así como de manera rutinaria y a gran escala para determinar la presencia de otros virus en semillas, por ejemplo, el virus

del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) en altramuces (WYLIE *et al.*, 1993). Sin embargo, dicha técnica no había sido usada para evaluar la transmisión por semilla del MNSV.

En este trabajo, el MNSV ha sido detectado por RT-PCR en plántulas en estado de cotiledón procedentes de semilla comercial, no así en estado adulto lo cual podría apoyar la hipótesis de la posible resistencia de algunos cultivares de melón a este virus, reportado previamente por otros autores (COUDRIET *et al.*, 1981; LOVISOLO *et al.*, 1982; ÁLVAREZ, 1997; MALLOR *et al.*, 2003; DÍAZ *et al.*, 2004; MALLOR *et al.*, 2004). Aunque el virus inicialmente se replica y está presente en las raíces, su movimiento en la planta podría ser restringido como resultado de la resistencia genética derivada del propio cultivar de melón. Sin embargo, existe el riesgo de que el virus pueda ser adquirido por el vector a partir de plántulas infectadas una vez que estas hayan sido transplantadas en el campo y, posteriormente, transmitirlo a plantas adultas. La infección del MNSV depende en gran medida de las condiciones ambientales, por lo tanto, resulta difícil predecir lo que ocurrirá en una plántula procedente de una semilla infectada.

La técnica RT-PCR ha sido efectiva para evaluar la transmisión por semilla del MNSV, como hemos indicamos, obteniendo altos índices de transmisión, incluso analizando un pequeño número de muestras (Tabla 1), superior a los obtenidos por CAMPBELL *et al.* (1996) los cuales utilizaron semilla procedente de frutos infectados y analizando un mayor número de muestras, pero utilizando un método de detección menos sensible, el ELISA. No obstante, es importante analizar un mayor número de lotes de semilla comercial y de frutos de melón infectados, antes de ofrecer una recomendación general relacionada con el uso rutinario de la técnica RT-PCR. También hay que señalar la importancia de seleccionar la zona de la planta de donde se tome la muestra y el momento idóneo de este muestreo, y este punto es aplicable al estudio de cualquier otro virus que se necesite analizar.

Eficacia de tratamientos de desinfección de semilla

Existen diferentes métodos de control del MNSV, siendo los más efectivos aquellos que previenen su entrada en el campo, entre estos, la resistencia al virus presente en algunos cultivares de melón, el control de *O. bornovanus* mediante la aplicación del surfactante Agral en cultivos hidropónicos, el cual afecta las zoosporas de este hongo vector (TOMLINSON Y THOMAS, 1986), o el uso de semilla libre de virus (DUMAS DE VAULX, 1970). En este último caso, es importante dejar claro que el análisis de todas las semillas para determinar la ausencia o presencia del MNSV no es una medida práctica, por lo tanto, se deben establecer medidas para regular los tratamientos de semillas y garantizar que las mismas estén libres del virus.

Efectos de tratamientos de semilla sobre la germinación de semillas de melón.

En todos los tratamientos, excluyendo los controles, el índice de germinación de las semillas del lote 06 fue significativamente mayor ($P > 0.0002$) que el del lote 05 (Tabla 2). Además, el tratamiento de desinfección

no tuvo un efecto significativo ($P > 0.7636$) sobre el índice de germinación en ambos lotes de semillas. En este sentido, el tratamiento T96 no afectó la germinación del lote de semilla 06 en comparación con las semillas no tratadas. Por otro lado, el tratamiento TTP tuvo una mayor incidencia en el índice de germinación del lote de semilla 05, reduciéndolo a un 75%, en comparación con el 86% de las semillas no tratadas, pero no tuvo un efecto en el lote 06. La reducción en la germinación de las semillas del lote 06 con respecto a las semillas no tratadas se observó en los tratamientos T72, T120 y THC, mientras que en los tratamientos T144, TTC y TTP aumentó el índice de germinación; TTC tuvo el efecto más favorable sobre la germinación de las semillas, un aumento del 2% en comparación con las semillas no tratadas (Tabla 2).

Detección del MNSV en plántulas por DAS-ELISA

Mediante la técnica serológica ELISA no fue posible detectar el MNSV en las plantas de melón en estado de cotiledón y en estado adulto, en ninguno de los tratamientos efectuados en ambos lotes de semillas. Sin embargo, en todos los tratamientos, se observaba una reducción significativa ($P = 0.0000$) en los valores de la absorbancia en comparación con las semillas no tratadas.

Detección del MNSV en plántulas por RT-PCR

Los resultados de la detección del MNSV en las plántulas por RT-PCR después de varios tratamientos de desinfección de semillas, así como los índices de transmisión del MNSV de semilla tratada y no tratada a plántulas, se recogen en la Tabla 1.

El tratamiento T144 fue el único tratamiento capaz de eliminar totalmente el MNSV de las plántulas en ambos lotes de semillas, además de incrementar la germinación de las semillas tratadas respecto a las semillas no tratadas (Tabla 2). No obstante, este es un tratamiento prolongado y debe ser aplicado por personal cualificado.

Tabla 2. Efecto de los tratamientos de desinfección en los índices de germinación de semilla comercial de melón.

Tratamiento ^a	Lote-05			Lote-06		
	Número de semillas ^b	Índice de germinación (%) ^c	Índice de variación ^d	Número de semillas ^b	Índice de germinación (%) ^c	Índice de variación ^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

^a Tratamientos de desinfección: NT, semillas no tratadas; T72, T96, T120, T144, tratamientos de termoterapia a 70°C durante 72, 96, 120 y 144 h, respectivamente; TTC, termoterapia a 70°C durante 120 h seguido de inmersión en 10% de fosfato trisódico (Na₃PO₄) durante 3 h; TTP, inmersión en 10% de fosfato trisódico durante 3 h; THC, inmersión en 0.1 N de ácido clorhídrico (HCl) durante 30 min.

^b Número total de semillas colocadas en las bandejas de germinación.

^c Índice de germinación registrado 15 días después de germinadas las semillas.

^d Diferencia en el índice de germinación de semillas no tratadas y tratadas.

En los otros tratamientos, la incidencia del MNSV estuvo en el rango del 1 al 70% en el lote de semilla 05 y del 4 al 70% en el lote de semilla 06, en comparación al 70 y 80% obtenido en las plántulas procedentes de semillas no tratadas en los lotes 05 y 06, respectivamente. Una disminución en la incidencia del MNSV fue evidente en las plántulas después de realizar todos los tratamientos de semillas en comparación con las plántulas procedentes de semillas no tratadas, excepto para el tratamiento T72, cuya incidencia se mantuvo en el mismo rango que las plántulas procedentes de semillas no tratadas en el lote de semilla 05. Los tratamientos de semillas T96 y T120 redujeron la infección en las plántulas en un 42.9% en el lote de semillas 05, y en un 50% y 100%, respectivamente, en lote de semillas 06. Por lo tanto, los tratamientos térmicos T72, T96 y T120 reducen los índices de transmisión en relación a las semillas no tratadas. No obstante, la alta estabilidad del MNSV podría ser

la razón por la cual estos tratamientos de termoterapia, y en particular el tratamiento T72, resultan ineficaces en eliminar el MNSV. En este sentido, como indicamos anteriormente los tratamientos térmicos han sido utilizados en diversas ocasiones para eliminar o reducir de manera significativa diferentes virus, entre ellos cabe citar, el TMV (LATERROT y PÉCAUT, 1968), 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), mediante el calentamiento de las semillas sin afectar la germinación de las mismas.

Los tratamientos TTP y THC redujeron la infección en un 14.3% y 18.6%, respectivamente, en el lote de semilla 05, y 25% y 28.8%, respectivamente, en el lote de semilla 06, en comparación con las plántulas procedentes de semillas no tratadas. En este sentido, los tratamientos químicos, por ejemplo, el tratamiento con fosfato trisódico, han sido usados en otras

virosis transmitidas por semilla con la finalidad de eliminar virus localizados en la cubierta de las mismas, sin afectar la germinación de éstas (GREEN *et al.*, 1987). En el caso del MNSV, también se ha usado dicho tratamiento, como indicamos anteriormente, observándose que existe una reducción pero no elimina la infección del MNSV, debido a que éste virus no solo se aloja en la cubierta de las semillas sino en el endospermo (CAMPBELL *et al.*, 1996). Otros autores han citado la inactivación del MNSV mediante el tratamiento con ácido clorhídrico (DUMAS DE VAULX, 1970), aunque estos resultados están basados en la observación de la sintomatología que podían mostrar las plántulas procedentes de semillas infectadas tratadas y, como indicamos anteriormente, la observación de síntomas no es suficiente para realizar un diagnóstico preciso, esta podría ser la causa de los valores negativos. En este sentido, el tratamiento mediante la inmersión de las semillas en 0.1 N de ácido clorhídrico (THC) en nuestro caso no fue efectivo en la eliminación del virus obteniéndose altos índices de transmisión tras dicho tratamiento.

El tratamiento TTC redujo la infección en las plántulas en un 85.7% y 100% en los lotes de semillas 05 y 06, respectivamente. En este sentido, el tratamiento combinado (físico-químico) mediante la exposición de las semillas a 80°C durante 24 h seguido de la inmersión en una solución al 10% de fosfato trisódico durante 3 h, ha resultado efectivo en la inactivación de virus localizados en la cubierta de las semillas en otros casos (DINANT y LOT, 1992; CÓRDOBA-SELLÉS *et al.*, 2007). No obstante, en el caso del MNSV el cual además de la cubierta se aloja en el endospermo, el tratamiento combinado TTC (termoterapia a 70°C durante 120 h seguido de inmersión en 10% de fosfato trisódico durante 3 h) reduce, pero no elimina completamente la incidencia del MNSV. Es importante indicar en este sentido que la no eliminación total del virus de las semillas podría suponer un peligro para la producción debido a la diseminación secundaria por el hongo vector *O. bornovanus*.

Los tratamientos T120 y TTC en el lote de semilla 06 y el tratamiento T144 en ambos lotes de semillas presentaron una probabilidad de infección de 0.0 en el estado de cotiledón (Tabla 1). Por otro lado, la probabilidad de detectar una plántula infectada después de tratar las semillas estuvo en el rango de 1.0 a 11.3 en el lote de semilla 05 y de 4.9 a 11.3 en el lote de semilla 06, en comparación con las plántulas procedentes de semillas no tratadas, las cuales estuvieron en el rango de 11.3 y 14.8 en los lotes de semillas 05 y 06, respectivamente. Los tratamientos de desinfección de semillas afectaron significativamente ($P = 0.0000$) la incidencia del MNSV en las plántulas. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P = 0.6439$) entre ambos lotes de semillas.

Todas las plantas procedentes de semillas de los tratamientos T72, TTP y THC (tratamientos en los cuales se obtuvo la mayor probabilidad de infección en las plántulas) fueron analizadas en estado adulto para la detección del MNSV por DAS-ELISA y RT-PCR, sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos tras dichos análisis.

Por último, es importante indicar en relación a la transmisión y desinfección del MNSV, que se requiere de un protocolo internacional para el análisis y el tratamiento de las semillas. No obstante, es necesario realizar investigaciones adicionales para optimizar dicho protocolo frente a la infección por el MNSV, con el fin de controlar y erradicar la enfermedad.

Análisis de secuencia del aislado del MNSV

En el caso del MNSV, no se disponía de ninguna secuencia procedente de plántulas procedentes de semilla comercial de melón infectada. La secuencia del aislado MNSV-SEED 1 (GenBank accesión No. DQ443545) procedente de plántulas obtenidas de semillas comerciales de melón, tenía un 100% de homología de secuencia en la región del genoma estudiada con varios aislados obtenidos de diferentes regiones geográficas (HERRERA-VÁSQUEZ *et al.*, 2007), incluyendo un aislado originario de Panamá, MNSV-PAN2 (DQ443547), que se había utili-

zado como testigo positivo en este estudio. Esta casualidad nos indica que la diseminación de la enfermedad está claramente relacionada con la comercialización de las semillas.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue posible gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Agen-

cia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID, España, periodo 2004-2007) y del Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos y la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (IFARHU-SENACYT, Panamá, período 2007-2010) otorgadas a José Angel Herrera Vásquez.

ABSTRACT

HERRERA VÁSQUEZ, J. A., M. C. CÓRDOBA SELLÉS, M. C. CEBRIÁN, A. A. FERNÁNDEZ, C. JORDÁ. 2012. Seed transmission of *melon necrotic spot virus* (MNSV) and efficacy of seed-disinfection treatments. *Bol. San. Veg. Plagas*, **38**: 387-398

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*, *Cucumis melo*, ELISA, RT-PCR, seed.

REFERENCIAS

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**: 3389-3402.
- ÁLVAREZ, J.M. 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 A.D 1985. Occurrence of *Melon necrotic spot virus* in Crete (Greece). *Phytopath. Z.*, **114**: 365-372.
- CAMPBELL, R.N., WIPF-SCHEIBEL, C., LECOQ, H. 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. *Phytopathology*, **86**: 1294-1298.
- CÓRDOBA-SELLÉS, M.C., GARCÍA-RÁNDEZ, A., ALFARO-FERNÁNDEZ, A., JORDÁ-GUTIÉRREZ, C. 2007. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*, **91**: 1250-1254.
- COUDRIET, D.L., KISHABA, A.N., BOHN, G.W. 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.
- DÍAZ, J.A., NIETO, C., MORIONES, E., TRUNIGER, V., ARANDA, M.A. 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.
- 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.

- GIBBS, A.J., GOWER, J.C. 1960. The use of a multiple-transfer method in plant virus transmission studies: some statistical points arising in the analysis of results. *Annals of Applied Biology*, **48**: 75-83.
- GÓMEZ, J., GUIRADO, M.L., 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, D.J., KISHABA, A.N., BOHN, G.W. 1979. Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California isolate of *Melon necrotic spot virus*. *Phytopathology*, **69**: 340-345.
- GOSALVEZ, B., NAVARRO, J.A., LORCA, A., BOTELLA, F., SÁNCHEZ-PINA, M.A., 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, S.K., HWANG, L.L., KUO, Y.K. 1987. Epidemiology of *Tomato mosaic virus* in Taiwan and identification of strains. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **94**: 386-387.
- HERRERA-VÁSQUEZ, J.A., CEBRIÁN, M.C., ROSELLÓ, J.A., 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*. Italy: Sorrento, p. 281.
- JORDÁ, C., FONT, M.I., MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. 2005. Viral etiology of diseases detected in melon in Guatemala. *Plant Disease*, **89**: 338.
- KISHI, K. 1966. Necrotic spot of melon, a new virus disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **32**: 363-386.
- 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.
- LOVISOLO, O., LECOQ, H., PITRAT, M. 1982. Note sur les virus de cucurbitacées présents en France. Montfavet, France: INRA-CRA d'Avignon, 29 p.
- MALLOR, C., ÁLVAREZ, J.M., 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, J.M., 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, M.D.M. 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 necroticas del melón (MNSV). Valencia, Spain: Universidad Politécnica de Valencia, PhD thesis.
- SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A., 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, J.A., THOMAS, B.J. 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.
- WYLIE, S., WILSON, C.R., JONES, R.A.C., JONES, M.G.K. 1993. A polymerase chain reaction assay for *Cucumber mosaic virus* in lupin seeds. *Australian Journal of Agricultural Research*, **44**: 41-51.
- 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.

(Recepción: 10 septiembre 2012)

(Aceptación: 27 diciembre 2012)