

## APLICACIÓN DEL DIAGNÓSTICO FITOVIROLÓGICO EN CULTIVOS ASOCIADOS A HUERTOS URBANOS

Ana L. Echemendía, Surey Valdés, S. Jiménez, Gloria González y J. Fernández

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

### RESUMEN

La agricultura urbana ha adquirido gran importancia en nuestro país en los últimos años como una vía más para garantizar el suministro de vegetales y hortalizas a la población de las ciudades. Aparejado al surgimiento de hidropónicos, organopónicos y huertos, se han realizado de forma sistemática muestreos e inventarios de las plagas y enfermedades que afectan los cultivos asociados a estos sistemas. En este trabajo se señala la aparición de tres sintomatologías virales en los cultivos de lechuga (*Lactuca sativa* L.), apio (*Apium graveolens* L.) y melón de Castilla (*Cucumis melo* L.), asociados a la presencia de áfidos vectores. Para la identificación de los agentes causantes de estas enfermedades se emplearon diferentes técnicas de diagnóstico como son: las plantas indicadoras, microscopía óptica y electrónica, y la técnica ELISA en sus variantes DAS e indirecto. Los resultados demostraron que los síntomas observados en lechuga son producidos por el virus del mosaico de la lechuga (LMV); en el caso del apio se trata de una raza del virus del mosaico del pepino (CMV), ambos reportados por primera vez en nuestro país, y en el melón de Castilla se identificó como el virus de la mancha anular de la fruta bomba, raza w (PRSV) nunca antes encontrado este cultivo. Se identificó también por vez primera una especie de áfido colonizando lechuga y como vector del LMV.

Palabras claves: diagnóstico, ELISA, *Lactuca sativa* L., *Apium graveolens* L., *Cucumis melo* L., *Potyvirus* y *Cucumovirus*

### ABSTRACT

The urban agricultural is very important to supply vegetable in our country. A study is presented in which ELISA, optical and electron microscopy and host plant were used to detect three different viruses of lettuce, celery and melon samples. This is the first report of detection about Lettuce Mosaic Virus, a strain of Cucumber Mosaic Virus and w strain of PRSV from lettuce, celery and melon plants.

Key words: diagnosis, ELISA, *Lactuca sativa* L., *Apium graveolens* L., *Cucumis melo* L., *Potyvirus* y *Cucumovirus*

### INTRODUCCIÓN

La agricultura urbana ha adquirido gran importancia en nuestro país en los últimos años, como una vía más para garantizar el suministro de vegetales y hortalizas a la población de las ciudades. El combate de las plagas en los sistemas de cultivos de organopónicos constituye un elemento básico para la obtención de rendimientos aceptables bajo esta modalidad de agricultura urbana.

La aparición de diferentes enfermedades en estos sistemas requiere de un diagnóstico eficiente que permita que estas puedan ser manejadas y controladas, por lo que se han realizado de forma sistemática muestreos e inventarios de las plagas y enfermedades que afectan a los cultivos asociados a estos.

Este trabajo se realizó con el objetivo de diagnosticar las virosis encontradas en los organopónicos muestreados, en los cultivos de apio (*Apium graveolens* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y melón de Castilla (*Cucumis melo* L.).

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Toma de muestras

Se realizaron muestreos sistemáticos en los organopónicos a partir de enero de 1996-97 hasta la culminación del ciclo de los cultivos. Se colectaron hojas y semillas de lechuga, apio y hojas de melón de Castilla,

debido a la aparición de patologías virales asociadas a estos cultivos.

Las muestras de hojas se procesaron para la realización del diagnóstico por diferentes técnicas, y las semillas fueron sembradas para determinar si existía transmisión del virus por esta vía.

#### Plantas indicadoras

Se procedió a macerar el material vegetal con tampón fosfato 0,025 M pH 7 en el caso del melón de Castilla, y con tampón citrato 0,05 M pH 6,5 para el apio y la lechuga. En todos los casos se empleó carbón activado como agente antioxidante y carborundum como abrasivo.

La lechuga se inoculó mecánicamente en posturas de *L. sativa* L. y en *Gomphrena globosa* L., mientras que las muestras de apio y melón de Castilla se inocularon en *A. graveolens* L. y en *Cucumis sativus* L. respectivamente. Las plantas fueron mantenidas en condiciones controladas a 25-30°C.

#### Microscopía óptica y electrónica

Fueron analizadas las muestras de lechuga, apio y melón de Castilla por microscopía óptica y electrónica según lo establecido por Christie y Edwarson (1977).

#### ELISA-DAS

Para diagnosticar el virus del mosaico del pepino (CMV) en hojas de lechuga, apio y melón de Castilla se empleó un kit de la SANOFI capaz de detectar varias razas de este virus.

El procedimiento consistió en el recubrimiento de las placas con la IgG policlonal durante dos horas a 37°C. El extracto vegetal fue incubado 16 horas a 4°C. Con el buffer PBS-Tween-Albúmina pH 7,4 se diluyó el conjugado que se mantuvo cuatro horas a 37°C y posteriormente se añadió el sustrato (4-nitrofenilfosfato en buffer de dietanolamina pH 9,8) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 405 nm en un equipo SUMAL PE.

#### Vectores

Fueron hechos muestreos de los áfidos presentes en los organopónicos, asociados o no a los cultivos de interés, para la determinación de la especie y su relación con las virosis encontradas. La clasificación se hizo de acuerdo con la clave de Holman (1974). En el caso del LMV se realizó la infección por áfidos para determinar qué especies eran capaces de transmitir el virus.

#### ELISA indirecto

Esta técnica se empleó para diagnosticar el virus del mosaico de la lechuga (LMV) en hojas de lechuga. Se siguió el procedimiento descrito por Clark y Adams (1977). El extracto vegetal se incubó 16 horas a 4°C. Al día siguiente se añadió albúmina de suero bovino (BSA) al 3%, manteniéndose una hora a 37°C. El in-

munosuero específico empleado procedente de Dinamarca se adicionó tres horas a 37°C. El conjugado diluido con PBS-T se mantuvo una hora a la misma temperatura y el sustrato otra hora, pero a temperatura ambiente. La lectura se realizó de la forma ya descrita.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas de lechuga colectadas de plantas infectadas con LMV germinaron tres días después de sembradas, apareciendo los síntomas a los 20 días de germinadas. De esta forma se comprobó que hubo un 20% de transmisión de este virus por semillas. Esto coincide con lo planteado por muchos autores [Maury *et al.*, 1989 y Maury-Chovelon, 1984]. En otros trabajos se encontró en el tejido embrionario y no embrionario de las semillas y en las primeras hojas verdaderas agregados de partículas de LMV [Hunter *et al.*, 1993]. Las semillas de apio sembradas procedentes de plantas enfermas dieron lugar a posturas sanas.

En el análisis del rango de hospederos, las plántulas de lechuga inoculadas con el extracto vegetal de plantas con síntomas virosos demoraron en mostrar los síntomas de 20-25 días. Estos consistían en un aclaramiento en las nerviaciones seguido de un mosaico ligero de color verde. En el caso de la *G. globosa* se observó, a partir del sexto día, la presencia de lesiones locales necróticas, coincidiendo con lo obtenido por otros autores para el LMV [Tomilson, 1970].

Después de inocular las plantas de apio con la savia de plantas virosas, se observó a los 10 días síntomas de mosaico verde difuso, y más tarde anillos amarillos que se expanden hasta provocar la decoloración, y con ella la marchitez de las hojas. Esto se corresponde con lo descrito para una raza del CMV [Smith, 1972].

Las plantas de pepino inoculadas con el extracto vegetal obtenido del melón de Castilla viroso, mostraron a los cinco días síntomas de mosaico intenso verde con algunas verrugas y deformación de las hojas. Estas características se asemejan a lo encontrado para la raza w del PRSV [Gonsalves, 1984].

En cuanto a las especies de áfidos colectadas en los organopónicos, estas correspondían a *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* Sulz y *Dactynotus ambrosiae* Thomas, las dos primeras conocidas como vectores de CMV, LMV y PRSV [Smith, 1972; Kennedy *et al.*, 1962; Kucharex and Purcifull, 1997], mientras que la última se conoce que habita en lechuga y fue comprobado en nuestro trabajo que es vector del LMV.

En las muestras de lechuga y melón de Castilla analizadas al microscopio de luz fueron observadas inclusiones amorfas citoplasmáticas en las células epidérmicas, mientras que en el microscopio electrónico se encontró por tinción negativa partículas alargadas flexuosas típi-

cas de un potyvirus, tanto en las muestras de organopónicos, de las plantas de lechuga germinadas a partir de semillas infectadas, como en las expuestas a la actividad vectorial de *D. ambrosiae*. Es importante señalar que en las revisiones realizadas no se encontraron reportes de la existencia del LMV en nuestro país.

En el caso de las plantas de apio se observaron al microscopio óptico inclusiones cristalinas en el citoplasma de las células epidérmicas correspondientes a las provocadas por el CMV.

El método ELISA indirecto resultó eficaz para detectar las muestras infectadas con LMV, coincidiendo los resultados con los obtenidos por microscopía óptica y electrónica. Muchos autores han empleado esta técnica para diagnosticar la presencia de LMV en semillas y plantas, considerándola muy efectiva, ya que detecta bajas concentraciones de virus [Grogan, 1980; Jafarpour *et al.*, 1979; Van Vuurde y Maat, 1983 y Ertun, 1992].

Con la técnica ELISA-DAS se detectó CMV sólo en las muestras de apio analizadas, lo que coincidió con lo observado por microscopía óptica. Esta virosis no se había encontrado con anterioridad en nuestro país, infectando este cultivo.

Las muestras de melón de Castilla fueron negativas para este virus y, teniendo en cuenta los síntomas desarrollados después de ser inoculados en pepino, podemos decir que estamos ante la presencia del virus de la mancha anular de la fruta bomba raza W (PRSV-W).

## CONCLUSIONES

- Los síntomas observados en lechuga, apio y melón de Castilla corresponden a los virus del mosaico de la lechuga, del mosaico del pepino y de la mancha anular de la fruta bomba raza W.
- La raza del virus del mosaico del pepino (CMV) en apio, el virus del mosaico de la lechuga (LMV) y la raza W del PRSV en melón de Castilla fueron reportados por primera vez en Cuba.

- Se identificó a *Dactynotus ambrosiae*, Thomas colonizando plantas de lechuga y como vector del virus del mosaico de la lechuga.

## REFERENCIAS

- Christie, R. G.; J. R. Edwarson: «Light and Electron Microscopy of Plant Virus Inclusion Bodies», *Agr. Exp. Sta. Mon.* no. 9, 1977.
- Clark, M. F.; A. N. Adams: «Characteristics of the Microplate Methods of Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for Detection of Plant Viruses», *Journal of General Virology* 34, 475-483, 1977.
- Ertunç, F.: «Detection of Lettuce Mosaic Virus (LMV) from Infected Lettuce and Wild Mustard (*Sinapis arvensis* L.) Seeds by Non-Precoated Indirect Enzyme-Like Immunoabsorbent Assay», *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları* no. 1 253, 1992.
- Gonsalves, D.; D. Purcifull: «Papaya Ringspot Virus», *CMV/AAB. Descriptions of Plant Viruses* no. 292, 1984.
- Grogan, R. G.: «Control of Lettuce Mosaic Virus-Free Seed», *Plant Disease*, 64, 446-449, 1980.
- Hunter, D. G.; J. W. Bowyer: «Cytopathology of Lettuce Mosaic Virus Infected Lettuce Seeds and Seedlings», *Journal of Phytopathology* (Australia) 137(1): 61-72, 1993.
- Jafarpour, B.; R. J. Shephard; R. G. Gronan: «Serological Detection of Bean Common Mosaic and Lettuce Mosaic Virus in Seeds», *Phytopathology* (EUA) 69: 1125-1129, 1979.
- Kennedy, Day & Eastop: *A Conspectus of Aphids as Vector of Plant Viruses*, Commonwealth Institute of Entomology, London, 1962.
- Kucharek, T.; D. Purcifull: «Aphid-Transmitted Viruses of Cucurbits in Florida», Circular 1184, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1997.
- Maury-Chovelon, V.: *Thesis*, Submitted at Université des Science et Techniques du Languedoc, France, 1984.
- Maury, Y.; R. K. Khetarpal: *Testing Seed for Viruses Using ELISA. Perspectives in Plant Pathology*. New Delhi, 1989, pp. 31-49.
- Smith, K.M.: *A Textbook of Plant Viruses Disease*, London, 1972 pp. 310-312.
- Tomilson, J. A.: «Lettuce Mosaic Virus». *CMV/AAB. Descriptions of Plant Viruses* no. 9, 1970.
- Van Vuurde, J. W. L.; D. Z. Maat: «Routine Application of ELISA for the Detection of Lettuce Mosaic Virus in Lettuce Seeds», *Seed Sci. & Technol.* 11: 503-513, 1983.