

Aphid-borne viruses infecting cultivated watermelon and squash in Spain: characterization of a variant of cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV)

Virus transmitidos por pulgón infectando sandía y calabaza en España: caracterización de una variante del virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgón (CABYV)

M.P. Rabadán^{1*}, M. Juárez², C. De Moya-Ruiz¹, P. Gómez¹

¹Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, Apartado 164, 30100 Espinardo, Murcia. Spain.

²Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Orihuela 03312, Alicante. Spain.

*mprabadan@cebas.csic.es

Abstract

Aphid-borne viruses are responsible for major cucurbit diseases. Systematic monitoring can reveal the occurrence and distribution of these viruses, facilitating the control of diseases. During three seasons (2018-2020), the presence of aphid-borne viruses was controlled in watermelon and squash plants in three cucurbit-producing areas (Castilla La-Mancha, Alicante and Murcia) in Spain. Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) was the most common virus found (29%) in the plants from both crops. Likewise, except for squash samples from Castilla La-Mancha and Alicante, watermelon mosaic virus (WMV) was also found (23%) with a relatively high frequency. In addition, we observed more exacerbation symptoms in watermelon plants that was often accompanied by a fruit abortion. CABYV was the causative agent of this new disease; two infectious cDNA clones (one from watermelon CABYV-LP63 and one from melon CABYV-MEC12.1) were constructed to compare and characterize this disease. The phylogenetic study revealed that both isolates were within the Mediterranean branch. Isolate LP63 shows two potential recombination events compared to MEC12.1. LP63 isolate caused more severe symptoms and showed higher RNA accumulation than MEC12.1 in five cucurbits plant species. These results suggest that a novel CABYV variant that causes severe yellowing symptoms, may be causing outbreaks in cucurbit crops.

Keywords: cucurbits; epidemiology; plant viral diseases; WMV.

Resumen

Los virus transmitidos por pulgones son responsables de las principales enfermedades de cucurbitáceas. El continuo seguimiento de estos cultivos puede ayudar a prevenir la aparición y distribución de estos, facilitando el control de enfermedades. Durante tres temporadas (2018-2020) se examinó la presencia de virus transmitidos por pulgón en plantas de sandía y calabaza en tres zonas productoras de cucurbitáceas en España. El virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgón (CABYV) fue mayoritario (29%) en ambos cultivos, seguido del virus del mosaico de la sandía (WMV) (23%). Se observaron unas plantas de sandía con síntomas más graves acompañados de aborto en los frutos revelando que CABYV era el agente causante de estos síntomas. Se construyeron dos clones de ADNc infecciosos (uno de sandía CABYV-LP63 y otro de melón CABYV-MEC12.1) para

comparar y caracterizar esta nueva variante de CABYV. El estudio filogenético reveló que ambos aislados estaban dentro de la rama mediterránea. El aislado LP63 tiene dos eventos potenciales de recombinación en comparación con MEC12.1. Además, esta nueva variante causó síntomas más graves y presentó mayor acumulación en cinco especies de cucurbitáceas. Una nueva variante de CABYV causa síntomas de amarilleos más graves puede estar amenazando los cultivos de cucurbitáceas.

Palabras clave: cucurbitáceas; epidemiología; enfermedad viral de plantas; WMV.

1. INTRODUCTION

Las cucurbitáceas se encuentran entre las hortalizas más importantes de la cuenca mediterránea. Sin embargo, la sostenibilidad de su producción se ve amenazada por enfermedades que incluyen al menos 28 especies de virus diferentes (1). La prevalencia de virus afectando a las cucurbitáceas se está viendo incrementada no solo debido a la falta de medidas de control, sino también por el aumento de cultivos en sistemas de producción ecológico que pueden alterar la población de insectos vectores de virus, como los pulgones. Por ello, existe la necesidad de realizar un continuo seguimiento acerca de la presencia y distribución de estas enfermedades virales, así como, de estudiar la estructura genética poblacional y epidemiología de las mismas.

Entre estas enfermedades virales, el virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgón (cucurbit aphid-borne yellows virus; CABYV) es uno de los virus más prevalentes (2). CABYV se transmite principalmente por pulgones (*Aphis gossypii* Glover y *Myzus persicae* Sulzer) de manera circulativa persistente y no propagativa. En España se identificó por primera vez en 2004 (3), y se ha ido extendiendo a los cultivos de cucurbitáceas, volviéndose más prevalente en los cultivos de melón y calabacín en el sureste de España (4,5). Además, también se han descrito potyvirus: virus del mosaico de la sandía (watermelon mosaic virus; WMV), el virus del mosaico amarillo del calabacín (zucchini yellows mosaic virus; ZYMV) y el virus de la mancha anular de la papaya (papaya ring spot virus; PRSV), así como el virus del mosaico del pepino (cucumber mosaic virus; CMV), entre otros, que afectan mayoritariamente a cucurbitáceas en España (6). Las infecciones virales múltiples también se observan con alta frecuencia en especies de cucurbitáceas, siendo CABYV y WMV los que se encuentran de manera mayoritaria (2,4,5).

La secuenciación de diferentes aislados de CABYV revela que hay cuatro grupos genéticamente relacionados: asiático o chino (C), mediterráneo (N), taiwanés (TW), y recombinantes (R) (7). Un análisis más detallado y centrado en la proteína de cubierta (CP) ha mostrado que CABYV tiene una alta tasa de sustitución de nucleótidos (1×10^{-2} sustitución/sitio/año) (8), sugiriendo que las mutaciones son la principal fuente de diversidad genética en este virus. Esta plasticidad genética podría favorecer la rápida evolución y adaptación de los virus bajo nuevas condiciones agrícolas y, por lo tanto, contribuir a la emergencia de nuevas variantes de CABYV que desafíen las estrategias de control establecidas. El objetivo de este trabajo es examinar la presencia y distribución de virus transmitidos por pulgón que causan enfermedades en los cultivos de sandía y calabaza, presentando atención a la emergencia de nuevas enfermedades.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Colección de muestras y detección de virus

Un total de 292 muestras fueron recogidas durante 2018-2020 en zonas productoras de sandía y calabaza de Murcia, Alicante y C. La-Mancha. El ARN total de las muestras fue extraído con Tri-Reagent y mediante hibridación molecular por dot-blot usando sondas específicas se detectaron CABYV, WMV, ZYMV, CMV y PRSV.

2.2 Amplificación del genoma completo y construcción de clon infectivo de CABYV

Para la construcción de los clones, se amplificó mediante RT-PCR el genoma de una muestra de sandía y otra de melón. Ambos se clonaron en pJL89 (In-Fusion cloning) y se transformó en *Escherichia coli*.

2.3 Secuenciación y estudio genético de CABYV

Mediante SANGER se secuenciaron los dos clones con 8 primers internos. El análisis filogenético se realizó con MEGA X y los eventos de recombinación se detectaron con RDP4. Ambas secuencias se depositaron en GenBank.

2.4 Agro-inoculación de cucurbitáceas y estudio de acumulación de CABYV

Se agroinfectaron 5 especies diferentes de cucurbitáceas tanto con LP63 con MEC12.1. Se estudió la acumulación de cada uno de los clones mediante RT-qPCR en cada una de las cucurbitáceas y se procedió a su análisis estadístico con JMP software v9 y Rstudio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cultivos de cucurbitáceas son importantes económicamente, siendo España uno de los principales productores. Estos cultivos se ven continuamente amenazados por enfermedades virales, principalmente transmitidas por pulgón. En este trabajo se analizaron un total de 292 muestras sintomáticas de sandía y calabaza recogidas durante 3 temporadas (2018-2020). En general, CABYV fue el virus mayoritario (29%) tanto en sandía como en calabaza, seguido de WMV (23%), mientras que en una baja proporción se observaron ZYMV y PRSV (<3%) (Fig. 1). La alta prevalencia de CABYV podría estar relacionada con la presencia de especies silvestres que actúan como fuente de inóculo y/o reservorio para la diseminación por pulgones (2). Además, se ha observado que plantas infectadas con CABYV, influyen en el comportamiento de los pulgones estimulando la atracción de plantas infectadas y preferencia de los pulgones por plantas sanas (9). Es bastante probable que la prevalencia de CABYV se deba a la falta de especies resistentes, junto con la presencia de plantas silvestres cerca de campos de cultivo que se superponen, así como el papel de CABYV en la transmisión de pulgones.

Durante los muestreos realizados se observaron unos síntomas más intensos en plantas de sandía. Mediante los postulados de Koch se confirmó que estos síntomas eran producidos por una nueva variante de CABYV (LP63). En el análisis filogenético mostró que esta variante estaba dentro del grupo mediterráneo (2), y que su secuencia nucleotídica compartía un 96% de similitud con el aislado CABYV-MEC12.1. En particular, el ORF2 de LP63 muestra un elevado número de mutaciones no-sinónimas, y su genoma presentó dos posibles eventos de recombinación. Esto demanda continuas prospecciones para estudiar la variabilidad genética de las poblaciones de CABYV.

La construcción de clones infectivos de CABYV (LP63 y MEC12.1) permitió evaluar la expresión de síntomas y estimar la acumulación de ARN viral en cinco especies de cucurbitáceas (melón, calabacín, sandía, pepino y calabaza). En general, se observó que LP63 produce una sintomatología de amarilleos más acusada (Fig. 2), así como abortos en los frutos de las plantas de sandía infectadas. También se observó una mayor acumulación de ARN viral en todas las especies de plantas ensayadas. Es muy probable que esta nueva variante tenga una ventaja competitiva en cultivos de cucurbitáceas, ampliando la presencia y distribución de CABYV en estos cultivos. Es por esto, que surge la necesidad de monitorizar la población de CABYV e investigar en profundidad la diversidad genética y dinámica evolutiva de las poblaciones virales.

4. CONCLUSIONES

- CABYV y WMV son los virus predominantes en cultivos de sandía y calabaza.
- Una nueva variante de CABYV ha sido detectada en sandía, y puede estar amenazando la producción de los cultivos de cucurbitáceas.

5. AGRADECIMIENTOS

Ministerio de ciencia, innovación y universidades con beca de doctorado (PRE2018-083915). AGL2017-89550-R de la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y fondos FEDER (UE).

6. REFERENCIAS

1. Lecoq H, Desbiez C. Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region. An Ever-Changing Picture. In: Advances in Virus Research. 2012:67–126.
2. Kassem M, Juárez M, Gómez P, Mengual C, Sempere R, Plaza M, et al. Genetic diversity and potential vectors and reservoirs of Cucurbit aphid-borne yellows virus in southeastern Spain. *Phytopathology*. 2013;103(11):1188–97.
3. Juárez M, Truniger V, Aranda MA. First Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Spain. *Plant Dis*. 2004;88(8):907.
4. Kassem MA, Sempere RN, Juárez M, Aranda MA, Truniger V. Cucurbit aphid-borne yellows virus is prevalent in field-grown cucurbit crops of southeastern Spain. *Plant Dis* [Internet]. 2007 Mar;91(3):232–8. Available from: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-91-3-0232>
5. Juárez M, Legua P, Mengual CM, Kassem MA, Sempere RN, Gómez P, et al. Relative incidence, spatial distribution and genetic diversity of cucurbit viruses in eastern Spain. *Ann Appl Biol*. 2013;162(3):362–70.
6. De Moya-Ruiz C, Rabadán P, Juárez M, Gómez P. Assessment of the current status of potyviruses in watermelon and pumpkin crops in Spain: Epidemiological impact of cultivated plants and mixed infections. *Plants*. 2021;10(1):1–14.
7. Knierim D, Deng TC, Tsai WS, Green SK, Kenyon L. Molecular identification of three distinct Polerovirus species and a recombinant Cucurbit aphid-borne yellows virus strain infecting cucurbit crops in Taiwan. *Plant Pathol*. 2010;59(5):991–1002.
8. Pagán I, Holmes EC. Long-Term Evolution of the Luteoviridae: Time Scale and Mode of Virus Speciation. *J Virol*. 2010;84(12):6177–87.
9. Carmo-Sousa M, Moreno A, Plaza M, Garzo E, Fereres A. Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. *Ann Appl Biol*. 2016;169(2):284–97.

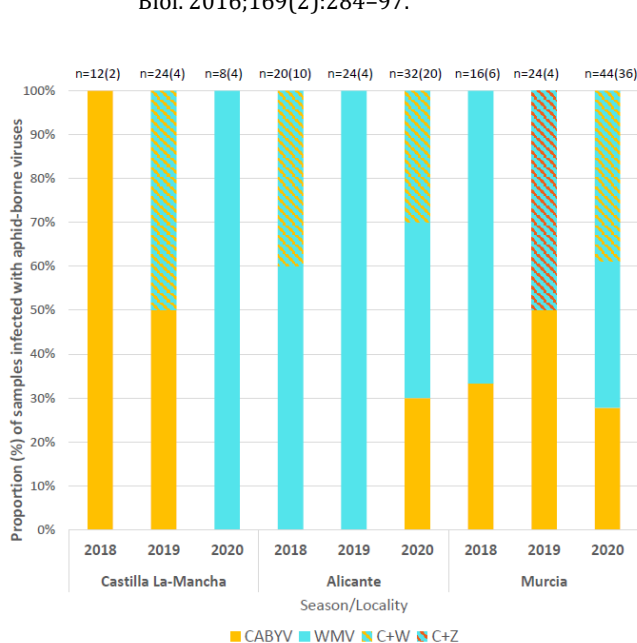


Figura 1. Virus transmitidos por pulgón detectados (CABYV, WMV, ZYMV, PRSV y CMV) en sandía durante 2018-2020 en 3 zonas de cultivo (Castilla La-Mancha, Alicante and Murcia).

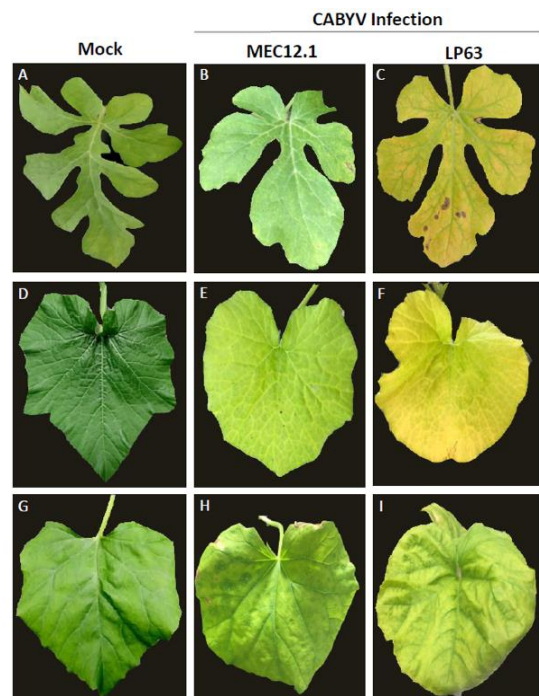


Figura 2. Comparación de síntomas producidos por los dos aislados CABYV MEC 12.1 y CABYV LP63.