

El «stolbur» del tomate: detección en España mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

L. AVINENT y G. LLÁCER

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se detectó, en el verano de 1994, la presencia del «stolbur» de las solanáceas, enfermedad asociada a fitoplasmas. Los síntomas de la enfermedad se observaron en plantaciones de tomate y pimiento de Valencia. La detección se llevó a cabo con la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA del fitoplasma, utilizándose iniciadores universales y específicos. Con ambos tipos de iniciadores se lograron amplificaciones del fragmento indicado. Estos resultados confirman la presencia del «stolbur» en nuestro país.

L. AVINENT y G. LLÁCER. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial, 46113-Moncada (Valencia).

Palabras clave: Stolbur, detección, PCR, tomate, pimiento, fitoplasmas.

INTRODUCCION

El «stolbur» del tomate es una enfermedad de las solanáceas asociada a la presencia de fitoplasmas en el floema (PLOAIE y MARAMOROSCH, 1969), patógenos anteriormente conocidos como MLOs (del inglés mycoplasma-like organisms) (STM, 1994). Patatas, tomates, pimiento y tabaco son cultivos muy sensibles a la enfermedad.

Esta fitoplasmosis se detectó por primera vez en Checoslovaquia en 1932, aunque se cree presente desde 1921; la primera referencia escrita data de la antigua URSS, de 1946. Actualmente la enfermedad se encuentra citada, además, en Bulgaria, Rumanía, Yugoslavia, Hungría, Austria, Suiza, Francia, Italia, Grecia, España, Reino Unido, Arabia Saudí e Iraq (ALIVIZATOS, 1990; PEÑA, 1977).

El porcentaje de infección varía según los años, variabilidad observada en todos los países en donde se ha estudiado. En el su-

reste francés, el porcentaje de plantas infectadas puede oscilar entre un 5%, que es el porcentaje más habitual, y un 80% en los años más desfavorables. El por qué es una enfermedad tan esporádica es un aspecto de momento desconocido. Dado que el «stolbur» se transmite por insectos homópteros, la hipótesis más aceptada es la influencia de las poblaciones del vector. Entre los vectores conocidos se encuentran los homópteros *Hyalestes obsoletus* (Cixiidae), *Macrostelus laevis*, *Aphrodes bicincta* y *Euscelis plebejus* (Cicadellidae), cuyas densidades poblacionales varían de acuerdo con las condiciones climáticas de la estación. En Eslovaquia, las primaveras secas y cálidas hacen aumentar las poblaciones de *H. obsoletus*; los años de alta incidencia de stolbur se caracterizan por escasez de lluvias en junio y julio y temperaturas medias superiores a las habituales en la primavera y verano (BRCÁK, 1979).

Por otra parte, algunas malas hierbas, como *Convolvulus arvensis*, *Lepidium*

draba, *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* y *Cirsium arvense* son hospedadores alternativos de los vectores y algunas, como *C. arvensis*, también son capaces de albergar al patógeno (BRCÁK, 1979; FOS *et al.*, 1992).

La primera referencia que se tiene en España de la presencia del «stolbur» es la de PEÑA (1977). En 1978, se expuso la primera comunicación sobre la presencia del «stolbur» en tomates de Calasparra (Murcia) (GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 1978). La detección se llevó a cabo por sintomatología de campo, transmisión a plantas indicadoras y microscopía electrónica (C. JORDÁ, comunicación personal). Además, la enfermedad también se observó en plantaciones comerciales de pimientos del Valle del Ebro (LUIS, 1980), donde regularmente aparecen plantas con síntomas similares a los descritos como causados por el «stol-

bur» de las solanáceas; el agente patógeno fue transmitido a pimientos sanos y a *Vinca rosea*. Asimismo, la enfermedad también se observó en cultivos de pimiento de Zaragoza (1980 y 1982), Badajoz (1982) y Logroño (1982) (LUIS, 1989). Dado que la enfermedad, en España, no causa graves pérdidas económicas y que también se presenta de manera esporádica, no ha sido objeto de estudios de investigación en los últimos años y, por tanto, la sintomatología no ha sido objeto de divulgación entre los agricultores.

En el verano de 1994 se detectó en la zona de Llutxent (Valencia) una parcela de tomates severamente afectada por algún patógeno que causaba una sintomatología desconocida para los agricultores de la zona. Las plantas mostraban floración reducida, con flores deformadas (Figura 1), sépalos excesivamente grandes (Figuras 2 y 3), fru-



Fig. 1.—A la derecha, brote terminal de tomate con reducción del tamaño foliar y flor deformada. A la izquierda brote normal.



Fig. 2.—Flor con sépalos anormalmente grandes (tomate).

tos endurecidos, proliferación de brotes axilares, reducción del tamaño foliar de los brotes terminales (Figura 1) y coloración violácea de las hojas (Figura 4). Junto a los tomates había una parcela de pimientos en

la que algunos pies mostraban claros síntomas de amarilleo y enanismo (Figura 5).

Estas plantas enfermas se analizaron en el Servicio de Sanidad y Certificación Vegetal de Silla (Valencia) con el fin de descartar una posible virosis. Se aplicó el método ELISA para los virus del mosaico del pepino, del mosaico del tomate, bronceado del tomate y virus Y de la patata (J. SERRA, comunicación personal). La sintomatología no era nueva para este servicio pero nunca se había podido confirmar la presencia de ningún patógeno. Tras los resultados negativos obtenidos, se comunicó al IVIA la existencia de estas plantas, por si alguna fitoplasmosis pudiera estar implicada. Los síntomas observados fueron ya una primera indicación del «stolbur». Dado que en el IVIA se dispone de las técnicas moleculares necesarias para la detección y caracterización de fitoplasmas, se decidió abordar el tema y confirmar la presencia del patógeno.



Fig. 3.—Fruto con sépalos de gran tamaño (tomate).



Fig. 4.—Hoja de tomate con coloración violácea.

MATERIAL Y METODOS

Material vegetal

En agosto de 1994 se visitaron las parcelas afectadas y se tomaron muestras de plantas con síntomas, tanto de tomates como de pimientos. La parcela de tomates era de 1 hanegada y la de pimientos de unas 5, aproximadamente. La sintomatología coincidía con la observada, un mes antes, por M. J. MELO y M. GARCÍA-MORATÓ (comunicación personal), aunque la manifestación de síntomas era mucho menor, entre otras cosas, porque el agricultor había eliminado los pies o partes de las plantas afectadas.

Extracción del DNA

Para la detección de fitoplasmas por PCR es necesaria la extracción del DNA de los mismos. Para ello se siguió el método de en-

riquecimiento de DNA fitoplásmico descrito por AHRENS y SEEMÜLLER (1992).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo la reacción se eligió como DNA molde el gen 16S rRNA (AHRENS y SEEMÜLLER, 1992). Los oligonucleótidos iniciadores fueron: rU3 (AHRENS y SEEMÜLLER, 1994), fU5 (secuencia no publicada; cedida por U. AHRENS), fSTOL y rSTOL (E. SEEMÜLLER, comunicación personal). El par fU5/rU3 se utiliza para una detección no específica, es decir, para todos los fitoplasmas. El par fSTOL/rSTOL es específico del stolbur.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 50 μ l, con 5 μ l de la muestra de DNA, 250 nM de cada iniciador, 100 μ M de los cuatro dNTPs, Taq polimerasa (1,25 unidades) y el tampón de la Taq. Las condicio-



Fig. 5.—Enanismo y amarillo en pimientos.

nes de la reacción fueron: 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 55 °C y 60 s a 72 °C. Los productos de la amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, en tampón TAE, teñido con bromuro de etidio.

RESULTADOS

Tanto los iniciadores universales como los específicos amplificaron el fragmento esperado del gen 16S rRNA. El par fU3/rU5 amplificó un fragmento de unas 880 pb (Figura 6); el par fSTOL/rSTOL amplificó un fragmento de unas 600 pb (Figura 7). Estas

amplificaciones se obtuvieron tanto en pimientos como en tomates con síntomas. No se obtuvo ninguna amplificación del DNA extraído de plantas sanas.

DISCUSION

Los resultados obtenidos confirman la presencia de «stolbur» en nuestro país. El método utilizado permite una detección rápida, fiable y específica. Se evita así tener que realizar laboriosas preparaciones microscópicas o lentas transmisiones a plantas indicadoras, métodos que, aunque ponen de manifiesto la

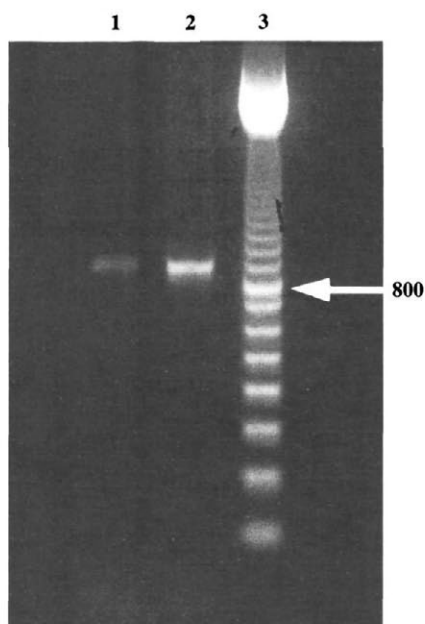


Fig. 6.—Resultado de la amplificación por PCR. Iniciadores U3-U5. Línea 1: pimiento enfermo; Línea 2: tomate enfermo. Línea 3: marcador molecular.

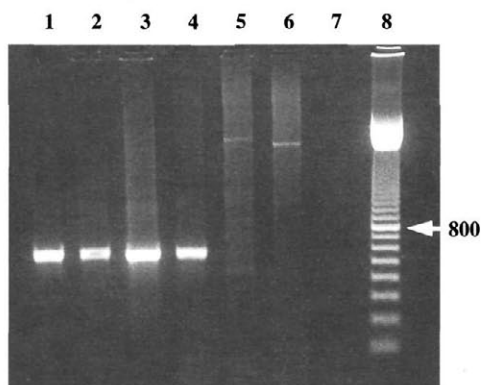


Fig. 7.—Resultado de la amplificación por PCR. Iniciadores específicos de stolbur. Líneas 1 y 2: tomate enfermo. Líneas 3 y 4: pimiento enfermo. Líneas 5 y 6: tomate sano. Línea 7: Control negativo sin muestra vegetal. Línea 8: marcador.

presencia de fitoplasmas en el floema, no son capaces de discriminar entre ellos.

En cuanto al vector, éste es, de momento, desconocido en España. En Francia se ha

detectado, mediante serología (ELISA-DAS), la presencia de fitoplasmas, asociados al «stolbur», en varios homópteros. Entre ellos se encuentra *H. obsoletus* (un 25% de los insectos analizados estaban infectados) que, además, transmitió el patógeno a varias plantas indicadoras, siendo considerado por tanto vector de la enfermedad (FOS *et al.*, 1992). Este insecto no se encuentra frecuentemente en los campos de tomates, sino en la correhuela (*C. arvensis*), reservorio natural del patógeno. Así pues, y según estos autores, la correhuela junto con *H. obsoletus* juega un papel muy importante en la epidemiología de la enfermedad en el sureste francés, a diferencia de lo apuntado hace algunos años por LECLANT y LACOTE (1969), autores que no consideraron a esta especie como vector, ya que los adultos aparecían a finales de junio, al mismo tiempo que los síntomas, y no se considera a las ninfas capaces de transmitir la enfermedad, por su baja movilidad en el suelo y la baja tasa de infectividad natural (RAZVJAZKINA, 1950). En España desconocemos las poblaciones de insectos presentes en las parcelas afectadas o sus inmediaciones, por lo que, de momento, no podemos saber qué especie está implicada en la difusión natural. Sí sabemos, por indicación de los agricultores, que en la primavera de 1994 se registraron poblaciones muy elevadas de cicadélidos.

Como método de control en cultivos al aire libre se recomiendan los tratamientos insecticidas, tratamientos herbicidas y colocación de barreras alrededor de las parcelas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a M. J. Melo (Escuela de Capacitación Agraria de Llutxent) y a M. García-Morató (Servicio de Transferencia de Tecnología) por la localización de las parcelas y observación de síntomas y a J. Serra (Servicio de Sanidad y Certificación Vegetal) por su desinteresada colaboración.

ABSTRACT

AVINENT, L. & LLÁCER, G., 1995: Stolbur detection in Spain by polymerase chain reaction (PCR). *Bol. San. Veg. Plagas*, **21**(3): 417-423.

By polymerase chain reaction (PCR), stolbur was detected in tomato and pepper plants in Valencia (Spain). A fragment of the phytoplasma 16S rRNA gene was amplified with universal and specific primers. No amplifications were obtained with healthy plants. These results corroborate the presence of stolbur in our country.

Key words: Stolbur, detection, PCR, tomato, pepper, phytoplasmas.

REFERENCIAS

- AHRENS, U. y SEEMÜLLER, E., 1992: Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, **82**: 828-832.
- AHRENS, U. y SEEMÜLLER, E., 1994: Detection of mycoplasma-like organisms in declining oaks by polymerase chain reaction. *Journal of Forest Pathology*, **24**: 55-63.
- ALIVIZATOS, A. S., 1990: Occurrence and distribution of tomato stolbur in Greece. En: *Plant Pathogenic Bacteria*. Z. Klement (Ed.). Akademiai Kiado, Budapest. 945-950 pp.
- BRCÁK, J., 1979: Leafhopper and planthopper vectors of plant disease agents in central and southern Europe. En: *Leafhopper vectors and Plant diseases*. K. Marmorosch y K. F. Harris (Eds.). Academic Press. New York. 97-154 pp.
- FOS, A.; DANET, J. L.; ZREIK, L.; GARNIER, M. y BOVE, J. M., 1992: Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Dis.*, **76**: 1.092-1.096.
- GARCÍA JIMÉNEZ, J.; JORDA, C.; MEDINA, V. y ALFARO, A., 1978: El «stolbur» del tomate en España. Comunicación en la Reunión anual del Grupo de Fitopatología de la Sociedad Española de Microbiología. Valencia.
- LECLANT, F. y LACOTE, J. P., 1969: Recherches sur les vecteurs du stolbur dans le midi de la France. *Ann. Phytopath.*, **1**, No. Hors. Serie. 439 pp.
- LUIS, M., 1980: Síntomas de tipo stolbur en los cultivos de pimiento del Valle del Ebro. Primeras observaciones. *ITEA*, **39**: 25-32.
- LUIS, M., 1989: Virosis y micoplasmosis del pimiento cultivado al aire libre en España. Identificación de virus y caracterización de cepas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. ETSIA. 215 pp.
- PEÑA, A., 1977: Catálogo de virus y microorganismos del tipo micoplasma y rickettsia identificados en plantas cultivadas en España. *Catálogos INIA*, **7**, Ministerio de Agricultura. 108 pp.
- PLOAIÉ, P. y MARAMOROSCH, K., 1969: Electron microscopic demonstration of particles resembling mycoplasma or psittacosis-lymphogranuloma-trachoma group in plants infected with European yellows-type diseases. *Phytopathology*, **59**(5): 536-544.
- RAZVIAZKINA, G. M., 1950: On the distribution of the stolbur virus in nature. *Mikrobiologiya*, **19**: 256-259.
- STM (Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes), 1994: Meeting in the 10th International Congress of the IOM. Bordeaux, julio 1994. En preparación.

(Aceptado para su publicación: 30 mayo 1995)