

La transmisión de virus no persistentes estudiada a través del comportamiento de prueba de los pulgones

J. L. COLLAR, C. AVILLA, B. MARTÍN, M. DUQUE y A. FERERES

Cinco años de investigación sobre el comportamiento de prueba del pulgón *Myzus persicae* Sulzer con la ayuda de un monitor electrónico de comportamiento (técnica EPG) han permitido obtener un mejor conocimiento sobre el mecanismo de transmisión no persistente de virus vegetales, empleando como modelo el virus Y de la patata (PVY). Las breves picaduras intracelulares producidas por el pulgón al inicio de la prueba son registradas en el monitor electrónico como breves caídas de potencial (denominadas *pds*). La presencia y morfología de este patrón de onda *pd* ha resultado ser clave en el proceso de transmisión de PVY. Se ha observado que la presencia de al menos una *pd* es necesaria para la adquisición del virus, y que una mayor frecuencia de *pds* aumenta la probabilidad de adquisición. Asimismo, se ha comprobado que el proceso de inoculación del virus también tiene lugar durante la *pd*, más en concreto en su fase inicial III1, mientras que la adquisición es un proceso posterior (fase II3). Esta evidencia pone en duda el mecanismo mayoritariamente aceptado de ingestión-egestión, proponiéndose como hipótesis alternativa un mecanismo de ingestión-salivación. Asimismo, la presencia y morfología de la fase II3 de la *pd* ha proporcionado una explicación satisfactoria al conocido efecto del ayuno previo (que aumenta la eficiencia de transmisión) y a la distinta capacidad vectorial observada en diferentes especies de pulgones.

J. L. COLLAR: Departamento de Protección Vegetal. Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC. Serrano 115 dpdo., 28006 Madrid. Dirección actual: Cyanamid Ibérica S.A. Departamento Técnico. Apartado 471, 28080 Madrid.

B. MARTÍN, M. DUQUE y A. FERERES: Departamento de Protección Vegetal. Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC. Serrano 115 dpdo., 28006 Madrid.

C. AVILLA: Departamento de Ciencias Agroforestales. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola. Ctra. Utrera Km 1, 41013 Sevilla

Palabras clave: Transmisión de virus, *Myzus persicae*, PVY, Gráficos de Penetración Eléctrica (EPG).

INTRODUCCIÓN

Las virosis vegetales transmitidas de manera no persistente por pulgones tienen una gran importancia económica a nivel mundial (RACCAH, 1986, MATTHEWS, 1991). La prevención de este tipo de enfermedades es especialmente complicada, ya que estos virus pueden ser adquiridos por los pulgones tras muy pocos segundos de contacto con la planta infectada (HARRIS, 1990). Además, al no existir periodo de latencia, el virus puede

ser inoculado inmediatamente a una planta sana, por lo que el proceso completo de transmisión puede producirse en pocos minutos. No debe por tanto extrañarnos el fracaso reiterado de las estrategias de lucha química contra este tipo de virosis (COLLAR y col., 1995), ya que los insecticidas suelen tardar horas en actuar y los pulgones tan sólo minutos en dispersar el virus (LOWERY y col., 1990).

No se conoce completamente el mecanismo de transmisión de virus no persistentes,

si bien es evidente que los procesos biológicos que determinan la transmisión deben estar relacionados con el comportamiento de prueba tan peculiar que muestran los pulgones. Estos insectos introducen su estilete en los tejidos de la planta y lo dirigen a través de los espacios intercelulares en busca del floema (TJALLINGII y HOGEN ESCH, 1993). Sin embargo, se ha observado que ocasionalmente el estilete penetra brevemente células epidérmicas, lo que aprovecha el pulgón para probar el citoplasma celular. Se ha comprobado que estas breves picaduras intracelulares están correlacionadas con la transmisión de virus no persistentes (LOPEZ-ABELLA y col., 1988), lo que indica que tanto la adquisición como la inoculación del virus son procesos típicamente intracelulares. La hipótesis generalmente aceptada para explicar el proceso se basa en un mecanismo de ingestión-egestión (HARRIS, 1977), según el cual el pulgón ingiere las partículas virales al probar el citoplasma celular infectado y posteriormente lo inocula al regurgitar parte de ese jugo en la célula de una planta sana.

Un fenómeno interesante y ampliamente estudiado es el llamado «efecto del ayuno previo» (WATSON, 1938), según el cual los pulgones transmiten mejor los virus no persistentes tras un periodo de ayuno. Hasta la fecha no se ha encontrado una explicación plenamente satisfactoria de este fenómeno, si bien existen numerosas hipótesis (HARRIS, 1977, BRADLEY, 1964, POWELL, 1993). Otro hecho difícil de explicar es la diferente habilidad mostrada por distintas especies de pulgones para transmitir eficientemente este tipo de virus.

Una herramienta poderosa para estudiar el comportamiento de los pulgones es el empleo de monitores electrónicos (MCLEAN y KINSEY, 1964, TJALLINGII, 1978). La técnica denominada Gráficos de Penetración Eléctrica (EPG, TJALLINGII, 1990) permite distinguir numerosos patrones de onda que indican en cada momento la acción que realiza el pulgón y el tipo de tejido en que se encuentra su estilete. Diversos trabajos (PO-

WELL, 1991, POWELL y col., 1992, 1995) han mostrado que debemos centrar nuestros esfuerzos en comprender el significado del patrón de onda *pd*, que indica una breve penetración intracelular, durante la cual se produce el proceso de transmisión del virus. En el presente trabajo se resumen cinco años de investigación dedicados a aclarar algunos aspectos sobre la relación entre el comportamiento del pulgón y la transmisión de virus no persistentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron ensayos de laboratorio empleando clones de cuatro especies de pulgones: *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* Glover, *Rhopalosiphum padi* (L.) y *Sitobion avenae* (Fabricius) (ver Figura 1). Los clones se mantuvieron sobre plantas de diferentes especies (pimiento para *M. persicae*, melón para *A. gossypii*, trigo para *R. padi* y *S. avenae*) sembradas en tiestos cubiertos por cilindros de metacrilato y mantenidas a una temperatura de 22:18 °C (día:noche) y un fotoperiodo de 14:10 h



Fig. 1.—Cuatro especies de pulgones sometidas a la técnica EPG: *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Sitobion avenae* y *Rhopalosiphum padi*.

(luz:oscuridad). Se empleó asimismo un aislado del virus Y de la patata (PVY) del patotipo 0 inoculado sobre plantas de pimiento cv. Yolo Wonder. Para confirmar la presencia de infección sistémica en las plantas se empleó la prueba serológica ELISA (CLARK y ADAMS, 1977).

Para registrar el comportamiento de prueba de los pulgones se adhirió a su dorso un filamento de oro mediante una gota de pintura de plata conductora y se conectaron a

un monitor EPG Giga-2 (TJALLINGII, 1990). Las ondas producidas por el pulgón se registraron simultáneamente en papel y en ficheros de ordenador que permitieron un posterior análisis detallado. Los patrones registrados se clasificaron esencialmente en tres categorías: *np* (no prueba), *C* (prueba extracelular) y *pd* (picadura intracelular). El patrón de onda *pd* se dividió en tres fases diferenciadas (II1, II2 y II3), como puede observarse en la figura 2.

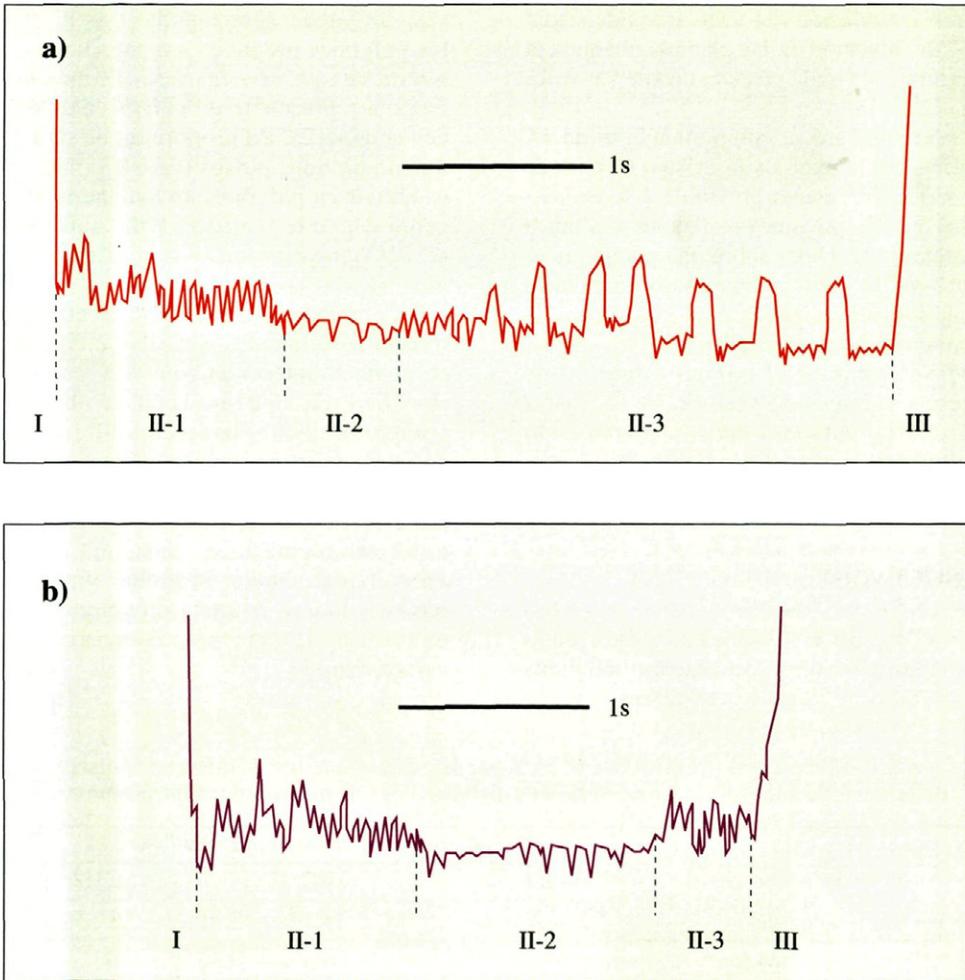


Fig. 2.—Distintas fases del patrón de onda *pd* (equivalente a una picadura intracelular) obtenido mediante la técnica EPG. a) *pd* con pulsos en II3. b) *pd* con II3 corta (sin pulsos).

Se diseñaron tres experimentos para correlacionar el comportamiento de los pulgones con su capacidad de transmitir PVY:

1) Se interrumpieron las pruebas de adquisición (sobre planta infectada) y de inoculación (sobre planta sana previa adquisición) de PVY realizadas por *Myzus persicae*. En concreto, las pruebas se interrumpieron cuidadosamente mientras se estaban registrando diferentes fases del patron de onda *pd*, es decir, en diferentes momentos de la producción de la picadura intracelular. Posteriormente se comparó la eficiencia de adquisición o inoculación del virus (medida según el % de infección en las plantas) obtenida al interrumpir la onda en cada una de sus fases (II1, II2 o II3).

2) Se comparó el comportamiento de *M. persicae* en función de la existencia o no de un periodo de ayuno previo de 1 h. Se permitió que los pulgones realizaran una única picadura intracelular sobre una planta infectada, tras lo cual se traspasaron a plantas sanas individualizadas para comprobar si existía o no infección de PVY.

3) Se comparó el comportamiento de prueba y la eficiencia vectorial de las cuatro especies de pulgones citadas, permitiendo que los pulgones realizaran una única picadura intracelular sobre una planta infectada.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los porcentajes de adquisición e inoculación obtenidos

al interrumpir la onda *pd* en sus diferentes fases. Como puede observarse, se observa un claro aumento en la eficiencia de adquisición (frente a valores residuales) cuando se permite que el pulgón realice la fase II3. Por el contrario, para la obtención de eficiencias de inoculación aceptables basta con que el pulgón produzca la fase II1, mientras que la adición de las sucesivas fases no mejora la eficiencia vectorial.

En el cuadro 2 se compara el comportamiento y la eficiencia vectorial de ejemplares de *M. persicae* según hayan sido sometidos o no a un periodo de ayuno previo. Se puede apreciar que tras el ayuno los pulgones producen *pds* más largas, debido a que poseen una fase II3 más larga, con clara presencia de pulsos característicos (Figura 2). La proporción de pulgones que no produce pulsos (fase II3 más corta) es mayor en pulgones no ayunados. Como cabía esperar, la eficacia de transmisión de PVY mejora mucho con el ayuno previo.

En el cuadro 3 se observa el comportamiento de diferentes especies sobre plantas de pimiento infectadas con PVY y su posterior eficiencia en transmisión. Se observa un comportamiento claramente diferenciado entre las especies que colonizan pimiento (*M. persicae* y *A. gossypii*) y las no colonizantes (*S. avenae* y *R. padi*): en efecto, las especies colonizantes transmiten mejor el virus, tardan menos en probar y producen *pds* más largas, con una proporción mayor de fases II3 largas (con presencia de pulsos característicos).

Cuadro 1.—Eficiencia de transmisión de PVY por *Myzus persicae* tras la interrupción artificial de pruebas de adquisición e inoculación en distintas fases de una picadura intracelular (*pd*)

	<i>pd</i> interrumpida al finalizar la fase		
	II1	II2	II3
Eficiencia de adquisición	8,1%	18,7%	62,5%*
Eficiencia de inoculación	50,0%	38,5%	33,3%

Un asterisco indica diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto a los valores de la misma fila según prueba de CHI-2.

Cuadro 2.—Comparación de variables de comportamiento obtenidas mediante EPG al registrar una única prueba producida por *M. persicae* (con o sin ayuno previo) sobre pimiento infectado con PVY

Variable	Con ayuno previo	Sin ayuno previo	P
Duración de <i>pd</i> , s	6,22 ± 0,19	4,92 ± 0,24	<0,01 (1)
Duración de fase III, s	1,62 ± 0,04	1,46 ± 0,05	0,02 (1)
Duración de fase II2, s	0,97 ± 0,03	0,94 ± 0,04	0,14 (2)
Duración de fase II3, s	3,63 ± 0,18	2,52 ± 0,21	<0,01 (2)
Proporción de registros sin pulsos en II3	6/54	22/56	<0,01 (3)
Eficiencia adquisición PVY	57,1%	3,6%	<0,01 (3)

(1) P según prueba *t* de Student (variables normales).

(2) P según prueba *U* de Mann-Whitney (variables no normales).

(3) P según prueba de CHI-2 (comparación de proporciones).

Cuadro 3.—Comparación de variables de comportamiento obtenidas mediante EPG al registrar una única prueba producida por cuatro especies de pulgones sobre pimiento infectado con PVY

Variable	<i>M. persicae</i>	<i>A. gossypii</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. avenae</i>
Tiempo de no prueba, s	27,8 ± 3,4	29,6 ± 5,7	91,6 ± 11,3* ²	115,6 ± 12,3* ²
Duración de <i>pd</i> , s	6,3 ± 0,2	8,2 ± 0,4* ¹	3,7 ± 0,2* ²	5,4 ± 0,2* ¹
Duración de fase III1, s	1,6 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1* ²	1,9 ± 0,1* ²
Duración de fase II2, s	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0* ¹	1,1 ± 0,0* ¹
Duración de fase II3, s	3,7 ± 0,2	5,6 ± 0,3* ²	1,6 ± 0,1* ²	2,5 ± 0,2* ²
Proporción de registros sin pulsos en II3	5/54	4/54	39/54* ³	22/53* ³
Eficiencia adquisición PVY	57,1%	35,7%	<3,6%* ³	<3,6%* ³

Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto a *M. persicae* según: ¹ prueba *t* de Student (variables normales), ² prueba *U* de Mann-Whitney (variables no normales), y ³ prueba de CHI-2 (comparación de proporciones).

DISCUSIÓN

Los resultados ponen de manifiesto la importancia del patrón de onda *pd* (correlacionado con la producción de picaduras intracelulares) para el proceso de transmisión de PVY (del tipo no persistente), hecho ya mencionado en trabajos anteriores (POWELL, 1991, COLLAR y col., 1997). Se puede concluir que el proceso de adquisición sucede en la fase II3, mientras que la

inoculación se produce durante la fase III. Esto demuestra que la fase II3 debe estar asociada a un proceso de ingestión en el que las partículas virales son adquiridas (POWELL y col., 1995). Más difícil de explicar es la relación entre la fase III1 y la inoculación, ya que si ésta se produjera por regurgitación (egestión), debería ser un proceso posterior a la ingestión, y no anterior a ella como ha quedado demostrado. Esto ha llevado a proponer un mecanismo alternativo

según el cual la inoculación estaría causada por la salivación que se produce al comienzo de la picadura intracelular (MARTÍN y col., 1997).

El efecto del ayuno previo en transmisión puede explicarse según la diferente capacidad de los pulgones para producir *pds* con una fase II3 larga (con presencia de pulsos característicos). Así, una proporción considerable de los pulgones que no han ayunado realizan *pds* con fase II3 corta (es decir, sin ingestión asociada). Posiblemente, en este caso los pulgones no necesitan ingerir pequeñas muestras de jugo celular (encaminadas a aceptar o rechazar la planta como huesped), y las picaduras intracelulares suponen una simple comprobación mecánica (a través mecanoreceptores) del tejido vegetal en que se encuentran los estiletes (dirigida a la localización del floema). Este resultado demuestra que en el efecto del ayuno previo influyen claramente factores

de comportamiento, frente a lo sugerido por algunos trabajos anteriores (POWELL, 1993, POWELL y col., 1995). La tendencia de producir mayoritariamente picaduras intracelulares con o sin ingestión asociada puede también explicar la distinta eficiencia vectorial mostrada por especies colonizantes o no colonizantes de la planta huesped. En este sentido las especies no colonizantes tardan más en probar la planta (tienden a caminar sobre la hoja), y cuando lo hacen realizan picaduras más cortas, que no suelen conducir a una adquisición eficiente del virus. Esto indica que para algunas especies no colonizantes pueden bastar estímulos mecánicos (percibidos a través de los tarsos o de las antenas) para rechazar una planta como huesped, si bien no se excluye la existencia de una cierta eficiencia residual de transmisión que en ocasiones es importante desde el punto de vista epidemiológico (PÉREZ y col., 1995).

ABSTRACT

COLLAR, J. L.; AVILLA, C.; MARTÍN, B.; DUQUE, M. y FERERES, A., 1998: Nonpersistent virus transmission studied through aphid probing behaviour. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24(4):687-694.

Five years of research on the probing behaviour of the aphid *Myzus persicae* Sulzer with the help of a behavioural electronic monitor (EPG technique) have led us to obtain a deeper knowledge about the transmission mechanism of nonpersistent plant viruses, using Potato virus Y (PVY) as a model. The brief intracellular punctures produced by the aphid at the beginning of the probe are registered by the electronic monitor as short potential drops (labeled *pds*). The occurrence and morphology of this waveform pattern *pd* has proved critical for the PVY transmission process. It has been observed that the occurrence of at least a *pd* is necessary for virus acquisition, and that a higher frequency of *pd* occurrence increases the probability of virus acquisition. Moreover, it has been demonstrated that the inoculation process also takes place during *pd* occurrence, specifically during its initial phase II1, while acquisition is a later event (phase II3). This evidence has led us to propose the hypothesis of an ingestion-salivation mechanism as an alternative to the widely accepted mechanism of ingestion-egestion. Finally, the study of the occurrence and morphology of *pd* phase II3 has provided a satisfactory explanation to the widely known preacquisition starvation effect (that results in an increased transmission efficiency), and to the distinct vectorial abilities observed among different aphid species.

Key words: Virus transmission, *Myzus persicae*, PVY, Electrical Penetration Graphs (EPG).

REFERENCIAS

- BRADLEY, R. H. E., 1964: Aphids transmission of stylet-borne viruses, pp. 148-174. *En* M. K. Corbett y H. D. Sisler [eds.], *Plant virology*. University of Florida Press, Gainesville.
- CLARK, M. F. y ADAMS, A. N., 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**: 475-483.
- COLLAR, J. L.; AVILLA, C.; DUQUE, M. y FERERES, A., 1995: Assessment of potato virus Y (PVY) spread in bell peppers treated with different insecticides, pp. 3. *En* Abstracts, 6th International Plant Virus Epidemiology Symposium: Epidemiological Aspects of Plant Virus Control. 23-28 April 1995, Jerusalem, Israel. Ortra, Tel Aviv.
- COLLAR, J. L.; AVILLA, C. y FERERES, A., 1997: New correlations between aphid stylet paths and nonpersistent virus transmission. *Environ. Entomol.*, **26**(3): 537-544.
- HARRIS, K. F., 1977: An ingestion-egestion hypothesis of noncirculative virus transmission, pp. 165-220. *En* K. F. Harris y K. Maramorosch [eds.], *Aphids as virus vectors*. Academic, New York.
- HARRIS, K. F., 1990: Aphid transmission of plant viruses, pp. 177-204. *En* V. L. Mandahar [ed.], *Plant viruses*, **2**. Pathology. CRC, Boca Raton, FL.
- LÓPEZ-ABELLA, D.; BRADLEY, R. H. E. y HARRIS, K. F., 1988: Correlation between stylet paths made during superficial probing and the ability of aphids to transmit nonpersistent viruses, pp. 251-285. *En* K. F. Harris [ed.], *Advances in disease vector research*, **5**. Springer, New York.
- LOWERY, D. T.; SEARS, M. K. y HAMMER, C. S., 1990: Control of turnip mosaic virus of rutabaga with applications of oil, whitewash, and insecticides. *J. Econ. Entomol.* **83**: 2352-2356.
- MARTÍN, B., COLLAR, J. L.; TJALLINGII, W. F. y FERERES, A., 1997: Intracellular salivation and ingestion by aphids causes the inoculation and acquisition of non-persistently transmitted plant viruses. *J. Gen. Virol.*, **78**: 2701-2705.
- MATTHEWS, R. E. F., 1991: *Plant virology*, 3rd ed. Academic, San Diego, CA.
- MCLEAN, D. L. y KINSEY, M. G., 1964: A technique for electronically recording aphid ingestion and salivation. *Nature* (Lond.) **202**: 1358-1359.
- PÉREZ, P.; COLLAR, J. L.; AVILLA, C.; DUQUE, M. y FERERES, A., 1995: Estimation of vector propensity of potato virus Y in open-field pepper crops of Central Spain. *J. Econ. Entomol.* **88**: 986-991.
- POWELL, G., 1991: Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: consequences for the transmission of two potyviruses. *Ann. Appl. Biol.* **119**: 313-321.
- POWELL, G., 1993: The effect of pre-acquisition starvation on aphid transmission of potyviruses during observed and electrically recorded stylet penetrations. *Entomol. Exp. Appl.* **66**: 255-260.
- POWELL, G.; HARRINGTON, R. y SPILLER, N. J., 1992: Stylet activities and potato virus Y vector efficiencies by the aphids *Brachycaudus helichrysi* and *Drepanosiphum platanoidis*. *Entomol. Exp. Appl.* **62**: 293-300.
- POWELL, G.; PIRONE, T. P. y HARDIE, J., 1995: Aphid stylet activities during potyvirus acquisition from plants and *in vitro* system that correlate with subsequent transmission. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**: 411-420.
- RACCAH, B., 1986: Nonpersistent viruses: epidemiology and control. *Adv. Virus Res.* **31**: 387-430.
- TJALLINGII, W. F., 1978: Electronic recording of penetration behavior by aphids. *Entomol. Exp. Appl.* **24**: 521-530.
- TJALLINGII, W. F., 1990: Continuous recording of stylet penetration activities by aphids, pp. 89-99. *En* R. K. Campbell y R. D. Eikenbary [eds.], *Aphid-plant genotype interactions*. Elsevier, Amsterdam.
- TJALLINGII, W. F. y HOGEN ESCH, T. H., 1993: Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiol. Entomol.* **18**: 317-328.
- WATSON, M. A., 1938: Further studies on the relationship between *Hyosciamus virus 3* and the aphid *Myzus persicae* (Sulz.) with special reference to the effects of fasting. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B.* **125**: 144-170.

(Recepción: 26 enero 1998)

(Aceptación: 16 junio 1998)

