

## **VIROSIS DE LA BORRAJA. SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A VIRUS EN INOCULACIÓN ARTIFICIAL**

**Marisol Luis Arteaga**  
**J.M<sup>a</sup> Álvarez Álvarez**  
Servicio de Investigación  
Agroalimentaria D.G.A.  
Apartado 727  
50080 ZARAGOZA

### **RESUMEN**

Al igual que otros cultivos hortícolas, la borraja presenta enfermedades de etiología viral. Hasta ahora han sido identificados el mosaico del pepino (CMV) y el virus de las venas amarillas del trébol (CYVV), asociados a virosis en infección natural.

Con el fin de conocer el comportamiento de la especie frente a otros virus causantes de enfermedades en especies hortícolas, y su papel potencial en la epidemiología de los mismos, se inocularon plantas de borraja, de forma mecánica en condiciones controladas, con aislados de varios virus. Se ha verificado la susceptibilidad a los virus: mosaico del tomate (ToMV) y mosaico de la alfalfa (AMV), mostrando en ambos casos síntomas de mosaico, y a moteado suave del pimiento (PMMV), marchitez del haba (BBWV) y mosaico de la lechuga (LMV), con infección latente. Los virus: manchas bronceadas del tomate (TSWV), mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) y virus Y de la patata (PVY) no produjeron infección sistémica en borraja.

### **SUMMARY**

#### **VIRUS DISEASES IN BORAGE. VIRUS SUSCEPTIBILITY IN ARTIFICIAL INOCULATION**

As other vegetable crops borage (*Borago officinalis* L.) is susceptible to some diseases of viral etiology. Untill now two virus have been associated to some virus-like symptoms under natural infection, namely cucumber mosaic virus (CMV) and clover yellow vein virus (CYVV).

In order to assess the species behaviour when inoculated with other viruses causing diseases on other vegetable crops, and the potential role it plays in virus epidemiology, borage plants were inoculated with different virus isolates. Susceptibility to tomato mosaic virus (ToMV) and alfalfa mosaic virus (AMV) was assesed, borage plants showing mosaic symptoms. The species appeared to be also susceptible to pepper mild mottle virus (PMMV), broad bean wilt virus (BBWV) and lettuce mosaic virus (LMV) showing latent infection. Tomato spotted wilt virus (TSWV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) and potato virus Y (PVY) did not produce any systemic reaction when artificially inoculated into borage.

## Introducción

La borraja (*Borago officinalis* L.) es un cultivo hortícola característico del Valle medio del Ebro, donde se localiza hasta el 90% de la superficie cultivada de esta especie en toda España, y que COTRINA (1991) cifra en 500 ha, la mayoría de ellas en la provincia de Zaragoza.

En los últimos años ha alcanzado un desarrollo considerable el cultivo de esta especie en ciclo de invierno-primavera bajo invernadero, pudiendo decirse que es un cultivo básico dentro de las alternativas en los invernaderos de Aragón (Prol, 1992 a y b). A esta intensificación del cultivo es previsible que corresponda una agudización de sus problemas, en especial de los patológicos, y en este sentido hay que citar la identificación del virus del mosaico del pepino (CMV) como causante de mosaico, deformación y asimetría en hojas así como reducción del crecimiento (LUIS ARTEAGA *et al.*, 1988). Más recientemente se ha identificado al virus de las venas amarillas del trébol (CYVV) como causante de síntomas del tipo de mosaico severo y deformación en hojas (LUIS ARTEAGA *et al.*, 1996).

Dado que, como se ha dicho, la borraja forma parte importante de las rotaciones de cultivos y que otros cultivos hortícolas que intervienen en estas rotaciones presentan enfermedades de etiología viral, en ocasiones con niveles de infección muy elevados, consideramos de interés conocer si la borraja es susceptible a la infección por otros virus de especies hortícolas y también si de forma natural es infectada por virus específicos o comunes con otros cultivos, pudiendo intervenir en el ciclo epidemiológico de los mismos.

Por ello, se hicieron observaciones en cultivos comerciales y experimentales, con

el fin de determinar la presencia de virosis y su etiología, y se llevaron a cabo una serie de inoculaciones artificiales con aislados españoles de virus procedentes de otras especies hortícolas. Los resultados obtenidos se resumen a continuación.

## Material y métodos

### a) Prospección de virosis

Durante 1993 y 1994 se hicieron observaciones en cultivos experimentales y comerciales.

En 1993 se observó la sintomatología en una parcela experimental cultivada en primavera al aire libre, en el Servicio de Investigación Agroalimentaria (SIA) (Montañana - Zaragoza), y se recogieron muestras para verificar la posible etiología viral, sobre plantas aparentemente sanas y con síntomas típicos o dudosos de virosis. Se recogieron un total de 16 muestras, siete tomadas al azar entre las plantas aparentemente sanas, tres sobre plantas con mosaico dudoso (decoloraciones en hojas apicales) y seis sobre plantas con síntomas característicos de virosis.

También se analizaron muestras procedentes de plantas de un cultivo de verano para obtención de semilla, ubicado en Valencia, de plantas nacidas espontáneamente en otoño en el SIA a partir de semillas de las plantas del cultivo de primavera y de un invernadero comercial ubicado en Montañana (Zaragoza) en el que algunas plantas presentaban posibles síntomas de virosis.

En 1994 se realizaron observaciones de sintomatología y recogida de muestras en cultivos experimentales situados al aire

CUADRO 1  
 RELACIÓN DE ESPECIES VEGETALES Y SÍNTOMAS (LOCALES Y SISTÉMICOS)  
 OBTENIDOS EN LAS INOCULACIONES A PARTIR DE PLANTAS DE BORRAJA,  
 CON SÍNTOMAS DE TIPO VIRAL, PROCEDENTES DE UNA PARCELA  
 EXPERIMENTAL CULTIVADA EN 1993  
 SYMPTOMS (LOCAL AND SYSTEMIC) SHOWN BY DIFFERENT PLANT SPECIES  
 AFTER INOCULATIONS WITH LEAF SAP FROM BORAGE PLANTS FROM AN  
 EXPERIMENTAL PLOT SHOWING VIRUS-LIKE SYMPTOMS IN 1993

Familia Especie	Reacción local	Reacción sistémica
Aizoaceae		
<i>Tetragonia expansa</i> Murr.	llc	0
Amaranthaceae		
<i>Gomphrena globosa</i> L.	0	0
Apocinaceae		
<i>Vinca rosea</i> L.	0	0
Boraginaceae		
<i>Borago officinalis</i> L.	0	Mo
Compositae		
<i>Lactuca sativa</i> L. Kwick	0	0
Cucurbitaceae		
<i>Cucumis melo</i> L. Galia	0	0
<i>C. sativus</i> L. Marketer	0	0
<i>Cucurbita pepo</i> L. F <sub>1</sub> Diamante	0	0
Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn	lln	Sn
<i>C. quinoa</i> Willd	lln	lln
Labiatae		
<i>Ocimum basilicum</i> L.	0	0
Leguminosae		
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. Pinto	lln	Mo
<i>Vicia faba</i> L.	0	Mo
<i>Vigna unguiculata</i> L. (Walp)	0	0
Solanaceae		
<i>Capsicum annuum</i> L. Doux des Landes	0	0
<i>C. annuum</i> L. Yolo Wonder	0	0
<i>Datura stramonium</i> L.	0	0
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	0	0
<i>N. megalosiphon</i> Herck & Muell	0	0
<i>N. tabacum</i> L. Paraguay	0	0
Samsun	Rsn	0
Xanthi nc	Rsn	0
<i>N. clevelandii</i> Gray	llc-n	Mo
<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	0	0
<i>Physalis floridana</i> Rybd.	0	0

c = clorótico

Rs = manchas anulares

ll = lesiones locales

S = manchas

Mo = mosaico

0 = sin reacción

n = necrótico

libre (SIA) y en invernadero (SIA y Escuela de Capacitación Agraria de Movera-Zaragoza) y en un cultivo comercial en invernadero (Montañana). Se estudiaron un total de 7 muestras. También se analizó una muestra procedente de un invernadero comercial de Zaragoza.

El diagnóstico se llevó a cabo mediante transmisión por inoculación mecánica a especies indicadoras, cultivadas en invernadero de ambiente controlado (Cuadro 1), y mediante análisis serológicos.

### **b) Comportamiento de la borraja en inoculación artificial**

Se utilizaron aislados de los siguientes virus: mosaico de la alfalfa (AMV), marchitez del haba (BBWV), CMV, mosaico de la lechuga (LMV), moteado suave del pimientito (PMMV), virus Y de la patata (PVY), mosaico del tomate (ToMV), manchas bronceadas del tomate (TSWV) y mosaico amarillo del calabacín (ZYMV). La relación de aislados figura en el Cuadro 2. Previamente a su utilización, los aislados virales fueron multiplicados en especies con reacción sistémica, las cuales sirvieron como fuente de inóculo.

En las inoculaciones, además de borraja, se incluyó la gama de especies indicadoras específica para cada virus (Cuadro 3) con el fin de verificar su identidad y detectar posibles contaminaciones.

### **c) Preparación del inóculo, inoculación y observación de síntomas**

Todas las inoculaciones artificiales, tanto para detección de virus como para estudiar la reacción de la borraja a aislados de virus conocidos, se hicieron de forma mecánica

utilizando extractos vegetales a dilución 1/5. Se prepararon triturando el tejido foliar en una solución 0.03M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  conteniendo 0,2% de dietilditiocarbonato de sodio. Se utilizó carborundo como abrasivo y carbón vegetal activado como adsorbente contra sustancias inhibidoras de infección, ambos a razón de 75 mg/ml.

A partir del tercer día de la inoculación, se hicieron observaciones cada 3-4 días para verificar la aparición de reacciones locales y/o sistémicas en las plantas inoculadas. Tres semanas después de la inoculación se hicieron retroinoculaciones a partir de las plantas de borraja inoculadas, para verificar la existencia de infección latente y/o la identidad del virus implicado, utilizando la gama de especies indicadoras específica para cada virus.

## **Resultados y discusión**

### **a) Sintomatología**

En la parcela experimental cultivada al aire libre en 1993 en el SIA, aparecieron plantas distribuidas por toda la parcela que mostraban mosaicos foliares severos, con áreas de color verde oscuro, verde claro y marrón, reducción del tamaño, deformación y asimetría del limbo (Figura 1). Esta sintomatología era diferente de la observada y descrita en un trabajo previo como causada por CMV (LUIS ARTEAGA *et al*, 1988). Además, algunas plantas mostraban alteraciones del color en las hojas apicales.

En el cultivo para semilla algunas plantas mostraron crecimiento escaso con aspecto achaparrado, las hojas deformes, rizadas, con los nervios encogidos y los limbos asimétricos.

CUADRO 2  
 RELACIÓN DE VIRUS, Y AISLADOS DE CADA UNO DE ELLOS, UTILIZADOS EN INOCULACIONES ARTIFICIALES DE PLANTAS DE BORRAJA. N° DE PLANTAS INOCULADAS, N° DE PLANTAS CON SÍNTOMAS Y N° DE PLANTAS CON INFECCIÓN LATENTE  
*VIRUSES AND VIRUS ISOLATES, USED IN ARTIFICIAL INOCULATIONS OF BORRAGE PLANTS. N° OF INOCULATED PLANTS, N° OF SYMPTOMATIC PLANTS AND N° OF PLANTS WITH LATENT INFECTION*

Virus	Aislado	N.º Plantas inoculadas	N.º Plantas con síntomas	Infección latente (n.º plantas)
AMV	T-4-92	5	3 Mo Sy	+
	T-6-92	5	5 Mo Sy	+
	T-9-92	5	5 Mo Sy	+
BBWV	P-26-90	8	0	+(4)
	P-24-91	7	0	+(3)
	P-26-93	4	0	+(1)
	P-25-95	8	0	+(5)
	P-33-95	8	0	+(4)
CMV	T-14-91	6	5 Mo DF	+
	Bo-17-93	10	8 Mo DF	+
	Bo-19-93	6	4 Mo DF	+
	Bo-8-94	4	4 Mo DF	+
LMV	L-1-92	16	0	+(16)
PMMV	P-3-90	18	0	+(18)
PVY	P-62-81	12	0	-(12)
	P-27-86	2	0	-(2)
	P-22-88	6	0	-(6)
	T-7-88	2	0	-(2)
ToMV	T-17-90	29	29 Mo grave	+
TSWV	P-85-90	6	0	-(6)
	T-14-91	2	0	-(2)
ZYMV	C-3-86	6	0	-(6)

Mo= mosaico  
 DF= deformación foliar  
 S= manchas

y= amarillas  
 += Virus detectado por retroinoculación  
 -= Virus no detectado por retroinoculación

Entre las plantas espontáneas crecidas en otoño, en las proximidades de la parcela experimental, una de ellas mostró las hojas apicales con los bordes enrollados hacia arriba y hacia adentro, con reducción del tamaño del limbo y mosaico (Figura 2).

En 1994 no se observaron síntomas claros de virosis ni similares a los del año anterior ni atribuibles a CMV. Únicamente deformaciones en hojas apicales y manchas de color verde claro-verde oscuro con apariencia de mosaico poco evidente.



Figura 1. Síntomas observados sobre plantas de borraja en una parcela experimental durante la primavera de 1993. Mosaico, deformación y reducción del crecimiento en hojas  
*Symptoms on borage plants from an experimental plot in the spring 1993. Mosaic, deformation and growth reduction of leaves*



Figura 2. Síntomas en una planta de borraja espontánea. Planta achaparrada con enrollamiento de los bordes de las hojas y mosaico suave  
*Symptoms on a spontaneous grown borage plant. Stunting, rolling of leaf margins, and mild mosaic*



## b) Detección e identificación de virus

En las muestras recogidas en la parcela experimental cultivada al aire libre en 1993 se obtuvieron los siguientes resultados. Las inoculaciones realizadas a partir de las muestras tomadas sobre plantas aparentemente sanas (3 muestras), y sobre plantas con alteraciones suaves del color en hojas apicales (7 muestras), no produjeron reacción alguna en las especies indicadoras inoculadas. A partir de las plantas que mostraron síntomas típicos de virosis (Figura 1) se obtuvieron reacciones en la gama de especies indicadoras utilizada y se reprodujeron sobre plantas de borraja síntomas similares a los de las plantas del campo (Figura 3). Los resultados obtenidos están resumidos en el Cuadro 1 y son diferentes a los que producen otros virus de especies hortícolas manejados previamente en nuestro laboratorio (PVY, PMMV, ToMV, CMV, AMV, BBWV, LMV, ZYMV, WMV-2, TSWV). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización biológica sobre especies indicadoras (Cuadro 1), la transmisión experimental por el áfido *Myzus persicae* por el modo no-persistente y la comparación de las secuencias del gen de la proteína de la cápsida y del extremo 3' del ARN viral con las secuencias de otros virus del grupo Potyvirus, el virus implicado ha sido identificado como un aislado del virus de las venas amarillas del trébol (clover yellow vein virus - CYVV) (LUIS ARTEAGA *et al.*, 1996), que no había sido señalado con anterioridad a dicha fecha en España, ni en borraja ni en otras especies.

Las muestras procedentes del cultivo para semilla y de la planta espontánea produjeron las reacciones características del CMV, que aparecen resumidas en el Cuadro 3, y en ambos casos se obtuvieron síntomas sistémicos en las plantas de borraja inclui-

das en la gama de especies indicadoras (Figura 4).

En los análisis realizados durante 1994 no hubo reacción sobre las especies indicadoras en ninguna de las 7 muestras procedentes de cultivos experimentales y comerciales de Montañana y Movera, las cuales no presentaban síntomas característicos de virosis, sino únicamente dudosos; sóloamente una muestra procedente de un invernadero comercial de Zaragoza produjo reacciones atribuibles a CMV.

## c) Comportamiento frente a virus inoculados artificialmente

En el Cuadro 2 se resumen los resultados obtenidos en las inoculaciones mecánicas de plantas de borraja con varios aislados de diferentes virus.

Entre los nueve virus utilizados, tres de ellos (AMV, CMV y ToMV) produjeron infecciones sistémicas con síntomas netos en las plantas, muy evidentes en el caso de ToMV y CMV y suaves en el caso de AMV (Figuras 4 y 5). En los tres casos, el virus fue recuperado mediante retroinoculación a partir de las plantas de borraja. Los síntomas de mosaico y deformación foliar producidos por ToMV y CMV aparecieron a los 10-15 días de la inoculación y permanecieron visibles sobre todas las hojas de las plantas, mientras que las plantas inoculadas con AMV mostraron mosaico sistémico en forma de manchas de color amarillo vivo, típicas de dicho virus en otras especies sensibles, en las hojas desarrolladas durante 2-3 semanas a partir de la inoculación, y cesaron de aparecer en las hojas desarrolladas posteriormente.

BBWV, LMV y PMMV no produjeron síntomas visibles en las plantas inoculadas,



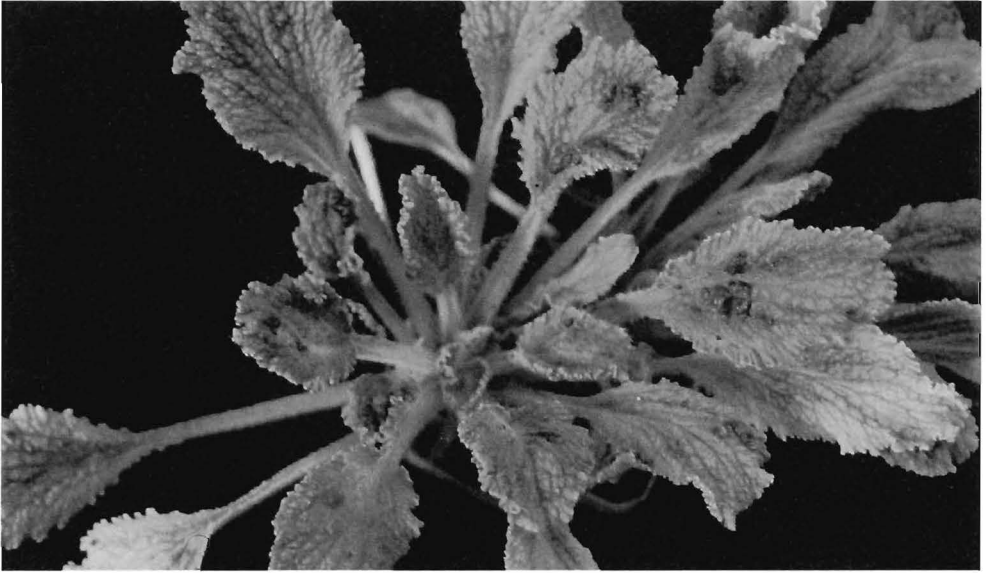


Figura 3. Síntomas obtenidos en plantas de borraja por inoculación artificial con extractos de las plantas enfermas en la primavera de 1993

*Symptoms on borage plants inoculated with leaf sap from diseased plants in the spring 1993*



Figura 4. Síntomas sistémicos obtenidos en plantas de borraja inoculadas con aislados de CMV

*Systemic symptoms on borage plants experimentally inoculated with CMV isolates*

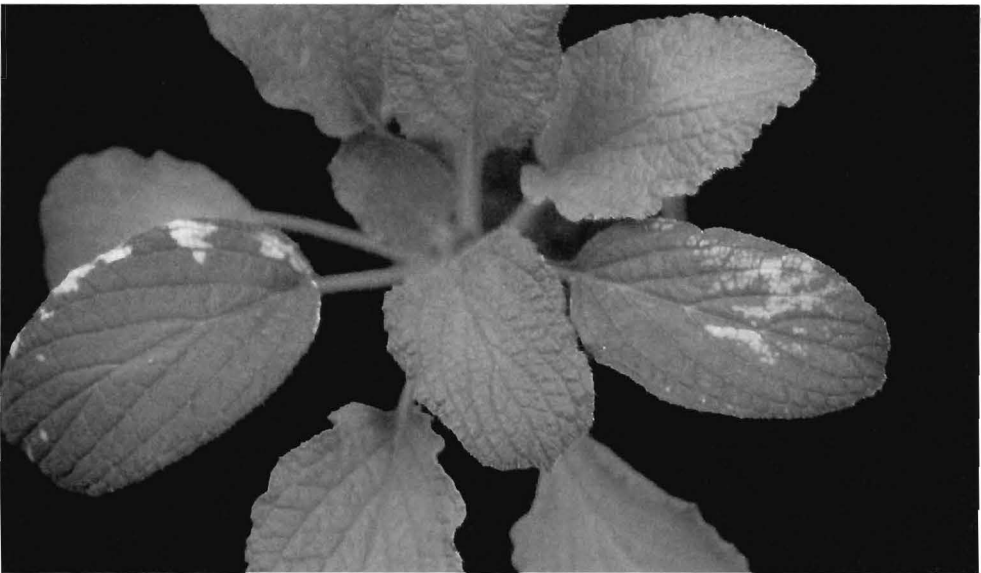
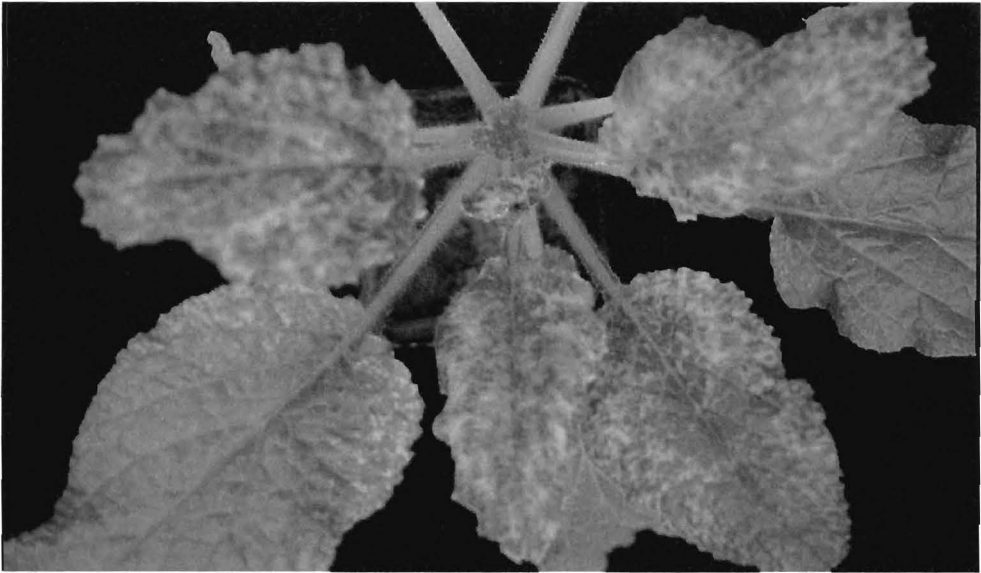


Figura 5. Síntomas sistémicos obtenidos en plantas de borraja inoculadas artificialmente con aislados del virus del mosaico del tomate (A) y del virus del mosaico de la alfalfa (B)  
*Sistemic symptoms on borage plants that have been artificially inoculated with tomato mosaic virus (A) and alfalfa mosaic virus (B) isolates*

pero los virus fueron recuperados por retroinoculación a partir de todas o la mayoría de las plantas de borraja inoculadas, dependiendo del virus (Cuadro 2).

En las inoculaciones con PVY, TSWV y ZYMV no se obtuvieron síntomas sobre las plantas de borraja ni fueron recuperados los virus en las retroinoculaciones realizadas, por lo que aparentemente, al menos con el método utilizado, no son capaces de infectar borraja.

El Cuadro 3 recoge la relación de especies indicadoras utilizadas en las inoculaciones artificiales, incluida la borraja, y las reacciones mostradas por las mismas con los virus utilizados.

### Conclusiones

La planta de borraja, en las condiciones de cultivo observadas, presenta cierta tendencia a mostrar manchas y decoloraciones en tonos verde claro-verde oscuro, fundamentalmente en las hojas apicales, que tienden a desaparecer a medida que éstas crecen y que pueden ser atribuidas erróneamente a virosis.

Los virus CMV y CYVV han sido encontrados en la naturaleza asociados a enfermedades en borraja.

Los virus ToMV y AMV, en inoculación artificial, son capaces de infectar de forma

sistémica a borraja; ToMV produce síntomas graves y AMV síntomas suaves.

Los virus PMMV, BBWV y LMV pueden llegar a infectar la borraja de forma latente (sin síntomas aparentes, pero el virus se recupera por retroinoculación).

Los virus PVY, TSWV y ZYMV no parecen ser capaces de infectar la borraja de forma sistémica.

### Bibliografía

- COTRINA F., 1991. Campos de ensayo sobre marcos de plantación en borraja. Surcos de Aragón, 31, 11-13.
- LUIS ARTEAGA M., RODRÍGUEZ CEREZO E., MAISTRO C., GARCÍA-ARENAL F., 1988. Detection and characterization of an isolate of cucumber mosaic virus (CMV) infecting borage (*Borago officinalis*) in Spain. Plant Disease, 72, 265-267.
- LUIS ARTEAGA M., GARCÍA-ARENAL F., RODRÍGUEZ CEREZO E., 1996. Characterization of a strain of clover yellow vein potyvirus infecting borage (*Borago officinalis* L.) in Spain. Plant Pathology, 45, 38-44.
- PROL J.M., 1992a. La horticultura de invernadero en Aragón (I). Surcos de Aragón, 34, 10-21.
- PROL J.M., 1992b. La horticultura de invernadero en Aragón (II). Surcos de Aragón, 35, 28-33.
- (Aceptado para publicación el 21 de junio de 1996)