

**N. Capote, C. Monzó, A. Urbaneja, J. Pérez-Panadés, E. Carbonell,
M. Ravelonandro, R. Scorza, M. Cambra**

**EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DEL CULTIVO EN CAMPO
DE CIRUELOS EUROPEOS TRANSGÉNICOS SENSIBLES
Y RESISTENTES A *PLUM POX VIRUS***

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **103** N.º 3 (156-167), 2007

Evaluación del riesgo ambiental del cultivo en campo de ciruelos europeos transgénicos sensibles y resistentes a *Plum pox virus*

N. Capote*, C. Monzó*, A. Urbaneja*, J. Pérez-Panadés*, E. Carbonell*, M. Ravelonandro**, R. Scorza***, M. Cambra*

* Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, IVIA, Valencia, España

** Institut de Biologie Vegetale et Moleculaire, INRA, Bordeaux, Francia

*** USDA-ARS Appalachian Fruit Research Station, Kearneysville, West Virginia, EEUU

Resumen

El impacto ambiental de la liberación al campo de ciruelos europeos (*Prunus domestica* L.) transgénicos portadores del gen de la proteína de la cápsida (CP) de *Plum pox virus* (PPV) se ha evaluado durante un periodo de ocho años, en una finca experimental de Liria, Valencia, y los resultados obtenidos se revisan y discuten en este trabajo. La variabilidad molecular de poblaciones de PPV que infectan ciruelos transgénicos se comparó con la de poblaciones de PPV que infectan ciruelos no transgénicos, así como el número y las especies de pulgones (vectores de transmisión del virus) y otros artrópodos que visitaron los dos tipos de árboles del campo experimental. Además, se estudió la posibilidad de que en los ciruelos transgénicos emergieran virus recombinantes (entre el ARNm del transgén y el ARN de un virus infectivo) con propiedades biológicas alteradas y potencialmente peligrosas. Para los ensayos se utilizaron cinco líneas transgénicas de ciruelo europeo (la línea C5 'HoneySweet' resistente a PPV y las líneas C4, C6, PT6 y PT23, susceptibles a PPV) y ciruelos europeos y japoneses (*P. salicina* Lind) no transgénicos. No se detectaron diferencias entre la variabilidad de las poblaciones de PPV presentes en ciruelos transgénicos y no transgénicos ni en el número y especies de pulgones y otros artrópodos que visitaron ciruelos transgénicos y convencionales. Tampoco se detectaron virus recombinantes viables en las plantas transgénicas después de ocho años de exposición de las mismas a la infección natural por PPV. Los datos indican que el cultivo en campo de ciruelos europeos transgénicos en condiciones mediterráneas no supone ningún riesgo ambiental, en términos de los parámetros estudiados, más allá del ocasionado por el cultivo de ciruelos convencionales.

Palabras clave: *Prunus domestica* L. transgénicos, PPV, evaluación riesgos, poblaciones de virus y artrópodos.

Summary

Risk assessment of the field release of transgenic European plums susceptible and resistant to *Plum pox virus*

The environmental impact of the field release of transgenic European plums (*Prunus domestica* L.) carrying the coat protein (CP) gene of *Plum pox virus* (PPV) was assessed in Valencia over an eight-year experimental period. The obtained results are reviewed and discussed in this manuscript. The molecular variability of PPV populations present in transgenic vs. non-transgenic plums was compared, and total numbers and species of visitor aphids (PPV transmission vectors) and other arthropods that were found on transgenic and conventional plums were estimated. Additionally, the possibility of recombination between the transcripts derived from the transgene and the infecting viral RNA was tested. Five different *P. domestica* transgenic lines (the PPV-resistant C5 'HoneySweet' line and the PPV-susceptible C4, C6, PT-6 and PT-23 lines) and non-transgenic *P. domestica* and *P. salicina* Lind trees, were

tested. No differences in terms of diversity of PPV populations and numbers of aphids and other arthropod species that visited the trees were detected between transgenic and non-transgenic plums. No recombination between the transgene transcripts and the incoming viral RNA was detected over an eight-year period of exposure to natural PPV infection in the field. The overall data indicate that the growth of PPV-CP transgenic European plums under Mediterranean conditions does not represent an environmental risk, in terms of the parameters studied, beyond the cultivation of conventional plum trees.

Key words: transgenic *Prunus domestica* L., PPV, risk assessment, virus and arthropod populations.

Introducción

En este trabajo se revisan, divulgan y discuten resultados experimentales sobre la evaluación de los riesgos (otros que el flujo genético del transgén por polen) del cultivo de ciruelos europeos transgénicos portadores del gen de la proteína de la cápsida del virus de la sharka (*Plum pox virus*, PPV). Los experimentos se llevaron a cabo en España entre los años 1997 y 2005. La intención de este estudio fue la de evaluar la influencia que tienen los ciruelos transgénicos sobre la dinámica y diversidad de poblaciones virales, concretamente de PPV, de pulgones vectores de transmisión del virus y de otros artrópodos que pueden ejercer control biológico o constituir plaga. Algunos resultados han sido previamente publicados, aunque se incluyen resultados nuevos relacionados con el estudio de la diversidad de artrópodos encontrados en plantas transgénicas y convencionales.

Como fruto de este y otros trabajos llevados a cabo en otros países, se ha autorizado en EEUU el cultivo, comercialización y uso con fines de mejora de la línea transgénica de ciruelo europeo C5 (denominada 'HoneySweet') autocompatible, resistente al virus de la sharka y productora de frutos de interés comercial por su calidad.

La sharka como enfermedad de frutales de hueso

La sharka o viruela, está considerada como la enfermedad más grave de los frutales de hueso en términos de impacto agronómico e importancia económica (Dunez and Sutic, 1988; Németh, 1994). Afecta principalmente a albaricoquero, ciruelo y melocotonero produciendo pérdida de calidad y caída prematura de los frutos. Además, complica enormemente la producción en viveros de plantas libres de virus. El agente causante es un virus de ARN perteneciente al género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*, denominado *Plum pox virus* (PPV) o virus de la sharka. El coste asociado a la enfermedad de la sharka y su manejo a nivel mundial desde los años 1970s se estima que supera los 10.000 millones de euros (Cambra et al., 2006a).

PPV se puede transmitir mediante injerto o de forma no persistente a través de pulgones. El movimiento ilegal de material vegetal infectado es la principal vía de dispersión del virus a grandes distancias. Una vez instalado en una plantación, los pulgones pueden transmitirlo a cortas distancias, de árbol a árbol o incluso de plantación a plantación, simplemente al efectuar picaduras de prueba.

Actualmente se han descrito seis tipos de PPV que difieren en sus características epi-

demiológicas, serológicas y genéticas: PPV-D o Dideron, que afecta principalmente a albaricoquero (*Prunus armeniaca*), ciruelo japonés (*P. salicina*), ciruelo europeo (*P. domestica*) y apenas afecta a melocotonero (*P. persicae*); PPV-M o Marcus muy agresivo en melocotonero, ciruelo y albaricoquero, y que se transmite con más eficacia a través de pulgón; PPV-EA o El Amar, aislados localizados geográficamente en Egipto; PPV-C o Cherry, que afecta a cerezo dulce (*P. avium*) y guindo (*P. cerasus*); PPV-W o Winona, un aislado inusual descrito en Canadá que infecta a ciruelo europeo; y PPV-Rec o recombinante entre D y M, de epidemiología similar al tipo D (Candresse y Cambra, 2006; James y Glasa, 2006).

PPV se detectó en España por primera vez en 1984 en ciruelo japonés (Llácer y Cambra, 1985), un nuevo hospedador natural de PPV no descrito hasta entonces, y de ahí se propagó a albaricoquero y ciruelo europeo en las zonas de producción temprana a lo largo de toda la costa mediterránea (Cambra et al., 2006b). La sharka tipo D o Dideron es la única presente actualmente en España. Los programas de erradicación voluntaria no han sido suficientes para controlar la enfermedad, debido a que PPV-D apenas afecta a melocotonero, no provoca serios problemas en ciruelo japonés (que actúa como reservorio de la enfermedad) y además el arranque de todos los árboles infectados no es obligatorio. Unido a ello, la elevada incidencia de pulgones y la alta eficacia de *Aphis spiraecola* Patch y otras especies en transmitir la enfermedad explica la rápida dispersión de PPV en la mayoría de especies de *Prunus* en toda España (Cambra et al., 2006b). Los aislados virales pertenecientes al tipo D, presentes en nuestro país no se dispersan entre melocotoneros ni desde otras especies de *Prunus* a ellos. Sin embargo, los aislados de tipo Marcus siguen una pauta epidemiológica muy diferente,

ya que se dispersan muy fácilmente entre cualquier tipo de melocotonero, albaricoquero o ciruelo. La introducción de aislados de PPV tipo M en España causaría graves daños en la producción de melocotonero (Capote et al., 2005b). Más aún, cuando estudios de protección cruzada han demostrado que la infección de un árbol con un aislado tipo D no protege frente a la infección con M, sino que por el contrario, los aislados M tienden a desplazar a los aislados D en un árbol doblemente infectado (Capote et al., 2006). La diligente y acertada erradicación de los focos de PPV-M detectados en Aragón (Cambra et al., 2004), así como la permanente vigilancia de los Servicios de Sanidad Vegetal de las distintas Comunidades Autónomas han conseguido que los aislados agresivos del virus de la sharka no se estén dispersando actualmente en nuestro país.

El uso de plantas transgénicas como estrategia de control. Ventajas e inconvenientes

En la actualidad existen programas de mejora genética encaminados a conseguir variedades del género *Prunus* resistentes al virus de la sharka. Sin embargo, la naturaleza poligénica de la resistencia y el extenso periodo de tiempo necesario para conseguir una variedad resistente y comercialmente aceptable, han motivado que hasta el momento sólo se dispongan de variedades de albaricoquero resistentes al virus de la sharka (Badenes et al., 2006; Karayiannis et al., 2006). La obtención de plantas transgénicas que expresan un gen viral puede considerarse una estrategia de control alternativa o complementaria a programas convencionales de mejora basados en cruzamientos. La ventaja que ofrece la ingeniería genética es la posibilidad de poder introducir directamente en la planta la característica deseada y a

más corto plazo. Sin embargo, una de las principales controversias del cultivo de plantas transgénicas es el desconocimiento sobre los posibles riesgos medioambientales asociados a la liberación al campo de organismos modificados genéticamente, que incluyen: 1) la hipótesis de que los productos de las plantas transgénicas pueden ser peligrosos para el consumo animal y/o humano, 2) el flujo genético vía polen del transgén desde las plantas transgénicas a plantas convencionales de su misma especie, 3) la influencia de las plantas transgénicas sobre la diversidad y dinámica de artrópodos y microorganismos asociados a las plantas y al suelo, y 4) en el caso específico de plantas que portan un gen viral, la posibilidad de recombinación entre los transcritos derivados del transgén y el ARN del virus infectivo. Este fenómeno podría originar teóricamente la aparición de virus recombinantes viables con características distintas y potencialmente peligrosas, como aumento de la patogenicidad o cambio o ampliación de la gama de huéspedes o del vector de transmisión. Por todo ello, es esencial, por sus implicaciones económicas, ecológicas, políticas y sociales, llevar a cabo investigaciones para evaluar el impacto ambiental del cultivo en campo de plantas transgénicas y más aún cuando se trata de plantas leñosas con una permanencia elevada en el campo.

Obtención del ciruelo europeo transgénico "HoneySweet"

Siguiendo la estrategia de control de la resistencia derivada del patógeno (PDR) (Sanford and Johnston, 1985), los Drs. R. Scorza (USDA, EEUU) y M. Ravelonandro (INRA, Francia) obtuvieron plantas transgénicas de ciruelo europeo (*P. domestica* L.) mediante la introducción en las células

vegetales del gen de la proteína de la cápsida (CP) de PPV vía *Agrobacterium tumefaciens* (Scorza et al., 1994). La resistencia a PPV de siete líneas transgénicas denominadas C2, C3, C4, C5, C6, PT6 y PT23 fue evaluada en condiciones de invernadero (Ravelonandro et al., 1997) y en tres plantaciones localizadas en España, Polonia y Rumania (Ravelonandro et al., 2002; Hily et al., 2004; Malinowski et al., 2006). En España, el campo experimental se estableció en 1997 en Liria, Valencia. Filas de ciruelos europeos transgénicos de las líneas C4, C5, C6, PT6 y PT23 (10 árboles por línea transgénica) se plantaron separadas de filas de ciruelos no transgénicos, tanto europeos como japoneses. El seguimiento del campo se llevó a cabo entre los años 1997 y 2005 mediante inspección visual de síntomas y los métodos de diagnóstico oficialmente recomendados por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (OEPP, 2004): ELISA-DASI usando el anticuerpo monoclonal universal 5B-IVIA (Cambra et al., 1994), comercializado en forma de kit por AMR Lab y Real/Durviz (Valencia); e inmunocaptura RT-PCR usando los iniciadores universales P1 y P2 (Wetzel et al., 1992).

La línea transgénica C5 (cv. HoneySweet) autoincompatible demostró ser altamente resistente a la infección natural del virus y a la transmisión de la enfermedad mediante injerto (Ravelonandro et al., 2002; Hily et al., 2004; Malinowski et al., 2006). El resto de las líneas analizadas fue tan sensible a PPV como los ciruelos convencionales usados como control. La resistencia de los ciruelos C5 es debida a un mecanismo de defensa natural de las plantas denominado silenciamiento post-transcripcional (PTGS) (Scorza et al., 2001) en la que están involucrados ARN pequeños de interferencia (siRNA) (Hily et al., 2005) y que conlleva finalmente a la degradación específica del ARN del virus infectivo. El carácter de resistencia se

transmite a la progenie mediante hibridación cruzada (Ravelonandro et al., 1998; Scorza et al., 1998).

El proceso de autorización para el cultivo y comercialización de la variedad de ciruelo europeo transgénica 'HoneySweet' se está llevando a cabo actualmente en EEUU (Scorza et al., 2007). Además de los estudios de resistencia al virus de la sharka desarrollados en invernadero y en campo en distintas zonas ecológicas europeas, en EEUU (USDA-ARS, Kearneysville) se llevaron a cabo análisis de campo para evaluar las características agronómicas del árbol y la calidad de los frutos. La productividad del cultivar HoneySweet injertado sobre *P. marianna* o NemaGuard es buena y la calidad del fruto es excelente, con un peso medio de fruto de 59,5 g y tamaño medio de 4,39 x 5,08 cm. El hueso es libre con una pequeña zona unida al fruto. El contenido medio de azúcar, medido como grados Brix, es de 21-22° (Scorza et al., 2007). La autorización del cultivo de la variedad HoneySweet permitiría no sólo su comercialización como una nueva variedad de ciruela, sino su uso en investigación y mejora para el desarrollo de nuevas variedades y patrones resistentes a PPV. Por otro lado, la aplicación de la tecnología de silenciamiento (PTGS) para la obtención directa de plantas transgénicas resistentes a virus podría aplicarse para el desarrollo de otros cultivares de frutales de hueso (melocotonero, albaricoquero, ciruelo japonés y cerezo) resistentes al virus de la sharka, así como para obtener nuevos portainjertos resistentes.

Riesgos medioambientales del cultivo de plantas transgénicas

Para evaluar el impacto de las plantas transgénicas sobre el medio ambiente se estudió: 1) la diversidad de poblaciones de PPV presentes en plantas transgénicas de ciruelo

europeo (susceptibles a la infección por PPV) comparada con plantas convencionales de ciruelo europeo y japonés, 2) la posible presencia de secuencias virales recombinantes en ciruelos transgénicos, y 3) la diversidad y abundancia de artrópodos (con especial atención a los pulgones, vectores del virus) que visitaron ciruelos transgénicos y no transgénicos. Los ensayos se realizaron desde 1997 hasta 2005 en una parcela experimental localizada en Liria, Valencia, con permisos para la liberación de organismos modificados genéticamente (OMGs) (B/ES/96/16 y B/ES/05/14) concedidos por el Ministerio de Medio Ambiente. Similares análisis de riesgo se realizaron paralelamente en Polonia y Rumanía.

Diversidad de poblaciones de PPV

Para comparar la diversidad de poblaciones de PPV presentes en plantas transgénicas y convencionales en condiciones mediterráneas se definieron artificialmente tres poblaciones: 1) población de aislados de PPV que infecta ciruelos transgénicos del campo experimental (32 aislados), 2) población de PPV presente en ciruelos no transgénicos del campo experimental (24 aislados) y 3) aislados de PPV presentes en ciruelos convencionales de una finca control externa al campo experimental (29 aislados). Se analizó la diversidad genética de los 85 aislados mediante la secuenciación del fragmento más variable del genoma de PPV correspondiente a la región 3' del gen de la ARN replicasa viral (N1b) y la región 5' del gen de la proteína de la cápsida (CP). Todos los aislados fueron del tipo D, confirmándose así los estudios serológicos y moleculares desarrollados en la misma parcela experimental (Capote et al., 2005a). A través de una matriz de distancia genética se determinó que el porcentaje de homología a nivel de ácidos nucleicos entre los distintos aislados analizados variaba entre un 96,9% y un

99,8% y que, por tanto, la variabilidad genética en la región del genoma analizada entre los distintos aislados de PPV era muy baja. Haciendo uso de la comparación entre las secuencias se construyó un árbol filogenético en el que los aislados no se agruparon por origen transgénico o no transgénico, demostrándose de nuevo que todos los aislados de PPV formaban una única población o metapoblación. El análisis de la diversidad en el interior de cada población y entre poblaciones determinó que existía mayor diversidad genética (una medida de la frecuencia de haplotipos de una población) y nucleotídica (una medida de lo diferentes que son los aislados a nivel de la secuencia de nucleótidos) dentro de una misma población que entre ellas. Todos estos análisis no detectaron diferencias moleculares significativas entre los aislados de PPV presentes en plantas transgénicas y no transgénicas y, por tanto, es posible concluir que el carácter transgénico del árbol al que infecta PPV no altera la diversidad genética natural de las poblaciones virales.

Análisis de recombinación

La recombinación es una de las estrategias que siguen los virus de ARN para aumentar su variabilidad. Existen recombinantes naturales de PPV originados a partir de un evento ancestral de recombinación entre aislados del tipo D y M. El primer aislado recombinante de PPV fue descrito por Cervera *et al.* (1993), pero fue considerado un aislado inusual no representativo de la población natural de PPV. Sin embargo, el aumento y desarrollado de análisis para la caracterización de aislados de PPV ha puesto de manifiesto que los aislados recombinantes son más frecuentes de lo que inicialmente se creía en varios países de Europa Central y del Este (Glasa *et al.*, 2002, 2004; James and Glasa, 2006). Estos aislados forman un nuevo grupo o tipo de PPV (PPV-Rec) y comparten un origen ancestral común

(Glasa *et al.*, 2004). Por otro lado, se han aislado virus recombinantes con propiedades biológicas alteradas en plantas transgénicas, pero estos experimentos se realizaron bajo condiciones de presión de selección moderadas o altas para favorecer la emergencia de virus recombinantes (Greene and Allison, 1994, 1996; Wintermantel, 1996; Varrelman *et al.*, 2000). Para poder descartar este riesgo, se analizó la posible presencia de virus recombinantes en las plantas transgénicas del campo experimental. Para ello, se secuenció el gen completo de la proteína de la cápsida de 14 aislados de PPV presentes en las líneas transgénicas C4 (con altos niveles de expresión del transgén y elevados niveles de transcrito en el citoplasma) y PT6 (con niveles moderados de transcrito en el citoplasma). Después de comparar estas secuencias con la secuencia del transgén, no se detectó ninguna señal de recombinación entre los transcritos del transgén y el ARN del PPV infeccioso. Por tanto, se puede concluir que los ciruelos transgénicos que portan el gen CP de PPV no indujeron la aparición de virus recombinantes a niveles detectables después de ocho años de exposición a la infección natural de PPV (Capote *et al.*, 2007). En el caso de los ciruelos C5, la posibilidad de riesgo ambiental por emergencia de virus recombinantes es todavía más reducida, si no nula, ya que esta línea transgénica posee niveles indetectables de transcrito de CP en el citoplasma (una de las características del silenciamiento post-transcripcional) (Scorza *et al.*, 1994 y 2001) y es resistente a la infección por el virus (Ravelo-Andrade *et al.*, 2002; Hily *et al.*, 2004; Malinovsky *et al.*, 2006).

Diversidad y abundancia de poblaciones de pulgones

Las poblaciones de pulgones que visitan una parcela determinada varían a lo largo del año y entre unos años y otros. Generalmente, la abundancia de pulgones se rela-

ciona con la aparición de nuevos brotes y la presencia de temperaturas templadas. Por todo ello, el mes de mayo suele ser el de máxima afluencia de pulgones en parcelas de frutales de hueso en condiciones mediterráneas (Cambra et al., 2006). Para determinar la abundancia y la diversidad de poblaciones de especies de pulgones que visitaron los ciruelos europeos transgénicos y comparadas con la de ciruelos europeos y japoneses convencionales, se capturaron poblaciones de pulgones a lo largo los meses de mayo de dos años consecutivos (2004 y 2005) mediante el método del brote pegajoso (Avinent et al., 1993; Cambra et al., 2000). Este método consiste en aplicar pegamento en forma de aerosol a un número determinado de brotes jóvenes y succulentos de un árbol. Después de 10 días se recolectan los brotes. Los insectos capturados se despegan mediante aguarrás u otro disolvente y se lavan con agua jabonosa. Se seleccionan los pulgones capturados y se preservan en 70% de alcohol para su posterior conteo e identificación bajo una lupa binocular. El mismo día de la recolección se colocan nuevos brotes pegajosos y así se actúa hasta abarcar todo el periodo de muestreo. Mediante este método se analizaron un total de 6.097 pulgones recogidos en mayo 2004 y 2005 de 2 brotes por árbol en 6 ciruelos europeos transgénicos, 6 ciruelos europeos convencionales y 6 ciruelos japoneses convencionales del campo experimental. Los pulgones que más visitaron los árboles del campo experimental pertenecieron a la especie *Aphis spiraecola* Patch (51%) seguida de *A. gossypii* Glover (28%), *Hyalopterus pruni* (Geoffroy), (16,5%), *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach) (1,8%), *A. fabae* Scopoli (1,0%), *A. craccivora* Koch (1,0%), *Myzus persicae* (Sulzer) (0,1%) y otras especies (0,7%). No se detectaron diferencias significativas entre las especies y el número de pulgones que visitaron cirue-

los transgénicos y no transgénicos (europeo y japonés) (Capote et al., 2007).

No todos los pulgones que visitan un árbol son capaces de transmitir PPV. Si un pulgón se alimenta sobre hojas de un árbol infectado con PPV es altamente probable que en su estilete queden retenidas partículas virales y sea capaz de transmitirlo a otro árbol al realizar simplemente picaduras de prueba, antes de alimentarse. Todo ello tiene que suceder en un corto periodo de tiempo (máximo una hora) por tratarse PPV de un virus que se transmite de forma no persistente (Kunze and Krczal, 1971; Labonne et al., 1995). En el mecanismo de adquisición/transmisión del virus participa la proteína viral HC-Pro o "helper component"-proteínasa que establece un puente de interacción reversible entre el estilete del pulgón y la cápsida del virión. El virión queda retenido en el estilete cuando el pulgón succiona y luego es liberado a la célula vegetal cuando el pulgón insaliva, llevándose a cabo la transmisión del virus de una planta a otra. (Pirone and Blanc, 1996; Syller, 2006). Los pulgones portadores de partículas virales se denominan virulíferos. Para conocer si el carácter transgénico de un árbol influye en el número de pulgones virulíferos que lo visitan, se comparó el porcentaje de pulgones virulíferos que aterrizaron en ciruelos transgénicos y no transgénicos en el mes de mayo de dos años consecutivos. La detección del virus en pulgones se realizó mediante PCR a tiempo real usando sondas TaqMan (Olmos et al., 2005). Aproximadamente el 25% de los pulgones que visitaron el campo experimental resultaron ser PPV-virulíferos. La alta incidencia de pulgones y el alto porcentaje de virulíferos fue consistente con la rápida dispersión del virus en el campo experimental (Malinowski et al., 2006) y en otras plantaciones de frutales de hueso de la zona mediterránea (Cambra et al., 2004).

No se detectaron diferencias significativas entre el número de pulgones virulíferos de las especies *A. spiraecola* y *A. gossypii* que visitaron los ciruelos transgénicos y convencionales. Por tanto, las especies de pulgones son potencialmente capaces de adquirir y transmitir PPV en ciruelos transgénicos y no transgénicos con la misma frecuencia, no existiendo preferencias ni interferencias con el carácter transgénico de las plantas (Capote et al., 2007). La única excepción la constituyen los ciruelos C5 que, debido a su probada resistencia, es la única línea transgénica capaz de alterar la epidemiología de la sharka, frenando la dispersión del virus.

Diversidad y abundancia de otros artrópodos

El ecosistema del campo experimental también está compuesto de otros artrópodos que bien pueden ser considerados como plaga o tener o no interés en control biológico. Para conocer si la presencia en el campo de plantas transgénicas alteraba el equilibrio de las poblaciones de artrópodos, se compararon el número y la diversidad de órdenes y familias de artrópodos encontrados en los ciruelos transgénicos y no transgénicos monitoreados del campo experimental. Se capturaron un total de 24.908 artrópodos (sin incluir pulgones) en septiembre 2005 mediante el método del brote pegajoso y fueron preservados en 70% de alcohol, contados e identificados haciendo uso de una lupa binocular. Los artrópodos más abundantes pertenecieron al orden *Diptera* (Familias: *Sciaridae*, *Muscidae* y *Culicidae*) (57,8% del total de artrópodos capturados) seguidos de los órdenes *Psocoptera* (28%), *Hemiptera* (9,4%) (Familias: *Cicadellidae*, *Anthocoridae* y *Miridae*), *Neuroptera* (1,7%) (Familias: *Coniopterygidae* y *Chrysopidae*), *Coleoptera* (Familias: *Coccinellidae* y *Staphylinidae*), *Hymenoptera* (1%) (Familias: *Braconidae*,

Ichneumonidae, *Encyrtidae*, *Eulophidae*, *Cynipoidea*, *Proctotrupoidea*, *Platygastroidea*, *Ceraphronoidea*, *Aphelinidae*, *Agaonidae*, *Pteromalidae*, *Perilampidae*, *Agaonidae*, *Mymaridae*, *Mymarommatoidea*, *Formicidae*, *Vespoidea*, *Apoidea*, *Torymidae*, *Eurytomidae* y *Leucospidae*), *Lepidoptera* (0,3%), *Thysanoptera* (0,2%) y finalmente la clase *Araneae* (0,1%) (Familia *Liniphidae*) (Figura 1). No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la abundancia y diversidad de órdenes y familias de artrópodos encontrados en ciruelos transgénicos comparados con no transgénicos. Las familias de insectos que pueden ejercer un control biológico sobre pulgones u otras plagas visitaron con la misma frecuencia los árboles transgénicos y convencionales. Estos resultados sugieren que la presencia en campo de plantas transgénicas de ciruelo europeo no altera la abundancia y diversidad de las poblaciones de artrópodos. Por tanto, la introducción en las plantas transgénicas de un gen viral, que puede conferirle resistencia al mismo, no alteró la ecología natural de la relación huésped-artrópodos.

Conclusiones

Las evaluaciones realizadas indican que el cultivo en campo de plantas transgénicas de ciruelo europeo no altera la diversidad o dinámica de poblaciones de PPV, pulgones y otros artrópodos ni promueve la aparición de virus recombinantes con propiedades biológicas alteradas. Estos datos apoyan la hipótesis de que el cultivo de ciruelos europeos transgénicos que expresan el gen de la cápsida de PPV no supone un riesgo para el medioambiente más allá del que representa el cultivo habitual de ciruelos convencionales. Además, el carácter de autocompatibilidad de estos ciruelos disminuye considerablemente el riesgo de flujo del transgén

mediante polinización cruzada. Este y otros estudios han ayudado a la autorización del cultivo y comercialización de la línea transgénica C5 en EEUU, dando origen a una nueva variedad de ciruelo europeo denomi-

nada 'HoneySweet'. El carácter de resistencia a PPV de esta nueva variedad le hace idónea para su uso en mejora genética clásica de otros cultivares de ciruelo europeo y de patrones de *Prunus*.

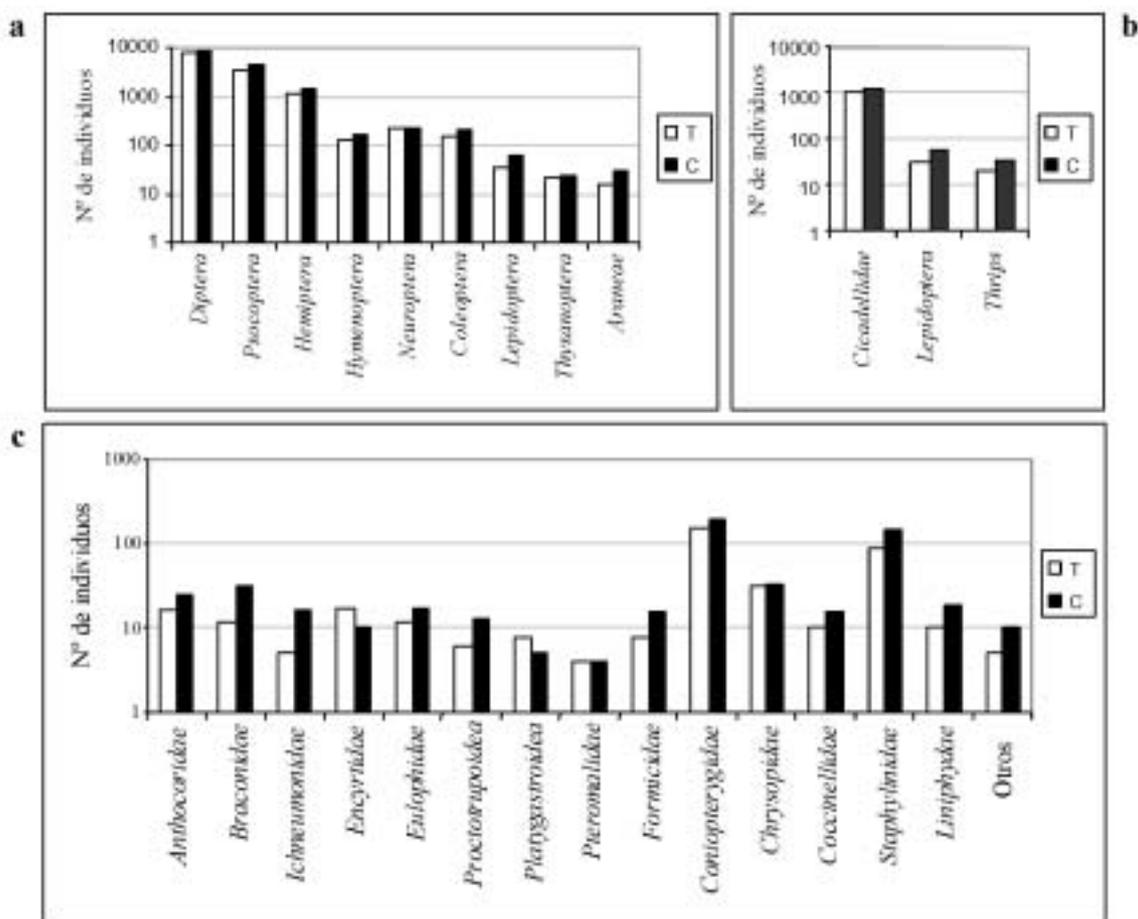


Figura 1. Comparación del número de artrópodos (sin incluir pulgones) de distintos órdenes (a), familias plaga (b), y familias con potencial interés biológico (c) encontrados en ciruelos europeos transgénicos (T) y ciruelos europeos y japoneses convencionales (C) del campo experimental en Septiembre 2005 ($p < 0.05$). Los datos representan el nº de individuos capturados en 15 árboles transgénicos y 15 convencionales (2 brotes / árbol).

Figure 1. Comparison of the number of arthropods (aphids not included) from different orders (a), pest families (b), and biological control families (c) found in transgenic European plums (T) and conventional European and Japanese plums (C) from the experimental orchard in September 2005 ($p < 0.05$). Data represent the number of captured individuals in 15 transgenic trees and 15 conventional trees (2 shoots / tree).

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado en el marco de proyectos de investigación financiados por UE (QLK3-CT-2002-02140), INIA (SC98-060 y RTA03-099) y Ministerio de Educación y Ciencia (RTA05-00190). Los autores agradecen a C. Collado por la identificación de especies de pulgones y a B. Tamargo y J. Micó (Cooperativa Vinícola de Llíria) por asistencia técnica en el campo experimental. Los permisos para la liberación al campo de OMG n^{os} B/ES/96/16 y B/ES/05/14 fueron concedidos por el Ministerio de Medio Ambiente.

Bibliografía

- Avinent L, Hermoso de Mendoza A, Llácer G, 1993. Comparison of sampling methods to evaluate aphid populations (*Homoptera, Aphidinea*) alighting on apricot trees. *Agronomie* 13: 609-613.
- Badenes ML, Moustafa TA, Martínez-Calvo J, Llácer G, 2006. Resistance to sharka trait in a family from selfpollination of 'Lito' apricot cultivar. *Acta Horticulturae* 701: 381-384.
- Cambra M, Asensio M, Gorris MT, Pérez E, Camarasa E, García JA, López-Moya JJ, López-Abella D, Vela C, Sanz A, 1994. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24: 569-577.
- Cambra M, Capote N, Cambra MÁ, Llácer G, Botella, P, López-Quílez A, 2006b. Epidemiology of sharka disease in Spain. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36: 271-275.
- Cambra M, Capote N, Myrta A, Llácer G, 2006a. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36: 202-204.
- Cambra M, Gorris MT, Marroquín C, Román MP, Olmos A, Martínez MC, Hermoso de Mendoza A, López A, Navarro L, 2000. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencia Community of Spain. *Virus Research* 71: 85-95.
- Cambra M, Gorris MT, Mataix E, Asensio M, Martínez MC, López A, Bertolini E, Collado C, Capote N, Hermoso de Mendoza A, 2004. Epidemiology of *Plum pox virus* in Japanese plum in Spain. *Acta Horticulturae* 657: 195-200.
- Cambra MA, Crespo J, Gorris MT, Martínez MC, Olmos A, Capote N, Cambra M, 2004. Detection and eradication of *Plum pox virus* Marcus type in Aragón (Spain). *Acta Horticulturae* 657: 231-235.
- Capote N, Cambra M, 2005. Variability of *Plum pox virus* populations in PPV-resistant transgenic and non-transgenic plums. *Phytopathologia Polonica* 36: 107-113.
- Capote N, Cambra M, Gorris MT, 2005. La enfermedad de la sharka tipo Marcus, una grave enfermedad para el cultivo del melocotonero. *Fruticultura profesional* 152: 89-93.
- Capote N, Gorris MT, Martínez MC, Asensio M, Olmos A, Cambra M, 2006. Interference between D and M types of *Plum pox virus* in Japanese plums assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time RT-PCR. *Phytopathology* 96: 320-325.
- Capote N, Pérez-Panadés J, Monzó C, Carbonell EA, Urbaneja A, Scorza R, Ravelonandro M, Cambra M, 2007. Assessment of the diversity of *Plum pox virus* and aphid populations on transgenic European plums under Mediterranean conditions. *Transgenic Research*, DOI:10.1007/s11248-007-9112-0 (en prensa).
- Cervera MT, Riechmann JL, Martín MT, García JA, 1993. 3'-Terminal sequence of the *Plum pox virus* PS and 06 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *Journal of General Virology* 74: 329-334.
- Dunez J, Sutic D, 1988. *Plum pox virus*. In: Smith, I.M., Dunez, J., Elliot, R.A., Phillips, D.H., Arches, S.A. (Eds.), *European Handbook of Plant Diseases*. Blackwell, London, pp. 44-46.
- Glasa M, Marie-Jeane V, Labonne G, Šubr Z, Kúdela O, Quiot JB 2002. Natural population of recombinant *Plum pox virus* is stable and

- competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 108: 843-853.
- Glasa M, Palkovics L, Komínek P, Labonne G, Pittnerová S, Kúdela O, Candresse T, Šubr Z, 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV group. *Journal of General Virology* 85: 2671-2681.
- Greene AE, Allison FR, 1994. Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* 263: 1423-1425.
- Greene AE, Allison FR, 1996. Deletions in the 3' untranslated region of cowpea chlorotic mottle virus transgene reduce recovery of recombinant viruses in transgenic plants. *Virology* 225: 231-234.
- Hily JM, Scorza R, Malinowski T, Zawadzka B, Ravelonandro M, 2004. Stability of gene silencing-based resistance to *Plum pox virus* in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Research* 13: 427-436.
- James D, Glasa M, 2006. Causal agent of sharka disease: New and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36: 247-250.
- Karayianis I, Mainou A, Stylianidis D, Thonidis T, Karayiannis NI, Tsaftaris A, 2006. Resistant to sharka disease (PPV) apricot hybrids of high quality, selected in Greece. *Acta Horticulturae* 701: 337-340.
- Kunze L, Krczal H, 1971. Transmission of sharka virus by aphids. *Annales de Phytopathologie, H.S.*: 255-260.
- Labonne G, Yvon M, Quiot JB, Avinent L, Llácer G, 1995. Aphids as potential vectors of plum pox virus: Comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae* 386: 207-218.
- Llácer G, Cambra M, 1985. Occurrence of *Plum pox virus* in Japanese plum, a new natural host. *Plant Disease* 70: 173 (Disease Note).
- Malinowski T, Cambra M, Capote N, Zawadzka B, Gorris MT, Scorza R, Ravelonandro M, 2006. Field trials of plum clones transformed with the *Plum pox virus* coat protein (PPV-CP) gene. *Plant Disease* 90: 1012-1018.
- Németh M, 1994. History and importance of plum pox in stone-fruit production. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24: 525-536.
- Olmos A, Bertolini E, Gil M, Cambra M, 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods* 128: 151-155.
- Ravelonandro M, Scorza R, Bachelier JC, Labonne G, Levy L, Damsteegt V, Callahan AM, Dunez J, 1997. Resistance of transgenic *Prunus domestica* to plum pox virus infection. *Plant Disease* 81: 1231-1235.
- Ravelonandro M, Scorza R, Minoiu N, Zagrai I, Platon I, 2002. Field tests of transgenic plums in Romania. *Sănătatea Plantelor* 6: 16-17.
- Ravelonandro M, Scorza R, Renaud R, Salesses G, 1998. Transgenic plums resistant to *Plum pox virus* infection and preliminary results of cross-hybridization. *Acta Horticulturae* 478: 67-71.
- Scorza R, Callahan A, Levy L, Damsteegt V, Ravelonandro M, 1998. Transferring potyvirus coat protein genes through hybridization of transgenic plants to produce *Plum pox virus* resistant plums (*Prunus domestica* L.). *Acta Horticulturae* 472: 421-425.
- Sanford JC, Johnston SA, 1985. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 113: 395-405.
- Scorza R, Callahan A, Levy L, Damsteegt V, Webb K, Ravelonandro M, 2001. Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Research* 10: 201-209.
- Scorza R, Hily JM, Callahan A, Malinowski T, Cambra M, Capote N, Zagrai I, Damsteegt V, Briard P, Ravelonandro M, 2007. Deregulation of plum pox resistant transgenic plum 'Honey-Sweet'. *Acta Horticulturae* (en prensa).

- Scorza R, Ravelonandro M, Callahan AM, Cordts JM, Fuchs M, Dunez J, Gosalves D, 1994. Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Reports* 14: 18-22.
- Varrelman M, Palkovics L, Maiss E, 2000. Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of *Plum pox virus*. *Journal of Virology* 74: 7462-7469.
- Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, Ravelonandro M, Dunez J, 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *Plum pox virus* detection. *Journal of Virological Methods* 39: 27-37.
- Wintermantel WM, Schoelz JE, 1996. Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology* 223: 156-64.
- (Aceptado para publicación el 30 de mayo de 2007)