

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES



**Epidemiología de *Plum pox virus* y *Citrus tristeza virus* en bloques de plantas de vivero.  
Métodos de control**

**TESIS DOCTORAL**

**EDUARDO VIDAL IZQUIERDO**

**Ingeniero Agrónomo**

**Valencia, 2010**



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA  
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS  
DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES



INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS  
CENTRO DE PROTECCIÓN VEGETAL Y BIOTECNOLOGÍA



### Tesis Doctoral

# **Epidemiología de *Plum pox virus* y *Citrus tristeza virus* en bloques de plantas de vivero. Métodos de control**

Memoria presentada por:

**Eduardo Vidal Izquierdo**  
Para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo

Directores:

**Dr. Mariano Cambra Álvarez**  
**Dra. Aránzazu Moreno Lozano**

**Valencia, 2010**





GENERALITAT VALENCIANA  
Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación

-----  
**INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES  
AGRARIAS**

Carretera Moncada a Náquera Km. 4,5, 46113-MONCADA,  
VALENCIA, SPAIN

Dr. Mariano Cambra Álvarez, Doctor Ingeniero Agrónomo, Profesor de Investigación del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), y la Dra. Aránzazu Moreno Lozano, Doctora en Ciencias, Científico Titular en el Departamento de Protección Vegetal del Instituto de Ciencias Agrarias del Centro de Ciencias Medioambientales-CSIC de Madrid.

CERTIFICAN:

que D. Eduardo Vidal Izquierdo ha realizado bajo su dirección en el laboratorio de Virología e Inmunología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada (Valencia), el trabajo que con el título de “Epidemiología de *Plum pox virus* y *Citrus tristeza virus* en bloques de plantas de vivero. Métodos de control”, presenta para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Moncada, Valencia a 2 de Septiembre de 2010.

Fdo. Dr. Mariano Cambra Álvarez

Fdo. Dra. Aránzazu Moreno Lozano



## *AGRADECIMIENTOS*

En primer lugar quisiera dar las gracias a mis dos directores de Tesis, a Mariano Cambra y a Aránzazu Moreno. A Mariano por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por ayudarme a sumergirme en el “arte” de la fitopatología (ha sido todo un placer) y por sus consejos, apoyo y confianza. A Arantxa por ayudarme en todo momento, por haber estado siempre “ahí” antes y después de su marcha, por su forma clara de decir las cosas y por sus acertados consejos desde el primer momento a este “agonías”. A los dos, muchas gracias.

Lo primero de todo, me gustaría agradecer a mis compañeros de laboratorio su ayuda a la hora de muestrear las parcelas experimentales, sin ellos esta Tesis no se hubiera podido realizar. Gracias por vuestra ayuda moral y REAL en aquellos largos y cansados días de campo, que aunque duros siempre tenían su lado positivo, sólo había que buscárselo. ¡MUCHAS GRACIAS!

Me gustaría agradecer a Edson todos sus consejos, todo su apoyo y todas sus innumerables enseñanzas. Mucha suerte Chaval en lo venidero, te mereces lo mejor. A Nieves por haber sido mi primera “profe” y por la alegría que desprendía tanto dentro como fuera del laboratorio, te echamos de menos aunque yo sé que tú también a nosotros. A Maite por haber compartido tantas horas en la sala de becarios, por su ayuda sobre todo al final de esta andadura y por ayudarme en todo lo que ha podido. A Antonio por presentarme al señor Bayes, por su página web y por nuestras conversaciones sobre nuestro Club del alma que me ayudaban a desconectar. A Mari Carmen por haberme apoyado sobre todo a mí llegada y por ser tan buena compañera como persona. A Consuelo por su inestimable ayuda con nuestros amigos los pulgones y por sus “particulares” observaciones y comentarios. A Alba Rocío por su valiosa ayuda al final de este camino, te deseo mucha suerte en tu nueva experiencia. A Tere por prestarme su ayuda siempre que se la pedí. Y no me podía olvidar de Delia, Sara, Patri y Rubén que aunque estuvieron poco tiempo en el laboratorio, su ayuda fue importante sobre todo al principio de esta Tesis.

A Ray y todo su equipo (Bob, Saúl y Mariana) por haberme acogido como uno más y hacer mi estancia en su laboratorio lo más agradable posible. Muchas gracias.

Me gustaría agradecer también a la Cooperativa Vinícola de Lliria, en particular a Belén Tamargo y a Pepe Micó y a la Cooperativa Agrícola San Bernardo de Carlet, en particular a Vicente Demófilo, por su ayuda en el establecimiento y mantenimiento de las parcelas experimentales y en los tratamientos con aceites minerales. También me gustaría agradecer la ayuda prestada para la realización de esta Tesis a Cuca Orero.

Me gustaría dar las gracias a todo el laboratorio de Bacteriología. Sois muchos pero os doy las gracias a TODOS por vuestra ayuda, por haberme dejado compartir laboratorio, material, congeladores, risas y algunos pacharanes. Por simplemente un hola (es gratis) de muchos de vosotros, que te hacía mucho más fácil las mañanas aunque sabías perfectamente que te estaban esperando en el congelador unos cuantos

cientos de muestras. Gracias. De todas formas, me quiero acordar especialmente de Ana, gracias por compartir las penas en nuestra guarida y por tu ayuda con los papeleos, borradores e informes que se generan en una Tesis, sólo decirte que mucho ÁNIMO y no dejes de pedalear.

También me gustaría agradecer a Manolo por preocuparse por la evolución de mi Tesis, por nuestras charlas al principio de cada jornada y por ser un gran tío.

A Emilio y a Jordi por su ayuda en la estadística de esta Tesis y por introducirme en el maravilloso mundo de Poisson, Bonferroni y tanto otros que nos hacen tan fácil o tan difícil, según se mire, nuestra labor, y a Manolo Zarzo que me inició en ese camino. A Alfonso por su ayuda en la identificación de los pulgones, por resolver todas aquellas dudas que me han ido surgiendo a lo largo del tiempo, por su buen carácter y por aquella visita a los “Cloisters”.

Y por encima de todos, a mis abuelos, a mi madre y a mi hermano, sin ellos esta Tesis no habría sido posible. Y por supuesto, a Irene por aguantarme mis mejores y no tan mejores días, por escuchar “mis historias” del laboratorio, por ser tan comprensiva y simplemente por ser como eres. Muchas gracias.

# ÍNDICE

---

<b>Índice de abreviaturas.....</b>	<b>i</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>iii</b>
<b>Summary.....</b>	<b>vii</b>
<b>Resum.....</b>	<b>xi</b>
<b>Capítulo 1. Introducción General.....</b>	<b>1</b>
1.1 Importancia del cultivo de frutales de hueso y de la citricultura en España...	1
1.2 Patrones utilizados en el cultivo de frutales de hueso y cítricos. Cultivo en vivero.....	2
1.3 Virosis transmitidas por pulgones. Mecanismos de transmisión.....	7
1.4 La enfermedad de la sharka de frutales de hueso.....	10
1.5 La enfermedad de la tristeza de los cítricos.....	12
1.6 Métodos de detección de <i>Plum pox virus</i> y <i>Citrus tristeza virus</i> .....	14
1.7 Parámetros de validación de técnicas de diagnóstico y medida de la coincidencia entre dos técnicas de diagnóstico (índice kappa de Cohen).....	17
1.8 Métodos de control de enfermedades virales en vegetales.....	23
<b>Capítulo 2. Objetivos Generales.....</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo 3. Materiales y Métodos Generales.....</b>	<b>29</b>
3.1 Material vegetal: parcelas experimentales, localización y diseño experimental.....	29
3.1.1 Parcela situada en Lliria.....	29
3.1.2 Parcela situada en Carlet.....	33
3.1.3 Parcela situada en Moncada.....	37
3.2 Muestro vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo.....	40
3.2.1 Parcelas de Lliria y Carlet.....	40
3.2.2 Parcela de Moncada.....	40
3.3 Técnicas de detección de virus.....	41
3.3.1 Técnicas de detección de virus en material vegetal.....	41
3.3.1.1 Detección de PPV en material vegetal.....	41
3.3.1.1.1 ELISA-DASI (“Double Antibody Sandwich Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay”).....	42
3.3.1.1.2 “Spot” RT-PCR a tiempo real.....	42
3.3.1.2 Detección de CTV en material vegetal.....	43
3.3.1.2.1 Inmunoimpresión-ELISA o “Tissue print”-ELISA.....	43

3.3.1.2.2 “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real.....	44
3.3.2 Técnicas empleadas en la detección de ambos virus.....	45
3.4 Caracterización serológica y molecular de los aislados de PPV.....	45
3.5 Métodos de muestreo de pulgones.....	46
3.5.1 Trampa de Moericke.....	46
3.5.2 Planta pegajosa.....	46
3.6 Cálculo de la superficie foliar de aterrizaje disponible para los pulgones.....	47
3.6.1 Método de determinación de la superficie foliar aplicado durante el período de brotación.....	48
3.6.2 Método de determinación de la superficie foliar aplicado en los meses posteriores al período de brotación.....	49
3.7 Métodos estadísticos.....	50

**Capítulo 4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural..... 51**

4.1 Introducción.....	51
4.2 Objetivos.....	52
4.3 Materiales y métodos.....	52
4.3.1 Localización de las parcelas.....	52
4.3.2 Patrones empleados.....	52
4.3.3 Muestro vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo.....	52
4.3.4 Caracterización serológica y molecular de los aislados de PPV.....	52
4.3.5 Muestreo de pulgones y detección de pulgones virulíferos.....	52
4.3.6 Estima de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones.....	53
4.3.7 Análisis estadísticos.....	54
4.4 Resultados.....	55
4.4.1 Incidencia viral.....	55
4.4.2 Caracterización de los aislados de PPV presentes en la parcela.....	57
4.4.3 Estudio de la relación de algunos de los factores que condicionan la incidencia de la infección viral.....	58
4.4.3.1 Estima de la población de pulgones visitantes y porcentaje de individuos virulíferos.....	58
4.4.3.1.1 Capturas mediante trampas Moericke.....	58
4.4.3.1.2 Capturas mediante el método de la planta pegajosa.....	60
4.4.3.1.3 Estima del número de pulgones virulíferos en las parcelas experimentales.....	69
4.4.3.2 Estima de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones.....	72
4.4.3.2.1 Parcela situada en Lliria.....	72
4.4.3.2.2 Parcela situada en Carlet.....	75
4.4.3.3 Relación entre la superficie de aterrizaje disponible para los pulgones y el número de pulgones visitantes.....	78
4.5 Discusión.....	80

<b>Capítulo 5. Incidencia del Virus de la Tristeza de los cítricos en bloques de vivero de <i>Citrus macrophylla</i> cultivado en campo.....</b>	<b>89</b>
5.1 Introducción.....	89
5.2 Objetivos.....	90
5.3 Materiales y métodos.....	91
5.3.1 Localización de la parcela.....	91
5.3.2 Muestreo vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo.....	91
5.3.3 Muestreo de pulgones y detección de individuos virulíferos.....	91
5.3.4 Medición de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones.....	92
5.3.5. Métodos estadísticos.....	92
5.4 Resultados.....	93
5.4.1 Incidencia viral.....	93
5.4.2 Estudio de la relación de algunos de los factores que condicionan la incidencia viral.....	93
5.4.2.1 Estima de la población de pulgones visitantes y porcentaje de individuos virulíferos.....	93
5.4.2.1.1 Capturas mediante trampa Moericke.....	93
5.4.2.1.2 Capturas mediante el método de la planta pegajosa.....	94
5.4.2.1.3 Estima del número de pulgones virulíferos que visitaron las plantas de la parcela experimental.....	97
5.4.2.2 Estima de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones.....	98
5.4.2.3 Relación entre la superficie de aterrizaje disponible para los pulgones y el número de pulgones visitantes.....	100
5.5 Discusión.....	101
 <b>Capítulo 6. Validación de “Spot” y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real. Comparación con técnicas serológicas y cálculo de parámetros de diagnóstico.....</b>	 <b>105</b>
6.1 Introducción.....	105
6.2 Objetivos.....	109
6.3 Materiales y métodos.....	109
6.3.1 Determinación del número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar en un extracto para tener una adecuada precisión de detección de PPV.....	109
6.3.1.1 Métodos estadísticos.....	110
6.3.2 Validación de “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV. Comparación con la técnica ELISA-DASI y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero.....	111
6.3.2.1 Material vegetal: parcelas experimentales.....	111
6.3.2.2 Cálculo de la concordancia entre técnicas.....	111

6.3.2.3 Cálculo de los parámetros de diagnóstico de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en condiciones de vivero.....	111
6.3.3 Validación de “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección de CTV. Comparación con Inmunoimpresión-ELISA y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero...	114
6.3.3.1 Material vegetal: parcelas experimentales.....	114
6.3.3.2 Cálculo de la concordancia entre técnicas.....	114
6.3.3.3 Cálculo de los parámetros de diagnóstico de las técnicas Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real en condiciones de vivero.....	114
6.4 Resultados.....	116
6.4.1 Determinación del número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar en un extracto para tener una adecuada precisión de detección de PPV.....	116
6.4.2 Validación de “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV. Comparación con la técnica ELISA-DASI y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero.....	121
6.4.2.1 Resultados obtenidos en las diferentes parcelas y concordancia entre técnicas.....	121
6.4.2.2 Cálculo de la sensibilidad y especificidad de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en primavera.....	124
6.4.2.2.1 Cálculo de la sensibilidad y la especificidad de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en primavera mediante análisis de las plantas con resultados analíticos discrepantes.....	124
6.4.2.2.2 Determinación de la sensibilidad y de la especificidad de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en primavera mediante modelos latentes.....	127
6.4.2.3 Cálculo de las razones de verosimilitud y de las probabilidades post-test de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real.....	130
6.4.3 Validación de “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección de CTV. Comparación con la técnica Inmunoimpresión-ELISA y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero...	136
6.4.3.1 Resultados obtenidos en las diferentes parcelas y concordancia entre técnicas.....	136
6.4.3.2 Resultados obtenidos mediante injerto en lima mejicana de material de las parcelas situadas en Tulare (EEUU).....	138
6.4.3.3 Determinación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR en condiciones de vivero.....	139

6.4.3.4 Cálculo de las razones de verosimilitud y de las probabilidades post-test de Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real.....	142
6.5 Discusión.....	144
<b>Capítulo 7. Evaluación del efecto de tratamientos con aceites minerales sobre la incidencia viral y sobre el desarrollo vegetativo de las plantas en bloques de vivero.....</b>	<b>153</b>
7.1 Introducción.....	153
7.2 Objetivos.....	158
7.3 Materiales y métodos.....	158
7.3.1 Localización de las parcelas.....	158
7.3.2 Tratamiento con aceites minerales.....	158
7.3.3 Muestreo vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo.....	159
7.3.4 Medición de parámetros relacionados con el desarrollo vegetativo (superficie foliar y altura de la planta).....	159
7.3.5 Análisis estadísticos.....	160
7.4 Resultados.....	161
7.4.1 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en la incidencia viral en las parcelas experimentales.....	161
7.4.1.1 Parcela de Lliria (PPV, alta densidad de inóculo).....	161
7.4.1.2 Parcela de Carlet (PPV, baja densidad de inóculo).....	161
7.4.1.3 Parcela de Moncada (CTV, alta densidad de inóculo).....	162
7.4.2 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en el desarrollo vegetativo de los patrones.....	163
7.4.2.1 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en la altura de los patrones.....	163
7.4.2.1.1 Parcela de Lliria.....	163
7.4.2.1.2 Parcela de Carlet.....	165
7.4.2.1.3 Parcela de Moncada.....	168
7.4.2.2 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en la superficie foliar de los patrones.....	169
7.4.2.2.1 Parcela de Lliria.....	169
7.4.2.2.2 Parcela de Carlet.....	172
7.4.2.2.3 Parcela de Moncada.....	175
7.4.3 Otros efectos producidos por el tratamiento con aceites minerales en las plantas.....	176
7.5 Discusión.....	179
<b>Conclusiones.....</b>	<b>183</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>187</b>
<b>Anejos.....</b>	<b>225</b>



# RELACIÓN DE ABREVIATURAS

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFT	Agua fisiológica tamponada
ANOVA	Análisis de la Varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ASTM	Asociación americana para la certificación de materiales (American Society for Testing Materials)
BAK	Índice kappa de Cohen ajustado para evitar errores debido al sesgo (Bias Adjusted Kappa)
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor ( <i>Cauliflower mosaic virus</i> )
CEVd	Viroide de la exocortis ( <i>Citrus exocortis viroid</i> )
CITA	Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón
Co-PCR	PCR Cooperativa
CPsV	Virus de la psorosis de los cítricos ( <i>Citrus psorosis virus</i> )
CTV	Virus de la tristeza de los cítricos ( <i>Citrus tristeza virus</i> )
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis (4 -clorofenil)-etano
DIC	Criterio de información de la deviance (Deviance Information Criterion)
DIECA	Dietil ditiocarbamato sódico
EC	Concentrado emulsionable
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEUU	Estados Unidos de America
ELISA	Técnica Inmunoenzimatica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EM	Algoritmo Esperanza-Maximización (Expectation-Maximization)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación
FAOSTAT	Base de datos estadísticos de la FAO
GAM	Anticuerpos de cabra anti-conejo (Goat Anti-Mouse)
HSVd	Viroide de la cachexia o viroide del enanismo del lúpulo ( <i>Hop stunt viroid</i> )
IC-RT-PCR	Inmuncaptura RT-PCR
INRA	Instituto para la investigación agronómica de Francia (Institut National de la Recherche Agronomique)
IPPC	Convención Internacional para la Protección Vegetal (International Plant Protection Convention)
IVIA	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
k	Índice kappa de Cohen
LR	Razón de verosimilitud de una técnica de detección (Likelihood ratio)

MAb	Anticuerpos monoclonales
MGB	Sondas para ligandos de unión al surco menor (Minor Groove Binder)
NASBA	Amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (Nucleic Acid Sequence Based Amplification)
NBT	Cloruro de tetrazolio nitro-azul
Nested-PCR	RT-PCR anidada
NR	Algoritmo de Newton-Raphson
OEPP/EPPO	Organización Europea y Mediterránea para la Protección Vegetal (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes/ European and Mediterranean Plant Protection Organization)
PABAK	Índice kappa de Cohen ajustado para evitar errores debido al sesgo y a la prevalencia (Prevalence-adjusted Bias Adjusted Kappa)
PAbs	Anticuerpos policlonales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPV	Virus de la sharka ( <i>Plum pox virus</i> )
Pr	Prevalencia
PTSL	Síndrome de la corta vida del melocotonero (Peach Tree Short Life)
PVP	Polyvinilpirrolidona
PVY	Virus Y de la patata ( <i>Potato virus Y</i> )
rhoD	Correlación entre resultados positivos (Sensibilidad)
rhoDc	Correlación entre resultados negativos (Especificidad)
RT-LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle mediante transcriptasa inversa (Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification)
RT-PCR	PCR asociada a la acción de la transcriptasa inversa
Se	Sensibilidad de una técnica de detección
Sp	Especificidad de una técnica de detección
TAGS	Programa “Test in Absence of a Gold Standard”
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de America (United States Department of Agriculture)
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

## **RESÚMENES**



## RESUMEN

España es el principal productor de frutales de hueso y cítricos de la Unión Europea. Las enfermedades virales más importantes asociadas a estos cultivos son la sharka en frutales de hueso, causada por *Plum pox virus* (PPV; *Potyvirus*), y la tristeza de los cítricos, causada por *Citrus tristeza virus* (CTV; *Closterovirus*), ambas transmitidas mediante pulgones de forma no persistente y semipersistente, respectivamente. Actualmente existe un amplio conocimiento de la epidemiología de ambos virus en plantaciones adultas, sin embargo no existen estudios sobre su epidemiología en bloques vivero. Además, las características especiales de éstos, como un marco de plantación más reducido y la presencia de plantas con caracteres juveniles y con brotaciones suculentas, hace que el control de la dispersión natural de ambos virus sea más difícil.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue el estudio de los distintos factores que determinan la epidemiología de PPV y de CTV en vivero, con el fin de establecer posibles estrategias de control. Además, considerando que toda estrategia de control requiere en algún momento de la aplicación de métodos de detección fiables, se han validado métodos serológicos y moleculares para una detección viral precoz y precisa de las plantas infectadas en vivero antes de la comercialización del material vegetal.

Se establecieron tres parcelas experimentales de vivero durante el año 2006 en diferentes localidades de la provincia de Valencia. Un vivero experimental se estableció en la localidad de Lliria junto a una parcela de ciruelos japoneses con un 90% de incidencia de PPV y otro en Carlet en una área con un 5% de incidencia de PPV. Además, se estableció una parcela experimental del patrón de cítricos *Citrus macrophylla* en Moncada en una zona con una incidencia del 85% de CTV. Las parcelas se muestrearon para conocer la incidencia viral en diferentes períodos y se analizaron mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en el caso de PPV y mediante Inmunoimpresión-ELISA en el caso de CTV.

Los patrones de frutales de hueso más susceptibles a la infección natural por PPV en condiciones de alta densidad de inóculo fueron los ciruelos Adesoto 101 y Mariana GF8-1. Los patrones Nemaguard y Mirobolan 29C presentaron una susceptibilidad media, mientras los patrones Cadaman y Garnem resultaron resistentes a PPV-D detectándose únicamente el virus mediante RT-PCR a tiempo real. Sólo los patrones Adesoto 101, Mariana GF8-1 y Nemaguard, resultaron infectados en la parcela sometida a baja presión de inóculo. Además, se confirmó la alta susceptibilidad a la infección natural a CTV del patrón *C. macrophylla*.

La dinámica poblacional de los pulgones se estableció con base en las capturas de trampas amarillas de Moericke y plantas pegajosas. Tanto en los viveros

de frutales de hueso como en la parcela de *C. macrophylla*, mayo resultó el mes con mayor número de capturas. El número medio estimado de pulgones visitantes por planta en la parcela de Lliria durante el mes de mayo de dos años consecutivos fue de 38,1, mientras en la parcela de Carlet fue de 36,7. Mientras, en la parcela de *C. macrophylla* el número de pulgones visitantes por planta durante el mes de mayo fue de 387,9. La especie predominante durante todo el año fue *Aphis spiraecola* por ambos métodos de muestreo (más del 90% en trampas Moericke y aproximadamente el 55% en plantas pegajosas), otras especies encontradas frecuentemente fueron *A. gossypii* y *Hyalopterus pruni*. El porcentaje de pulgones PPV-virulíferos, determinado por “Squash” RT-PCR a tiempo real, que sobrevoló y/o aterrizaron sobre las plantas de vivero de frutales en una zona con una alta densidad de inóculo durante el mes de mayo (30,32%), fue más del triple que el determinado en una zona con una baja densidad de inóculo (7,98%). Se determinó que las visitas de los pulgones a las plantas de vivero y a las distintas especies de patrones de frutales se realizaron al azar. Además, no se han encontrado diferencias significativas en el número de pulgones PPV-virulíferos que visitaron las distintas especies de patrones de frutales ensayados en ambas parcelas. Se determinó la inexistencia de una relación directa entre el número de pulgones visitantes en una planta de vivero y su superficie foliar. El 17,50% de los individuos que aterrizaron en *C. macrophylla* y/o sobrevolaron la parcela experimental resultaron CTV-virulíferos.

En Lliria, se utilizaron los patrones Nema-guard y Mariana GF8-1 para evaluar el efecto de la aplicación de aceites minerales en la incidencia viral. El tratamiento consistió en la aplicación de aceite mineral hortícola (Sunspray Ultrafine 85 % [EC] P/V) al 1% cada 10-12 días durante el primer año (2006), desde la brotación de las plantas hasta la caída de las hojas. Durante el segundo año (2007), los tratamientos se efectuaron con el mismo aceite cada siete días durante los meses de primavera de máximo vuelo de pulgones. En la parcela situada en Carlet se evaluó el tratamiento con aceites minerales en los seis patrones de frutales de hueso. Los tratamientos no impidieron la presencia viral en los viveros experimentales, pero redujeron significativamente la incidencia de PPV en el patrón Mariana GF8-1 en una zona con una alta presión de inóculo. La aplicación reiterada de aceites minerales no sólo no supuso un perjuicio para el desarrollo vegetativo de las plantas tratadas sino que puede sustituir a otros tratamientos fitosanitarios. En la parcela de *C. macrophylla* el uso de aceite no supuso reducción de la incidencia de CTV.

Se validaron las técnicas “Spot” y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real, en comparación con ELISA-DASI e Inmunoimpresión-ELISA, respectivamente, para su uso rutinario en detección. La coincidencia en resultados entre “Spot” RT-PCR a tiempo real y ELISA-DASI fue casi perfecta para detección de PPV y la coincidencia entre “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real e Inmunoimpresión-ELISA fue substancial para detección de CTV, según el índice kappa de Cohen. Los diferentes parámetros de diagnóstico calculados indican que las técnicas moleculares

presentaron mayor sensibilidad y por tanto son recomendables cuando se requiera una muy buena precisión en los individuos negativos (plantas madre, material base y plantas para exportación). Sin embargo, las técnicas serológicas utilizadas mostraron mayor especificidad y son recomendables para inspección rutinaria. La combinación de técnicas serológicas y moleculares es recomendable para una precisión casi total de los análisis.

Se ha demostrado como la técnica “Spot” RT-PCR a tiempo real puede ser utilizada con éxito en muestras compuestas de hasta diez plantas sin perder precisión en detección de PPV en cualquier época del año. Por el contrario, la técnica ELISA-DASI mostró diferencias significativas en la precisión de la detección según la época del año y el número de plantas analizadas, siendo las mejores épocas para la detección de PPV primavera y verano seguidos de otoño y no se aconseja el uso de mezclas compuestas en invierno.

Se han aplicado, por primera vez en fitopatología, modelos latentes para la estimación de los diferentes parámetros de diagnóstico de las técnicas “Spot” RT-PCR a tiempo real y ELISA-DASI. Se ha demostrado que éstos pueden ser aplicados en la estimación de los parámetros de diagnóstico de nuevas o ya validadas técnicas de detección de agentes fitopatógenos.

Como conclusión general, esta Tesis Doctoral aporta conocimientos básicos sobre la epidemiología de los virus de la sharka y de la tristeza en bloques de vivero, que podrán ser aplicados para el diseño de estrategias de control. Además, se sugiere el uso de métodos de control respetuosos con el medio ambiente, como son el empleo de patrones poco susceptibles o resistentes a PPV y el uso de aceites minerales con residuo cero. También se han validado las técnicas moleculares “Spot” y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección fiable y precisa de PPV y CTV en plantas de vivero. El uso de ambas técnicas ofrece una mayor garantía de la sanidad del material vegetal analizado que otras técnicas hasta ahora empleadas.



## SUMMARY

Spain is the leading producer of stone fruit and citrus of the European Union. The most important viral diseases associated with these crops are sharka in stone fruit, caused by *Plum pox virus* (PPV; *Potyvirus*) and citrus tristeza, caused by *Citrus tristeza virus* (CTV; *Closterovirus*); both are transmitted by aphids in a non-persistent and semi-persistent manner, respectively. Nowadays there is a vast amount of information about the epidemiology of both viruses in adult orchards, however, there are no studies on their epidemiology in nursery blocks. In addition, nurseries' specific features such as a small planting pattern and the presence of plants with juvenile characters and succulent shoots make controlling the natural spread of both these viruses more difficult.

The main objective of this Thesis is to study the factors involved in determining the epidemiology of PPV and CTV in nursery blocks, in order to design viable control strategies. Moreover, bearing in mind that any control strategy requires reliable detection methods, serological and molecular methods have been validated for an early and accurate viral detection of infected plants in the nursery prior to the commercialization of plant material.

Three experimental nursery plots were established in 2006 in different locations across the province of Valencia. The first nursery plot was laid out in the village of Lliria close to an adult Japanese plum orchard with a PPV-incidence of 90%; another one in Carlet in an area with a PPV-incidence of 5% and a third experimental nursery plot was done with the *Citrus macrophylla* citrus rootstock in Moncada, an area with an incidence of 85% of CTV. All three plots were sampled to determine the viral incidence in time intervals and analyzed by ELISA-DASI and Spot real-time RT-PCR for PPV and by Tissue print-ELISA in the case of CTV.

The most susceptible *Prunus* rootstocks to natural infection by PPV in an environment of high inoculum pressure were Adesoto 101 and Mariana GF8-1. Nemaguard and Mirobolan 29C rootstocks showed a medium susceptibility, while Cadaman and Garnem were resistant to PPV-D having the virus detected only by real-time RT-PCR. Just Adesoto 101, Mariana GF8-1 and Nemaguard rootstocks were infected in the plot under low inoculum pressure. Furthermore, there was confirmation of the *C. macrophylla* rootstock's high susceptibility to natural infection with CTV.

The dynamics of aphid populations were established based on samples captured with Moericke yellow traps and the sticky plants method. May turned out to be the month with the highest number of captures of aphid population in *Prunus* nurseries and in the *C. macrophylla* plot. The estimated average number of visitant aphids per plant in Lliria during May for two consecutive years was 38.1 while in the plot of Carlet was 36.7. Meanwhile, in the *C. macrophylla* plot, the number of visitant aphids per plant during May was 387.9. The dominant aphid species throughout the year by both

sampling methods was *Aphis spiraecola* (over 90% in traps Moericke and approximately 55% in sticky plants), *A. gossypii* and *Hyalopterus pruni* were other species often found too. Percentage-wise, the number of PPV-viruliferous aphids determined by squash real-time RT-PCR which flew over and/or landed on the *Prunus* nursery plants in an area with a high inoculum pressure during May (30.32%) was over three times higher than those determined in an area with low inoculum pressure (7.98%). It was determined that the visits of the aphids to nursery plants and to the different *Prunus* rootstocks followed no pattern. In addition, no significant differences were found in the number of PPV-viruliferous aphids that visited the different *Prunus* rootstocks tested in both plots. It was concluded that there is no link between the number of aphid visitants and the leaf area of a nursery plant. 17.50% of the aphids which landed and/or flew over the experimental *C. macrophylla* plot were CTV-viruliferous.

In Llúria's plot Nema-guard and Mariana GF8-1 rootstocks were used to evaluate the effects of the application of mineral oil to the viral incidence. The treatment consisted of the application of horticultural mineral oil (85% Ultrafine Sunspray [EC] P/V) at a rate of 1% every 10-12 days during the first year (2006) from the sprouting of plants to leaf fall. During the second year (2007), the treatments were made with the same oil every seven days during the spring's peak flight time of aphids. In the plot located in Carlet the treatments were evaluated with mineral oil in the six *Prunus* rootstocks studied. The treatments did not stop the viral presence in the experimental nurseries, but reduced significantly the PPV-incidence in the Mariana GF8-1 rootstock in an area with high inoculum pressure. The repeated application of mineral oil not only did not damage the vegetative development of the treated plants but it could also replace other pesticide treatments. In *C. macrophylla* plot the use of mineral oil did not reduce the incidence of CTV.

The Spot and Tissue-print real-time RT-PCR techniques were validated and compared with ELISA-DASI and Tissue print-ELISA, respectively, for routinely use in detection. The coincidence in results between Spot real-time RT-PCR and ELISA-DASI was almost perfect for PPV detection and the coincidence between Tissue-print real-time RT-PCR and Tissue print-ELISA was, according to Cohen's kappa index, substantial for CTV detection. The diagnostic parameters calculated indicate that molecular techniques were more sensitive and are therefore recommended when very precise results in negative individuals (mother plants, material base and material for export) are required. However, serological techniques used showed greater specificity and are recommended for routinely inspection. The combination of serological and molecular techniques is recommended for almost total analysis accuracy.

It has been proved that the Spot real-time RT-PCR technique can be successfully used in compound samples of up to ten plants without losing accuracy in detection of PPV throughout the year. By contrast, the ELISA-DASI showed significant differences in detection accuracy depending on the time of year and the number of

plants analyzed being spring and summer the best times for detection of PPV followed by autumn and it is not recommended use of compounds in winter.

Latent models have been applied for first time in plant pathology for estimating the different diagnostic parameters of Spot real-time RT-PCR and ELISA-DASI techniques. It has been shown that they can be applied to the estimation of the parameters for the diagnosis of new and existing validated techniques for detection of plant pathogens.

As a general conclusion, this Thesis provides a basic understanding of the epidemiology of sharka and tristeza diseases in nursery blocks, which may be applied to the design of control strategies. Furthermore, it suggests the use of environmentally friendly control methods with zero residues such as the employment of less susceptible or resistant PPV *Prunus* rootstocks and the use of mineral oils. Also, the molecular techniques Spot real-time and Tissue-print RT-PCR have been validated for a reliable and accurate detection of PPV and CTV in nursery plants. The use of both these techniques provides a better guarantee for the virus-free status of analyzed plant material than other techniques employed so far.



## RESUM

Espanya és el principal productor de fruiters d'os i cítrics de la Unió Europea. Les enfermetats virals més importants associades a aquests cultius són la sharka en fruiters d'os, causada per Plum pox virus (PPV; Potyvirus), i la tristesa dels cítrics, causada per Citrus tristesa virus (CTV; Closterovirus), ambdues transmeses mitjançant pugons de forma no persistent i semipersistent, respectivament. Actualment hi ha un ampli coneixement de l'epidemiologia dels dos virus en plantacions adultes, però no existeixen estudis sobre la seua epidemiologia en blocs de viver. A més, les característiques especials d'aquests, com un marc de plantació més reduït i la presència de plantes amb caràcters juvenils i amb brotades suculentas, fa que el control de la dispersió natural d'ambdós virus sigui més difícil.

L'objectiu principal d'aquesta Tesis Doctoral va ser l'estudi dels diferents factors que determinen l'epidemiologia de PPV i de CTV en viver, per tal d'establir possibles estratègies de control. A més, considerant que tota estratègia de control requereix en algun moment de l'aplicació de mètodes de detecció fiables, s'han validat mètodes serològics i moleculars per a una detecció viral precoç i precisa de les plantes infectades en viver abans de la comercialització del material vegetal.

Es van establir tres parcel·les experimentals de viver durant l'any 2006 en diferents localitats de la província de València. Un viver experimental es va establir a la localitat de Lliria al costat d'una parcel·la de pruneres japoneses amb un 90% d'incidència de PPV i un altre a Carlet en una àrea amb un 5% d'incidència de PPV. A més, es va establir una parcel·la experimental del patró de cítrics *Citrus macrophylla* a Moncada en una zona amb una incidència del 85% de CTV. Les parcel·les es van mostrejar per conèixer la incidència viral en diferents períodes i es van analitzar per ELISA-DASI i "Spot" RT-PCR a temps real en el cas de PPV i mitjançant Inmunoimpresión-ELISA en el cas de CTV.

Els patrons de fruiters d'os més susceptibles a la infecció natural per PPV en condicions d'alta densitat de inòcul van ser les pruneres Adesoto 101 i Mariana GF8-1. Els patrons Nemaguard i Mirobolan 29C presenten una susceptibilitat mitjana, mentre els patrons Cadaman i Garnem resulten resistents a PPV-D detectant únicament el virus mitjançant RT-PCR a temps real. Només els patrons Adesoto 101, Mariana GF8-1 i Nemaguard, van resultar infectats a la parcel·la sotmesa a baixa pressió de inòcul. A més, es va confirmar l'alta susceptibilitat a la infecció natural a CTV del patró *C. macrophylla*.

La dinàmica poblacional dels pugons es va establir amb base en les captures de trampes grogues de Moericke i plantes enganxoses. Tant en els vivers de fruiters d'os com a la parcel·la de *C. macrophylla*, mai resulten el més amb major nombre de captures. El nombre mitjà estimat de pugons visitants per planta a la parcel·la de Lliria

durant el mes de maig de dos anys consecutius va ser de 38,1, mentre a la parcel de Carlet va ser de 36,7. Mentre, a la parcela de *C. macrophylla* el nombre de pugons visitants per planta durant el mes de maig va ser de 387,9. L'espècie predominant durant tot l'any va ser *Aphis spiraecola* per ambdós mètodes de mostreig (més del 90% en trampes Moericke i aproximadament el 55% en plantes enganxoses), altres espècies trobades freqüentment van ser *A. gossypii* i *Hyalopterus pruni*. El percentatge de pugons PPV-virulífers, determinat per "Squash" RT-PCR a temps real, que va sobrevolar i/o aterrar sobre les plantes de viver de fruiters en una zona amb una alta densitat de inòcul durant el mes de maig (30, 32%), va ser més del triple que el determinat en una zona amb una baixa densitat de inòcul (7,98%). Es va determinar que les visites dels pugons a les plantes de viver ia les diferents espècies de patrons de fruiters es van realitzar a l'atzar. A més, no s'han trobat diferències significatives en el nombre de pugons PPV-virulífers que van visitar les diferents espècies de patrons de fruiters assajats en les dues parcelles. Es va determinar la inexistència d'una relació directa entre el nombre de pugons visitants en una planta de viver i la seva superfície foliar. El 17,50% dels individus que van aterrar a *C. macrophylla* i/o sobrevolar la parcel experimental resultar CTV-virulífers.

A Llúria, es van utilitzar els patrons Nemaguard i Mariana GF8-1 per avaluar l'efecte de l'aplicació d'olis minerals en la incidència viral. El tractament va consistir en l'aplicació d'oli mineral hortícola (Sunspray ultrafina 85% [EC] P / V) a l'1% cada 10-12 dies durant el primer any (2006), des de la brotació de les plantes fins a la caiguda de les fulles. Durant el segon any (2007), els tractaments es van efectuar amb el mateix oli cada set dies durant els mesos de primavera de màxim vol de pugons. A la parcel situada a Carlet es va avaluar el tractament amb olis minerals en els sis patrons de fruiters d'os. Els tractaments no van impedir la presència viral en els vivers experimentals, però van reduir significativament la incidència de PPV en el patró Mariana GF8-1 en una zona amb una alta pressió de inòcul. L'aplicació reiterada d'olis minerals no només no va suposar un perjudici per al desenvolupament vegetatiu de les plantes tractades sinó que pot substituir a altres tractaments fitosanitaris. A la parcel de *C. macrophylla* l'ús d'oli no va suposar reducció de la incidència de CTV.

Es van validar les tècniques "Spot" i "Tissue-print" RT-PCR a temps real, en comparació amb ELISA-DASI i Inmunoprecipitació-ELISA, respectivament, per al seu ús rutinari en detecció. La coincidència en resultats entre "Spot" RT-PCR a temps real i ELISA-DASI va ser gairebé perfecta per a detecció de PPV i la coincidència entre "Tissue-print" RT-PCR a temps real i Inmunoprecipitació-ELISA va ser substancial per a detecció de CTV, segons l'índex kappa de Cohen. Els diferents paràmetres de diagnòstic calculats indiquen que les tècniques moleculars van presentar major sensibilitat i per tant són recomanables quan es requereixi una molt bona precisió en els individus negatius (plantes mare, material base i plantes per a exportació). No obstant això, les tècniques serològiques utilitzades van mostrar

major especificitat i són recomanables per a inspecció rutinària. La combinació de tècniques serològiques i moleculars és recomanable per a una precisió gairebé total de les anàlisis.

S'ha demostrat com la tècnica "Spot" RT-PCR a temps real pot ser utilitzada amb èxit en mostres compostes de fins a deu plantes sense perdre precisió en detecció de PPV durant tot l'any. Per contra, la tècnica ELISA-DASI va mostrar diferències significatives en la precisió de la detecció segons l'època de l'any i el nombre de plantes analitzades, a les millors èpoques per a la detecció de PPV primavera i estiu seguides de tardor i no s'aconsella l'ús de mesclures compostes a l'hivern.

S'han aplicat, per primera vegada en fitopatologia, models latents per l'estimació dels diferents paràmetres de diagnòstic de les tècniques "Spot" RT-PCR a temps real i ELISA-DASI. S'ha demostrat que aquests poden ser aplicats en l'estimació dels paràmetres de diagnòstic de noves o ja validades tècniques de detecció d'agents fitopatògens.

Com a conclusió general, aquesta Tesis Doctoral aporta coneixements bàsics sobre l'epidemiologia dels virus de la sharka i de la tristesa en blocs de viver, que podran ser aplicats per al disseny d'estratègies de control. A més, es suggereix l'ús de mètodes de control respectuosos amb el medi ambient, com són l'ús de patrons poc susceptibles o resistent a PPV i l'ús d'olis minerals amb residu zero. També s'han validat les tècniques moleculars "Spot" i "Tissue-print" RT-PCR a temps real per a la detecció fiable i precisa de PPV i CTV en plantes de viver. L'ús d'ambdues tècniques ofereix una major garantia de la sanitat del material vegetal analitzat que altres tècniques fins ara emprades.



# **CAPÍTULO 1.**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



# CAPÍTULO 1.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

### 1.1 IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE FRUTALES DE HUESO Y DE LA CITRICULTURA EN ESPAÑA

España es uno de los principales productores de frutales de hueso y cítricos de la Unión Europea. Según datos del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino las producciones totales de frutales de hueso (incluyendo únicamente, albaricoquero (*Prunus armeniaca*), ciruelo (ciruelo europeo (*P. domestica*) y ciruelo japonés (*P. salicina*)) y melocotonero (*P. persica*)) y cítricos se cifran en 1.511.488 y 5.303.490 t en el año 2007, respectivamente (Anónimo, 2009). Según cifras del mismo año, ambos cultivos frutales ocupan el cuarto y tercer lugar, respectivamente, en producción en España, tras el olivo (6.140.300 t) y la vid (5.962.600 t) (Anónimo, 2009).

La superficie total cultivada de frutales de hueso en España se cifra en 119.026 ha en el año 2007. De éstas, el 68% corresponde a melocotonero, un 18% a ciruelo y un 15% a albaricoquero. El 81% de la producción total corresponde a melocotonero, el 13% a ciruelo y el 6% a albaricoquero (Anónimo, 2009). Hay que citar que España es el tercer productor de melocotón del mundo tras China (8.028.435 t) e Italia (1.630.436 t) (FAOSTAT, 2007). Esto indica la gran importancia del cultivo del melocotonero en la producción total de frutales de hueso en España. El 42% de la producción total de frutales de hueso se destina a exportación siendo los principales destinos Alemania y Francia. Las principales Comunidades Autónomas (CCAA) productoras varían según la especie. Así para albaricoquero la principal zona productora es la Región de Murcia (58.301 t); para ciruelo la Región de Murcia (44.493 t) y Andalucía (41.045 t) y para melocotón Cataluña (319.912 t), Aragón (307.812 t) y Andalucía (153.408 t) (Anónimo, 2009).

En cuanto a los cítricos, la superficie total cultivada en España se cifra en 315.580 ha en el año 2007 (Anónimo, 2009). De éstas el 46% corresponde a naranjo dulce (*Citrus sinensis*), el 39% a mandarino (*C. reticulata*) y 13% a limonero (*C. limon*). La producción se reparte de la siguiente forma: el 52% se destina a naranjo dulce, el 37% a mandarino y el 10% a limonero. La citricultura española es una citricultura enfocada a la exportación de fruta fresca puesto que el 51% de la producción se exporta a diferentes países, principalmente de la Unión Europea (UE), siendo Alemania y Francia los principales clientes. El 33% de la producción se dedica a consumo interno y sólo un 16% se dedica a transformación. España ocupa un lugar importante en la producción cítrica mundial siendo el primer productor de la UE y séptimo mundial en producción de naranja dulce, tras países como Brasil (18.685.000 t), EEUU (7.357.000 t) o México (4.244.715) (FAOSTAT, 2007), y el

segundo productor más importante de mandarina tras China (15.184.608 t) (FAOSTAT, 2007). Las principales zonas de cultivo de cítricos en España son la Comunidad Valenciana (3.107.942 t) y Andalucía (1.436.854 t), destacando también el cultivo del limonero en la Región de Murcia (249.203 t) (Anónimo, 2009).

Estas cifras indican el peso específico de ambos cultivos dentro de la agricultura española. Por tanto, es muy importante mejorar en su competitividad para que sigan manteniendo su estatus tanto en la agricultura española como en la internacional. Esta mejora tiene varios puntos de vista: mejora de variedades y patrones, mejora en las técnicas de cultivo (riego, fertilización) y por supuesto, mejora en la protección de los mismos contra plagas y enfermedades. En este último aspecto se centra esta Tesis Doctoral.

## **1.2 PATRONES UTILIZADOS EN EL CULTIVO DE FRUTALES DE HUESO Y CÍTRICOS. CULTIVO EN VIVERO**

La propagación de árboles frutales mediante semilla tiene dos grandes inconvenientes. Los árboles frutales procedentes de semilla (francos) deben de cumplir un período de juvenilidad que normalmente oscila de entre 5-8 años hasta que llegan a la fase adulta. Durante este período presentan unas características no deseables como espinas, alto vigor, incapacidad de producir flores etc... que son incompatibles con la explotación comercial. Además, la composición genética de la mayoría de los árboles frutales es muy heterocigota y por tanto, sus características se pierden al ser propagados mediante semilla. Debido a esto surge el concepto de clon o material genéticamente uniforme procedente de un sólo individuo. El clon es el material que se propagará vegetativamente. Así, la mayoría de los árboles frutales están compuestos por dos partes, una parte aérea compuesta por la variedad cultivada (clon de una variedad de interés) y una parte subterránea compuesta por el patrón o portainjerto.

El patrón juega un papel muy importante en el desarrollo del árbol y por tanto en su producción, puesto que se trata de la parte subterránea la cual proporciona agua y nutrientes al resto de la planta. Más de 20 características hortícolas de una variedad se ven influenciadas por el patrón seleccionado, incluyendo el vigor y el tamaño del árbol, desarrollo y profundidad de las raíces, la cosecha, tamaño, textura, calidad intrínseca y época de maduración del fruto, tolerancia al frío, adaptación de las condiciones del suelo, tales como salinidad, pH, excesos y defectos de agua, comportamiento frente a nematodos, hongos, tolerancia a virus etc.... (Agustí, 2000). Por lo tanto, una correcta elección del patrón es fundamental para lograr una producción de calidad.

A continuación, se exponen algunas de las características de los principales patrones de frutales de hueso y cítricos empleados en España, muchos de los cuales han sido empleados en esta Tesis Doctoral.

## A) Patrones de frutales de hueso

### A.1) Patrones francos

**Nemaguard** (*Prunus persica* x *P. davidiana*): Patrón franco seleccionado en 1949 por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) en California. Se puede emplear como patrón de melocotonero, almendro, ciruelo y albaricoque. Produce árboles de muy buen vigor, con rápida entrada en producción, productividad mediana y con homogeneidad aceptable (Felipe, 1989). En zonas cálidas sale del reposo antes que otros francos por lo que adelanta algo la maduración y el calibre de las variedades precoces (Felipe, 1989). Es sensible a la clorosis férrica en suelos con un elevado pH o calizos (Felipe, 1989) y a la asfixia radicular (Reighard y Loreti, 2008). Reduce los posibles daños causados por frío en el cultivar injertado. Es resistente a los nematodos *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita* (Felipe, 1989; Reighard y Loreti, 2008), pudiéndose desarrollar en sus raíces la especie de nemátodo agallador *M. floridensis* (Nyczepir y Beckman, 2000). Sin embargo, es sensible al nematodo *Pratylenchus vulnus* y muy sensible al nematodo *Mexocriconema xenoplax* el cual induce heridas en la planta, por las cuales es fácil la entrada de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *syringae* produciendo la muerte de la planta. Este fenómeno es habitual en zonas de California y del sureste de Estados Unidos de América, fenómeno conocido como “Peach Tree Short Life” (PTSL) (Nyczepir et al., 1983). Es poco sensible a *Agrobacterium tumefaciens* pero sensible a *Armillaria mellea*, *Verticilium dahliae* y *Phytophthora spp.* Es el patrón de frutales de hueso más extendido en California y Sudamérica (Reighard y Loreti, 2008).

### A.2) Ciruelos

#### A.2.1) Ciruelos de crecimiento lento:

**Adesoto 101** (*P. insititia*): Patrón seleccionado en la estación experimental de Aula Dei (CSIC) en Zaragoza. La selección se realizó a partir de una población de “Pollizos de Murcia” (Cambra, 1970; 1979). Es el patrón más empleado en la región murciana (Moreno, 2003). Se puede emplear como patrón de melocotonero, almendro, ciruelo y albaricoquero (Reighard y Loreti, 2008). Se adapta bien a suelos calcáreos y compactos, siendo resistente a la asfixia radicular y a la clorosis férrica (Moreno et al., 1995). En melocotonero adelanta la producción con respecto a otros patrones como pueden ser los francos o los híbridos y produce árboles de menor tamaño (Moreno et al., 1995). Su propagación por estacilla leñosa es difícil, aunque actualmente se propaga mediante cultivo *in vitro*. Es resistente a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* y moderadamente tolerante a *P. vulnus* (Pinochet et al.,

1999). Presenta gran afinidad a la colonización por hongos micorrizantes (Calvet et., 2004).

### **A.2.2) Ciruelos de crecimiento rápido**

Este grupo de patrones se caracteriza por su crecimiento vigoroso durante los primeros años de su vida, una generalizada facilidad de propagación y una reducida polivalencia de compatibilidad de injerto comparada con los ciruelos de crecimiento lento (Felipe, 1989).

**Mirobolan 29C** (*P. cerasifera*): Introducido en el mercado por Gregory Brothers Nursery Co. (California, EEUU) (1920) y seleccionado por la Universidad de California (Davis) (Herrero, 1970). Se utiliza como patrón en ciruelo y albaricoquero. Es tolerante a la clorosis férrica y a la asfixia radicular. Es resistente a los nematodos del grupo de *Meloidogyne*, aunque sensible a *P. vulnus* (Felipe, 1989). Es moderadamente resistente a *A. mellea* y *A. tumefaciens* (Felipe, 1989).

**Mariana GF8-1** (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*): Seleccionado en la Estación Experimental de “La Grande Ferrade” del INRA en Burdeos (Francia). Se utiliza como patrón en ciruelo y albaricoquero, aunque no es compatible con algunas variedades de ciruelo europeo del grupo “Reina Claudia” y tampoco es compatible con algunas variedades de albaricoquero como “Canino”, “Moniqui”, “Búlida” y “Rouge du Roussillon” (Felipe, 1989). Produce árboles grandes, se adapta a todo tipo de suelos e induce una alta productividad y una buena calidad de los frutos. Es resistente a los nematodos del grupo de *Meloidogyne*, al hongo *A. mellea* y a la asfixia radicular. Es moderadamente resistente a *V. dahliae* y *A. tumefaciens*. Sin embargo, es sensible al mal del plomo en vivero (producido por *Stereum purpureum*). Se propaga fácilmente por estaquilla leñosa (Felipe, 1989).

### **A.3) Híbridos interespecíficos de melocotonero**

#### **A.3.1) Melocotonero x *Prunus davidiana***

**Cadaman** (*P. persica* x *P. davidiana*): Fue seleccionado en Hungría y de allí introducido en Francia por el INRA (Edin y Garcin, 1996). Se utiliza como patrón en melocotonero y almendro. Puede ser propagado por estaquilla o por propagación *in vitro*. El vigor inducido a la variedad injertada es alto pero tiende a desaparecer a los 4 ó 5 años. Además induce precocidad, productividad y un alto calibre (Reighard y Loreti, 2008). Es más tolerante a la asfixia radicular que otros melocotoneros e híbridos, es tolerante a la clorosis férrica y al replante. Es también resistente a los nematodos *M. incognita* y *M. javanica*.

### A.3.2) Híbridos de almendro x melocotonero

**GF677** (*P. dulcis* x *P. persica*): Híbrido de almendro por melocotonero, seleccionado en la estación francesa de “La Grande Ferrade” del INRA de Burdeos a partir de híbridos naturales reunidos entre 1944 y 1950 (Felipe, 1989). Patrón muy vigoroso, induce a la variedad hasta una 15% más de vigor, además proporciona un buen sistema radicular lo que le proporciona un buen anclaje (Reighard y Loreti, 2008). Compatible con variedades de melocotonero y almendro, así como con bastantes de ciruelo japonés y algunas de ciruelo europeo “d’Ente” y “Stanley” y de albaricoquero (Felipe, 1989). Retarda la maduración y se adapta a suelos pobres y con alta caliza activa (Reighard y Loreti, 2008). Debido a su alta vigorosidad no está recomendado en suelos fértiles o con altas densidades de plantación. Es sensible a la asfixia radicular y no se adapta a suelos arcillosos y fácilmente encharcables (Reighard y Loreti, 2008). Es sensible a *A. mellea*, *A. tumefaciens*, *Phytophthora cactorum* y *S. purpureum* (Loreti y Massai, 1995). Se propaga con dificultad mediante estaquillado clásico, pero muy bien *in vitro* (Cambra, 1979; Felipe, 1989).

**Garnem o GxN 15** (*P. dulcis* x ((*P. persica* x *P. davidiana*) x *P. persica*)): Híbrido entre almendro Garfi y el patrón franco de melocotonero de hoja roja Nemared (Felipe, 2009), que a su vez es procede de una F<sub>3</sub> del cruzamiento entre Nemaguard y el melocotonero de hoja roja “Bound Brook” (Ramming y Tammer, 1983). Garnem es un patrón de hoja roja desarrollado por el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Se utiliza como patrón de melocotonero y almendro, aunque también es compatible con ciruelos japoneses como las variedades “Santa Rosa” y “Golden Japan” y con variedades de albaricoquero como la “Paviot”. Los patrones sin injertar son vigorosos y el vigor que transmiten a la variedad injertada, así como la producción, es similar al logrado por otros patrones como GF677 o Hansen 536 (Felipe, 2009). Tiene un buen prendimiento de los injertos. Es poco exigente en horas frío y por eso se recomienda en zonas de producción precoz. Es tolerante a la clorosis férrica (De la Guardia et al., 1995). Se adapta bien a suelos pobres si éstos están bien drenados (Felipe, 2009). Como los almendros y los híbridos de almendro x melocotonero, presenta una baja tolerancia a la asfixia radicular y es resistente a la sequía. Es resistente a los nematodos agalladores del grupo *Meloidogyne* (Pinochet et al., 1999) por lo que es útil en situaciones de replante (Pinochet, 1997). Es sensible a *A. tumefaciens* y al nematodo lesionador *P. vulnus* (Pinochet et al., 1996). Se propaga muy bien por estaquilla y por cultivo *in vitro*.

## 2) Patrones de cítricos.

**Naranja amargo** (*Citrus aurantium*): Patrón más utilizado en la citricultura española desde principios del siglo XX hasta la década de 1970. Con la introducción y dispersión del virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV; *Closterovirus*) en nuestro país, se restringió su uso como patrón debido a la alta susceptibilidad de su combinación (Román et al., 2004). Posteriormente se prohibió

su uso en 1968 exceptuándose su combinación con el limonero, al ser tolerante esta combinación a los síntomas de tristeza (Agustí, 2000; Cambra et al., 2000a). Induce buena productividad y calidad de fruta en todas las variedades de naranjo y mandarino. En limonero induce miriñaque, un notable abultamiento en la zona superior del injerto que puede reducir la vida útil del árbol, siendo frecuente en variedades como “Verna” y “Eureka” (Agustí, 2000). Es tolerante a los viroides de la exocortis (*Citrus exocortis viroid*, CEVd; *Pospiviroides*) y de la cachexia (*Hop stunt viroid*, HSVd; *Hostuviroid*) y al virus de la psoriasis (*Citrus psorosis virus*, CPsV *Ophiovirus*). Es resistente a la asfixia radicular, salinidad, clorosis férrica y sequía, y a los hongos *A. mellea* y *Phytophthora* spp. (Agustí, 2000).

**Citrange Troyer** (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*): Híbrido entre naranjo dulce y *P. trifoliata*. Se caracteriza por ser patrón vigoroso y en general productivo. Las variedades sobre él injertadas entran pronto en producción, dando fruta de calidad y adelanto en la maduración. Es sensible a la caliza activa y a la salinidad. Es tolerante a tristeza, psoriasis y cachexia y moderadamente resistente a *Phytophthora* spp., aunque sensible a exocortis y a *A. mellea*.

**Citrange Carrizo** (*C. sinensis* x *P. trifoliata*): Híbrido entre naranjo dulce y *P. trifoliata*. Es el patrón de cítricos más utilizado en la citricultura española. En la Comunidad Valenciana el 70% de la producción de plantones producidos durante la campaña 2006-07 fueron sobre este patrón (ISAV, 2007). Es tolerante a CTV e induce combinaciones tolerantes al síndrome de tristeza, también tolera psoriasis y cachexia, pero es sensible a exocortis como citrange Troyer, aunque presenta mejores cualidades que éste. Es más resistente a la caliza activa, a la salinidad y a *Phytophthora* spp. e induce una mayor productividad y calidad (Agustí, 2000).

**Citrus macrophylla**: Es un híbrido probablemente de *C. celebica* x *C. grandis*, originario de Filipinas y morfológicamente y genéticamente es muy similar a limoneros y limas (Agustí, 2000). Es el segundo patrón más utilizado en la citricultura valenciana. Así, durante la campaña 2006-07, el 13% de los plantones comercializados fueron de este patrón (ISAV, 2007), siendo el más utilizado en limonero. Confiere una rápida entrada en producción y una productividad muy buena. En limonero no induce miriñaque. Posee buena resistencia a la salinidad y a la caliza activa, pero es muy sensible al frío y a la asfixia radicular. Es muy resistente a *Phytophthora* spp. pero muy sensible a nemátodos. Es sensible a CTV (Cambra y Moreno, 2000) pero induce una combinación tolerante a los síntomas de tristeza. Es tolerante a exocortis pero no a la cachexia.

**Citrus volkameriana**: Híbrido natural de limonero. Induce una buena producción pero menor a otros patrones. Resistente a la caliza activa y a la asfixia radicular. Presenta una resistencia media a la salinidad. Sin embargo, es sensible al frío, induce baja calidad de la fruta, fuerte heterogeneidad de plantas y sensible a *Phytophthora* spp. Es tolerante a CTV e induce combinaciones tolerantes al síndrome de tristeza.

**Mandarino Cleopatra** (*C. reshni* Hort ex Tanaka): Induce una producción de buena calidad aunque con un tamaño menor. Es resistente a la salinidad y a la caliza activa. Su comportamiento en vivero es malo, necesitando más de dos años de semillero para su producción, lo que alarga enormemente el período de formación de la planta. Da un vigor reducido a la planta y por lo tanto la entrada en producción es algo más tardía que con otros patrones (Agustí, 2000). Tolerante a tristeza, exocortis, psoriasis y cachexia. Menos resistente a *Phytophthora* spp. que los citranges. Es tolerante a CTV e induce combinaciones tolerantes al síndrome de tristeza.

Debido a que la comercialización de las plantas empieza en vivero, la elección de la combinación variedad/patrón, así como el estado sanitario de la planta es fundamental para el agricultor, ya que de ello dependerá la posterior producción.

Generalmente, el periodo que permanece un plantón en vivero en condiciones de campo es de 2 ó 3 años. Con la producción en invernadero este período se puede rebajar hasta los 12-18 meses (Agustí, 2000).

El buen estado sanitario de las plantas de vivero es fundamental para impedir la comercialización de plantas infectadas con alguna enfermedad que pueda repercutir en la producción y ocasionar pérdidas económicas. La gran densidad de plantación (aproximadamente de 50.000-100.000 planta/ha) hace que este control sanitario sea sumamente dificultoso y brotes de cualquier enfermedad sean difíciles de atajar. Tradicionalmente se ha estudiado la epidemiología y el control de las enfermedades que afectan a frutales en parcelas de árboles adultos, pero hay una falta de conocimientos sobre estos temas en el ámbito viverístico. Por ello, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral es proporcionar conocimientos sobre la epidemiología de los virus estudiados en vivero, para desarrollar estrategias de control de dos de las enfermedades virales transmitidas por pulgones más importantes que afectan a los frutales de hueso (sharka) y a los cítricos (tristeza).

### **1.3 VIROSIS TRANSMITIDAS POR PULGONES. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN**

Los virus vegetales son parásitos intracelulares obligados, que requieren ser transmitidos de una planta hospedadora a otra. Debido a su incapacidad de atravesar la pared celular de las plantas los virus han diseñado diferentes procedimientos entre los que incluyen transmisión por polen, semilla, o propagación vegetativa. No obstante, la mayor parte de los virus vegetales requieren de un insecto vector para ser transmitidos (Ferreles y Moreno, 2009). El impacto económico producido por las virosis vegetales transmitidas por insectos es muy grande, ocupando el segundo lugar

tras los hongos, en cuanto a daño económico producido sobre las cosechas por agentes fitopatógenos (Hull, 2002).

Los insectos capaces de transmitir virus vegetales pertenecen a diferentes órdenes (*Hemiptera*, *Coleoptera*, *Thysanoptera*, *Orthoptera*, *Dermaptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*), siendo el orden *Hemiptera* el orden con mayor número de especies vectoras, y más concretamente los subórdenes *Auchenorrhyncha* (cicadélidos) y *Sternorrhyncha* (pulgones, moscas blancas, cochinillas y psílidos). Los insectos pertenecientes a estos subórdenes se les conoce con el nombre genérico de hemípteros (Ferreles y Moreno, 2009).

Los hemípteros son responsables de la transmisión del 55% de los virus vegetales conocidos, siendo las familias *Aphididae* (pulgones) y *Aleyrodidae* (moscas blancas) las familias con un mayor número de especies vectoras (Nault, 1997; Hull, 2002; Jones, 2003).

La efectividad de los hemípteros como vectores virales radica en las características de su biología y alimentación, así como en la morfología de su aparato bucal, de tipo picador-chupador que minimiza los daños en la planta. Además la alta tasa de crecimiento de la población, el corto ciclo de vida y el alto potencial de dispersión hacen que los pulgones (junto con las moscas blancas) sean el principal grupo de insectos vectores de plantas (Ferreles y Moreno, 2009).

El proceso de transmisión de virus mediante vectores implica una interacción directa entre los tres principales factores involucrados: el hospedador, el virus y el vector. Este proceso está compuesto por varias fases:

**Fase de adquisición:** durante esta fase el vector se alimenta o prueba sobre la planta infectada adquiriendo el virus.

**Período de latencia:** tiempo que transcurre entre que el vector adquiere el virus y es capaz de transmitirlo. No todos los virus requieren de esta fase para ser transmitidos.

**Período de retención:** período durante el cual el vector es capaz de transmitir el virus.

**Fase de inoculación:** proceso por el cual el virus es inoculado en la planta receptora durante el proceso de alimentación o prueba del vector.

En función de la duración de estas fases y del lugar donde queda retenido el virus en el vector, los virus vegetales se clasifican en dos grupos: virus no circulativos y virus circulativos o persistentes.

Recientemente, Ferreles y Moreno (2009), basándose en el lugar de retención del virus en el cuerpo del vector, propusieron la denominación de virus transmitidos

a través de la cutícula (“cuticula borne”) para referirse a los virus no circulativos y virus transmitidos a través de las glándulas salivales (“salivary gland-borne”) para referirse a los virus circulativos.

Entre los virus circulativos o persistentes, podemos diferenciar entre propagativos o no propagativos, según su capacidad para replicarse en el vector. Estos virus suelen estar confinados a floema por lo que su adquisición se realiza cuando el pulgón se alimenta en éste. Una vez que el virus llega al intestino del pulgón se produce una endocitosis mediada por receptor por la que el virus es transportado al hemocele del insecto. Allí viaja hasta las glándulas salivares accesorias siendo inoculado a la planta receptora mediante salivación (Gray, 1996; Gray y Barnejee, 1999).

Los virus no circulativos son aquellos que no logran traspasar las paredes de tracto digestivo y alcanzar el hemocele del insecto, quedando retenidos en la cutícula del insecto (Syller, 2006; Fereres, 2007). Dentro de los virus no circulativos se distinguen entre virus no persistentes y semipersistentes (Watson y Roberts, 1939; Sylvester, 1956). Los virus no persistentes se caracterizan por ser adquiridos e inoculados tras breves pruebas en la epidermis y mesófilo de la planta ( $\approx 1$  min). Las partículas virales son retenidas en la parte distal del estilete del pulgón, por lo que también se denominan virus transmitidos a través del estilete (“stylet-borne”) (Kennedy, 1962), transmitiéndose mediante un mecanismo de ingestión-salivación (Martín et al., 1997, Powell, 2005b). Los géneros *Alfamovirus*, *Carlamovirus*, *Cucumovirus*, *Fabavirus* y *Potyvirus* se transmiten de manera no persistente. Los pulgones son los únicos insectos vectores capaces de transmitir virus no persistentes (Ng y Falk, 2006).

Los virus semipersistentes tienen un fase de adquisición y un período de retención más largo que los virus no persistentes. Aunque en la mayoría de los casos tanto la adquisición como la inoculación viral se realiza en el floema de la planta (Ng y Falk, 2006), en el caso del Virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, *CaMV*; *Caulimovirus*) la adquisición y la inoculación también pueden producirse en tejidos no floemáticos (Palacios et al., 2002; Moreno et al., 2005). Recientemente se ha demostrado, como en el caso del CaMV, que la retención de las partículas se produce en la región distal del estilete, como en el caso de los virus no persistentes (Uzest et al., 2007), sin poder descartar un segundo receptor en el tracto digestivo del pulgón. Son transmitidos de manera semipersistente los géneros *Carlavirus*, *Caulimovirus*, *Closterovirus*, *Sesquimovirus* y *Vitivirus*. Además de los pulgones, las moscas blancas y los cicadélidos son capaces de transmitir virus vegetales de forma semipersistente (Ng y Falk, 2006).

Una característica que diferencia a los virus no circulativos y circulativos es la especificidad virus-vector. Los virus no circulativos tienen una baja especificidad lo que hace que un mismo virus no circulativo pueda ser transmitido por distintas especies de pulgones vectores y que una misma especie de pulgón pueda transmitir

distintas especies de virus. Lo contrario ocurre con los virus circulativos o persistentes, puesto que la especificidad virus-vector es alta. Esta especificidad viene dada principalmente por la interacción entre la proteína de la cápsida viral y los receptores situados en las glándulas salivares accesorias del vector (Brault et al., 2001).

En la Tabla 1.1, tomada de Moreno (2005), se exponen las características principales de los diferentes virus de vegetales transmitidos por insectos.

**Tabla 1.1: Principales características de los virus de vegetales transmitidos por insectos**

Características	No circulativos		Circulativos	
	No persistente	Semipersistente	No propagativo	Propagativos
<b>Fase Adquisición</b>	Segundos, minutos	Minutos, horas	Horas a días	Horas a días
<b>Período Retención</b>	Minutos	Horas	Días a semanas	Semanas a meses
<b>Período de Latencia</b>	No	No	Días a semanas	Semanas a meses
<b>Multiplicación en el vector</b>	No	No	No	Si
<b>Transmisión transovarial</b>	No	No	No	A veces
<b>Insecto virulífero tras muda</b>	No	No	Si	Si
<b>El virus atraviesa las membranas del vector</b>	No	No	Si	Si
<b>Tejidos vegetales donde tiene lugar la transmisión</b>	Epidermis	Epidermis/Mesófilo Floema	Floema	Floema
<b>Mecanismo transmisión</b>	Ingestión-Salivación	Ingestión-Salivación o Egestión	Ingestión-Salivación	Ingestión-Salivación
<b>Lugar de retención del virus</b>	Estilete	Superficie stomodeum	Hemocele	Hemocele
<b>Lugar de salida del virus</b>	Canal alimenticio	Canal alimenticio	Canal salival	Canal salival

#### 1.4 LA ENFERMEDAD DE LA SHARKA DE FRUTALES DE HUESO

La sharka es la principal enfermedad viral que afecta a los frutales de hueso. La enfermedad fue descrita por primera vez por Atanassov (1932) en Bulgaria, aunque había sido observada entre 1917-1918 en *Prunus domestica* “Kjustendil”. Desde entonces se ha extendido por toda Europa y a lo largo de la costa mediterránea, alcanzando incluso el Oriente Medio (Roy y Smith, 1994). La enfermedad también ha sido descrita en Sudamérica (Chile y Argentina) y Norteamérica (EEUU y Canadá) (Roy y Smith, 1994; Levy et al., 2000; Thompson et al., 2001; Dal Zotto et al., 2006) y en Asia (Kazakhstan, China y Pakistán) (Spiegel et al., 2004; Navrátil et al., 2005; Kollerová et al., 2006), llegando a las más importantes zonas productoras de frutales de hueso, exceptuando Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y California (EEUU) (Cambra et al., 2006c; García y Cambra, 2007). La rápida dispersión de PPV a lo largo de la geografía mundial se debe,

principalmente, al tráfico de material infectado, a la fácil transmisión por injerto y a la eficiencia en la dispersión natural producida por sus vectores naturales, los pulgones (Cambra et al., 2006c).

El agente causal de la sharka es *Plum pox virus* (PPV), perteneciente al género *Potyvirus* (López Moya et al., 2000; García y Cambra, 2007). Su transmisión natural es mediante pulgones de forma no persistente (Ng y Falk, 2006) siendo sus principales especies vectoras (*Myzus persicae* Sulzer, *Aphis spiraecola* Pagenstecher, *A. gossypii* Glover, *A. fabae* Scopoli y *A. craccivora* Koch (Labonne et al., 1995).

En la actualidad se dispone de abundante información molecular del virus (Olmos et al., 2006; James y Glasa 2006), de la función de genes de su genoma (García y Cambra, 2007) y se ha usado como vector en biotecnología (García et al., 2006). Existen varios tipos de aislados de este virus, que varían en su sintomatología, epidemiología y agresividad. Estas diferencias han sido serológica y molecularmente descritas (Candresse y Cambra, 2006; Cambra et al., 2006a). Se han descrito 7 tipos: PPV-D (Dideron), PPV-M (Marcus), PPV-EA (El Amar), PPV-C (Cherry), PPV-W (Winona), PPV-Rec (recombinante entre D y M) y PPV-T (Turquía, recombinante) (Candresse y Cambra, 2006; James y Glasa, 2006; Ulubas Serçe et al., 2009).

De todos ellos, los tipos más predominantes son PPV-D y PPV-M. El tipo PPV-D, único dispersado ampliamente en España, causa daños en albaricoquero y en ciruelo europeo, produciendo graves pérdidas en variedades tempranas de los mismos, pero afecta poco a ciruelo japonés, y no se dispersa naturalmente entre cultivares de melocotonero o lo hace con poca eficacia. No infecta a almendros (*P. dulcis*) y cerezos (*P. cerasus*). Los síntomas originados por PPV-D son la aparición de manchas cloróticas en las proximidades de las nerviaduras foliares y en los frutos. En algunos casos el virus origina en los frutos deformaciones y “acorchados” que deprecian su consumo en fresco e incluso impiden su utilización en la industria por su mal sabor.

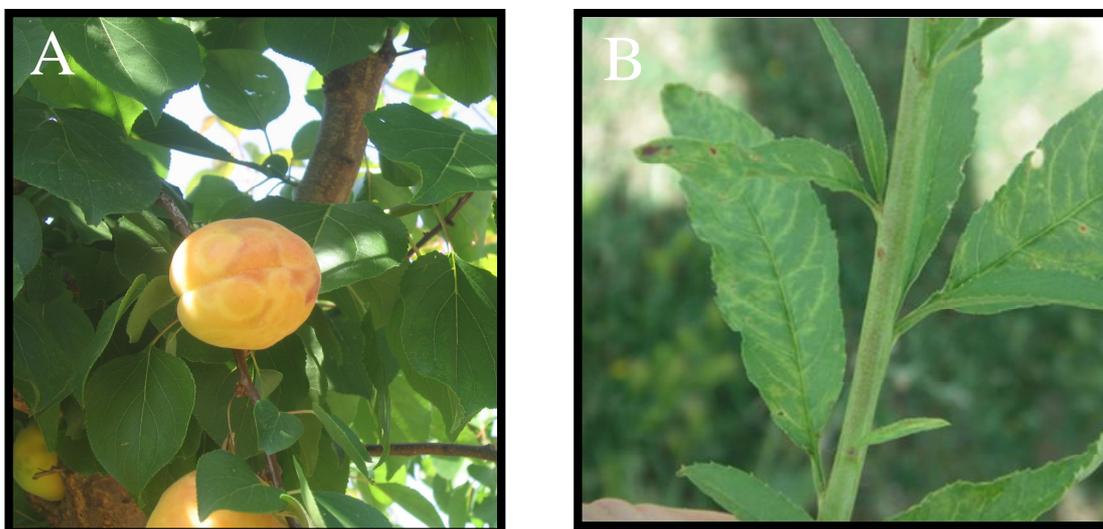
El tipo M se caracteriza por su mayor agresividad y su más rápida dispersión, afectando más gravemente a todos los tipos de melocotoneros, ello ha sido considerada una de las enfermedades más graves de dicho cultivo. Consecuentemente, su introducción en las zonas de cultivo de melocotonero españolas sería devastadora.

Las pérdidas producidas por la sharka a lo largo de los últimos 30 años en todo el mundo se han evaluado en unos 10.000 millones de euros (Cambra et al., 2006c). En España se detectó por primera vez PPV-D en 1984 en Sevilla, concretamente en ciruelo japonés “Red Beaut”, y fundamentalmente con dicha especie se extendió por las zonas templadas de cultivo de Murcia y Valencia. En las condiciones españolas mediterráneas, *A. spiraecola*, y *A. gossypii* son los principales vectores responsables de la dispersión natural de la enfermedad (Cambra et al., 2004, 2006b). La enfermedad se extendió rápidamente entre ciruelos japoneses y

albaricoqueros, no ocasionando daños en la producción de melocotonero. Desde 1989 más de 2,3 millones de árboles han sido arrancados en Aragón, Murcia y Valencia, con un coste total de 63 millones de euros, incluyendo los costes de renovación de plantación y pérdidas de la producción (Cambra, et al., 2006d).

PPV-M fue detectado en España en julio de 2002 en Aragón y rápidamente fue erradicado de la zona (Cambra, et al., 2006d; Capote et al., 2010), impidiendo su dispersión y las cuantiosas pérdidas económicas que se podían producir en la industria del melocotonero. Actualmente existe un foco en Cataluña y se está procediendo a su erradicación (comunicación personal Dr. Mariano Cambra, 2010).

**Figura 1.1: Sintomatología típica producida por la enfermedad de la sharka (A: fruto de albaricoque; B: hojas del patrón Nemaguard)**



## 1.5 LA ENFERMEDAD DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

La enfermedad de la tristeza de los cítricos es la enfermedad viral más importante que ha afectado a la citricultura mundial y que ha producido un mayor número de pérdidas económicas (Bar-Joseph et al., 1989; Moreno et al., 2008). Se estima que más de 100 millones de árboles de naranjo dulce, mandarino y pomelo injertados sobre naranjo amargo han muerto desde 1930 por tristeza en todo el mundo (Román et al., 2004).

El agente causal de la tristeza es *Citrus tristeza virus*, miembro del género *Closterovirus* (Karasev et al., 1995). Los huéspedes naturales del virus de la tristeza se encuentran dentro de los géneros *Citrus* y *Fortunella* de la familia *Rutaceae* (Cambra y Moreno, 2000). Dependiendo de los aislados virales y de las combinaciones variedad/patrón, CTV puede causar tres distintos síndromes (Moreno et al., 2008).

**Tristeza:** Es el síndrome más conocido producido por CTV. Se caracteriza por un decaimiento o marchitez del naranjo dulce, mandarino, pomelo, kumkuat o lima cuando están injertados sobre naranjo amargo o limonero. Este decaimiento se caracteriza por clorosis y posterior defoliación del árbol. El decaimiento se puede producir de forma progresiva o de forma súbita produciéndose el fenómeno conocido como decaimiento rápido (“quick decline”) (Román et al., 2004). Este síndrome puede ser impedido si se emplean patrones tolerantes al síndrome, en lugar del naranjo amargo o el limonero (Cambra y Moreno, 2000; Moreno et al., 2008).

**Acanaladuras en la madera** (“stem pitting”): A este síndrome se asocia el síntoma de clorosis nervial y la infección con los aislados más agresivos de CTV. Este síndrome se produce tanto en plantas francas como en plantas injertadas sobre cualquier patrón de cítricos (Cambra y Moreno, 2000). Se caracteriza por la formación de depresiones en ciertas zonas del cambium, estas depresiones pueden ser más acentuadas impidiendo el crecimiento en grosor de la planta lo que puede producir enanismo, hojas tiernas y amarillas, frutos pequeños con poco zumo no comerciales, y por tanto pérdida en producción (Rocha-Peña et al., 1995; Broadbent et al., 1996).

**Amarillez de plantas francas de pie** (“seedling yellows”): es un síndrome asociado al virus de la tristeza (Rocha-Peña et al., 1995) que se utiliza para caracterizar biológicamente aislados en invernadero (Cambra y Moreno, 2000). Se caracteriza por enanismo, producción de hojas pequeñas pálidas o amarillas, una reducción del sistema radicular y en ocasiones un cese completo del crecimiento de plantas francas de naranjo amargo, pomelo o limonero (Fraser, 1952; Mc Clean, 1960).

CTV es transmitido mediante propagación vegetativa de material infectado y por pulgones de forma semipersistente; no se transmite por semilla. La densidad poblacional y hábitos de los vectores, la densidad de inóculo, las especies de cítricos predominantes y la intensidad y duración de brotación, son factores que determinan la velocidad de dispersión de CTV en cada zona (Roistacher y Bar-Joseph, 1984; Hermoso de Mendoza et al., 1988; Marroquín et al., 2004). Su vector más eficaz en campo es el pulgón *Toxoptera citricida* Kirkaldy, capaz de dispersar las razas más agresivas del virus (Yokomi et al., 1994). *T. citricida* se encuentra actualmente dispersado por Asia, Australia, África subsahariana, Sudamérica, Centroamérica, diferentes países del Caribe y Florida (EEUU) (Costa y Grant, 1951; Mc Clean, 1975; Yokomi et al., 1994; Rocha-Peña et al., 1995; Halbert et al., 2004). Actualmente también se ha detectado su presencia en Madeira (Portugal) y diferentes zonas del norte de Portugal y España (Hermoso de Mendoza et al., 2008), poniendo en peligro la citricultura de nuestro país. *A. gossypii* ha resultado ser el vector más eficaz de CTV cuando *T. citricida* no está presente, siendo el vector principal en regiones como España, Israel o California (EEUU) (Racah et al., 1976; Hermoso de Mendoza, 1984; Cambra et al., 2000a; Yokomi y DeBorde, 2005). Yokomi et al.

(1994), demostraron como *T. citricida* era de 6-25 veces más eficaz a la hora de transmitir el virus de la tristeza que *A. gossypii*. Otras especies de pulgones capaces de transmitir el virus, pero con eficacias menores, son: *A. spiraecola* y *T. aurantii* Boyer de Fonscolombe (Hermoso de Mendoza et al., 1984), *M. persicae* (Varma et al., 1960), *A. craccivora* y *Ureleucon jaceae* Linneaus (Varma et al., 1965).

El virus de la tristeza fue probablemente introducido en España entre 1930-35 con plantas de vivero de Washington navel importadas de California (EEUU). Sin embargo, la enfermedad no se citó hasta 1959 (Planes et al., 1965) después de un brote en 1957 en La Ribera Alta (Valencia) (Cambra et al., 2000a). Desde su introducción, España ha sido el área citrícola mundial con el mayor número de árboles muertos por tristeza, más de 40 millones (Cambra et al., 2000a) y evaluándose en más de 50 en la actualidad (M. Cambra, comunicación personal, 2010). La sustitución del naranjo amargo por patrones tolerantes a la tristeza ha sido la estrategia seguida en España para el control de la enfermedad; actualmente el 97% de la citricultura española está plantada sobre patrones que inducen tolerancia al síndrome de tristeza. Para ello, se inició en 1975 el Programa de Saneamiento, Cuarentena y Certificación (Navarro et al., 2002), el cual proporciona a los viveristas material libre, no sólo de CTV, sino de todos los patógenos transmisibles por injerto, dando al control de enfermedades en vivero un papel fundamental en la producción citrícola.

## 1.6 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE *Plum pox virus* Y *Citrus tristeza virus*

### A) *Plum pox virus*

**A.1) Métodos biológicos:** Se recomiendan como plantas indicadoras para la detección de PPV mediante métodos biológicos los melocotoneros de semilla GF305 (*Prunus persica*) y Nemaguard además de *P. tomentosa* (OEPP/EPPO, 2004b; Gentit, 2006). En GF305 los síntomas de PPV-D, -M y -EA son parecidos: clorosis internervial en las hojas de las brotaciones jóvenes y deformación y curvatura de las hojas si los síntomas son fuertes. Se ha observado como en GF305 los síntomas producidos por el aislado PPV-C son más débiles. En *P. tomentosa* se puede distinguir entre aislados D y M, puesto que estos últimos aparte de las clorosis típicas desarrollan necrosis en las hojas (Damsteegt et al., 1997).

**A.2) Métodos serológicos:** El protocolo OEPP/EPPO (2004b) recomienda el anticuerpo monoclonal para la detección universal de PPV, 5B-IVIA (Cambra et al., 1994). Este anticuerpo es el único que puede detectar todos los aislados de PPV citados hasta la fecha (Cambra et al., 2006a). En cuanto a la caracterización de los aislados, el mismo protocolo indica que para la caracterización de los aislados PPV-D recomienda los anticuerpos monoclonales 4DG5 y 4DG11 (Cambra et al., 1994) y para la caracterización de aislados PPV-M recomienda el anticuerpo monoclonal AL

(Boscia et al., 1997). Este anticuerpo también reconoce a aislados del tipo Rec (Cambra et al., 2006a). Otros anticuerpos monoclonales útiles en la caracterización de aislados de PPV son: EA24 (Myrta et al., 1998) que detecta aislados del tipo El Amar y los anticuerpos AC y TUV (Myrta et al., 2000), que detectan aislados del tipo PPV-C. El uso de anticuerpos policlonales no está recomendado debido a su pobre especificidad, baja homogeneidad entre las partidas y que sólo del 10-15% de los anticuerpos obtenidos reaccionan contra el antígeno diana, además se pueden dar fenómenos de reacción cruzada entre el anticuerpo policlonal y otros virus o huéspedes (Cambra et al., 2006a).

**A.3) Métodos moleculares:** El protocolo OEPP/EPPO (2004b) recomienda el uso de las técnicas moleculares de Inmuncaptura RT-PCR (IC-RT-PCR) (Wetzel 1991, 1992; Olmos et al., 1997) y la PCR cooperativa (Co-PCR) (Olmos et al., 2002). Por ambas técnicas se puede caracterizar un aislado como PPV-D o -M. A parte de las técnicas moleculares anteriormente descritas, para la detección de PPV tanto en material vegetal como en pulgones se pueden emplear otras técnicas como “squash capture”-PCR (Olmos et al., 1997), Nested-PCR en un solo tubo cerrado (Olmos et al. 1999), RT-PCR a tiempo real (Scheider et al., 2004, Olmos et al., 2005, Varga y James 2005, 2006a; Capote et al., 2006) o “Spot” RT-PCR a tiempo real (Capote et al., 2009). Actualmente esta última técnica ha sido evaluada y se ha incluido en el nuevo protocolo de diagnóstico de PPV realizado por la IPPC (International Plant Protection Convention) de FAO. Otras técnicas moleculares sin necesidad de termociclador han sido desarrolladas para la detección de PPV, como la RT-LAMP (“Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification”) (Varga y James 2006b) y NASBA (“Nucleic Acid Sequence-Based Amplification”) (Olmos et al., 2007).

## **B) *Citrus tristeza virus***

**B.1) Métodos biológicos:** El protocolo OEPP/EPPO (2004a) recomienda como planta indicadora la lima mejicana (*Citrus aurantifolia*). La prueba biológica de la lima mejicana es muy sensible, aunque se han descrito aislados como el K, que no induce reacción (Albertini et al., 1988; Bové et al., 1988). Patotipos débiles sobre la propia lima son detectados con dificultad. La prueba biológica utilizando lima mejicana presenta el inconveniente de la lentitud en el diagnóstico, el alto coste y la imposibilidad de ser usada a gran escala (Cambra, 1983). Garnsey et al. (2005) diseñaron un protocolo para caracterizar biológicamente aislados de CTV, utilizando cinco tipos de plantas indicadoras (lima mejicana, pomelo Duncan, naranjo dulce Madame Vicious y naranjo amargo), además de la combinación de naranjo dulce sobre naranjo amargo. Según este protocolo se han citado 11 tipos de CTV o patotipos, tras analizar 266 aislados de 30 países (Garnsey et al., 2005). Además, Pina et al. (2005) recomiendan el uso de la combinación naranjo amargo sobre naranjo dulce para evaluar la capacidad de inducir decaimiento.

**B.2) Métodos serológicos:** El protocolo OEPP/EPPO (2004a) recomienda la utilización para la detección general o universal de CTV la utilización de las técnicas Inmunoimpresión-ELISA (Garnsey et al., 1993; Cambra et al., 2000b) o de ELISA-DAS (Garnsey y Cambra, 1991) empleando la mezcla de los anticuerpos monoclonales 3DF1 + 3CA5 específicos de CTV (Cambra et al., 1990). Estos anticuerpos monoclonales detectan todos los aislados de CTV analizados (Cambra et al., 2000a). Para la caracterización de aislados de CTV se han utilizado varios anticuerpos monoclonales (Vela et al., 1986; Gumpf et al., 1987; Tsai y Su, 1991; Nikolaeva et al., 1998), aunque el más utilizado y el único que puede diferenciar aislados con diferente comportamiento biológico es MCA13 (Permar et al., 1990), ya que reconoce un epítipo muy conservado en aislados agresivos y capaces de causar decaimiento de árboles injertados sobre naranjo amargo, pero poco conservado en aislados suaves de Florida (Pappu et al., 1993). Se ha utilizado extensivamente para caracterizar serológicamente aislados de CTV (Cambra et al., 2000a)

**B.3) Métodos moleculares:** El protocolo OEPP/EPPO (2004a) recomienda para detección universal de CTV las técnicas moleculares Inmuncaptura-RT-PCR (IC-RT-PCR) (Wetzel et al., 1992; Nolasco et al., 1993; Rosner et al., 1998) y la técnica Inmuncaptura-Nested RT-PCR en un solo tubo (Olmos et al., 1999). Aparte de estas dos técnicas moleculares también se han desarrollado otras técnicas para la detección de CTV como Co-PCR utilizando una sonda universal de hibridación sobre los productos de PCR (Olmos et al., 2002). También se han desarrollado diversos procedimientos utilizando RT-PCR cuantitativa a tiempo real para detección de CTV en material vegetal y pulgones (Ruiz-Ruiz et al., 2007; Bertolini et al., 2008; Saponari et al., 2008). Bertolini et al. (2008) desarrollaron la técnica “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección universal de CTV en material vegetal sin necesidad de extracción de ácidos nucleicos. Esta técnica está siendo evaluada para ser incorporada al nuevo protocolo internacional IPPC- FAO para la detección de CTV, siendo éste uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral. Para la caracterización molecular de aislados de CTV se han utilizado varios procedimientos entre ellos: 1) el patrón de los dsRNA (Dodds et al., 1987; Moreno et al., 1990; Guerri et al., 1991; Moreno et al., 1993), 2) hibridación tomando como patrón ADNc o ARNc de varias regiones del ARNg de CTV (Rosner y Bar-Joseph, 1984; Rosner et al., 1986; Albiach-Martí et al., 2000; Narváez et al., 2000), 3) utilización de la técnica RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) para el análisis del gen que codifica la proteína de la cápsida (Gillings et al., 1993; Roy et al., 2003), 4) utilización de patrones de amplificación mediante RT-PCR con iniciadores de PCR específicos de diferentes genotipos de CTV (Hilf et al., 1999, 2005). Más recientemente se han publicado trabajos que proponen la técnica RT-PCR a tiempo real para distinguir aislados de CTV suaves de agresivos (Ruiz-Ruiz et al., 2009; Yokomi et al., 2010).

### 1.7. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y MEDIDA DE LA COINCIDENCIA ENTRE DOS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO (ÍNDICE KAPPA DE COHEN)

El control en vivero de cualquier agente fitopatógeno (virus, bacteria, fitoplasma o viroide) es fundamental. La comercialización de material vegetal infectado puede acarrear graves consecuencias económicas, asociadas a la dispersión de la enfermedad en la zona de cultivo. Para ello, junto al control de la enfermedad en vivero, un aspecto de suma importancia es la pronta y correcta detección del agente fitopatógeno. El desarrollo de técnicas de diagnóstico precisas es básico para lograr este objetivo.

Para validar cualquier técnica de diagnóstico es necesario conocer los diferentes parámetros de diagnóstico que la caracterizan. Estos son: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, razones de verosimilitud “likelihood ratio” positivo y negativo y precisión. Para ello, generalmente se compara la técnica a validar con una técnica de referencia o “gold standard”, la cual determinará el verdadero estado sanitario de los individuos analizados (Kraemer, 1992; Altman y Brand, 1994a; Enøe et al., 2000). Los resultados obtenidos se clasifican como se describe en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2: Tabla de contingencia para el cálculo de los diferentes parámetros de una técnica de diagnóstico**

		Técnica de referencia		Total
		Positivo (Infectado)	Negativo (No infectado)	
Técnica a validar	Positivo	A	B	A+B
	Negativo	C	D	C+D
	Total	A+C	B+D	N

*A=Verdaderos positivos; B=Falsos positivos; C=Falsos negativos; D=Verdaderos negativos; A+C=Total enfermos; B+D=Total sanos; A+B=Total positivos detectados por la técnica a validar; C+D=Total negativos detectados por la técnica a validar; N=Total individuos analizados*

Los parámetros de diagnóstico más comunmente utilizados son la sensibilidad y la especificidad (Drobotz, 2009).

**Sensibilidad:** es la proporción de verdaderos positivos (plantas infectadas) que han sido correctamente identificados por la técnica a evaluar (Altman y Brand, 1994a).

$$\text{Sensibilidad (SE)} = A / (A+C) \quad (\text{Fórmula 1.1})$$

**Especificidad:** es la proporción de verdaderos negativos (plantas sanas) que han sido correctamente identificados por la técnica a evaluar (Altman y Brand, 1994a)

$$\text{Especificidad (SP)} = B / (B+D) \quad (\text{Fórmula 1.2})$$

Sin embargo, aunque se conozca la sensibilidad y la especificidad de la prueba a evaluar, es necesario establecer la probabilidad de que ésta ofrezca un diagnóstico verdadero (Altman y Brand, 1994b). Esto se consigue mediante los valores predictivos.

El **valor predictivo positivo** responde a la pregunta de si todos los positivos detectados por la técnica son verdaderos positivos. Se define como la proporción de individuos identificados como positivos por la técnica a evaluar y que son correctamente diagnosticados (Altman y Brand, 1994b). Se puede definir también, como la proporción entre el número de verdaderos positivos detectados por la técnica y el total de positivos detectados (Staquet et al., 1981).

$$\text{Valor predictivo positivo (VPP)} = A / (A+B) \quad (\text{Fórmula 1.3})$$

El **valor predictivo negativo** responde a la pregunta de si todos los negativos detectados por la técnica son verdaderos negativos. Se define como la proporción de individuos identificados como negativos por la técnica a evaluar y que son correctamente diagnosticados (Altman y Brand, 1994b). Se puede definir también, como la proporción entre el número de verdaderos negativos detectados por la técnica y el total de negativos detectados (Staquet et al., 1981).

$$\text{Valor predictivo negativo (VPN)} = D / (C+D) \quad (\text{Fórmula 1.4})$$

Otro aspecto importante a definir es el término **prevalencia** (PR). Así, la prevalencia se define como el número de casos de una enfermedad (o número de plantas infectadas) que se presenta en una población determinada en un tiempo dado (Martin, 1984).

La sensibilidad y la especificidad no dependen de la prevalencia, ni la tienen en cuenta, mientras que los valores predictivos sí se ven influenciados por ella (Martin, 1984; Altman y Brand, 1994b). Al aumentar la prevalencia el valor predictivo positivo aumenta mientras el valor predictivo negativo disminuye, y viceversa (Drobotz, 2009). La relación entre los valores predictivos y la prevalencia se exponen a continuación, extraídos de Altman y Brand (1994b).

$$VPP = SE \times PR / (SE \times PR) + [(1-SP) \times (1-PR)] \quad (\text{Fórmula 1.5})$$

$$VNP = SP \times (1-PR) / [(1-SE) \times PR] + [SP \times (1-PR)] \quad (\text{Fórmula 1.6})$$

Sin embargo, pocas pruebas de diagnóstico tienen la suficiente precisión como para admitir o descartar la enfermedad por sí solos según su resultado. Para interpretar los resultados se debe tener información no sólo de la prueba sino del individuo evaluado, en su caso de la población de procedencia (Bianchi y Alexander, 2006). Esto requiere la estimación de la probabilidad pre-test (prevalencia) que será ajustada según el resultado de la prueba. El factor que convierte la probabilidad pre-test en probabilidad post-test (probabilidad real de estar sano o enfermo/infectado) a partir del resultado del test, es **la razón de verosimilitud** o “likelihood ratio” (Bianchi y Alexander, 2006) (ver Anejo A.1). Así, la razón de verosimilitud nos indica la magnitud por la cual la probabilidad de un diagnóstico en un individuo es modificada por el resultado de una prueba (Halkin et al., 1998; Deeks y Altman, 2004). Se define como la probabilidad de obtener un determinado resultado (positivo o negativo) por un test particular de diagnóstico en una población de individuos enfermos partido por la probabilidad de obtener ese mismo resultado en una población de individuos sanos (Dujardin et al., 1994; Giard y Hermans, 1996). La razón de verosimilitud tiene dos valores: uno positivo y otro negativo.

**La razón de verosimilitud positiva** (“positive likelihood ratio”) se define como la probabilidad que un individuo enfermo (infectado) obtenga un resultado positivo dividido por la probabilidad que un individuo sano obtenga un resultado positivo (Drobatz, 2009). También, puede ser definida como la proporción de verdaderos positivos dividido por la proporción de falsos positivos (López et al., 2008; Drobatz, 2009). Su relación con la sensibilidad y la especificidad se expone a continuación:

$$\text{Razón de verosimilitud positiva (LR+)} = SE / (1-SP) \quad (\text{Fórmula 1.7})$$

**La razón de verosimilitud negativa** (“negative likelihood ratio”) se define como la probabilidad de que un individuo enfermo (infectado) obtenga un resultado negativo dividido por la probabilidad de que un individuo sano obtenga un resultado negativo (Drobatz, 2009). También puede ser definida como la proporción de falsos negativos dividido por la proporción de verdaderos negativos (López et al., 2008; Drobatz, 2009). Su relación con la sensibilidad y la especificidad se expone a continuación:

$$\text{Razón de verosimilitud negativa (LR-)} = (1-SE) / SP \quad (\text{Fórmula 1.8})$$

La razón de verosimilitud positiva se utilizará si el resultado de la prueba es positivo y la razón de verosimilitud negativa se empleará cuando el resultado de la prueba sea negativo (López et al., 2008).

El uso de las razones de verosimilitud ofrece varias ventajas con respecto a otros parámetros de diagnóstico. No dependen de la prevalencia como los valores predictivos, ya que como se ha comentado anteriormente se obtienen a partir de la sensibilidad y de la especificidad, que son constantes para un test determinado

(Deeks y Altman, 2004; López et al., 2008). Además, para la obtención de las razones de verosimilitud se emplean conjuntamente la sensibilidad y la especificidad y por tanto, la información extraída es más robusta y con menos posibilidad de error en la interpretación del valor de la prueba (Chien y Khan, 2001; Bianchi y Alexander, 2006).

Razones de verosimilitud  $>10$  y  $< 0,1$  indican pruebas de diagnóstico con una muy buena precisión (número de verdaderos positivos más verdaderos negativos dividido por el número total de muestras analizadas) con respecto a los valores positivos o negativos, respectivamente. Razones de verosimilitud entre 5-10 y 0,1-0,2 indican moderada confianza para sus valores positivos o negativos respectivamente. Valores entre 2-5 y 0,2-0,5 indican bajos valores de precisión de la técnica y con valores entre 2-0,5 la técnica no aporta cambios en la probabilidad pre-test de la enfermedad (Sackett et al., 2000; Jaeschke et al., 2002).

Al comparar dos técnicas, es habitual que algunas de las coincidencias puedan ser debidas al azar. El método más utilizado para medir la coincidencia entre dos técnicas de diagnóstico dicotómicas es el índice kappa de Cohen (Cohen, 1960). Dicho índice mide las coincidencias entre ambas técnicas no producidas por el mero azar, es decir las coincidencias más allá del azar (Abraira, 2001). Así, cuando se comparan entre sí dos técnicas se obtiene la siguiente tabla (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3: Tabla de contingencia para la comparación entre dos técnicas**

		Técnica 2		Total
		Positivo	Negativo	
Técnica 1	Positivo	a	b	a + b
	Negativo	c	d	c + d
Total		a + c	b + d	n

La proporción de coincidencias entre ambas técnicas se mide mediante:

$$P_0 = (a + d) / n \quad (\text{Fórmula 1.9})$$

Para calcular la proporción de coincidencias debida al azar ( $P_e$ ), el razonamiento es el siguiente: la probabilidad de que la Técnica 1 clasifique a un individuo como positivo se puede estimar como  $(a + b) / n$ , mientras que la correspondiente probabilidad de la Técnica 2 se estima como  $(a + c) / n$ . Al considerar que existe independencia en el resultado entre ambas técnicas, la probabilidad de coincidencia clasificando al mismo individuo como positivo será entonces el producto de las dos probabilidades  $[(a + c) (a + b)] / n^2$ . Aplicando el

mismo razonamiento, se puede calcular la probabilidad de que se produzca acuerdo entre las dos técnicas al clasificar a un individuo como negativo, y entonces la probabilidad de acuerdo en cualquiera de las dos clasificaciones será la suma de ambos valores (Fleiss, 1981). Así  $P_e$  se calcularía como se expone en la Fórmula 1.10.

$$P_e = [(a + c)(a + b) + (b + d)(c + d)] / n^2 \quad (\text{Fórmula 1.10})$$

El índice kappa de Cohen se calcularía según la Fórmula 1.11:

$$k = (P_o - P_e) / (1 - P_e) \quad (\text{Fórmula 1.11})$$

El índice kappa de Cohen puede oscilar entre -1 y 1. Si existe una total coincidencia entre las dos técnicas  $k=1$ , si la coincidencia entre las dos técnicas es mayor que la producida por el mero azar  $k \geq 0$ , si la coincidencia entre las técnicas es menor que la producida por el azar  $k \leq 0$  (Fleiss, 1981).

Landis y Koch (1977) propusieron una clasificación para la coincidencia entre dos técnicas según su índice kappa de Cohen (Tabla 1.4).

**Tabla 1.4: Clasificación en la coincidencia entre dos técnicas de diagnóstico según su índice kappa de Cohen (Landis y Koch, 1977)**

<b>Índice kappa de Cohen</b>	<b>Coincidencia</b>
0,81-1,00	Casi perfecta
0,61-0,80	Substancial
0,41-0,60	Moderada
0,21-0,40	Justa
0,00-0,20	Ligera
$k < 0,00$	Pobre

Feinstein y Cichetti (1990) identificaron dos paradojas en relación con la interpretación del índice kappa de Cohen. La primera dice que con un alto grado de coincidencia entre los dos técnicas y a su vez con una prevalencia alta o baja el índice de Cohen es más bajo de lo esperado. Esto es debido a la propia naturaleza del índice de Cohen, si la prevalencia es alta o baja, la probabilidad de coincidencia entre ambas técnicas debido al azar es más alta y por tanto el índice de Cohen lo detecta, haciendo que éste sea más bajo. Dohoo et al. (2003) indican que prevalencias menores al 20% o superiores al 80% afectan al índice de Cohen.

La segunda paradoja ocurre cuando los valores marginales de la tabla de contingencia son muy diferentes, es decir el valor de  $a + b$  es muy diferente al de  $a + c$  y al mismo tiempo el valor de  $b + c$  es muy diferente al de  $b + d$ . Esto se traduce en

un índice kappa de Cohen mayor al esperado, y es debido a que las dos técnicas difieren en el número de resultados positivos obtenidos (Hoehler, 2000). Existen numerosas técnicas estadísticas para detectar este sesgo, para revisiones exhaustivas con respecto a este tema se puede consultar a Ludbrook (2004) y Benavente et al. (2006). La prueba de Mc Nemar (1947) la más utilizada habitualmente, es aplicada para detectar diferencias en valores marginales en una tabla de contingencia y será la aplicada en esta Tesis Doctoral.

La prueba de Mc Nemar se expone en la Fórmula 1.12.

$$\chi^2 = (b - c)^2 / (b + c) \quad (\text{Fórmula 1.12})$$

Si la prueba no se ajusta a una  $\chi^2$  con un grado de libertad, indica que existen diferencias significativas entre los valores marginales de la tabla de contingencia, y por tanto sesgo.

Byrt et al. (1993) proponen dos índices de Cohen modificados para resolver las paradojas de Feinstein y Cichetti. El primero para resolver la segunda paradoja, “Bias-adjusted kappa” (BAK) y el índice PABAK “Prevalence-adjusted bias-adjusted kappa” (PABAK) para resolver las dos paradojas conjuntamente.

A modo de resumen, el índice kappa de Cohen ha sido el índice de coincidencia entre técnicas más utilizado, debido en gran parte a su facilidad de cálculo, sin embargo, para su correcto uso se deben de indicar los posibles efectos de la prevalencia o de sesgo sobre él (Cichetti y Feinstein, 1990; Byrt et al., 1993; Lantz y Nebenzahl, 1996).

## **1.8 MÉTODOS DE CONTROL DE ENFERMEDADES VIRALES EN VEGETALES**

La estrategia de control de enfermedades virales basada en la aplicación reiterada de plaguicidas dirigidos a eliminar sus vectores no es adecuada en el caso de virus no persistentes (Perring et al., 1999; Thackray et al., 2000) como PPV. Esto es debido a los cortos períodos necesarios para la adquisición e inoculación del virus por parte del vector que es capaz de inocular el virus, mediante picaduras de prueba, antes de que haga efecto el insecticida. Por tanto, las estrategias para el control de virus no persistentes deben ir mayoritariamente orientadas a la reducción del número de pruebas que efectúa el vector en el cultivo (Irwin, 1999).

Esta dificultad no se encuentra a la hora de controlar la mayoría de los virus semipersistentes y persistentes, donde el vector necesita mayores periodos de tiempo

para adquirir e inocular el virus. En este caso, el uso de insecticidas sistémicos ha sido eficaz en el control de algunas enfermedades (Perring et al., 1999). Sin embargo, la reiterada aplicación de insecticidas puede conllevar varios problemas: 1) pueden incrementar la dispersión del virus al modificar el comportamiento del vector y eliminar del cultivo especies depredadoras y parasitoides de los vectores (Gibson y Rice, 1989; Budnick et al., 1996), 2) pueden producir efectos no deseables por la acumulación de residuos (Perring et al., 1999), y 3) pueden aparecer resistencias en el vector (Robert et al., 2000; Parker et al., 2006). Por ello se hace imprescindible investigar sobre métodos alternativos de control tanto de los insectos plaga como de las enfermedades transmitidas por éstos. En este contexto es donde surge el concepto de Control Integrado de Plagas.

El concepto de Control Integrado de Plagas se comienza a utilizar a principios de los años 1950, sentándose las bases vigentes actualmente y surgiendo el concepto de nivel de daño económico, definido como la densidad mínima de plaga capaz de producir un daño económico a la cosecha y que no es capaz de ser controlada sino es por la utilización de medios químicos (Stern et al., 1954). En este sentido la Unión Europea, en su nueva Directiva 2009/128/CE sobre ‘Uso sostenible de plaguicidas’, fomenta firmemente los programas de control integrado de plagas anteponiendo el uso de métodos biológicos, biotecnológicos, culturales, físicos y genéticos a los métodos químicos (DOUE, 2009).

Es importante destacar también que la legislación vigente en España, en el marco de la Ley de Sanidad Vegetal y los distintos Reales Decretos que regulan la actividad agraria (Ley 43/2002, Real Decreto 1201/2002), ampara dichas actividades recomendando firmemente los programas de control integrado de plagas.

Concretamente, en relación a los virus no persistentes, los cuales son transmitidos por pulgones no colonizadores, el concepto de nivel de daño económico no es usado en la práctica, puesto que muy bajas densidades de población del vector son suficientes para ocasionar daños. Por ello, su control radica en el empleo de medidas preventivas para evitar la presencia de los vectores en el cultivo y con ello la enfermedad.

Entre estas medidas preventivas cabe destacar: 1) el empleo de diversas medidas culturales empleadas regularmente por ejemplo en cultivos hortícolas, como retrasar la siembra para que la germinación de las plántulas no coincida con la época de máximo número de vectores, (Ferreles, 2000; Hooks y Fereres, 2006), 2) el uso de variedades tardías, aplicada por ejemplo en el cultivo del albaricoquero para evitar los daños producidos por PPV-D. De esta forma el fruto es recogido a finales de junio, produciéndose su desarrollo con menores títulos de PPV debido al calor y por tanto, los síntomas de sharka no son tan evidentes, 3) el uso de cultivos barrera, otra medida cultural empleada en horticultura, basado en utilizar otros cultivos que sirven como atrayentes de los insectos vectores y que impiden o reducen su llegada al cultivo principal (Ferreles, 2000), 4) la eliminación de la flora adventicia colindante

al cultivo, eliminando posibles reservorios tanto de virus como de sus insectos vectores (Fereres, 1996), 5) el uso de barreras físicas como la cubiertas flotantes con agrotexiles, los plásticos absorbentes de luz UV y las mallas impregnadas con insecticidas o fotoselectivas, permite no sólo aumentar la precocidad de los cultivos y aumentar las cosechas, sino además proteger frente a plagas y enfermedades (Boiteau y Vernon 2001; Weintraub y Berlinger 2004; Díaz y Fereres, 2007), 6) el uso de enemigos naturales (parásitos y depredadores) para combatir insectos fitófagos produce una reducción de las poblaciones de éstos tanto en campo abierto (Chapman et al., 2009; Ohnesorg et al., 2009) como en invernadero (Cloyd, 2006) y con ello, se puede lograr una disminución de la dispersión de algunos virus que éstos puedan transmitir. El Control Biológico es hoy en día una de las herramientas más utilizadas en el Manejo Integrado o IPM., y 7) tratamientos con aceites minerales para el control de virus, sobre todo los transmitidos de forma no persistente. Una revisión bibliográfica sobre las características y uso de los aceites minerales se realiza en el Capítulo 7 de esta Tesis Doctoral.

A parte de las medidas anteriormente descritas, la obtención de **plantas resistentes** ha sido una estrategia común de control de enfermedades virales de vegetales. Esta Tesis Doctoral se centrará en los casos particulares de PPV y CTV.

Se han realizado búsquedas de genes de resistencia a PPV entre variedades de melocotonero, ciruelo y albaricoquero. Aunque, no se han encontrado estos genes en variedades de melocotonero (García y Cambra, 2007), sí que se ha logrado este objetivo en variedades de albaricoquero y ciruelo (Bádenes y Llácer 2006; Decroocq et al., 2006; Hartmann y Neumuller 2006). También se han utilizado procedimientos de silenciamiento génico para la obtención de plantas transgénicas en el género *Prunus* (Ravelonandro et al., 1997; Scorza y Ravelonandro, 2006). Otro procedimiento que se ha desarrollado, pero que todavía no se ha aplicado a variedades del género *Prunus* es la inmunomodulación entre el patógeno, en este caso PPV, y el huésped (Esteban et al., 2003).

En el caso de CTV, se ha detectado resistencia en especies del género *Citrus* (Asins et al., 2004), aunque la mayoría de especies resistentes se encuentran en otros géneros de la subfamilia *Aurantioideae* (Moreno et al., 2008). La compleja biología reproductiva de los cítricos, su elevada heterocigosis y los largos períodos juveniles de las plantas de semilla ha hecho imposible la incorporación de genes de resistencia a CTV en variedades comerciales mediante cruzamientos convencionales (Mestre et al., 1997a, b; Fang y Roose, 1999; Rai, 2006). Hasta el momento no se han obtenido resultados consistentes al incorporar resistencia derivada del patógeno mediante la transformación genética, debido a factores desconocidos que afectan el fenotipo de resistencia de las distintas propagaciones obtenidas (Moreno et al., 2008). Sin embargo, la técnica de la inmunomodulación ha sido aplicada con éxito en líneas de limas mejicanas transgénicas recientemente (Cervera et al., 2010). Al mismo tiempo, la mejora en la calidad de los patrones es fundamental, por eso, en España, se está buscando patrones tolerantes a CTV, con tolerancia además a suelos calizos,

salinidad, *Phytophthora spp.*, y nemátodos. De un estudio de 508 híbridos, cuatro de éstos ya están comercializados (Forner-Alcaide (FA) -5, -13, -418, -517), resistentes a CTV (Forner y Forner, 2003).

Otra estrategia usada para el caso de CTV ha sido la **protección cruzada**. Aislados de CTV suaves son inoculados en el árbol a proteger y son capaces de protegerlo de aislados más agresivos. Este método llamado pre-inmunización es utilizado en la citricultura brasileña, ya que el 100% de las plantas comercializadas en esta región están pre-inmunizadas. Esta ha sido la única herramienta efectiva para controlar aislados agresivos en regiones como Sudáfrica y Florida (Lee et al., 1987; van Vuuren et al., 1993; Powell et al., 1999).

Para evitar en primer lugar la introducción y posteriormente la dispersión de enfermedades virales como la sharka o la tristeza en una zona determinada, aparte de las estrategias y medidas anteriormente descritas, se deben de aplicar medidas preventivas como: 1) aplicación de programas de cuarentena para evitar la introducción de la enfermedad, 2) aplicación de programas de erradicación si la enfermedad ha penetrado en la zona y por supuesto 3) uso exclusivo de material vegetal sano procedente de viveros con garantía de estar libres de virosis.

En esta Tesis Doctoral se han evaluado distintas estrategias de control de virus transmitidos por pulgones como la aplicación de aceites minerales sobre la transmisión de PPV (no persistente) y CTV (semipersistente) en vivero y la susceptibilidad a la infección natural por PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso.



## **CAPÍTULO 2.**

# **OBJETIVOS GENERALES**



## CAPÍTULO 2.

### OBJETIVOS GENERALES

---

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es estudiar los distintos factores que determinan las epidemias de los virus de la sharka en frutales de hueso (PPV) y de la tristeza de los cítricos (CTV) en vivero, para establecer posibles estrategias de control y así reducir la infección natural. Además, se pretende validar métodos serológicos y moleculares avanzados para la detección viral fiable y precoz en plantas de vivero, antes de la comercialización del material vegetal, para contribuir a la eliminación de la infección a larga distancia.

Este objetivo general se puede descomponer en los siguientes objetivos particulares o más concretos:

#### **1) Evaluación de diferentes factores que afectan a la epidemiología de PPV y CTV en bloques de vivero.**

- Evaluación de la susceptibilidad a la infección natural por PPV-D, en condiciones de vivero, de los principales patrones empleados en la fruticultura española de hueso.
- Confirmación de la alta susceptibilidad a la infección natural por CTV, en condiciones de vivero, del patrón *Citrus macrophylla*.
- Estudio de la relación de algunos de los factores que condicionan la sensibilidad natural a la infección natural por PPV y/o CTV: superficie foliar de aterrizaje disponible para los pulgones, especies de pulgones vectores presentes y visitantes de los cultivos y relación entre la tasa o porcentaje de pulgones virulíferos visitantes y la tasa de infección viral real.

#### **2) Evaluación de diferentes técnicas de detección serológicas y moleculares en condiciones de vivero.**

- Determinación del número de plantas de vivero que se pueden mezclar en un extracto para tener una adecuada precisión en el muestreo de PPV a lo largo del año (análisis de muestras compuestas).
- Validación y comparación de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV en condiciones de vivero. Estimación de los parámetros de diagnóstico en primavera.

- Validación y comparación de las técnicas Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección de CTV en condiciones de vivero y árboles adultos. Estimación de los parámetros de diagnóstico en vivero.

**3) Evaluación del efecto de la aplicación de aceites minerales para reducir la infección natural en bloques de vivero.**

- Evaluación de la eficacia de la aplicación de tratamientos con aceites minerales en la reducción de la transmisión natural de PPV y CTV en bloques de vivero cultivados al aire libre.
- Evaluación del efecto de la aplicación de aceites en el desarrollo vegetativo de los plántones.

**CAPÍTULO 3.**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**  
**GENERALES**



## CAPÍTULO 3

# MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

---

### 3.1 MATERIAL VEGETAL: PARCELAS EXPERIMENTALES, LOCALIZACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Los ensayos de campo llevados a cabo durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se realizaron en distintas localizaciones dentro de la provincia de Valencia. En el caso de los estudios realizados con el virus de la sharka, se dispuso de dos situaciones ambientales muy distintas: una zona con una alta presión de inóculo (parcela situada en la localidad de Lliria) y otra con baja presión de inóculo (parcela situada en la localidad de Carlet). Los estudios realizados con el virus de la tristeza de los cítricos se realizaron en una parcela situada en la localidad de Moncada con una alta presión de inóculo.

#### 3.1.1 Parcela situada en Lliria

La parcela experimental estaba situada en una finca de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, regentada por la Cooperativa Vinícola de Lliria, en Lliria (Valencia). La fecha de plantación fue el 15 de marzo de 2006 y el ensayo se mantuvo hasta abril 2008. La superficie de la parcela era aproximadamente de 750 m<sup>2</sup> (Figura 3.1).

**Figura 3.1: Vista cenital de la parcela situada en Lliria (Fuente: Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC) del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino)**



La parcela se dividió en dos subparcelas: subparcela N°1 destinada a estudiar la susceptibilidad natural de diferentes patrones de frutales de hueso a la infección por PPV y la subparcela N°2, destinada a evaluar el efecto de la aplicación de aceite mineral sobre la infección natural por PPV (Figura 3.2). La parcela de ensayo era colindante en orientación noreste a una parcela de ciruelo japonés con un 90% de infección por PPV tipo D, dicha parcela actuó como fuente de inóculo viral para los ensayos realizados.

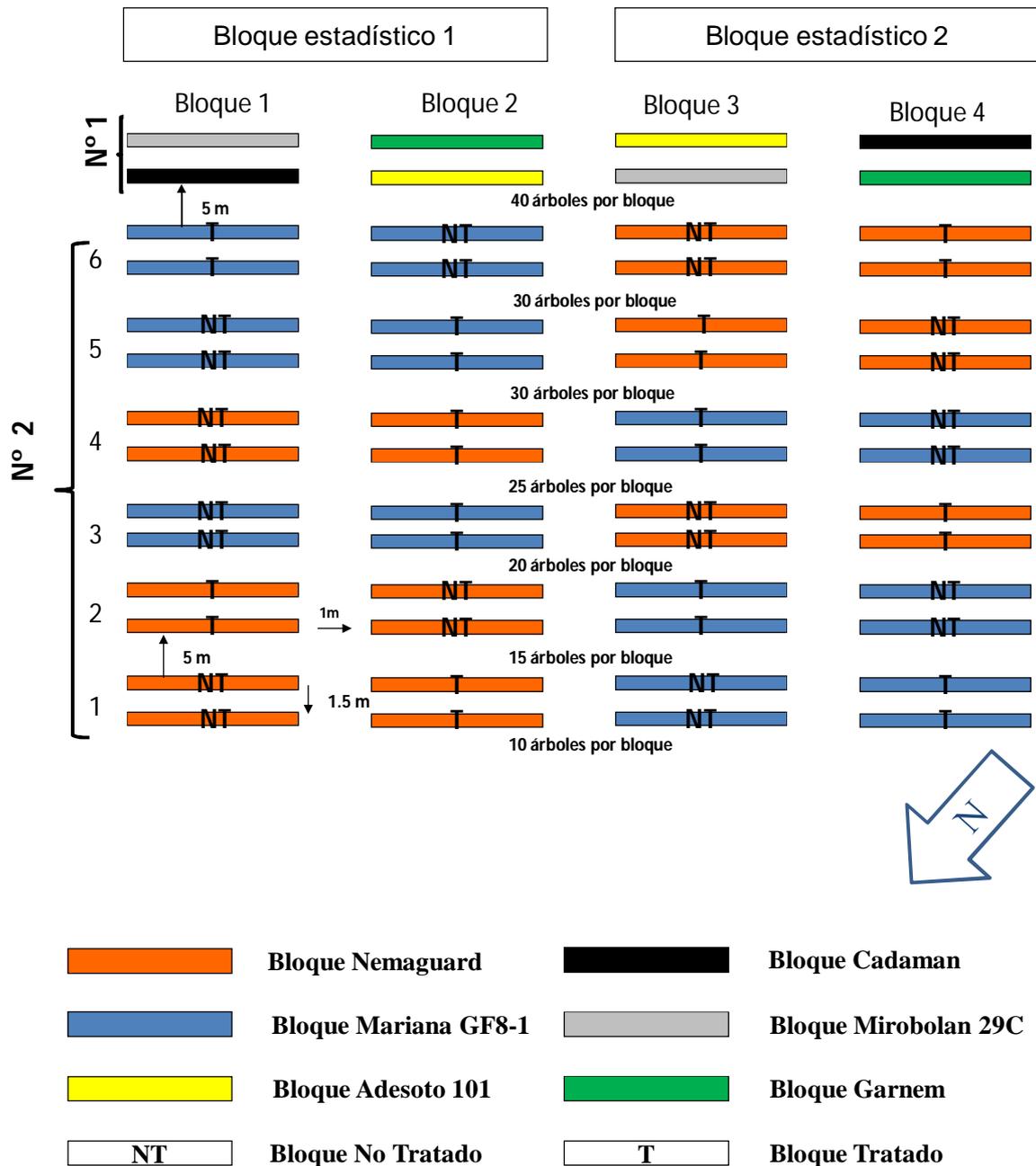
La parcela de ensayo se dividió en dos bloques estadísticos imaginarios, bloque 1 y bloque 2, cada uno de los cuales estuvo formado por dos bloques de plantas.

En la subparcela N°1, los patrones seleccionados para el estudio fueron: Garnem o GxN 15, Adesoto 101, Mirobolan 29C y Cadaman. Estos patrones fueron elegidos por representar los más frecuentemente utilizados en la fruticultura española. La plantación tipo vivero de la subparcela N°1, estuvo constituida por dos filas separadas entre sí por 1,5 m. Cada una de estas filas se dividió a su vez, en 4 grupos. Cada uno de los 4 grupos en los que se dividió cada fila estuvo separado por 1 m del grupo adyacente. Dentro de cada grupo de plantas, la plantación de los distintos patrones se realizó con 20 cm de separación entre cada planta. Cada uno de los grupos contó con 40 plantas, y en cada bloque estadístico se repitió una sola vez cada patrón, teniendo en total dos repeticiones (un total de 80 plantas) por cada uno de los patrones evaluados. Por tanto, el número total de plantas utilizadas en este estudio fueron 320.

En la subparcela N°2, se plantaron dos patrones diferentes: Mariana GF8-1 y Nemaguard. Para la evaluación de los tratamientos con aceite mineral como método de control de la dispersión viral en el cultivo, la mitad de las plantas de cada patrón fue tratada con aceites minerales, dejándose la otra mitad como testigo sin tratar. En total se plantaron 6 grupos de plantas de longitud variable, según se detalla en la Figura 3.2, separados por 5 m. Cada uno de los grupos en los que se dividió la subparcela consistió en 2 filas de plantas separadas entre sí por 1,5 m. Cada fila se dividió en 4 grupos de los dos patrones señalados anteriormente con una separación de 1 m entre ellos y en los que las plantas se colocaron con una distancia de 20 cm entre sí. Para el diseño experimental de la subparcela N°2, dentro de cada bloque estadístico y en grupos de dos filas consecutivas se fue aleatorizando, primero los patrones (“main plot”), y dentro de éstos los tratamientos con aceites (“sub-plot”) obteniéndose un típico diseño en “split-plot”. Según el diseño experimental anterior el número total de plantas en el estudio fue de 1040 plantas: 520 plantas del patrón Mariana GF8-1 y 520 plantas del patrón Nemaguard.

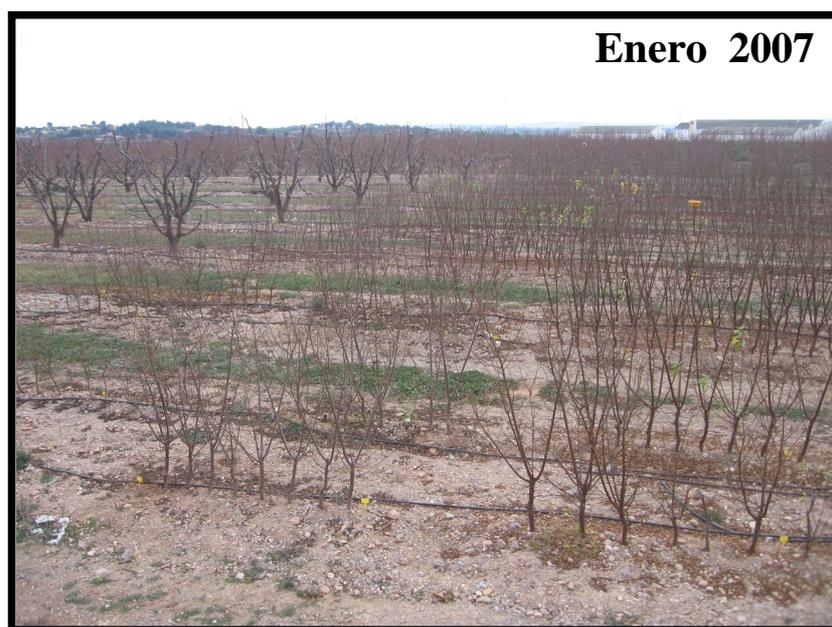
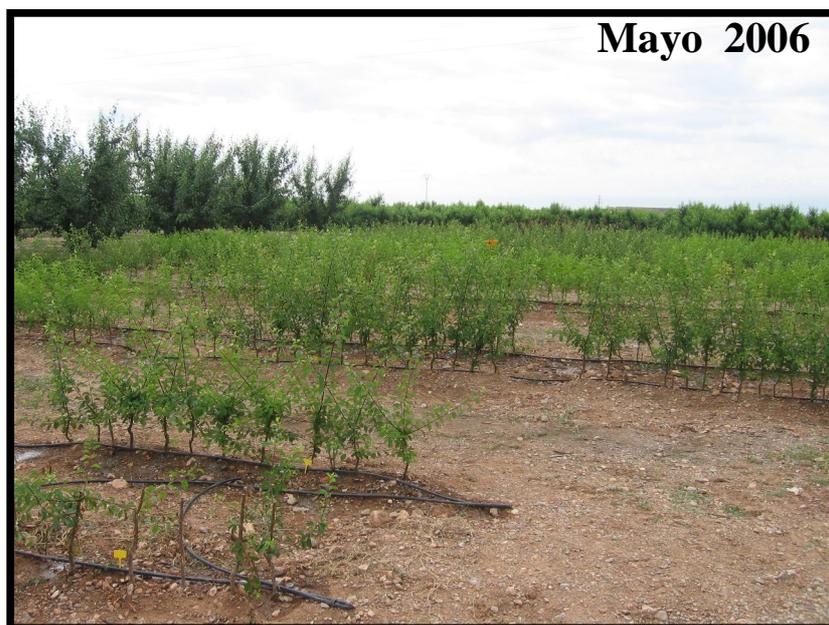
La parcela fue podada en dos ocasiones durante la realización del ensayo, según se realiza en viveros comerciales (13/3/2007 y 5/3/2008). A diferencia de lo que normalmente ocurre en un vivero comercial, las plantas del ensayo no fueron injertadas.

**Figura 3.2: Diseño experimental de la parcela situada en Lliria**



El aspecto general de la parcela en diferentes épocas del año se puede observar en la Figura 3.3.

**Figura 3.3: Aspecto de la parcela situada en Llíria en período vegetativo (mayo, 2006) y en período de dormancia (enero, 2007)**



### 3.1.2 Parcela situada en Carlet

La parcela estuvo situada en el campo de experiencias de la Cooperativa San Bernardo de Carlet, en Carlet (Valencia). La fecha de plantación fue el 28/4/2006 y el ensayo se mantuvo hasta noviembre de 2007.

A pesar de que en las proximidades de esta parcela no se tuvo conocimiento de la existencia de una posible fuente de inóculo concreta, existen datos históricos que avalan la presencia del virus en la zona. Por ello, se decidió considerar la finca perteneciente a la Cooperativa San Bernardo de Carlet, como emplazamiento de un ensayo en el que evaluar la epidemia viral y los factores que la determinan bajo unas condiciones de baja presión de inóculo viral.

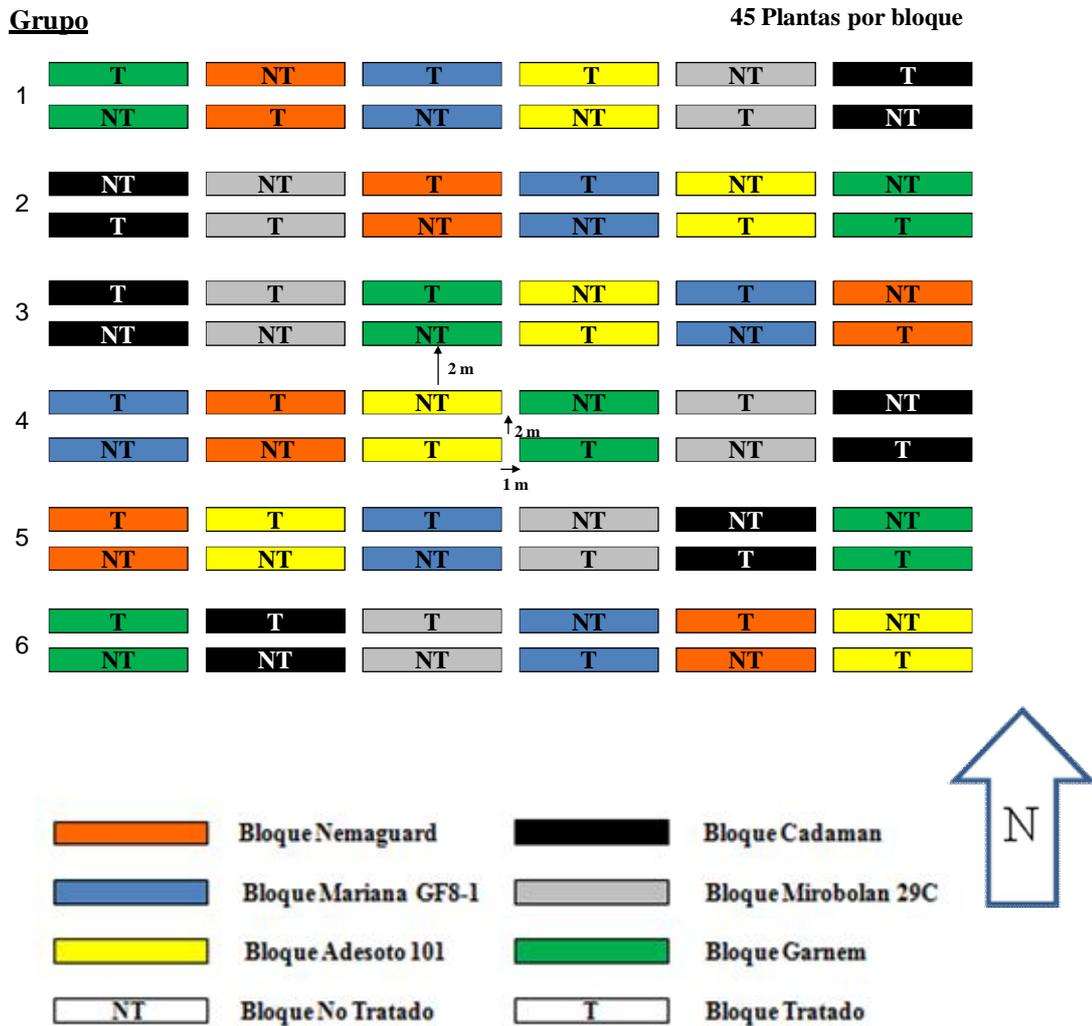
La parcela se dividió en dos subparcelas (Figura 3.4). En una primera subparcela (Nº1), con una superficie aproximada de 950 m<sup>2</sup>, se estudió la susceptibilidad a la infección natural por PPV de los mismos patrones utilizados en la parcela situada en Lliria, descrita anteriormente, y se evaluó la aplicación de aceite mineral como método de control de la infección natural por PPV (Figura 3.5). En la segunda subparcela (Nº2), con una superficie aproximada de 170 m<sup>2</sup>, se estimó la dinámica poblacional de las especies de pulgones presentes en la zona (Figura 3.6).

**Figura 3.4: Vista cenital de la parcela situada en Carlet (Fuente: Sigpac)**

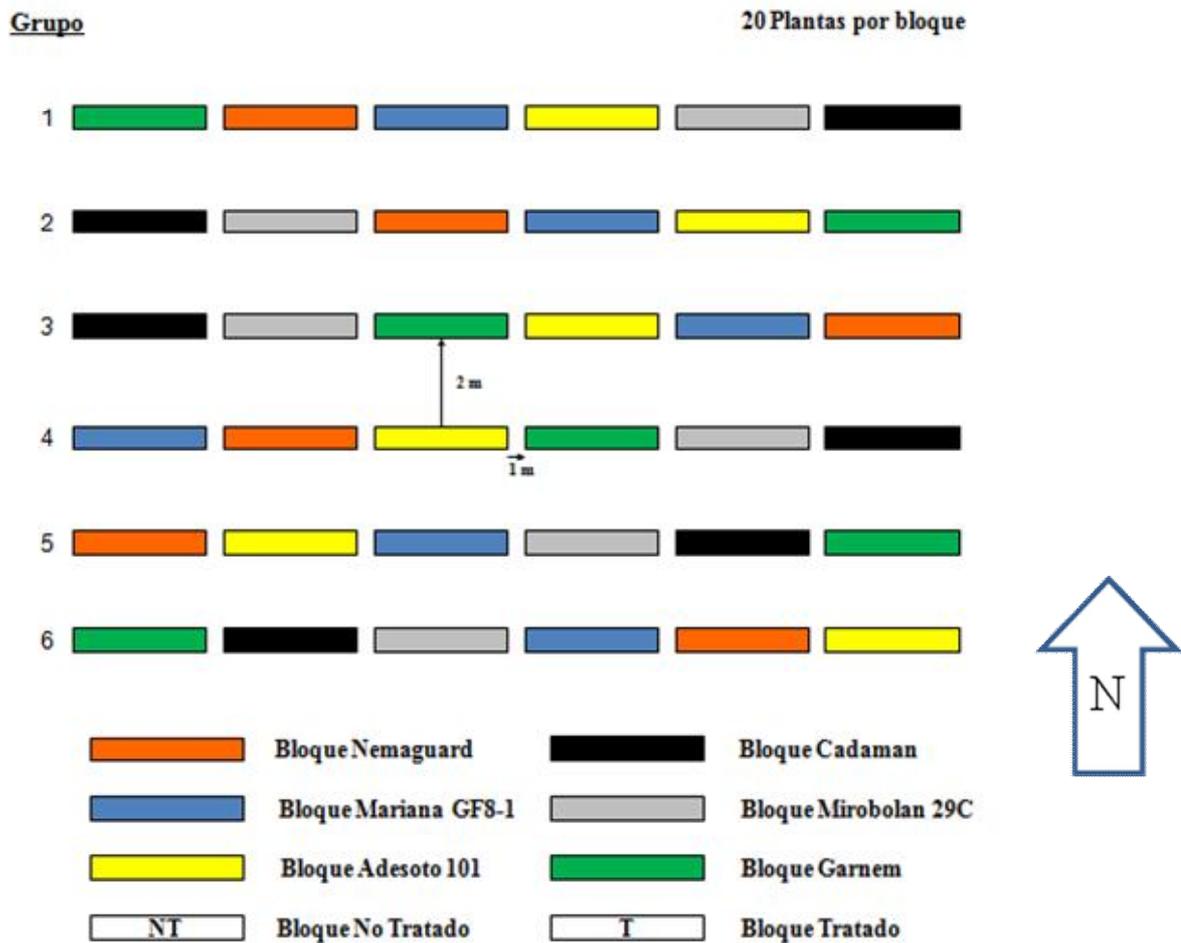


La subparcela Nº1 (Figura 3.5) estuvo constituida según diseño estadístico en “split-plot”, por 6 grupos de plantas, separados entre sí por 2 m. Cada grupo estuvo formado por 2 filas separadas entre sí por 2 m y cada fila estuvo formada por 6 bloques. Cada bloque estuvo separado por 1 m, y las plantas separadas entre sí por 20 cm. El número total de plantas por bloque fue de 45, siendo el número de plantas totales en el ensayo de 3240. Para la evaluación del efecto de la aplicación de aceites sobre la dispersión viral en el cultivo se trataron la mitad de las plantas (1620), dejándose la otra mitad como control no tratado. Dentro de cada grupo, en primer lugar se sorteó la posición que ocuparía cada patrón (“main-plot”), para después se sorteó la fila que se trataría con aceites (“sub-plot”).

**Figura 3.5: Diseño experimental de la parcela situada en Carlet, primera subparcela (Nº1)**



La subparcela Nº2 (Figura 3.6) estuvo constituida por 6 filas de plantas con 2 m de separación entre cada una de ellas. Cada fila estuvo compuesta por 6 bloques, separados entre sí por 1 metro. Cada bloque estuvo formado por 20 plantas a una distancia de 20 cm entre ellas, siendo el número total de plantas en esta segunda subparcela de 720. La posición relativa de cada uno de los patrones dentro de la subparcela fue la misma que la dispuesta en la primera subparcela.

**Figura 3.6: Parcela situada en Carlet, segunda subparcela (Nº2)**

Al igual que en la parcela de ensayo situada en la localidad de Llíria, la parcela fue podada el 26/02/2007, según se realiza en viveros comerciales aunque en ningún momento se realizaron injertos.

El aspecto general de la parcela en diferentes períodos vegetativos se puede apreciar en la Figura 3.7.

**Figura 3.7: Aspecto de la parcela situada en Carlet en diferentes períodos vegetativos**



### 3.1.3 Parcela situada en Moncada

La parcela experimental estuvo situada dentro de las instalaciones del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), en Moncada (Valencia). La parcela se plantó el 24/2/2006 y el ensayo se mantuvo hasta noviembre 2007.

La parcela se dividió en dos subparcelas (Figura 3.8). La primera subparcela (Nº1), con una superficie aproximada de 200 m<sup>2</sup>. En ella se estudió la susceptibilidad natural del patrón *Citrus macrophylla* a la infección natural por CTV y se evaluó la aplicación de aceite mineral como método de control de su dispersión natural. En la segunda subparcela (Nº2) con una superficie aproximada de 170 m<sup>2</sup>, se evaluó la dinámica poblacional de las especies de pulgones presentes en la zona. Datos previos de incidencia viral en los alrededores de la parcela (Cambra et al., 2000a) indicaron que las plantas se sometían a una alta densidad de inóculo (aproximadamente 85% en los árboles próximos).

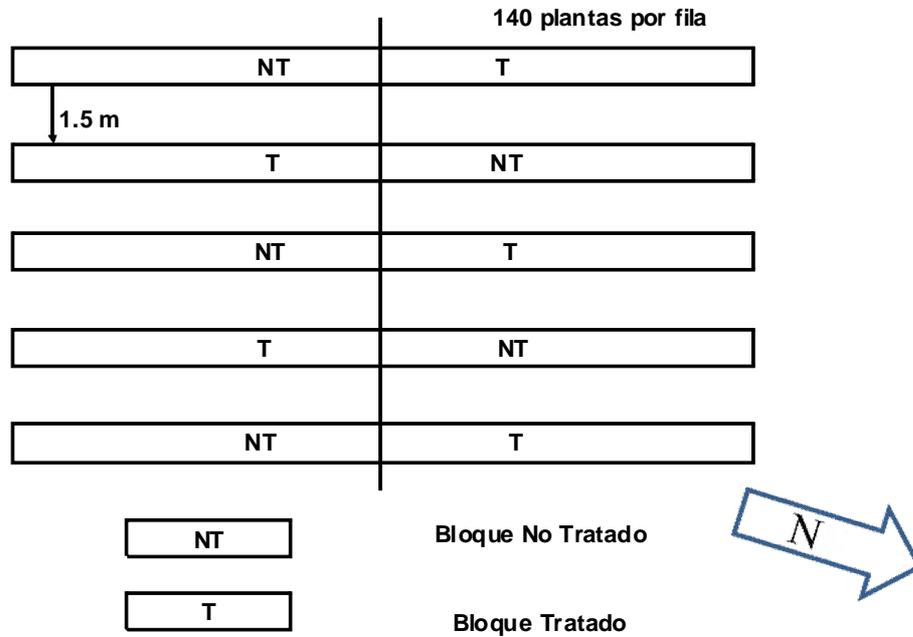
**Figura 3.8: Vista cenital de la parcela situada en Moncada**



La subparcela Nº1 (Figura 3.9) estuvo formada por 5 filas separadas entre sí por 1,5 m. Cada fila estuvo formada por 140 plantas separadas entre sí por 20 cm, teniendo un total de 700 plantas. Para la evaluación de la aplicación de los aceites minerales como posible método de control de la dispersión viral, se trató con aceite

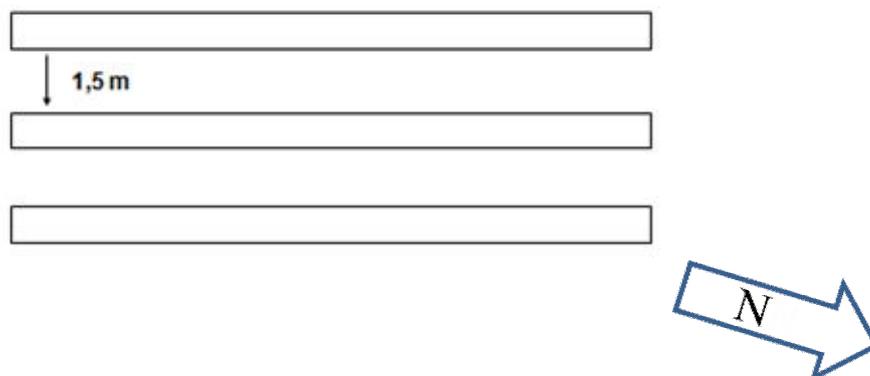
mineral la mitad de las plantas del ensayo (700 plantas), dejándose la otra mitad como control no tratado.

**Figura 3.9: Diseño experimental de la subparcela (N°1) localizada en Moncada**



La subparcela N°2 estuvo formada por 3 filas separadas entre sí por 1.5 m (Figura 3.10). En cada fila se plantaron 100 plantas separadas por 20 cm, teniendo un total de 300 plantas.

**Figura 3.10: Diseño experimental de la subparcela N°2 localizada en Moncada**



Al igual que en los casos anteriores, la parcela fue podada como si se tratara de un vivero comercial el 2/3/2007 y el 10/9/2007, pero no se injertó.

En la Figura 3.11 se puede apreciar el estado de la parcela en diferentes épocas del año.

**Figura 3.11: Aspecto de la parcela situada en Moncada en diferentes épocas del año**



## **3.2 MUESTRO VEGETAL Y EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA VIRAL EN EL CULTIVO**

### **3.2.1 Parcelas de Lliria y Carlet**

El muestreo de las parcelas para determinar la incidencia viral se realizó en distintos periodos a lo largo del estudio. El primer muestreo se realizó justo tras la plantación de las parcelas para corroborar que los patrones estaban libres de PPV. (Esta comprobación se realizó a pesar de que los patrones poseían el certificado fitosanitario correspondiente).

En Lliria, el primer muestreo de la subparcela N°2 (Figura 3.2) se realizó el mismo día de su plantación (15/3/2006). Se muestrearon las 4 primeras filas de la parcela. Las plantas eran estaquillas, por tanto se tomó material leñoso. El muestreo de la subparcela N° 1 se realizó el 5/4/2006 y en este caso se muestreó únicamente una de las filas. Al haber brotado ya las plantas, se cogieron 4 hojas por plantón. En ambos casos, para la obtención de extractos, se agruparon de 5 en 5 las muestras recogidas. La parcela se muestreó en tres ocasiones más: 2ª) otoño 2006 (23/10/2006); 3ª) primavera 2007 (16/5/2007) y 4ª) primavera 2008 (8/4/2008); en este caso sólo se muestrearon las plantas que no fueron tratadas con aceites. En las tres ocasiones el muestreo se realizó individualmente por planta, cogiendo 4 hojas al azar por planta procedentes de distintas partes de la planta. Las muestras se trataron como se indica en el apartado 3.3.1.1 y se analizaron mediante ELISA-DASI, en el caso del primer muestreo, y mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real, en los muestreos sucesivos, tal como se especifica en los apartados 3.3.1.1.1 y 3.3.1.1.2, respectivamente.

En Carlet la subparcela N°1 (Figura 3.5) se muestreó por primera vez justo después de su plantación. (8/5/2006). En esta ocasión se tomaron 5 plantas tomadas al azar de cada uno de los 72 bloques, se agruparon de 5 en 5 y se analizaron por ELISA-DASI. La parcela se muestreó en sucesivas ocasiones: 2ª) otoño 2006 (31/10/2006 y 6/11/2006) y 3ª) otoño 2007 (29/10/2007 y 12/11/2007). Se recogieron 4 hojas al azar por planta de diferentes partes de la misma. Se agruparon las muestras de dos en dos y se trataron como se indica en el apartado 3.3.1.1. Las muestras se analizaron mediante ELISA-DASI en octubre del 2006 y mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en octubre 2007, como se detalla en los apartados 3.3.1.1.1 y 3.3.1.1.2, respectivamente.

### **3.2.2 Parcela de Moncada**

El muestreo para determinar la incidencia viral en la subparcela N°1 (Figura 3.9) se realizó en distintos periodos a lo largo del estudio, utilizando la técnica Inmunoimpresión-ELISA, explicada en el apartado 3.3.1.2.1. El primer muestreo se realizó justo tras la plantación de la parcela para corroborar que los patrones estaban libres de CTV. Esta comprobación se realizó a pesar de que los patrones poseían el

certificado fitosanitario correspondiente. En este primer muestreo se tomaron 2 hojas por planta, debido al pequeño tamaño de las plantas. La parcela se muestreó en dos ocasiones más: 2ª) otoño 2006 (12/12/2006); 3ª) primavera 2007 (7/5/2007). En estas dos ocasiones el muestreo se realizó cogiendo 2 brotes por planta procedentes de distintas partes de la planta, según protocolo OEPP/EPPO (2004a).

### 3.3 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE VIRUS

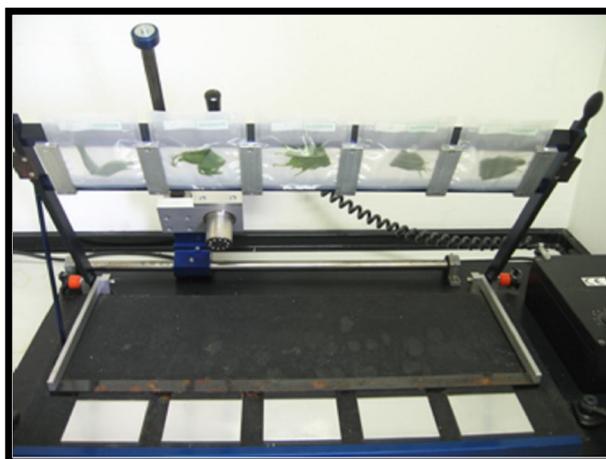
#### 3.3.1 Técnicas de detección de virus en material vegetal

##### 3.3.1.1 *Detección de PPV en material vegetal*

La detección de PPV en material vegetal se realizó mediante técnicas serológicas y moleculares: ELISA y RT-PCR a tiempo real.

Los extractos del material vegetal muestreado empleados en el análisis se obtuvieron mediante dos procedimientos, aplicados según el tipo de material disponible. Para material leñoso, se cortaron yemas y tiras de corteza, se introdujeron en bolsas de malla gruesa (Plant Print Diagnostics) y se homogeneizaron con ayuda de rodillos manuales o de martillo. Para análisis de hojas, se introdujeron en bolsas de plástico de malla fina (Bioreba) y se homogeneizaron con ayuda de un extractor de rodillos HOMEX 6 (Bioreba) (Figura 3.12). En ambos casos se utilizó una dilución aproximada 1:10 (peso: volumen) en tampón de extracción de frutales (agua fisiológica tamponada pH 7.2-7.4 (AFT) (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en un litro de agua destilada), 2% Polyvinilpirrolidona (PVP-10), 0,2% dietil ditiocarbamato sódico (DIECA)), según Cambra et al. (1994) y OEPP/EPPO (2004b). El mismo extracto se empleó en la detección del virus por los dos métodos descritos a continuación: ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real.

**Figura 3.12: Extractor de rodillos HOMEX 6 (Bioreba)**



*3.3.1.1.1 ELISA-DASI (“Double Antibody Sandwich Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)*

Para la detección de PPV mediante ELISA se empleó el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA (Cambra et al., 1994), utilizando el kit comercial de AMR Lab / Real-Durviz, según protocolo OEPP/EPPO (2004b). Para ello se tapizaron placas de poliestireno Polysorp, (Nunc) de 96 pocillos con una solución de 1 µg/ml de anticuerpos policlonales (PABs) específicos de PPV en tampón carbonato (1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g NaHCO<sub>3</sub> en un litro de agua destilada, pH 9,6) (200 µl por pocillo) y se incubaron durante 4 horas a 37°C. A continuación se lavaron tres veces con tampón lavador pH 7,2-7,4 (AFT con 0,05% Tween 20). Se añadieron 200 µl por pocillo de los extractos vegetales con dos repeticiones por muestra. Se incubaron las muestras 16 horas a 4°C. Se lavaron las placas como anteriormente se ha descrito. Se añadieron 200 µl por pocillo de una solución de 0,1 µg/ml del anticuerpo monoclonal (MAb) universal para PPV, 5B-IVIA en AFT pH 7,2-7,4 con 0,5% albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma). Las muestras se incubaron durante 2 h a 37°C. Se lavaron las placas como anteriormente se ha descrito. Se añadieron 200 µl por pocillo de una solución de 0,1 µg/ml de anticuerpos de cabra anti-conejo (GAM) conjugado con fosfatasa alcalina en AFT pH 7,2-7,4 con 0,5% BSA. Las muestras se incubaron durante 2 h a 37°C. Se lavaron las placas como anteriormente se ha descrito. Para la obtención de la reacción colorimétrica característica se añadieron 200 µl de una solución de 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato en tampón sustrato (97 ml de dietanolamina en 1 L de agua destilada, pH 9,8). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y se realizaron lecturas de las densidades ópticas a 405 nm, dos horas después de la adición del sustrato. Se consideraron valores positivos aquellos que al menos doblaron el valor de densidad óptica obtenido por el control negativo (extracto de melocotonero de semilla GF305, libre de PPV).

*3.3.1.1.2 “Spot” RT-PCR a tiempo real*

Para la inmovilización del extracto analizado mediante “Spot” RT-PCR a tiempo real (Capote et al., 2009) se dispensaron 5µl de extracto de muestra sobre un cuadrado aproximado de 0,45 µm<sup>2</sup> de membrana de Nylon (Roche) o papel de filtro Whatman 3mm que previamente se había introducido en un tubo Eppendorf (1,5ml). Tras añadir 100µl de tampón de extracción (0,5% Tritón X-100), la muestra se agitó con la ayuda de un agitador vortex y se mantuvo en incubación a temperatura ambiente durante 2-3 min, antes de ser aplicada en el cóctel de la reacción. Para la reacción de RT-PCR a tiempo real se siguió el protocolo descrito por Olmos et al. (2005), empleando los mismos iniciadores y sonda TaqMan: P241 (5'-CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3'), P316D (5'-GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3'), P316M (5'-GAT TCA CGT CAC CAG CGG TGT G-3') y sonda TaqMan universal PPV-U (5'-CGT CGG AAC ACA AGA AGA GGA CAC AGA-3'). El cóctel de reacción contenía 1× TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1× MultiScribe y RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems), 1 µM iniciador P241, 0,5 µM iniciador P316D, 0,5 µM iniciador P316M, 150 nM sonda

TaqMan PPV-U y 5 µl de muestra. El protocolo consistió en un ciclo de 48°C durante 30 min y 95°C durante 10 min seguido por 45 ciclos de amplificación (95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min).

La detección se realizó en termocicladores ABI Prism 7000 y One Step Plus (Applied Biosystems). La adquisición y análisis de datos se realizaron mediante los programas ABI Prism 7000 y One Step Plus (Applied Biosystems). El umbral límite de detección fue establecido de acuerdo a las especificaciones establecidas por dichos programas.

### ***3.3.1.2 Detección de CTV en material vegetal***

Para la detección de CTV en material vegetal se emplearon las técnicas Inmuno impresion-ELISA (Garnsey et al., 1993; Cambra et al., 2000b) y “tissue print” RT-PCR a tiempo real (Bertolini et al., 2008).

#### ***3.3.1.2.1 Inmunoimpresión-ELISA o “Tissue print”-ELISA***

Para la detección de CTV, se empleó una mezcla de los anticuerpos monoclonales 3CA5 y 3DF1 (Cambra et al., 1990), utilizando el kit comercial de Plant Print Diagnóstics S.L. según protocolo OEPP/EPPO (2004a).

El material vegetal utilizado para el muestreo fueron brotes de árboles adultos o de patrones de cítricos, según el caso. Por cada brote muestreado se realizaron dos impresiones en membranas de nitrocelulosa (Millipore). Después de dejar secar las improntas se alojaron en contenedores plásticos, se cubrieron con una solución al 1% de BSA en AFT pH 7,2-7,4 y se incubaron toda la noche a 4°C. Tras el periodo de incubación, se desechó la solución de BSA, añadiendo la mezcla los anticuerpos monoclonales específicos para CTV, 3DF1 y 3CA5, conjugados con fosfatasa alcalina diluidos en AFT (1/100), según especificaciones del fabricante. Tras un período de incubación de 2-3 h a temperatura ambiente, se desechó la solución de los anticuerpos y las membranas se lavaron con tampón lavador (apartado 3.3.1.1.1) durante 5 minutos (dos veces). Las membranas fueron depositadas en otro recipiente y se añadió tampón sustrato (apartado 3.3.1.1.1) en el que se había diluido previamente el sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato (BCIP) y cloruro de tetrazolio nitro-azul (NBT) (1 pastilla BCIP-NBT Sigma Fast por 10 ml de agua destilada). Las membranas se incubaron a temperatura ambiente de 10-15 minutos hasta que apareció una tonalidad púrpura, característica de la reacción, en los controles positivos. La reacción colorimétrica se detuvo añadiendo agua destilada. Las membranas se dejaron secar sobre papel de filtro y se observaron las impresiones con ayuda de una lupa Leica modelo MZ7.5. La presencia de precipitados púrpuras en la región vascular del material vegetal indicaba la presencia de CTV.

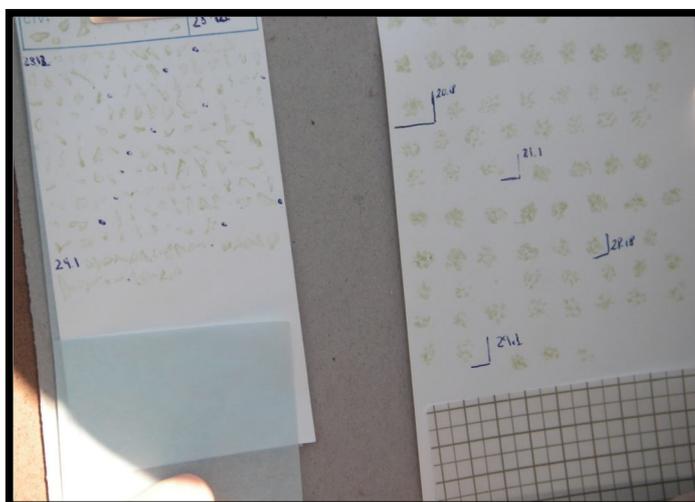
### 3.3.1.2.2 “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real

Dos hojas recogidas a mano por cada brote muestreado en los ensayos de campo, fueron impresas por su pedúnculo en membranas de nylon (Roche), superponiendo las impresiones. Posteriormente en el laboratorio, se recortaron las membranas y se pusieron en tubos Eppendorf (1,5ml). Se añadieron 100  $\mu$ l de tampón de extracción (0,1 M glicina, 0,05 M NaCl, 1 mM EDTA) (Osman y Rowani, 2006), los tubos se incubaron a 95°C durante 10 minutos y posteriormente se agitaron mediante vortex, antes de aplicar la muestra en el cóctel de reacción. Para la reacción de RT-PCR a tiempo real se siguió el protocolo descrito por Bertolini et al. (2008), empleando los mismos iniciadores y sonda TaqMan: 3'UTR1 (5' CGTATC CTC TCG TTG GTC TAA GC 3'), 3'UTR2 (5' ACA ACA CAC ACT CTA AGG AGA ACT TCT T 3'), y la sonda TaqMan 181T (5' TGG TTC ACG CAT ACG TTA AGC CTC ACT TG 3'). El cóctel de reacción contenía 1 $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 $\times$  MultiScribe and RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu$ M iniciador 3'UTR1, 1  $\mu$ M iniciador 3'UTR2, 150 nM sonda TaqMan 181T y 5  $\mu$ l de muestra. El protocolo consistió en un ciclo de 48°C durante 30 min y 95°C durante 10 min seguido por 45 ciclos de amplificación (95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min).

La detección se realizó en termocicladores One Step Plus (Applied Biosystems) e iQ5 (Biorad). La adquisición y análisis de datos se realizaron mediante los programas One Step Plus (Applied Biosystems) y iQ5 Optical System Software (Biorad). El umbral límite de detección fue establecido de acuerdo a las especificaciones establecidas por dichos programas.

Un ejemplo de las membranas utilizadas tanto en Tissue print-ELISA como Tissue print RT-PCR a tiempo real puede verse en la Figura 3.13

**Figura 3.13: Membranas utilizadas en las técnicas: Inmunoimpresión-ELISA (izquierda) y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real (derecha)**



### 3.3.2 Técnicas empleadas en la detección de ambos virus en pulgones

Los pulgones recogidos en las parcelas experimentales fueron escachados “Squash” sobre membranas de nylon con ayuda de la parte final de un tubo Eppendorf e introducidos en un tubo Eppendorf (1,5 ml). Se añadieron 100  $\mu$ l de tampón de extracción (Osman y Rowani, 2006), se incubaron los tubos a 95° C durante 10 min y se agitaron mediante vortex, antes de aplicar la muestra en el cóctel de reacción. Los iniciadores, sondas y protocolos empleados en la reacción fueron los específicos del virus que se pretendía detectar: para PPV ver apartado 3.3.1.1.2 y para CTV ver apartado 3.3.1.2.2. Los termocicladores y software empleados fueron los mismos explicados anteriormente.

## 3.4 CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE PPV

Se caracterizó el aislado de PPV presente en once plantas elegidas al azar procedentes de las parcelas de Lliria y Carlet, mediante serología y RT-PCR a tiempo real. Para la caracterización serológica se empleó la técnica ELISA-DASI con los siguientes anticuerpos monoclonales: 4DG5 específico para PPV-D (Cambra et al., 1994), AL específico para PPV-M (Boscia et al., 1997), EA24 específico para PPV-EA (Myrta et al, 1998) y AC y TUC específicos para PPV-C (Myrta et al., 2000).

El mismo material fue analizado mediante RT-PCR a tiempo real utilizando los iniciadores universales, sonda TaqMan universal y protocolo (Olmos et al., 2005) descritos en el apartado 3.3.1.1.2. y los iniciadores y sondas MGB específicas para PPV-D y PPV- M (Capote et al., 2006) descritos a continuación. Iniciadores: PPV-MGB-F (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3') y PPV-MGB-R (5'- CTC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3'); sondas: MGB-D (5'-TTC AAC GAC ACC CGT A-3') específica para PPV-D y la sonda MGB-M (5'-TTC AAC AAC GCC TGT G-3') específica para PPV-M. Las extracciones de ARN se realizaron con el kit de extracción de la casa comercial Mobio. El cóctel de reacción contenía 1 $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 $\times$  MultiScribe y RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu$ M iniciador PPV-MGB-F, 1  $\mu$ M iniciador PPV-MGB-R, 150 nM sonda MGB-D ó MGB-M, según el aislado que queríamos detectar y 5 $\mu$ l de muestra. El protocolo consistió en un ciclo de 48°C durante 30 min y 95°C durante 10 min seguido por 45 ciclos de amplificación (95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min).

### **3.5 MÉTODOS DE MUESTREO DE PULGONES**

Para estimar el número de pulgones que visitaron las parcelas experimentales a lo largo del período experimental se utilizaron dos tipos diferentes de trampas: trampas Moericke y trampas de tipo pegajoso.

#### **3.5.1 Trampa de Moericke**

Se utilizaron trampas Moericke amarillas (Moericke, 1955) (Figura 3.14a). Para su confección se dispuso de una cubeta de plástico pintada de amarillo (Titanlux no. 568) con un espectro de absorción luminosa de entre 500 y 600 nm y diámetro 20 cm y con una capacidad aproximada de 5 litros. El recipiente se llenó con agua, se suspendió en un soporte de metal y se clavó en tierra, a 1,50 m de altura. La colecta de los individuos capturados se realizó con una periodicidad de 7-10 días, rellenándose el recipiente de nuevo con agua. Las muestras recogidas fueron filtradas con la ayuda de un embudo y los insectos obtenidos se depositaron en un bote con alcohol etílico del 70% hasta su identificación. Este tipo de trampa es la más utilizada en estudios faunísticos de pulgones, estando indicada para determinar las especies de pulgones que sobrevuelan el cultivo.

#### **3.5.2 Planta pegajosa**

Es una variación del método utilizado por Avinent et al. (1993) y Marroquín et al. (2004). Las plantas completas fueron rociadas con cola pegajosa SOUVERODE (Scots), dejándose en el campo los últimos diez días de cada mes. Pasado este período, las plantas pegajosas eran retiradas del cultivo. En el laboratorio, las plantas recogidas fueron troceadas y depositadas en botes de vidrio (Figura 3.14b), donde se les añadió esencia de trementina (aguarrás), para separar la fauna que había quedado pegada en ellos. Las muestras fueron mantenidas en aguarrás durante un tiempo aproximado de 1h. Posteriormente el líquido contenido en los botes de vidrio era filtrado con ayuda de un colador. Los insectos obtenidos fueron lavados en agua jabonosa para eliminar cualquier resto de aguarrás y mantenido en alcohol etílico al 70% hasta su identificación.

**Figura 3.14: Trampa de Moericke y botes de planta pegajosa****a) Trampa de Moericke****b) Botes de trampa pegajosa****Tronco****Ramas**

El método de la planta pegajosa permite estimar con precisión el número de pulgones que aterrizan o visitan un patrón durante los diez días que éste está disponible para los pulgones en la parcela del ensayo. Para el cálculo del número de pulgones que visitan el cultivo en un mes, se multiplicó el número de pulgones visitantes en cada trampa pegajosa en el periodo de diez días por tres.

Al mismo tiempo, para evaluar el número de pulgones visitantes por área de aterrizaje en la planta, se contaron los insectos que aterrizaron en la zona foliar o zona leñosa. Para dicha evaluación se consideraron las siguiente localizaciones: 1) Hoja: superficie foliar + superficie de brotes no lignificada, 2) Madera secundaria: superficie lignificada de las ramas (este concepto se introdujo, a partir del mes de agosto, al observar que ya habían desarrollado auténticas ramas leñosas), y 3) Madera primaria: superficie del tronco hasta la primera ramificación.

### **3.6 CÁLCULO DE LA SUPERFICIE FOLIAR DE ATERRIZAJE DISPONIBLE PARA LOS PULGONES**

Para estimar la superficie foliar de aterrizaje disponible para los pulgones a lo largo del año en un patrón, y así poderla relacionar con el número de capturas mensuales, se midieron mensualmente, diferentes variables: número de brotes, número de hojas en los brotes, número de ramas, etc... El número evaluado de plantas varió en las distintas parcelas experimentales (véase apartado correspondiente en los Capítulo 4, 5 y 7). Los parámetros tuvieron que ser modificados en función del estado de los patrones, en diferentes períodos vegetativos de los mismos.

### 3.6.1. Método de determinación de la superficie foliar aplicado durante el periodo de brotación

Se utilizó este procedimiento cuando las plantas estaban brotando y no habían formado aún verdaderas ramas (sólo se disponía de brotes). Por cada una de las plantas se contó el número de brotes y el número de hojas presentes en tres de estos brotes (los brotes en los que se contó el número de hojas fueron seleccionados al azar). Se tomaron un total de 10 hojas (3 hojas de cada uno de los brotes contados, más una hoja al azar de la totalidad de la planta) para determinar la superficie foliar. Para ello se empleó un medidor de superficie foliar LICOR-3100 (Figura 3.15), obteniéndose un valor medio por cada 10 hojas seleccionadas.

**Figura 3. 15: Medidor de área foliar LICOR-3100**



Este valor fue tomado como valor medio de la superficie de una hoja de la planta analizada. El valor de la superficie foliar (área de aterrizaje) para cada planta fue estimado con el procedimiento siguiente:

**1) Estima del número total de hojas en cada planta:**

$$C = (A * B) / 3 \quad (\text{Fórmula 3.1})$$

C = número total de hojas

A = número de hojas contadas en 3 brotes

B = número de brotes totales contados a esa planta

**2) Estima de la superficie foliar de cada planta:**

$$S_F = C * S_h \quad (\text{Fórmula 3.2})$$

$S_F$  (m<sup>2</sup>) = Superficie foliar

C = número total de hojas

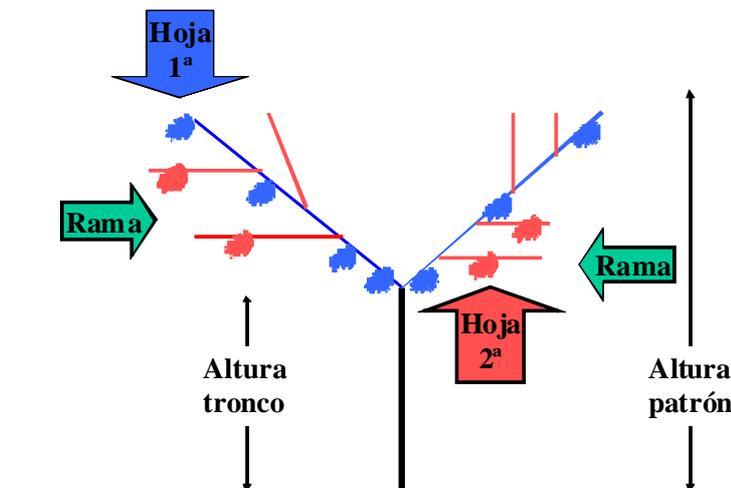
$S_h$  (m<sup>2</sup>) = Superficie media de una hoja

### 3.6.2 Método de determinación de la superficie foliar aplicado en los meses posteriores al periodo de brotación

En los meses en los que las plantas ya habían desarrollado ramas, se varió el procedimiento de estimación de la superficie foliar. Se contó el número de ramas de cada planta, desechando los posibles chupones (vástago que brota de las ramas principales del tronco y aún de las raíces de los árboles). Se seleccionaron tres ramas de cada planta e individualmente se contó el número total de brotes de cada una. De estas tres ramas seleccionadas, se eligieron dos brotes por rama y se contó el número de hojas secundarias (hojas ya diferenciadas que se encuentran en los brotes) de cada uno. A su vez, se contó el número de hojas primarias, hojas que se encuentran en el eje principal de cada rama (Figura 3.16). Al mismo tiempo se recogieron 10 hojas por plantón: una hoja primaria y dos hojas secundarias por rama, más otra hoja del resto de la planta seleccionada al azar.

La superficie foliar de esas 10 hojas se estimó con el mismo procedimiento que el detallado anteriormente.

**Figura 3.16: Esquema de la posición de las hojas primarias y secundarias en un patrón**



Los parámetros evaluados en este caso fueron:

- A = Número total de ramas
- B = Número total de brotes en tres ramas
- C = Media de hojas secundarias en dos brotes de tres ramas
- D = Número de hojas primarias de tres ramas

Con estos datos se calculó el área foliar:

- 1) Cálculo del número total de hojas en tres ramas

$$E = [(B * C) + D] \quad (\text{Fórmula 3.3})$$

- 2) Cálculo del número total de hojas

$$F = [E * A] / 3 \quad (\text{Fórmula 3.4})$$

- 3) Estima de la superficie foliar de cada planta

$$S_F = F * S_h \quad (\text{Fórmula 5})$$

$S_F$  (m<sup>2</sup>)= Superficie foliar

$S_h$  (m<sup>2</sup>)= Superficie media de una hoja

### 3.7 PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos en los ensayos se analizaron con los programas SAS 9.2, Winbugs 1.4 o TAGS para PC, según el caso. Los detalles de los procedimientos estadísticos se detallarán en los apartados de Materiales y métodos de los capítulos correspondientes.

**CAPÍTULO 4.**

**SUSCEPTIBILIDAD A PPV-D DE  
DIFERENTES PATRONES DE  
FRUTALES DE HUESO CULTIVADOS  
EN VIVERO Y ESTUDIO DE FACTORES  
QUE CONDICIONAN LA INFECCIÓN  
NATURAL**



## CAPÍTULO 4.

# SUSCEPTIBILIDAD A PPV-D DE DIFERENTES PATRONES DE FRUTALES DE HUESO CULTIVADOS EN VIVERO Y ESTUDIO DE FACTORES QUE CONDICIONAN LA INFECCIÓN NATURAL

---

### 4.1 INTRODUCCIÓN

La mejora de los patrones de árboles frutales se ha centrado en varios criterios de selección: compatibilidad del injerto, fácil propagación, resistencia a estreses abióticos (caliza activa, asfixia radicular y temperaturas invernales), resistencia a nemátodos y a hongos del suelo (*Armillaria*, *Phytophthora*) y, por supuesto, a la inducción del aumento de cosecha y calidad del fruto (Reighard y Loreti, 2008).

Desde la aparición de la enfermedad de la sharka, la resistencia o susceptibilidad a la misma se consideró como un nuevo criterio en la evaluación de los patrones de frutales de hueso (Kegler et al., 1998). En este sentido diversos trabajos han evaluado la susceptibilidad de diferentes patrones de frutales de hueso a la infección por PPV, mayoritariamente mediante desafíos con inoculación por injerto (Minoiu et al., 1998; Pascal et al., 2002; Rubio et al., 2005; Boeglin et al., 2006). En estos estudios se describieron diferentes patrones como resistentes: BN 4Kr (*Prunus cerasifera*) (Minoiu et al., 1998), GF677, Mirobolan 29C y L2 (*P. lannesiana*) (Rubio et al., 2005).

Diversos trabajos han abordado la epidemiología de PPV en plantaciones de árboles adultos en España desde la detección del virus en 1985 (Llácer et al., 1992; Avinent et al., 1994; Gottwald et al., 1995; Cambra et al., 2004, Cambra et al., 2006b; Malinowski et al., 2006). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado la epidemiología de PPV en bloques de vivero en condiciones de campo, donde la infección es consecuencia de la actividad de los pulgones virulíferos visitantes del cultivo. El conocimiento de la susceptibilidad a la infección natural es fundamental para el diseño de estrategias de control contra la enfermedad en vivero, evitando la dispersión viral a las nuevas plantaciones. Además, el empleo de patrones resistentes o poco susceptibles al virus de la sharka, puede ser una estrategia de control de la enfermedad respetuosa con el medio ambiente. Por tanto, la evaluación de los principales patrones de frutales de hueso utilizados en la fruticultura española es esencial.

## **4.2 OBJETIVOS**

- Evaluación de la susceptibilidad a la infección natural por PPV-D, en condiciones de vivero, de los principales patrones empleados en frutales de hueso en la fruticultura española.
- Estudio de la relación de algunos de los factores que condicionan la infección natural: superficie foliar de aterrizaje disponible para los pulgones, especies de pulgones visitantes del cultivo, época en la que mayoritariamente aparecen y relación del porcentaje de pulgones virulíferos con la tasa de infección viral.

## **4.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.3.1 Localización de las parcelas**

Los estudios planteados se realizaron en dos parcelas experimentales situadas en las localidades valencianas de Lliria y Carlet. Sus características se describen en el Capítulo 3, apartados 3.1.1 y 3.1.2.

### **4.3.2 Patrones empleados**

Los patrones de frutales de hueso elegidos en este estudio, por ser de los más empleados en la fruticultura española, fueron: Nemaguard, Mariana GF8-1, Adesoto 101, Cadaman, Mirobolan 29C y Garnem. Las características específicas de cada uno de ellos se exponen en el Capítulo 1, apartado 1.2 de esta Tesis Doctoral.

### **4.3.3 Muestro vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo**

El muestreo de las parcelas para determinar la incidencia viral se realizó en distintos periodos a lo largo del estudio. Los diferentes períodos y procedimientos empleados, según el caso, se describen en el Capítulo 3, en el apartado 3.2 de esta Tesis Doctoral.

### **4.3.4 Caracterización serológica y molecular de los aislados de PPV**

Para conocer el aislado de PPV presente en las parcelas se caracterizó mediante métodos serológicos y moleculares. Los procedimientos empleados se describen en el Capítulo 3, en el apartado 3.4 de esta Tesis Doctoral.

### **4.3.5 Muestreo de pulgones y detección de pulgones virulíferos**

El muestreo de la fauna afídica se realizó mediante dos tipos de trampas, las trampas amarillas tipo Moericke y las trampas de tipo pegajoso (Capítulo 3, apartado 3.5).

**Trampas Moericke:** En Lliria se recogieron las capturas de las trampas desde el 5/4/2006 hasta el 29/10/2007. En Carlet las capturas de las trampas se recogieron desde el 28/4/2006 hasta el 29/10/2007, cada 7-10 días.

**Planta pegajosa:** Se rociaron con cola Souverode (véase apartado 3.5 del Capítulo 3) cinco plantas del patrón Nemaguard y cinco plantas del patrón Mariana GF8-1 en Lliria y cinco plantas de cada uno de los seis patrones estudiados en Carlet. En Lliria las plantas pegajosas se utilizaron desde abril 2006 hasta febrero 2007, y en mayo 2007. En Carlet las trampas se colocaron en mayo, julio, agosto, septiembre, y noviembre de 2006 y en enero y mayo de 2007.

Los pulgones capturados se conservaron en alcohol del 70% hasta su identificación. Éstos se clasificaron en tres grupos: *Aphis spiraecola*, *A. gossypii* y otros. Esta clasificación se realizó debido al hecho de que en las condiciones españolas mediterráneas, ambas especies constituyen los principales responsables de la dispersión natural de la PPV (Cambra et al., 2004, 2006b). En el caso de Mayo 2006 y 2007, al observar que era el mes con mayor número de capturas, se identificaron los pulgones según las especies más abundantes en las condiciones mediterráneas (Cambra et al., 2004; Capote et al., 2008).

La estimación del porcentaje de pulgones virulíferos en las dos localidades de estudio se realizó en las especies mayoritarias *A. spiraecola* y *A. gossypii* (apartado 3.3.2 del Capítulo 3).

#### **4.3.6 Estima de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones**

En la parcela situada en Lliria se tomaron cinco plantas del patrón Nemaguard y otras tantas del patrón Mariana GF8-1 cada mes del cultivo en vivero, con la finalidad de estimar la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones tal y como se detalla en el apartado 3.6 del Capítulo 3. Las mediciones se efectuaron entre los meses de abril a noviembre del 2006 y el mes de mayo del 2007, ya que se observó que este mes fue el de mayor número de capturas de pulgones durante el año 2006. Durante el mes de abril de 2006 la medición del área foliar se realizó como se detalla en el apartado 3.6.1 del Capítulo 3, debido a la brotación de las plantas. En el resto de meses las mediciones se realizaron como se detalla en el apartado 3.6.2 del Capítulo 3. En Carlet se tomaron cinco plantas por patrón estudiado, en total 30 plantas por mes, para medir la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones, tal y como se detalla en el apartado 3.6 del Capítulo 3. Las mediciones se efectuaron los meses de mayo, junio, julio, agosto, septiembre y noviembre del 2006 y mayo del 2007. Durante el mes de mayo del 2006 la medición del área foliar se realizó como se detalla en el apartado 3.6.1 del Capítulo 3, ya que las plantas estaban brotando. En el resto de meses las mediciones se realizaron como se detalla en el apartado 3.6.2 del Capítulo 3.

#### 4.3.7 Análisis estadísticos

En el estudio de la susceptibilidad a la infección natural por PPV-D de los patrones ensayados, se aplicó un modelo lineal mixto generalizado (Molenberghs y Verbeke, 2005) con dos factores: Bloque y Patrón, asumiendo que la variable de interés (infección por PPV) sigue una distribución binomial. Para este tipo de análisis sólo se tuvieron en cuenta los datos de las plantas no tratadas con aceite en ambas parcelas. Al comparar las variedades entre sí se utilizó la corrección de Bonferroni (Bonferroni, 1936) para proteger los resultados del error de Tipo-I. Los resultados obtenidos en la parcela de Carlet fueron tan evidentes que no se realizó un análisis estadístico.

En el estudio de la dinámica poblacional (número de pulgones capturados en cada uno de los patrones ensayados) se definieron como variables de interés el número total de pulgones capturados por planta y el número de pulgones pertenecientes a las especies vectoras *Aphis spiraecola* y *A. gossypii* capturadas por planta. Se aplicó un modelo lineal generalizado (Molenberghs y Verbeke, 2005) con dos factores: Mes y Patrón, asumiendo que las variables de interés siguen una distribución binomial negativa. En los datos obtenidos en la parcela de Carlet se compararon todas las variedades entre sí aplicando la corrección de Bonferroni (Bonferroni, 1936) para proteger los resultados del error de Tipo-I.

Para estudiar las diferencias en el número de pulgones PPV-virulíferos capturados mediante trampa de Moericke o mediante planta pegajosa y las diferencias en el número de pulgones PPV-virulíferos presentes en ambas parcelas, se aplicó un modelo lineal generalizado (Molenberghs y Verbeke, 2005) con tres factores: Parcela, Trampa, Año y la interacción Año x Parcela, asumiendo que la variable de interés (número de pulgones virulíferos) sigue una distribución binomial.

Además, se comparó el número de pulgones PPV-virulíferos visitantes entre los dos patrones estudiados en la parcela de Lliria mediante test de hipótesis nula, admitiendo que la variable estudiada (porcentaje de pulgones virulíferos) sigue una distribución binomial.

En el estudio de la superficie de foliar de aterrizaje disponible para los pulgones en cada uno de los patrones empleados se utilizó la técnica ANOVA con un modelo mixto con dos factores (Patrón y Mes) junto con su interacción permitiendo que las varianzas de cada combinación Patrón x Mes puedan ser diferentes. Se utilizó el método de Kenward y Roger (1997) para la estimación de los grados de libertad. Si la interacción Mes x Patrón fue significativa, los datos se analizaron mes a mes aplicando un análisis de la varianza (ANOVA) clásico con homogeneidad de varianzas. En el caso de los datos de la parcela de Carlet se aplicó la corrección de Bonferroni (Bonferroni, 1936) al comparar las variedades entre sí para protegernos del error de Tipo-I.

Todos los análisis se realizaron con el programa para PC, SAS 9.2.

## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Incidencia viral

No se detectó PPV en los análisis realizados tras la plantación de ambas parcelas. En las Tabla 4.1 y 4.2 se pueden observar los resultados obtenidos mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en ambas parcelas estudiadas.

En abril de 2008, después de dos años de cultivo, se encontraron diferencias significativas en la incidencia viral de PPV entre los diferentes patrones de frutales de hueso ensayados en la parcela situada en Llíria con una alta densidad de inóculo (Tabla 4.1). Tras los análisis mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real (se dan la proporción de plantas infectadas con su respectivo error estándar de ambos datos entre paréntesis, respectivamente) los patrones Mariana GF8-1 ( $0,960 \pm 0,020$  y  $0,982 \pm 0,009$ ) y Adesoto 101 ( $0,969 \pm 0,025$  y  $0,969 \pm 0,022$ ) fueron los más susceptible a la infección natural por PPV. La alta susceptibilidad de estos patrones fue seguida por NemaGuard ( $0,612 \pm 0,103$ ;  $0,637 \pm 0,052$ ) y Mirobolan 29C ( $0,313 \pm 0,102$ ;  $0,384 \pm 0,068$ ). Cadaman y Garnem presentaron el menor número de plantas infectadas por PPV, sólo detectables mediante “Spot” RT-PCR a tiempo real. En mayo de 2007 esta tendencia en la susceptibilidad de los distintos patrones ya era patente (Tabla 4.1), encontrándose diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, en octubre 2006 sólo se encontraron diferencias significativas en la incidencia viral entre los patrones Cadaman y Garnem con el resto de patrones evaluados cuando el análisis se realizó mediante ELISA-DASI.

No se encontraron diferencias en la susceptibilidad a PPV-D entre los patrones de frutales de hueso ensayados después de un año y medio de cultivo en la parcela situada en Carlet, con una baja densidad de inóculo (Tabla 4.2). PPV fue únicamente detectado en dos plantas de Adesoto 101 por ELISA-DASI después de seis meses de cultivo. Esta incidencia aumentó al final de la experiencia en noviembre de 2007 cuando se analizó tanto por ELISA-DASI como por “Spot” RT-PCR a tiempo real. PPV sólo fue detectado en plantas de los patrones Adesoto 101 y NemaGuard (Tabla 4.2).

**Tabla 4.1: Susceptibilidad de diferentes patrones de frutales de hueso a la infección natural por *Plum pox virus* tipo D bajo una alta densidad de inóculo (parcela situada en Lliria)<sup>a</sup>, determinada mediante análisis por ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real**

Patrón	ELISA -DASI		"Spot" RT-PCR a tiempo real	
	Media ± error estándar	Número de plantas infectadas por PPV / Número de plantas analizadas	Media ± error estándar	Número de plantas infectadas por PPV / Número de plantas analizadas
<b>Mariana GF8-1</b>	24 / 222 <sup>b</sup> (0,108 ± 0,021) <sup>c</sup> a <sup>d</sup>	148 / 223 (0,618 ± 0,088) a	221 / 230 (0,960 ± 0,020) a	30 / 222 (0,133 ± 0,026) a 171 / 233 (0,724 ± 0,058) a 226 / 230 (0,982 ± 0,009) a
<b>Adesoto 101</b>	5 / 80 (0,050 ± 0,024) a	35 / 80 (0,436 ± 0,102) a, b	63 / 65 (0,969 ± 0,025) a, b	7 / 80 (0,087 ± 0,033) a 41 / 80 (0,513 ± 0,084) a, b 63 / 65 (0,969 ± 0,022) a, b
<b>Nemaguard</b>	13 / 225 (0,058 ± 0,016) a	63 / 236 (0,278 ± 0,076) b	123 / 210 (0,612 ± 0,103) b	13 / 225 (0,059 ± 0,017) a 94 / 236 (0,411 ± 0,069) b 132 / 210 (0,637 ± 0,052) b
<b>Mirobolan 29C</b>	3 / 82 (0,037 ± 0,021) a	15 / 81 (0,177 ± 0,066) b	26 / 80 (0,313 ± 0,102) b	3 / 82 (0,036 ± 0,021) a 17 / 81 (0,205 ± 0,060) b 31 / 80 (0,384 ± 0,068) b, c
<b>Cadaman</b>	0 / 80 (0 ± 0,000) b	0 / 80 (0 ± 0,000) c	0 / 78 (0 ± 0,000) c	3 / 80 (0,037 ± 0,022) a 2 / 80 (0,024 ± 0,018) b 4 / 78 (0,051 ± 0,026) c
<b>Garnem</b>	0 / 68 (0 ± 0,000) b	0 / 68 (0 ± 0,000) c	0 / 66 (0 ± 0,000) c	1 / 68 (0,015 ± 0,015) a 0 / 68 (0 ± 0,000) c 3 / 66 (0,045 ± 0,026) c

<sup>a</sup> Parcela localizada en Lliria, Valencia, en una zona con aproximadamente un 90% de incidencia de PPV

<sup>b</sup> Número de plantas infectadas por PPV / Número de plantas analizadas

<sup>c</sup> Media ± error estándar

<sup>d</sup> Datos seguidos por diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con un modelo lineal mixto generalizado siguiendo una distribución binomial ( $p$  total < 0,05 usando la corrección de Bonferroni)

4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural

**Tabla 4.2: Susceptibilidad de diferentes patrones de frutales de hueso a la infección natural por *Plum pox virus* tipo D bajo una baja densidad de inóculo (parcela situada en Carlet)<sup>a</sup>, determinada mediante análisis por ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real**

Patrón	Noviembre 2006		Noviembre 2007	
	ELISA-DASI <sup>b</sup>	“Spot” r-t <sup>b</sup>	ELISA-DASI	“Spot” r-t
Mariana GF8-1	0 / 222 <sup>c</sup>	n.d <sup>d</sup>	0 / 240	0 / 240
Adesoto 101	2 / 231	n.d	3 / 216	4 / 216
Nemaguard	0 / 174	n.d	1 / 159	1 / 159
Mirobolan 29C	0 / 225	n.d	0 / 205	0 / 205
Cadaman	0 / 261	n.d	0 / 260	0 / 260
Garnem	0 / 228	n.d	0 / 169	0 / 169
<b>Total</b>	<b>2 / 1366</b>	<b>n.d</b>	<b>4 / 1249</b>	<b>5 / 1249</b>

<sup>a</sup>Parcela localizada en Carlet, Valencia, en una zona con aproximadamente un 5% de incidencia de PPV

<sup>b</sup>ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real

<sup>c</sup>Número de plantas infectadas por PPV / Número de plantas analizadas

<sup>d</sup>No determinado

#### 4.4.2 Caracterización de los aislados de PPV presentes en la parcela

Los 11 aislados recogidos de los patrones infectados de ambas parcelas, reaccionaron con el anticuerpo monoclonal universal 5B-IVIA, pero no reaccionaron con los anticuerpos monoclonales específicos para caracterización de tipos M, Rec, EA y C: AL, EA24, TUV y AC. Ocho de los once aislados reaccionaron contra el anticuerpo monoclonal 4DG5. Los once aislados fueron amplificados al analizarlos por RT-PCR a tiempo real usando la sonda universal PPV-U y la específica para PPV-D (MGB-D), mientras que no se produjo amplificación con la sonda específica para PPV-M (MGB-M).

#### **4.4.3 Estudio de la relación de algunos de los factores que condicionan la incidencia de la infección viral**

##### *4.4.3.1 Estima de la población de pulgones visitantes y porcentaje de individuos virulíferos*

###### *4.4.3.1.1 Capturas mediante trampas Moericke*

El número de pulgones capturados en las parcelas de Lliria y Carlet durante el período que duró el muestro mediante trampas amarillas de Moericke se indica en la Tabla 4.3. El número de pulgones en ambas parcelas fue similar: 5.582 en Lliria y 5.265 en Carlet.

La especie más capturada en ambas parcelas mediante el método de trampa de Moericke fue *Aphis spiraecola*. El 97% de los pulgones capturados correspondieron a esta especie en la parcela situada en Lliria y el 93% en la situada en Carlet.

El mes de mayo resultó ser el mes con un mayor número de capturas en ambas localidades y en ambos años muestreados. Sin embargo, el porcentaje de capturas varió según la parcela y el año (Tabla 4.3). En Lliria el 76% de las capturas mediante trampa Moericke se produjeron en mayo de 2006, el 17% en mayo de 2007, siendo inferiores al 1,2% el resto de meses. En Carlet el 69% de las capturas mediante trampa Moericke se produjeron en mayo de 2007, el 10% en mayo el 2006, el 8% en el mes de enero 2007, el 7% en abril 2007 y el resto de meses el número de capturas representó porcentajes muy inferiores.

**Tabla 4.3: Número de pulgones capturados por una trampa amarilla de Moericke en las parcelas de Llíria y Carlet (Valencia) durante el periodo 2006-2007**

Mes	Alta densidad de inóculo <sup>a</sup>				Baja densidad de inóculo <sup>b</sup>			
	<i>Aphis spiraecola</i>	<i>A. gossypii</i>	Otros	Total	<i>A. spiraecola</i>	<i>A. gossypii</i>	Otros	Total
Abril 2006	0	2	5	7	n.d. <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	551
Mayo 2006	4.130	6	106	4.242	449	11	91	551
Junio 2006	0	0	0	0	0	0	0	0
Julio 2006	36	0	0	36	10	0	0	10
Agosto 2006	10	0	0	10	13	0	1	14
Septiembre 2006	60	0	0	60	47	0	0	47
Octubre 2006	24	0	0	24	4	0	0	4
Noviembre 2006	39	6	8	53	4	0	8	12
Diciembre 2006	37	11	8	56	65	8	49	122
Enero 2007	14	0	0	14	373	3	51	427
Febrero 2007	1	0	0	1	10	0	6	16
Marzo 2007	0	1	0	1	32	0	12	44
Abril 2007	50	0	8	58	327	6	48	381
Mayo 2007	936	1	12	949	3.550	0	41	3.591
Junio 2007	28	0	5	33	2	0	1	3
Julio 2007	12	0	1	13	4	1	0	5
Agosto 2007	17	1	1	19	22	3	3	28
Septiembre 2007	4	0	0	4	6	2	2	10
Octubre 2007	1	0	1	2	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>5.399</b>	<b>28</b>	<b>155</b>	<b>5.582</b>	<b>4.918</b>	<b>34</b>	<b>313</b>	<b>5.265</b>
<b>% Capturas / Especie</b>	<b>96,72%</b>	<b>0,50%</b>	<b>2,78%</b>	<b>100,00%</b>	<b>93,41%</b>	<b>0,65%</b>	<b>5,94%</b>	<b>100,00%</b>

<sup>a</sup> Parcela localizada en Llíria, Valencia, en una zona con aproximadamente un 90% de incidencia de PPV

<sup>b</sup> Parcela localizada en Carlet, Valencia, en una zona con aproximadamente un 5% de incidencia de PPV

<sup>c</sup> No determinado

#### 4.4.3.1.2 Capturas mediante el método de la planta pegajosa

En la Tabla 4.4 se muestran el número y porcentaje de pulgones por especie capturados mediante el método de la planta pegajosa durante los meses de mayo de 2006 y 2007 en ambas parcelas.

**Tabla 4.4: Número y porcentaje de pulgones capturados mediante el método de la planta pegajosa en las parcelas de Lliria y Carlet durante los últimos 10 días de los meses de mayo de 2006 y 2007**

Especie	Alta densidad de inóculo <sup>a</sup>		Baja densidad de inóculo <sup>b</sup>	
	Mayo 2006	Mayo 2007	Mayo 2006	Mayo 2007
<i>Aphis spiraecola</i>	108 (53,20%)	34 (66,67%)	19 (40,43%)	394 (57,35%)
<i>A. gossypii</i>	3 (1,48%)	4 (7,84%)	7 (14,89%)	83 (12,08%)
<i>Hyalopterus pruni</i>	46 (22,66%)	1 (1,96%)	8 (17,02%)	78 (11,35%)
<i>A.fabae</i>	9 (4,43%)	0 (0%)	2 (4,26%)	3 (0,44%)
<i>Myzus persicae</i>	8 (3,94%)	0 (0%)	3 (6,38%)	2 (0,29%)
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	2 (0,98%)	0 (0%)	2 (4,26%)	32 (4,66%)
<i>A.craccivora</i>	1 (0,49%)	1 (1,96%)	3 (6,38%)	3 (0,44%)
Otros	26 (12,81%)	11 (21,57%)	3 (6,38%)	92 (13,39%)
<b>Total</b>	<b>203</b>	<b>51</b>	<b>47</b>	<b>687</b>

<sup>a</sup> Parcela situada en Lliria (Valencia) en un zona con aproximadamente un 90% de incidencia de PPV. Se colocaron cinco plantas pegajosas de los patrones Nema-guard y Mariana GF8-1, respectivamente (10 plantas)

<sup>b</sup> Parcela situada en Carlet (Valencia), en una zona con aproximadamente un 5% de incidencia de PPV. Se colocaron cinco plantas pegajosas por cada patrón estudiado (30 plantas)

El número y porcentaje de individuos capturados mediante el método de la planta pegajosa en las parcelas de Lliria y Carlet durante un período vegetativo (2006) y mayo de 2007, clasificándose en las especies vectoras *Aphis spiraecola*, *A. gossypii* y “otros pulgones” se muestra en la Tabla 4.5. En Lliria el número total de pulgones capturados en un total de 10 plantas durante el período muestreado, fue de 412. En Carlet, los pulgones recogidos en un total de 30 plantas fueron 871.

La especie más abundante en la parcela de Lliria y de Carlet, con unos porcentaje muy similares, fue *A. spiraecola* con el 58% y el 57% del total de las capturas mediante el método de la planta pegajosa, respectivamente. *A. gossypii* representó el 4% y el 12% de las capturas totales en las parcelas de Lliria y Carlet, respectivamente. Otra especie abundante en ambas parcelas, fue *Hyalopterus pruni* (Geoffroy) (Tabla 4.4).

**Tabla 4.5: Número y porcentaje de especies de pulgones clasificados en *Aphis spiraeicola*, *A. gossypii* y otros capturados mediante el método de la planta pegajosa durante los últimos diez días de cada mes en la parcela de Líría y Carlet durante un período vegetativo (2006) y mayo 2007**

Mes	Alta densidad de inóculo <sup>a</sup>				Baja densidad de inóculo <sup>b</sup>			
	<i>A.spiraeicola</i>	<i>A.gossypii</i>	Otros	Total	<i>A.spiraeicola</i>	<i>A.gossypii</i>	Otros	Total
Abril 2006	12	0	30	42	n.d. <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
Mayo 2006	108	3	92	203	19	7	21	47
Junio 2006	1	2	6	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Julio 2006	24	4	1	29	11	4	3	18
Agosto 2006	18	0	1	19	26	9	19	54
Septiembre 2006	19	4	6	29	36	6	10	52
Octubre 2006	10	0	1	11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Noviembre 2006	12	2	5	19	6	0	2	8
Diciembre 2006	0	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Enero 2007	0	0	0	0	3	2	0	5
Febrero 2007	0	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mayo 2007	34	4	13	51	394	83	210	687
<b>Total</b>	<b>238</b>	<b>19</b>	<b>155</b>	<b>412</b>	<b>495</b>	<b>111</b>	<b>265</b>	<b>871</b>
<b>% Capturas / Especie</b>	<b>57,77%</b>	<b>4,61%</b>	<b>37,62%</b>	<b>100,00%</b>	<b>56,83</b>	<b>12,74</b>	<b>30,42</b>	<b>100,00%</b>

<sup>a</sup> Parcela situada en Líría (Valencia) en un zona con aproximadamente un 90% de incidencia de PPV. Se colocaron cinco plantas pegajosas de los patrones Nemaguard y Mariana GF8-1, respectivamente (10 plantas)

<sup>b</sup> Parcela situada en Carlet (Valencia), en una zona con aproximadamente un 5% de incidencia de PPV. Se colocaron cinco plantas pegajosas por cada patrón estudiado (30 plantas)

<sup>c</sup> No determinado

#### 4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural

---

En las Tablas 4.6a, 4.6b, 4.7a y 4.7b se muestra el número y porcentaje de pulgones totales y de las especies vectoras *A. spiraecola* y *A. gossypii*, respectivamente, que aterrizan sobre 5 plantas de cada uno de los diferentes patrones ensayados en ambas parcelas.

En la parcela situada en Lliria el 58% de los pulgones totales visitantes lo hacen sobre Mariana GF8-1 y el 42% sobre Nemaguard (Tabla 4.6a). El 60% de los pulgones pertenecientes a las especies vectoras *A. spiraecola* y *A. gossypii* aterrizaron sobre plantas del patrón Mariana GF8-1, mientras el 40% lo hicieron sobre plantas del patrón Nemaguard (Tabla 4.6b). No se encontraron diferencias significativas en el número total de pulgones, ni en el número de pulgones de las especies vectoras *A. spiraecola* y *A. gossypii* que visitaron una planta de cualquiera de los dos patrones estudiados en los meses muestreados (Tablas 4.6a y 4.6b).

En la parcela situada en Carlet el patrón más visitado fue Mariana GF8-1 (26,75% de las capturas), mientras que el menos visitado fue Adesoto 101 (7% de las capturas) (Tabla 4.7a). En Carlet, el patrón con más pulgones visitantes de las especies *A. spiraecola* y *A. gossypii* fue Mariana GF8-1 (31,85%) siendo el patrón menos visitado Adesoto 101 (6,77%). No se obtuvieron diferencias significativas entre el número de pulgones totales visitantes que aterrizan en cada patrón en ninguno de los meses muestreados (Tabla 4.7a). Sin embargo, sí que se obtuvieron diferencias significativas en el número de pulgones visitantes de las especies *A. spiraecola* y *A. gossypii* entre los patrones Mariana GF8-1 y Cadaman en el mes de mayo 2007 (Tabla 4.7b).

**Tabla 4.6a: Número y porcentaje total de pulgones que aterrizaron durante los últimos 10 días de cada mes en 5 plantas de Nemaguard y Mariana GF8-1 en la parcela situada en Llíria**

Patrón	Abr 2006	May 2006	Jun 2006	Jul 2006	Agost 2006	Sept 2006	Oct 2006	Nov 2006	Dic 2006	Ene 2007	Feb 2007	May 2007	Total
Nemaguard	20 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	28 <sup>a</sup>	173 (41.99%)
Mariana GF8-1	22 <sup>a</sup>	119 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>	239 (58.01%)

<sup>a</sup> Datos seguidos por diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes de acuerdo con un modelo lineal generalizado siguiendo una distribución binomial negativa ( $p < 0,05$ )

**Tabla 4.6b: Número y porcentaje de pulgones de las especies vectoras *Aphis spiraeicola* y *A. gossypii* que aterrizaron durante los últimos 10 días de cada mes en 5 plantas de Nemaguard y Mariana GF8-1 en la parcela situada en Llíria**

Patrón	Abr 2006	May 2006	Jun 2006	Jul 2006	Agost 2006	Sept 2006	Oct 2006	Nov 2006	Dic 2006	Ene 2007	Feb 2007	May 2007	Total
Nemaguard	4 <sup>a</sup>	42 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>	103 (40.08%)
Mariana GF8-1	8 <sup>a</sup>	69 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	154 (59.92%)

<sup>a</sup> Datos seguidos por diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes de acuerdo con un modelo lineal generalizado siguiendo una distribución binomial negativa ( $p < 0,05$ )

**Tabla 4.7a: Número y porcentaje total de pulgones que aterrizaron durante los últimos 10 días de cada mes en cinco plantas de cada uno de los patrones estudiados en la parcela situada en Carlet**

Patrón	May 2006	Jul 2006	Agost 2006	Sept 2006	Nov 2006	Ene 2007	May 2007	Total
Nemaguard	9 a	3 a	14 a	1 a	2 a	0 a	149 a	178 (20,44%)
Mariana GF8-1	25 a	2 a	5 a	2 a	0 a	3 a	196 a	233 (26,75%)
Adesoto 101	0 a	4 a	0 a	0 a	2 a	0 a	55 a	61 (7,00%)
Cadaman	13 a	5 a	24 a	12 a	2 a	1 a	52 a	109 (12,51%)
Mirobolan 29C	0 a	3 a	0 a	1 a	0 a	0 a	134 a	138 (15,84%)
Garnem	0 a	1 a	11 a	36 a	2 a	1 a	101 a	152 (17,45%)

<sup>a</sup> Datos seguidos por diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes de acuerdo con un modelo lineal generalizado siguiendo una distribución binomial negativa ( $p$  total < 0,05 usando la corrección de Bonferroni)

**Tabla 4.7b: Número y porcentaje de pulgones de las especies vectoras *Aphis spiraeicola* y *A. gossypii* que aterrizaron durante los últimos 10 días de cada mes en 5 plantas de cada uno de los patrones estudiados en la parcela situada en Liria**

Patrón	May 2006	Jul 2006	Agost 2006	Sept 2006	Nov 2006	Ene 2007	May 2007	Total
Nemaguard	0 a	2 a	6 a	1 a	2 a	0 a	100 a, b	111 (18,32%)
Mariana GF8-1	24 a	1 a	4 a	2 a	0 a	3 a	159 a	193 (31,85%)
Adesoto 101	0 a	4 a	0 a	0 a	0 a	0 a	37 a, b	41 (6,77%)
Cadaman	2 a	4 a	17 a	12 a	2 a	1 a	28 b	66 (10,89%)
Mirobolan 29C	0 a	3 a	0 a	1 a	0 a	0 a	97 a, b	101 (16,67%)
Garnem	0 a	1 a	8 a	26 a	2 a	1 a	56 a, b	94 (15,51%)

<sup>a</sup> Datos seguidos por diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes de acuerdo con un modelo lineal generalizado siguiendo una distribución binomial negativa ( $p$  total < 0,05 usando la corrección de Bonferroni)

En las Tablas 4.8 y 4.9, se presentan las estimas del número total de pulgones y del número de pulgones de las especies vectoras *A. spiraecola* y *A. gossypii* que visitaron cada uno de los patrones ensayados a lo largo de un período vegetativo.

En Lliria se estimó que una planta de Mariana GF8-1 fue visitada por un total 129,6 pulgones y 87 pulgones visitaron una de Nemaguard durante el mismo período vegetativo (Tabla 4.8).

En Carlet los patrones más visitados durante el mismo período fueron Cadaman y Garnem con 34,2 y 30,6 pulgones visitantes por planta, respectivamente (Tabla 4.8). Los patrones que recibieron un número menor de visitas fueron Adesoto 101 con 3,6 y Mirobolan 29C con 2,4 pulgones por planta, respectivamente.

Con los datos expuestos en las Tablas 4.8 y 4.9 se ha estimado que el número de pulgones totales que visitaron una planta de vivero en la parcela de Lliria durante el mes mayo de dos años consecutivos (2006-07) fue de 38,1 pulgones, mientras que en la parcela situada en Carlet fue de 36,7. De la misma forma, el número de pulgones pertenecientes a las especies vectoras *A. spiraecola* y *A. gossypii* que visitaron cualquier patrón en el mes de mayo fue de 22,35 pulgones en Lliria, y de 25,15 en Carlet.

**Tabla 4.8: Estima del número total de pulgones que aterrizaron durante el período vegetativo (2006) y mayo 2007 en una planta de cada uno de los diferentes patrones estudiados en las parcelas de Llíria y Carlet**

Período / Patrón	Alta densidad de inóculo <sup>a</sup>				Baja densidad de inóculo <sup>b</sup>						Media pulgones / planta	
	Nemaguard	Mariana GF8-1	Mariana GF8-1	Media pulgones / planta	Nemaguard	Mariana GF8-1	Adesoto 101	Cadaman	Mirobolan 29C	Garmen		Media pulgones / planta
Abril 2006	12 <sup>c</sup>	13,2	13,2	12,6	n.d <sup>d</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Mayo 2006	50,4	71,4	71,4	60,9	5,4	15	0	7,8	0	0	4,7	4,7
Junio 2006	0	5,4	5,4	2,7	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Julio 2006	5,4	12	12	8,7	1,8	1,2	2,4	3	1,8	0,6	1,8	1,8
Agosto 2006	1,8	9,6	9,6	5,7	8,4	3	0	14,4	0	6,6	5,4	5,4
Septiembre 2006	9,6	7,8	7,8	8,7	0,6	1,2	0	7,2	0,6	21,6	5,2	5,2
Octubre 2006	4,2	2,4	2,4	3,3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Noviembre 2006	3,6	7,8	7,8	5,7	1,2	0	1,2	1,2	0	1,2	0,8	0,8
Diciembre 2006	0	0	0	0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Enero 2007	0	0	0	0	0	1,8	0	0,6	0	0,6	0,5	0,5
Febrero 2007	0	0	0	0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Total<sup>e</sup></b>	<b>87</b>	<b>129,6</b>	<b>129,6</b>	<b>108,3</b>	<b>17,4</b>	<b>22,2</b>	<b>3,6</b>	<b>34,2</b>	<b>2,4</b>	<b>30,6</b>	<b>18,4</b>	<b>18,4</b>
<b>Mayo 2007</b>	<b>16,8</b>	<b>13,8</b>	<b>13,8</b>	<b>15,3</b>	<b>89,4</b>	<b>117,6</b>	<b>33</b>	<b>31,2</b>	<b>80,4</b>	<b>60,6</b>	<b>68,7</b>	<b>68,7</b>

<sup>a</sup> Parcela situada en Llíria (Valencia), en un área con aproximadamente un 90% de incidencia de PPV

<sup>b</sup> Parcela situada en Carlet (Valencia), en un área con aproximadamente un 5% de incidencia de PPV

<sup>c</sup> Pulgones estimados / planta.

<sup>d</sup> No determinado

<sup>e</sup> Estima de pulgones visitantes por planta en un período vegetativo.

**Tabla 4.9: Estima del número de pulgones de las especies vectoras *Aphis spiraeicola* y *A. gossypii* que aterrizaron durante el período vegetativo (2006) y mayo 2007 en una planta de cada uno de los diferentes patrones estudiados en las parcelas de Llíria y Carlet**

Período / Patrón	Alta densidad de inóculo <sup>a</sup>			Baja densidad de inóculo <sup>b</sup>					Media pulgones / planta <sup>c</sup>	
	Nemaguard	Mariana GF8-1	Media pulgones / planta <sup>c</sup>	Nemaguard	Mariana GF8-1	Adesoto 101	Cadaman	Mirobolan 29C		Garmen
Abril 2006	2,4 <sup>c</sup>	4,8	3,6	n.d <sup>d</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Mayo 2006	25,2	41,4	33,3	0	14,4	0	1,2	0	0	2,6
Junio 2006	0	1,8	0,9	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Julio 2006	4,8	12	8,4	1,2	0,6	2,4	2,4	1,8	0,6	1,5
Agosto 2006	1,8	9	5,4	3,6	2,4	0	10,2	0	4,8	3,5
Septiembre 2006	6	7,8	6,9	0,6	1,2	0	7,2	0,6	15,6	4,2
Octubre 2006	3,6	2,4	3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Noviembre 2006	2,4	6	4,2	1,2	0	0	1,2	0	1,2	0,6
Diciembre 2006	0	0	0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Enero 2007	0	0	0	0	1,8	0	0,6	0	0,6	0,5
Febrero 2007	0	0	0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Total<sup>e</sup></b>	<b>46,2</b>	<b>85,2</b>	<b>65,7</b>	<b>6,6</b>	<b>20,4</b>	<b>2,4</b>	<b>22,8</b>	<b>2,4</b>	<b>22,8</b>	<b>12,9</b>
<b>Mayo 2007</b>	<b>15,6</b>	<b>7,2</b>	<b>11,4</b>	<b>60</b>	<b>95,4</b>	<b>22,2</b>	<b>16,8</b>	<b>58,2</b>	<b>33,6</b>	<b>47,7</b>

<sup>a</sup>Parcela situada en Llíria (Valencia), en un área con aproximadamente un 90% de incidencia de PPV

<sup>b</sup>Parcela situada en Carlet (Valencia), en un área con aproximadamente un 5% de incidencia de PPV

<sup>c</sup>Pulgones estimados / planta.

<sup>d</sup>No determinado

<sup>e</sup>Estima de pulgones visitantes por planta en un período vegetativo.

4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural

En la Tabla 4.10 se puede observar el número de pulgones totales clasificados por la zona de la planta dónde aterrizan. Se observa que en los primeros meses de plantación los pulgones pueden aterrizar en las partes leñosas de la planta, pero a partir del mes de mayo los pulgones muestran una clara predilección por las parte foliar de la planta, así el 83,50% y el 95,87% de los pulgones capturados aterrizaron sobre la parte foliar de la planta en las parcelas de Lliria y Carlet, respectivamente.

**Tabla 4.10: Número y porcentaje de pulgones capturados durante los últimos diez días de cada mes en las parcelas de Lliria y Carlet, clasificados según la parte de la planta donde aterrizaron**

Mes	Alta densidad de inóculo <sup>a</sup>				Baja densidad de inóculo <sup>b</sup>			
	Hojas <sup>c</sup>	Madera 2º <sup>d</sup>	Madera 1º <sup>e</sup>	Total	Hojas	Madera 2º	Madera 1º	Total
Abril 2006	3	n.d. <sup>f</sup>	39	42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mayo 2006	182	n.d.	21	203	36	n.d.	11	47
Junio 2006	9	n.d.	0	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Julio 2006	29	n.d.	0	29	18	n.d.	0	18
Agosto 2006	18	1	0	19	48	0	6	54
Septiembre 2006	27	2	0	29	50	2	0	52
Octubre 2006	11	0	0	11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Noviembre 2006	19	0	0	19	0	7	1	8
Diciembre 2006	0	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Enero 2007	0	0	0	0	0	5	0	5
Febrero 2007	0	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Mayo 2007</b>	<b>46</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>51</b>	<b>683</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>687</b>
<b>Total</b>	<b>344</b>	<b>8</b>	<b>60</b>	<b>412</b>	<b>835</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>871</b>
% Capturas / Zona	83,50%	1,94%	14,56%		95,87%	2,07%	2,07%	

<sup>a</sup>Parcela situada en Lliria (Valencia), en un área con un 90% de incidencia de PPV aproximadamente. Se colocaron 5 plantas pegajosas en los patrones NemaGuard y Mariana GF8-1, respectivamente (10 plantas)

<sup>b</sup>Parcela situada en Carlet (Valencia), en un área con un 5% de incidencia de PPV aproximadamente. Se colocaron 5 plantas pegajosas por cada patrón estudiado (30 plantas)

<sup>c</sup>Hojas + superficie de brotes no lignificada

<sup>d</sup>Superficie lignificada (concepto aplicado a partir del mes de agosto)

<sup>e</sup>Tronco hasta la primera ramificación

<sup>f</sup>No determinado

4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural

4.4.3.1.3 *Estima del número de pulgones virulíferos en las parcelas experimentales*

En la Tabla 4.11 se indica el número de pulgones analizados mediante “Squash” RT-PCR a tiempo real y el número de pulgones PPV-virulíferos obtenidos en ambas parcelas.

**Tabla 4.11: Número de pulgones virulíferos y número de pulgones totales analizados mediante “Squash” RT-PCR a tiempo real capturados mediante trampas de Moericke o planta pegajosa en las parcelas localizadas en Lliria y Carlet**

	Lliria (Alta densidad de inóculo)			
	Mayo 2006		Mayo 2007	
	Moericke	Planta pegajosa	Moericke	Planta pegajosa
<i>Aphis spiraeicola</i>	2/126 <sup>a</sup> (1,59%)	56/108 (51,85%)	22/128 (17,19%)	4/34 (11,76%)
<i>A.gossypii</i>	0/0 (0,00%)	2/3 (66,66)	0/0 (0,00%)	0/4 (0,00%)
<b>Total</b>	<b>2/126 (1,59%)</b>	<b>58/111 (52,25%)</b>	<b>22/128 (17,19%)</b>	<b>4/38 (10,53%)</b>
<b>Total parcela</b>	<b>58/111 (52,25%)</b>		<b>26/166 (15,66%)</b>	
<b>Media</b>	<b>84/277 (30,32%)</b>			
	Carlet (Baja densidad de inóculo)			
	Mayo 2006		Mayo 2007	
	Moericke	Planta pegajosa	Moericke	Planta pegajosa
<i>A.spiraeicola</i>	11/129 (8,52%)	1/16 (6,25%)	2/41 (4,88%)	8/89 (8,99%)
<i>A.gossypii</i>	2/10 (20%)	1/10 (10%)	0/0 (0,00%)	1/31 (3,22%)
<b>Total</b>	<b>13/139 (9,35%)</b>	<b>2/26 (7,69%)</b>	<b>2/41 (4,88%)</b>	<b>9/120 (7,50%)</b>
<b>Total parcela</b>	<b>15/165 (9,09%)</b>		<b>11/161 (6,83%)</b>	
<b>Media</b>	<b>26/326 (7,98%)</b>			

<sup>a</sup> *Número total de pulgones PPV-virulíferos / Número total de pulgones analizados*

El porcentaje de pulgones PPV-virulíferos capturados en la parcela de Lliria en mayo de 2006 mediante trampa de Moericke fue muy inferior (1,59%) al porcentaje obtenido en la misma parcela mediante planta pegajosa (52,25%). Este bajo porcentaje de pulgones virulíferos no se corresponde con la alta incidencia viral observada en el cultivo y no es consistente con la proximidad de una parcela con una alta densidad de inóculo. Por ello, se consideró que el bajo porcentaje de detección de PPV en pulgones capturados en la zona en mayo 2006 con trampa Moericke se debió a algún tipo de problema en los procesos de conservación o detección y se decidió tener únicamente en cuenta el valor obtenido con los pulgones capturados en la planta pegajosa.

En la zona con una alta densidad de inóculo el porcentaje medio de individuos virulíferos que sobrevuelan y aterrizan sobre un bloque de plantas de

4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural

---

vivero es superior (30,32%) al obtenido en una zona con baja densidad de inóculo (7,98%).

La existencia de diferencias significativas en el número de pulgones virulíferos detectados mediante trampa de Moericke o planta pegajosa y entre el porcentaje de individuos PPV-virulíferos presentes en ambas parcelas se estudió mediante un modelo lineal generalizado admitiendo que la variable estudiada (porcentaje de individuos virulíferos) se distribuía como una distribución binomial (Tabla 4.12).

**Tabla 4.12: Resumen salida del programa SAS en el análisis del número de pulgones PPV-virulíferos presentes en ambas parcelas en el mes de mayo de dos años consecutivos (2006-07). Comparación del número de pulgones PPV-virulíferos según el método de muestreo.**

Efecto	g.l. numerador	g.l. denominador	F-Valor	Pr > F <sup>a</sup>
<b>Parcela</b>	1	2	42,55	0,0227
<b>Trampa</b>	1	2	0,30	0,6387
<b>Año</b>	1	2	17,40	0,0529
<b>Parcela x Año</b>	1	2	5,94	0,1351

<sup>a</sup> ( $Pr > F$ ) < 0,05 indica diferencias significativas de acuerdo a un modelo lineal generalizado siguiendo una distribución binomial.

No se encontraron diferencias significativas entre el número de pulgones PPV-virulíferos detectados según el método de captura. Sin embargo, se observaron diferencias en el número de pulgones PPV-virulíferos presentes entre ambas parcelas.

En la Tabla 4.13 se muestra el número de pulgones capturados mediante el método de la planta pegajosa, analizados mediante “Squash” RT-PCR a tiempo real y el patrón donde fueron capturados.

Se realizó una comparación del número de pulgones PPV-virulíferos visitantes entre los patrones NemaGuard y Mariana GF8-1 en la parcela de Lliria mediante el test de hipótesis nula, admitiendo que la variable estudiada (porcentaje de pulgones PPV-virulíferos) sigue una distribución binomial. No se obtuvieron diferencias significativas entre el número de pulgones virulíferos que aterrizaron en un patrón o en otro. En la parcela de Carlet no se pudo realizar ningún análisis estadístico debido al bajo número de pulgones virulíferos encontrados, pero se puede observar como en todos los patrones estudiados, exceptuando Mirololan 29C, aterrizaron pulgones virulíferos.

4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural

**Tabla 4.13. Número de pulgones capturados mediante el método de la planta pegajosa, clasificados según el patrón donde fueron capturados y analizados mediante “Squash” RT-PCR a tiempo real en las parcelas localizadas en Llíria y Carlet. Comparación del número de pulgones PPV-virulíferos que visitaron una planta de Nemaguard o de Mariana GF8-1 en Llíria**

	<b>Llíria (Alta densidad de inóculo)</b>		
	<b>Mayo 2006</b>	<b>Mayo 2007</b>	
	<b>Nemaguard</b>	18/42 <sup>a</sup> (42,86%) a <sup>b</sup>	3/26 (11,54%) a
<b>Mariana GF8-1</b>	40/69 (57,97%) a	1/12 (8,33%) a	
	<b>Carlet (Baja densidad de inóculo)</b>		
	<b>Mayo 2006</b>	<b>Mayo 2007</b>	
	<b>Nemaguard</b>	0/0 (0,00%)	3/20 (15,00%)
	<b>Mariana GF8-1</b>	0/24 (0,00%)	1/20 (5,00%)
	<b>Adesoto 101</b>	0/0 (0,00%)	2/20 (10,00%)
	<b>Cadaman</b>	2/2 (100%)	1/20 (5,00%)
	<b>Mirobolan 29C</b>	0/0 (0,00%)	0/20 (0,00%)
	<b>Garnem</b>	0/0 (0,00%)	2/20 (10,00%)

<sup>a</sup> Número de pulgones PPV-virulíferos / Número total de pulgones analizados

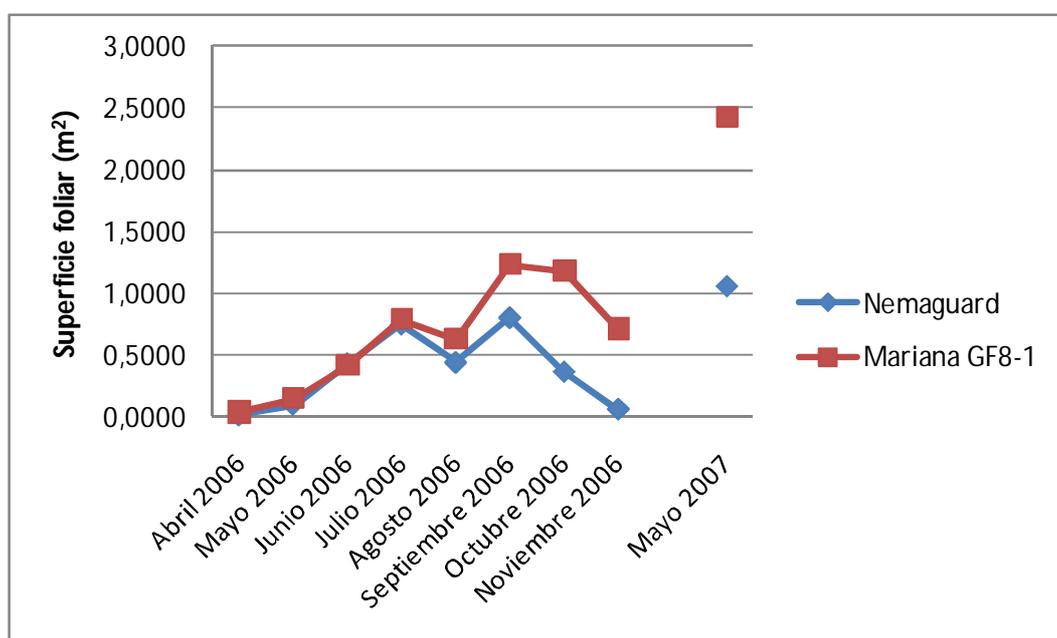
<sup>b</sup> Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con test de hipótesis nula (la variable de estudio sigue una distribución binomial)

#### 4.4.3.2 Estima de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones

##### 4.4.3.2.1 Parcela situada en Lliria

La estima de la superficie foliar disponible para los pulgones en los patrones Nemaguard y Mariana GF8-1 en la parcela situada en Lliria, durante un ciclo vegetativo (2006) y mayo de 2007 se puede ver en la Figura 4.1.

**Figura 4.1: Estima de la superficie foliar (m<sup>2</sup>) de una planta de vivero de los patrones Nemaguard y Mariana GF8-1 a lo largo de un ciclo vegetativo (2006) y mayo 2007**



La superficie foliar fue aumentando en ambos patrones desde la brotación apreciándose un ligero descenso en agosto. En el mes de septiembre siguió su progresión hasta el otoño donde la caída de hojas motivó un claro descenso de la superficie foliar por planta. Se observa que el patrón Mariana GF8-1 desarrolló una superficie foliar superior al patrón Nemaguard a lo largo de todo un ciclo vegetativo (2006), exceptuando los primeros meses. La máxima superficie foliar para ambos patrones se dio en septiembre. En ambos patrones a partir del mes de septiembre la superficie foliar disminuyó, aunque de forma distinta. La superficie foliar media en un patrón Mariana GF8-1 fue superior en octubre que la de un patrón Nemaguard. De la misma forma, la estima de la superficie foliar para el patrón Mariana GF8-1 en mayo 2007 fue superior a la estimación correspondiente al patrón Nemaguard en el mismo período de tiempo. En ambos patrones la superficie foliar estimada en mayo 2007 fue superior a la estimada en cualquiera de los anteriores meses muestreados en el primer año de cultivo (Figura 4.1).

4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural

---

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con los datos de superficie foliar del año 2006 y de mayo de 2007 de ambos patrones, mediante un modelo mixto, con dos factores (Mes y Patrón), permitiendo que las varianzas de cada combinación Patrón x Mes fueran diferentes. Los factores estudiados (Mes y Patrón) y su interacción presentaron diferencias significativas (Tabla 4.14).

**Tabla 4.14: Resumen de la salida del programa SAS, para el análisis (ANOVA modelo mixto) de la superficie foliar de aterrizaje en los patrones Nemaguard y Mariana GF81 cultivados en Llíria durante un ciclo vegetativo (2006) y mayo de 2007**

Efecto	g.l. numerador	g.l. denominador	F-Valor	Pr > F <sup>a</sup>
Patrón	1	72	22,98	<.0001
Mes	8	72	45,75	<.0001
Mes x Patrón	8	72	6,18	<.0001

<sup>a</sup> ( $Pr > F$ ) < 0,05 indica diferencias significativas con la técnica ANOVA ( $n=5$ ) mediante un modelo mixto

Al detectarse la interacción como significativa se realizó un análisis mes a mes (Tabla 4.15). En este caso, un análisis ANOVA clásico, ya que la variabilidad aumenta con el paso del tiempo pero dentro de un mes las varianzas son más homogéneas. Como se puede apreciar en la Tabla 4.14 existen diferencias significativas entre ambos patrones en su superficie foliar en los meses de abril, octubre y noviembre del 2006 y mayo de 2007.

**Tabla 4.15: Estima de la superficie foliar de aterrizaje (m<sup>2</sup>) para los pulgones en una planta de vivero de los patrones Nemaguard y Mariana GF8-1 durante un período vegetativo (2006) en la parcela de Llíria.**

Patrón / Período	Abril 2006	Mayo 2006	Junio 2006	Julio 2006	Agosto 2006	Septiembre 2006	Octubre 2006	Noviembre 2006	Mayo 2007
Nemaguard	0,015 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,101 ± 0,042 a	0,431 ± 0,118 a	0,746 ± 0,379 a	0,440 ± 0,317 a	0,802 ± 0,446 a	0,365 ± 0,225 a	0,062 ± 0,053 a	1,057 ± 0,364 a
Mariana GF8-1	0,040 ± 0,021 b	0,152 ± 0,067 a	0,418 ± 0,156 a	0,792 ± 0,316 a	0,629 ± 0,278 a	1,235 ± 0,314 a	1,181 ± 0,319 b	0,714 ± 0,300 b	2,428 ± 1,275 b

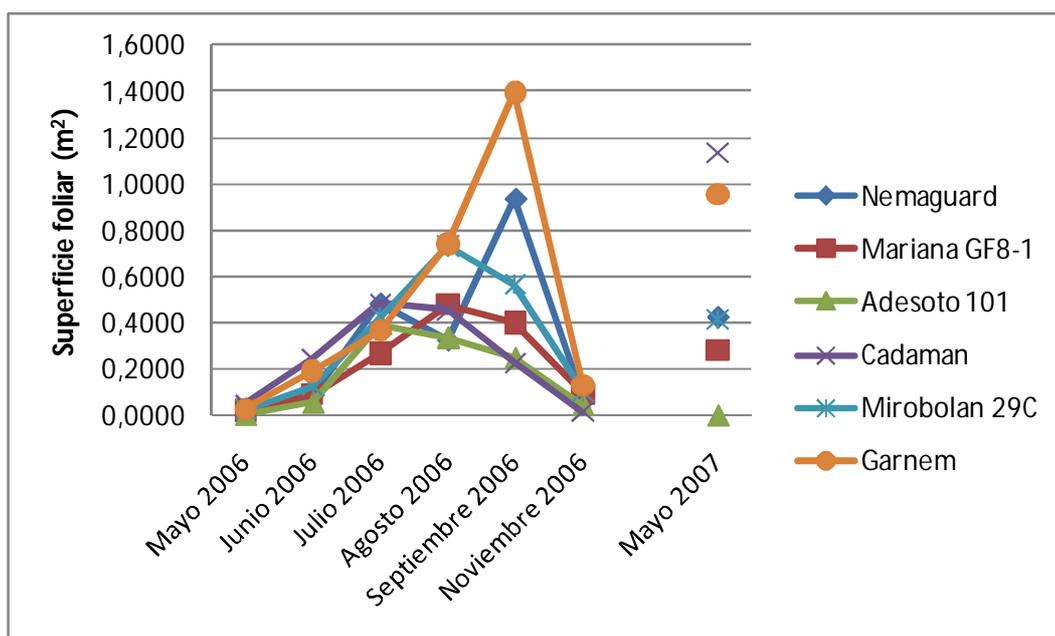
<sup>a</sup> Media ± Desviación típica

<sup>b</sup> Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas mediante ANOVA (n=5) (p<0,05)

#### 4.4.3.2.2 Parcela situada en Carlet

La estima de la superficie foliar disponible para el aterrizaje de los pulgones en una planta de vivero de los patrones ensayados en Carlet, durante un ciclo vegetativo (2006) y mayo 2007 se indica en la Figura 4.2.

**Figura 4.2: Estima de la superficie foliar de aterrizaje (m<sup>2</sup>) de una planta de vivero de los patrones estudiados en la parcela de Carlet a lo largo de un ciclo vegetativo (2006) y mayo 2007.**



En la Figura 4.2 se puede observar que los patrones Garnem y Nemaguard alcanzaron su máxima superficie foliar en septiembre de 2006. Las superficies foliares del resto de los patrones descendieron a partir del mes de agosto. Hay que destacar que el patrón Cadaman es el que brotó antes. También hay que destacar que el patrón Adesoto 101 fue el patrón con un crecimiento más lento.

Los patrones Cadaman y Garnem presentaron las superficies foliares mayores en las mediciones realizadas en mayo del segundo año de cultivo (2007). La superficie foliar del patrón Adesoto 101 no se pudo medir en mayo de 2007 por presentarse infestación de pulgón en la parcela que provocó severas distorsiones en las hojas de las plantas de este patrón que impidieron su medida.

Se realizó el mismo tipo de análisis detallado anteriormente para la parcela de Lliria, detectándose diferencias significativas entre los factores Patrón y Mes, así como en su interacción (Tabla 4.16).

4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural

---

**Tabla 4.16: Resumen salida programa SAS, para el análisis (ANOVA modelo mixto) de la superficie foliar de aterrizaje en Carlet durante un ciclo vegetativo**

<b>Efecto</b>	<b>g.l. numerador</b>	<b>g.l. denominador</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F<sup>a</sup></b>
<b>Patrón</b>	5	73,4	9,27	<.0001
<b>Mes</b>	6	124	43,98	<.0001
<b>Mes x Patrón</b>	29	108	4,81	<.0001

<sup>a</sup>(Pr > F) < 0,05 indica diferencias significativas con la técnica ANOVA (n=5) mediante un modelo mixto

Con estos resultados, al igual que en la parcela de Lliria, se realizó de nuevo un ANOVA clásico pero tomando los datos mes a mes y aplicando la corrección de Bonferroni al comparar las variedades entre sí. Los resultados se exponen en la Tabla 4.17. Se encontraron diferencias significativas en la superficie foliar entre los patrones Cadaman y Adesoto 101 en los meses de mayo y junio. Además se encontraron diferencias significativas entre los patrones Garnem y Nemaguard y el resto en el mes de septiembre. En el resto de meses no se detectaron diferencias significativas en la superficie foliar entre los patrones.

**Tabla 4.17: Estima de la superficie foliar de aterrizaje (m<sup>2</sup>) disponible para los pulgones en una planta de vivero de los patrones estudiados durante un período vegetativo (2006) y mayo de 2007 en la parcela de Carlet.**

Patrón / Período	Mayo 2006	Junio 2006	Julio 2006	Agosto 2006	Septiembre 2006	Octubre 2006	Noviembre 2006	Mayo 2007
<b>Nemaguard</b>	0,0260 ± 0,014 <sup>a</sup>	0,087 ± 0,052 a,b	0,482 ± 0,202 a	0,324 ± 0,163 a	0,937 ± 0,245 a	n.d. <sup>c</sup>	0,080 ± 0,045 a	0,424 ± 0,344 a,b
<b>Mariana GF8-1</b>	0,020 ± 0,006 a,b	0,089 ± 0,049 a,b	0,266 ± 0,132 a	0,480 ± 0,304 a	0,401 ± 0,181 b	n.d	0,093 ± 0,056 a	0,281 ± 0,134 a
<b>Adesoto 101</b>	0,003 ± 0,004 a	0,055 ± 0,032 a	0,394 ± 0,203 a	0,336 ± 0,107 a	0,248 ± 0,119 b	n.d	0,044 ± 0,029 a	n.d.
<b>Cadaman</b>	0,046 ± 0,023 b	0,246 ± 0,141 b	0,482 ± 0,380 a	0,453 ± 0,129 a	0,227 ± 0,078 b	n.d	0,017 ± 0,018 a	1,135 ± 0,448 b
<b>Mirobolan 29C</b>	0,024 ± 0,005 a,b	0,129 ± 0,066 a,b	0,421 ± 0,301 a	0,731 ± 0,282 a	0,564 ± 0,218 b	n.d	0,103 ± 0,047 a	0,414 ± 0,290 a,b
<b>Garnem</b>	0,028 ± 0,013 a,b	0,193 ± 0,091 a,b	0,364 ± 0,180 a	0,742 ± 0,398 a	1,396 ± 0,448 a	n.d	0,129 ± 0,132 a	0,952 ± 0,456 a,b

<sup>a</sup> Media ± Desviación típica

<sup>b</sup> Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas mediante ANOVA (n=5) (p total < 0,05 usando la corrección de Bonferroni)

<sup>c</sup> No determinado

#### ***4.4.3.3 Relación entre la superficie de aterrizaje disponible para los pulgones y el número de pulgones visitantes***

Si se relaciona el número estimado de pulgones que mensualmente visitan una planta de vivero con la superficie foliar o de aterrizaje estimada se obtiene una estima del número de pulgones que visitan o aterrizan en una planta de vivero mensualmente (n° pulgones/m<sup>2</sup>) (Tabla 4.18).

En los meses de abril y mayo del primer año de estudio (2006) en Llíria se obtuvo el mayor número de pulgones estimados por unidad de superficie en ambos patrones (Nemaguard y Mariana GF8-1). En la parcela de Carlet el mayor número de visitas de pulgones por unidad de superficie se produjo en el patrón Mariana GF8-1 y en el mes de mayo, contabilizándose 74.827 y 41.895 pulgones/m<sup>2</sup> de superficie foliar, respectivamente para los años 2006 y 2007.

**Tabla 4.18: Estima del número de pulgones que aterrizan en una planta de vivero por m<sup>2</sup> de superficie foliar en cada patrón estudiado en las parcelas de Lliria y Carlet durante un período vegetativo y mayo de 2007**

Período/Patrón	Alta densidad de inóculo (Lliria)		Baja densidad de inóculo (Carlet)					
	Nemaguard	Mariana GF8-1	Nemaguard	Mariana GF8-1	Adesoto 101	Cadaman	Mirobolan 29C	Garmen
Abril 2006	80.537	32.754	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mayo 2006	49.852	47.067	20.870	74.827	0	17.072	0	0
Junio 2006	0	1.292	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Julio 2006	724	1.516	373	450	609	623	427	165
Agosto 2006	409	1.526	2.595	624	0	3.176	0	890
Septiembre 2006	1.197	632	64	299	0	3.166	106	1.547
Octubre 2006	1.150	203	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Noviembre 2006	5.825	1.093	1.506	0	2.720	7.292	0	934
<b>Mayo 2007</b>	<b>1.590</b>	<b>569</b>	<b>21.072</b>	<b>41.895</b>	<b>n.d.</b>	<b>2.749</b>	<b>19.406</b>	<b>6.367</b>

<sup>a</sup> Número de pulgones por m<sup>2</sup> de superficie foliar

<sup>b</sup> No determinado

## 4.5 DISCUSIÓN

La epidemiología de un virus fitopatógeno depende, junto con otros factores, de las características del aislado viral presente en el cultivo. En la caracterización serológica y molecular realizada con material infectado recogido en las parcelas de ensayo, todas las muestras analizadas reaccionaron con la sonda universal TaqMan y la específica MGB-D, pero no se produjo reacción con la específica MGB-M. Sin embargo, y de forma coincidente con lo publicado por Candresse et al. (1998), algunas de ellas no reaccionaron contra el anticuerpo monoclonal 4DG5 (específico del aislado D). A la vista de estos resultados se puede concluir que el aislado viral presente en las dos parcelas experimentales empleadas en los estudios realizados fue PPV-D, único tipo que se dispersa en la actualidad en España (Cambra et al., 2006a).

La evaluación de la susceptibilidad natural de diferentes patrones de frutales de hueso frente a la infección natural por PPV fue realizada en dos áreas climáticas diferentes, continental moderada y mediterránea, ambas localizadas en áreas típicas de cultivo de frutales de hueso. Para ello, se seleccionaron los patrones de hueso comerciales más utilizados y se sometieron experimentalmente a diferentes presiones de inóculo de PPV.

En la parcela situada en una zona con una alta presión de inóculo (Lliria) fue posible la clasificación de los patrones ensayados según su susceptibilidad natural a la infección por PPV. Mariana GF8-1 y Adesoto 101 fueron los más susceptibles, seguidos por Nemaguard y Mirobolan 29C. Cadaman y Garnem presentaron un alto grado de resistencia en las condiciones ecológicas ensayadas.

La alta susceptibilidad de los ciruelos frente a PPV es bien conocida y ha sido descrita desde las primeras citas de la enfermedad (García y Cambra, 2007). Los datos obtenidos en condiciones naturales de inoculación por pulgones muestran una alta susceptibilidad de los ciruelos Mariana GF8-1 y Adesoto 101. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Rubio et al., (2005) que citaron la alta susceptibilidad de ambos patrones mediante injerto de inoculación. Nemaguard resultó también un patrón muy susceptible, aunque menos que Mariana GF8-1 o Adesoto 101. La gran susceptibilidad de este patrón era conocida, ya que se emplea como planta indicadora para detección de PPV (OEPP/EPPO, 2004b).

Bajo las condiciones naturales de los ensayos realizados, Mirobolan 29C resultó susceptible a la infección por PPV con más del 30% de infección después de dos años de ensayo. Aunque es conocido que *Prunus cerasifera* es susceptible a la infección por PPV (James y Thompson, 2006), diferentes clones de este patrón, como BN 4Kr y Mirobolan 29C, han sido descritos como resistentes a PPV-D (Minoiu, 1998; Rubio et al., 2005).

Por otra parte, Cadaman, a pesar de compartir el mismo genotipo que Nemaguard (*P. persica* x *P. davidiana*), mostró un alto grado de resistencia frente a la infección natural de PPV. La resistencia contra PPV de varios clones de *P. davidiana* ha sido descrita por Pascal et al. (1998). Sin embargo, Boeglin et al. (2006) describió al patrón Cadaman como susceptible después de desafío mediante injerto de inoculación con material infectado con PPV-D y PPV-M. En las condiciones naturales de nuestra experiencia PPV fue detectado en el patrón Cadaman en algunas plantas por “Spot” RT-PCR a tiempo real pero no por ELISA-DASI, y además estas plantas nunca mostraron síntomas. Las discrepancias en los resultados entre ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real podrían ser debidas a diferentes mecanismos de resistencia natural de la planta frente a PPV-D como: restricción del virus en el punto u órgano de inoculación impidiéndose el movimiento a corta o a larga distancia y con ello la infección sistémica de la planta o producción de una infección sistémica con bajo título viral (Bruening, 2006). Por lo tanto, se clasifica a Cadaman como un patrón con una alta resistencia a los aislados de PPV-D presentes en el área experimental.

El comportamiento variable del patrón Cadaman en la susceptibilidad frente a PPV cuando es inoculado por injerto o por pulgones virulíferos puede ser debido al diferente título o carga viral inoculada por ambos métodos. La alta carga viral inoculada por injerto y el continuo aporte de viriones desde el injerto puede contribuir a romper la posible resistencia frente a PPV del patrón Cadaman. Esta resistencia podría ser efectiva contra el menor número de viriones o título viral inoculado mediante la transmisión por pulgón (Moreno et al., 2009).

Las mismas consideraciones podrían argumentarse con el patrón Garnem, en el que sólo se detectaron plantas infectadas por PPV mediante “Spot” RT-PCR a tiempo real y que en ningún momento mostró síntomas. Todo ello pone de manifiesto la alta resistencia de este patrón frente a PPV-D bajo las condiciones ensayadas de campo. Estos resultados coinciden con la resistencia a PPV de distintos cultivares de almendro descrita por Rubio et al., (2003).

Con una baja densidad de inóculo, condición presente en la parcela situada en Carlet, no fue posible encontrar diferencias en la susceptibilidad de los distintos patrones analizados frente a PPV. Debido al bajo nivel de inóculo presente en la zona, muy probablemente se hubiera requerido de un diseño estadístico con un mayor número de plantas para detectar diferencias significativas entre los patrones. Sólo algunas plantas de los patrones más susceptibles, Adesoto 101 y Nemaguard, resultaron infectadas.

Los factores que determinan la incidencia viral en el cultivo están relacionados, junto con las características del aislado viral y la susceptibilidad de la especie vegetal, con la intensidad vectorial de las especies de pulgones presentes en el cultivo (Irwin y Ruesink, 1986). La intensidad vectorial, o verdadero riesgo de

transmisión de un virus al cultivo, está a su vez determinada por dos factores: la actividad vectorial o número de pulgones que visita el cultivo y la propensión vectorial o capacidad de transmisión que tiene una especie para transmitir un virus (que viene también condicionada por el número de pulgones virulíferos). Así, la determinación de las especies vectoras presentes en el cultivo es fundamental para conocer el riesgo de epidemia por parte de un determinado virus.

En este estudio se han evaluado dos métodos diferentes de muestreo para estimar la población de pulgones en viveros de frutales de hueso (las trampas amarillas de Moericke y el método de la planta pegajosa). Las capturas realizadas por ambos métodos muestran que la especie de pulgón más abundante en el cultivo en los dos años muestreados fue *Aphis spiraecola*. Esta especie fue descrita previamente por Cambra et al. (2004, 2006a) como la principal especie vectora de PPV en condiciones mediterráneas. El período con una mayor población de pulgones en ambas parcelas fue mayo, con distinto número de capturas, pero coincidiendo en el porcentaje relativo de capturas por ambos métodos de muestreo.

El porcentaje de individuos de *A. spiraecola*, principal especie vectora de PPV encontrada, capturados por ambos métodos fue muy diferente. La proporción de individuos de *A. spiraecola* capturados por el método de la planta pegajosa durante el período muestreado supuso el 57,77% de las especies capturadas en la parcela con alta densidad de inóculo, situada en Lliria y del 56,83% en la parcela con una baja densidad de inóculo, situada en Carlet. Por otro lado, el porcentaje de individuos de esta especie capturados por la trampa de Moericke fue el 96,72% del total de capturas en la parcela de Lliria y del 93,42% en la parcela de Carlet. Estas diferencias podrían ser debidas al color amarillo de las trampas de Moericke que atraen ciertas especies de pulgones como *A. spiraecola* (Labonne et al., 1989; Hermoso de Mendoza et al., 1998) o *Myzus persicae* (Boiteau, 1990; Fereres et al., 1999). Esto podría sobreestimar la presencia de estas especies de pulgones. No obstante, este método de muestreo es muy útil para estimar la dinámica de la población de los pulgones en una cierta zona, habiendo sido empleado en numerosos trabajos sobre dinámica poblacional de pulgones (Álvarez et al., 2004; Marroquín et al., 2004; Nebreda et al., 2004). Las especies encontradas en vivero coinciden con los previamente determinadas en plantaciones comerciales (Cambra et al., 2004; Capote et al., 2008), aunque no su frecuencia relativa ya que en vivero se capturaron poblaciones menores de *A. gossypii*, esto puede ser debido diferentes circunstancias del cultivo como presencia de enemigos naturales, cambio en los insecticidas utilizados (Hermoso de Mendoza et al., 1997) o fluctuaciones estacionales de las poblaciones de pulgones.

El método de la planta pegajosa ha sido usado con éxito para estimar la población de pulgones visitantes en árboles adultos, tanto de cítricos (Cambra et al., 2000a; Marroquin et al., 2004) como de frutales de hueso (Cambra et al., 2004; Capote et al., 2008), y ahora por primera vez en plantas de vivero.

Mediante el método de la planta pegajosa se ha podido estimar el número de pulgones que visitan o aterrizan en una planta de vivero. Una planta de vivero situada en Lliria durante un período vegetativo (abril 2006-febrero 2007) fue visitada como media por 108,3 pulgones. Así, una hectárea de vivero de árboles frutales situada en la zona de Lliria sería visitada por un número de pulgones que oscilaría entre 4.332.000 y 7.581.000 dependiendo de la densidad de plantación (40.000-70.000 plantas/ha, comunicación personal Teresa Orero, Viveros Orero). Mientras en la parcela situada en Carlet se estimaron 18,4 pulgones/planta (736.000-1.288.000 pulgones/ha). A priori, podría pensarse que existe gran diferencia en el número de pulgones que visita una planta de vivero en ambas parcelas. Estas diferencias podrían deberse a dos motivos: la ausencia de algunos datos en la parcela de Carlet debido a la no recolección de muestras en esos meses y, en mayor medida, a las diferencias en el número de pulgones capturados entre ambas parcelas en mayo de 2006. Así, el número de pulgones estimados que aterrizan en una planta de vivero en la parcela de Lliria en mayo de 2006 fue más de 10 veces superior a los estimados en la parcela de Carlet (60,9 pulgones/planta en Lliria y 4,7 pulgones/planta en Carlet). Por ello, si se comparan los datos medios de la estima de pulgones que visitan una planta de vivero en mayo de los años 2006 y 2007 entre ambas parcelas, se obtiene que el valor medio estimado en la parcela de Lliria fue de 38,1 pulgones/planta y en Carlet 36,7 pulgones/planta, valores muy similares en ambas parcelas. Esto nos indica que el número de pulgones visitantes en ambas parcelas a lo largo del período muestreado fue muy similar. Este último dato es corroborado por las capturas obtenidas mediante la trampa de Moericke en ambas parcelas durante el período muestreado (5.582 pulgones capturados en la parcela de Lliria, y 5.265 en la parcela de Carlet).

Las especies y el número de pulgones visitantes en ambas parcelas fueron muy similares. Por tanto, la diferencia en la incidencia viral final entre ambas parcelas puede deberse en primer lugar a las distintas presiones de inóculo presentes en las distintas zonas y, en segundo lugar, al número de plantas infectadas dentro del cultivo, que actuarían también como fuente secundaria de inóculo facilitando la dispersión secundaria del virus. Esto se refleja en el número de pulgones virulíferos que visitan una planta de vivero y/o sobrevuelan la zona.

Las epidemias de virus no persistentes se caracterizan por lo general por corresponderse con epidemias policíclicas, el patógeno puede multiplicarse durante varias generaciones en el curso de una misma epidemia y siguen un modelo de dispersión logístico o de Gompertz. Se caracterizan por un aporte inicial de inóculo (infección primaria) seguido por una dispersión secundaria del virus mediante vectores (Thresh, 1976).

El aterrizaje o visita de especies no colonizadoras del cultivo es la principal causa de dispersión de los virus no persistentes (Raccah et al., 1985; Pérez et al., 1995). La migración de pulgones procedentes de otras zonas de cultivo o “transient vectors” (Irwin et al., 2007; Fereres y Moreno, 2009) es un factor importante a

considerar en la dispersión de virus no persistentes. La presencia de una parcela de ciruelo japonés con un 90% de infección por PPV, explicaría la diferencia en el porcentaje de individuos virulíferos entre ambas parcelas.

El número medio de pulgones PPV-virulíferos de las principales especies vectoras *A. spiraecola* y *A. gossypii*, en la parcela de Lliria (alta densidad de inóculo) en el mes de mayo fue del 30,32% (muy similar al obtenido por Capote et al. (2008) en la misma zona en mayo de 2005 (27,50%). En la parcela de Carlet (con una baja de densidad de inóculo) esta estima supuso el 7,98%. Conociendo estos valores y conociendo también el número medio de pulgones estimado de estas especies que visitan una planta de vivero durante el mes de mayo (de los dos años muestreados) (22,35 pulgones/planta en Lliria y 25,15 pulgones/planta en Carlet), se puede estimar el porcentaje de pulgones PPV-virulíferos que visitan una hectárea de vivero de frutales de hueso. Así se estima que la media de pulgones PPV-virulíferos que aterrizarían en una hectárea de vivero de frutales de hueso en la zona de Lliria durante mayo oscilaría entre 271.060-474.356 pulgones/ha, dependiendo de la densidad de plantación. En la zona de Carlet este número oscilaría entre 80.279-140.488 pulgones/ha. En las condiciones de este estudio el número de pulgones PPV-virulíferos estimados en una parcela con una alta densidad de inóculo triplica al número de pulgones PPV-virulíferos estimados en una parcela con una baja densidad de inóculo.

Se puede observar que en la parcela situada en Lliria el número de individuos PPV-virulíferos descendió notablemente entre mayo 2006 y mayo 2007. Esto puede ser debido a la disminución de la población de pulgones, en especial de *A. spiraecola*, presente en la zona. Esto queda reflejado en la reducción de capturas mediante la trampa de Moericke. Además, esto coincide con una reducción de la actividad vectorial corroborada por la reducción en el número de pulgones capturados mediante el método de la planta pegajosa. Todo ello estaría de acuerdo con los modelos de predicción de enfermedad para virus no persistentes (Marcus y Raccah, 1986; Madden et al., 1990; Madden et al., 2000), que proponen que el número de pulgones infecciosos (virulíferos) por planta, es directamente proporcional a la densidad vectorial por planta y se relaciona con el número de plantas infectadas. Además, en nuestro caso particular, una disminución de la actividad vectorial puede traducirse en un menor tránsito de pulgones procedentes de la parcela vecina con una alta infección por PPV que implicaría un menor porcentaje de individuos virulíferos visitantes del vivero experimental.

Los resultados obtenidos no permitieron detectar diferencias significativas en el número de pulgones que aterrizaron entre los diferentes patrones estudiados, excepto en mayo 2007 en Carlet, entre los patrones Cadaman y Mariana GF8-1 y solamente en las especies *A. spiraecola* y *A. gossypii*. La no obtención de diferencias significativas a lo largo del año entre los patrones estudiados, puede ser debida al

pequeño número de capturas obtenidas en ambas parcelas, exceptuando los meses de mayo de 2006 en Lliria y mayo 2007 en Carlet.

Las diferencias significativas en el número de capturas de las principales especies vectoras, entre el patrón Mariana GF8-1 (muy susceptible a PPV) y el patrón Cadaman (con alto grado de resistencia a PPV) en mayo 2007, podrían sugerir que el primero atrae a un mayor número de pulgones que el segundo. Este hecho podría influir en su susceptibilidad natural en campo. Sin embargo, se puede observar que el número de pulgones totales estimados que visitan una planta de los patrones Garnem y Cadaman (ambos con alto grado de resistencia a PPV) en el año 2006 en la parcela de Carlet fue mayor que en el resto de patrones. Por otra parte, Adesoto 101, patrón muy susceptible a PPV, fue el menos visitado por los pulgones en Carlet en 2006.

La no existencia de diferencias significativas en el número de visitas entre los patrones estudiados, podría explicarse por el hecho de que los pulgones responden a los estímulos visuales durante el vuelo (Kring, 1972) y localizan las plantas huéspedes gracias al contraste entre el suelo y el color verde de las hojas (Kennedy et al., 1961; Döring et al., 2004). Sin embargo, estas indicaciones visuales no les permiten distinguir entre plantas huéspedes y no huéspedes (Kennedy et al., 1959; Compton, 2002). La aceptación de la planta se realizaría después de aterrizar mediante estímulos táctiles, olfatorios y gustativos (Feres y Moreno, 2009).

También se ha observado que no existen diferencias significativas en el número de pulgones virulíferos que visitan los diferentes patrones de frutales de hueso ensayados en ambas parcelas. Se han encontrado pulgones virulíferos en todos los patrones estudiados sin importar su susceptibilidad natural, excepto en Mirobolan 29C. Resultados similares fueron obtenidos por Marroquín et al. (2004) y Capote et al. (2008) al comparar el número de pulgones CTV o PPV-virulíferos, que aterrizan en árboles adultos de diferentes especies de cítricos y de frutales de hueso, respectivamente.

Con los datos disponibles se puede afirmar que los pulgones visitan al azar las plantas en un vivero, no existiendo una relación directa con el tipo de patrón de frutal de hueso visitado.

Durante mayo de 2007, la población de *A. spiraecola* en Carlet aumentó desproporcionalmente. Se apreció como las plantas de Adesoto 101 fueron las más afectadas. Esto podría indicar una mayor tendencia de la especie *A. spiraecola* a formar colonias en este patrón. Este hecho, no implica que Adesoto 101 sea más o menos visitado de forma esporádica por los pulgones, sino que puede ser mejor huésped que el resto para el establecimiento de colonias. En el proceso de selección de la planta hospedadora, los estímulos gustativos recibidos por el pulgón son determinantes. Tras la aceptación de otros estímulos como el color o los volátiles

emitidos por la planta, los pulgones insertan el estilete “probando” la calidad de la planta. (Fereres et al., 1999; Fereres y Moreno, 2009). Esta condición facilita la dispersión de virus no persistentes, los cuales se adquieren e inoculan en pruebas cortas superficiales en el tejido epidérmico y mesófilo de las plantas (Ng y Falk, 2006; Powell et al., 2006). Una vez seleccionada la planta hospedadora, y si las condiciones son las favorables como una baja densidad de pulgones y una alta calidad del huésped, muchas especies de pulgones aumentan la tasa de reproducción de la progenie áptera haciendo que la densidad de la colonia aumente (Powell et al., 2006).

Al principio del ciclo vegetativo de las plantas de vivero, cuando las plantas son prácticamente estaquillas, los pulgones visitan o aterrizan en la parte leñosa de la planta debido a la no disponibilidad de tejido foliar. Sin embargo, conforme la planta crece, los pulgones muestran predilección por la parte foliar, concentrándose la totalidad de las capturas en ella. Se puede observar que, cuando la planta carece de hojas, los pulgones no visitan las plantas de vivero o lo hacen en muy escaso porcentaje, incluso cuando la presencia de los pulgones en la zona es abundante como indican las capturas con la trampa de Moericke (enero de 2007 en Carlet). Enlazado con lo anteriormente comentado sobre preferencia de pulgones y selección de hospedador, esto podría explicarse por el hecho que los pulgones responden a estímulos visuales, siendo atraídos por objetos de color verde-amarillo (Fereres y Moreno, 2009). Esto les permite distinguir entre el suelo y el verde las hojas. Cuando las plantas están brotando y aparecen los primeros brotes verdes, los pulgones podrían distinguir el tejido foliar de la superficie del suelo, siendo atraídos por la hojas y brotes jóvenes. Durante este periodo, la superficie foliar de aterrizaje disponible para los pulgones en la planta es menor, siendo la densidad de pulgones por  $m^2$  de área foliar muy alta. Esto, unido a que la madera aún no está totalmente lignificada, hace que la superficie leñosa sea una buena superficie alternativa para su aterrizaje durante los primeros estadios del ciclo vegetativo. Por el contrario, en el período previo a la brotación en la que no hay hojas disponibles, los pulgones no pueden distinguir entre la planta de vivero y el suelo y no son atraídos por ésta. Todo ello podría explicar por qué el número de capturas de la trampa Moericke, con un color distinguible por los pulgones, es superior a las de las plantas pegajosas en el mismo período.

Se ha estimado la superficie foliar de aterrizaje disponible para los pulgones a lo largo de un ciclo vegetativo en una planta de vivero. Se han detectado diferencias significativas entre los diferentes patrones estudiados según el mes del año. Relacionando la estima del número de pulgones visitantes con la estima de la superficie foliar de aterrizaje ( $m^2$ ) se obtiene la estima de la densidad de pulgones por  $m^2$  que visitan una planta de vivero.

En la parcela situada en Lliria la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones siempre fue mayor en el patrón Mariana GF8-1 que en el patrón

Nemaguard, existiendo diferencias significativas entre ambos en los meses de abril, octubre y noviembre de 2006. Sin embargo, el número de pulgones totales visitantes entre ambos patrones no resultó significativamente diferente. Del mismo modo, en la parcela situada en Carlet en mayo de 2007, se obtuvieron diferencias significativas en la superficie foliar entre los patrones Cadaman y Mariana GF8-1, mientras el número de pulgones visitantes de las principales especies vectoras fue inversamente proporcional a la superficie foliar estimada. Por lo tanto, no se ha obtenido una relación directa entre el número de pulgones visitantes en una planta de vivero con la superficie foliar disponible para éstos.

Como era previsible el número de pulgones/m<sup>2</sup> varió entre los diferentes patrones estudiados, siendo mayor en los meses dónde la actividad vectorial de los pulgones es mayor, coincidiendo con los meses de menor superficie foliar disponible para los pulgones (abril y mayo). Por el contrario, en los meses con menor actividad vectorial disminuyó, ya que coincide con los meses con mayor superficie foliar disponible.

En resumen, en este capítulo se ha podido evaluar la susceptibilidad natural de los patrones de frutales de hueso más utilizados en las condiciones españolas clasificándolos según su grado de susceptibilidad. El uso de patrones resistentes o parcialmente resistentes a PPV-D como Cadaman o Garnem podría ser una estrategia respetuosa con el medio ambiente, de control del virus del sharka en vivero, en combinación con otros métodos como el control físico o biológico.

Una estrategia de control, derivada de los resultados obtenidos, sería la combinación dentro de un mismo bloque de vivero de patrones susceptibles y patrones resistentes a la sharka, siempre que las condiciones agronómicas lo permitan. De esta forma se disminuiría la probabilidad de que un pulgón virulífero aterrizase y probase en una planta susceptible y su infectividad se vería reducida al probar en plantas resistentes en las que liberarían el virus sin consecuencias para el cultivo (Irwin et al., 1999). Este concepto es el mismo que se utiliza en los cultivos barrera (Ferreles, 2000; Hooks y Fereres, 2006; Cook et al., 2007).

En este Capítulo también se ha estimado el porcentaje y número de individuos PPV-virulíferos que sobrevuelan una parcela de vivero en condiciones de alta y baja densidad de inóculo mediante la técnica “Squash” RT-PCR a tiempo real. Esta técnica puede ser empleada para la creación de modelos de predicción de la enfermedad como los generados por Irwin y Ruesink (1986), Fereres y Sánchez-Ponz (2002) o Thackray et al. (2004). En este sentido, ya otras técnicas moleculares como Nested RT-PCR ya ha sido utilizada con el Virus del mosaico de la lechuga (*Lettuce mosaic virus*, LMV; *Potyvirus*) (Moreno et al., 2007), para el diseño de modelos de predicción. Esta técnica también puede ser empleada para la elección del emplazamiento de un vivero. Ninguna planta infectada con PPV puede ser comercializada (Real Decreto 929/1995) y como se ha observado, con un 8% de

#### 4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural

---

pulgonos PPV- virulíferos en un año y medio, la probabilidad de infección es real. Por tanto, una parcela de vivero de frutales de hueso, no podría ser localizada en una zona donde se haya detectado anteriormente la presencia de pulgonos PPV- virulíferos ya que existe la probabilidad de infección debido a la existencia de *Prunus* infectados que servirán de fuente de inóculo.

Todos estos conocimientos sobre la epidemiología de PPV en bloques de vivero son fundamentales para el establecimiento de estrategias de control de la enfermedad eficaces y compatibles con el medio ambiente.

## **CAPÍTULO 5.**

### **INCIDENCIA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN BLOQUES DE VIVERO DE *Citrus* *macrophylla* CULTIVADO EN CAMPO**



# INCIDENCIA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN BLOQUES DE VIVERO DE *Citrus* *macrophylla* CULTIVADO EN CAMPO

---

### 5.1 INTRODUCCIÓN

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) produce varios síndromes dependiendo de la agresividad de los aislados presentes, previamente descritos en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral. El síndrome que ha tenido y tiene una mayor repercusión, producido por todos los aislados, especialmente por los más agresivos, es el que le da nombre de “tristeza” caracterizado por un marchitamiento y decaimiento de la variedad injertada (naranja dulce, mandarino, pomelo, kumquat o lima) sobre naranja amarga o sobre limonero. La consecuencia más grave es la muerte del árbol. Por tanto, se trata de una incompatibilidad inducida entre el naranja amargo o limonero y la variedad de cítrico infectada por CTV injertada sobre ellos.

Las únicas medidas eficaces para evitar la introducción de CTV en zonas libres del mismo es la aplicación de adecuados programas de cuarentena y certificación (Navarro et al., 2002). Para ello los métodos de detección rápida del virus son esenciales (Cambra, et al., 2000a). Sin embargo, cuando se ha producido la introducción del virus en una zona donde el patrón principal de cultivo en cítricos es el naranja amargo, la única solución es la utilización de combinaciones patrón/injerto resistentes o tolerantes al síndrome de la “tristeza” (Cambra y Moreno, 2000; Moreno et al., 2008).

La utilización de patrones tolerantes o resistentes al síndrome de la tristeza ha sido fundamental para el control de la enfermedad en España desde su aparición. Desde 1975, fecha en la que se inició el programa de certificación, se ha logrado la reconversión del 95% de la citricultura española, sustituyendo el naranja amargo como patrón principal en la citricultura española por combinaciones patrón/injerto tolerantes a la tristeza.

Los patrones de cítricos que inducen combinaciones tolerantes a la tristeza más comúnmente empleados en España son: los citranges Troyer y Carrizo, el mandarino Cleopatra, *Citrus volkameriana* y *C. macrophylla*. Además el naranja amargo es utilizado como patrón de limonero puesto que su combinación es tolerante a la tristeza. Las características de estos patrones fueron previamente descritas en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral.

La utilización de estos patrones ha supuesto la continuación del cultivo de cítricos en nuestro país. Sin embargo, la posible introducción de aislados agresivos de CTV en nuestro territorio pondría en peligro la citricultura española. Este hecho hace que en vivero, lugar donde se multiplica el material vegetal y principal puerta de dispersión de enfermedades a larga distancia, la tolerancia al virus de la tristeza sea cero. Por tanto, no se puede comercializar ningún plantón infectado por CTV, según regula el Real Decreto 929/1995 y sus posteriores modificaciones.

En este sentido, aunque la epidemiología del virus de la tristeza de los cítricos en árboles adultos ha sido bien estudiada en diferentes trabajos (Cambra et al., 2000a; Marroquín et al., 2004), hasta el momento no ha habido trabajos en los que se estudie la epidemiología del virus de la tristeza en bloques de vivero en campo.

El patrón *C. macrophylla* es un patrón susceptible a CTV (Yokomi y Garnsey, 1988; Roistacher, 1991; Ballester-Olmos et al., 1993; Cambra et al., 2000a), aunque las combinaciones sobre él son tolerantes al síndrome de la tristeza. Actualmente es el principal patrón utilizado en limonero en la Comunidad Valenciana y su uso se está generalizando como patrón para naranjos y mandarinos, siendo el segundo patrón de cítricos más comercializado con aproximadamente el 13% de las ventas en la campaña 2006-07 (ISAV, 2007). Este aumento en la producción es debido a sus características agronómicas, como son buena tolerancia a la salinidad y a la clorosis e induce una mayor producción y adelanto de la misma en la variedad injertada. Sin embargo, si es infectado prematuramente por un aislado moderado o severo de CTV puede producir enanismo en la planta (Piquer et al., 2005). Su uso se recomienda en zonas con baja incidencia de CTV, con problemas de salinidad y para variedades con escasa producción (Levy y Lifshitz, 1995; Piquer et al., 2005; Bruessow et al., 2010). Debido a su susceptibilidad, su producción en vivero al aire libre es muy problemática al ser fácilmente infectable mediante pulgones (Rodríguez et al., 2005). Por ello, conocer la epidemiología de CTV en bloques de vivero de *C. macrophylla* es importante para desarrollar estrategias de control del virus en vivero e impedir la comercialización de plantones infectados.

## 5.2 OBJETIVOS

- Evaluación de la susceptibilidad a la infección natural por CTV en condiciones de vivero del patrón *Citrus macrophylla* en una zona con alta densidad de inóculo.
- Estudio de la relación de algunos de los factores que condicionan la sensibilidad natural a la infección: superficie foliar de aterrizaje disponible para los pulgones, especies de pulgones vectores presentes en el cultivo y relación entre la tasa o porcentaje de pulgones virulíferos con la tasa de infección viral.

## **5.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.3.1 Localización de la parcela**

Los estudios planteados se realizaron en una parcela experimental localizada en el IVIA de Moncada (Valencia). Sus características se describen en el Capítulo 3, Materiales y métodos generales en el apartado 3.1.3.

### **5.3.2 Muestreo vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo**

El muestreo de la parcela para determinar la incidencia viral se realizó en distintos periodos a lo largo del estudio como se detalla en el apartado 3.2.2 del Capítulo 3, utilizando la técnica Inmunoimpresión-ELISA, detallada en el apartado 3.3.1.2.1 del mismo capítulo.

### **5.3.3 Muestreo de pulgones y detección de individuos virulíferos**

El muestro de la fauna afídica se realizó mediante dos tipos de trampas, las amarillas de Moericke y de tipo pegajoso (Capítulo 3, apartado 3.5).

Trampa Moericke: Se recogieron las capturas de las trampas desde el 29/3/2006 hasta el 31/5/2007.

Trampa pegajosa: Se rociaron 10 plantas con goma Souverode y se mantuvieron en el cultivo durante los 10 últimos días de cada mes tal como se detalla en el Capítulo 3, apartado 3.5.2. Las trampas de tipo pegajoso se pusieron desde abril 2006 hasta febrero 2007.

Los pulgones capturados se conservaron en alcohol etílico al 70% hasta su identificación. Éstos se clasificaron en tres grupos: *Aphis spiraecola*, *A. gossypii* y otros. Esta clasificación se debe al hecho que estas dos especies de pulgones sean las más abundantes en los cítricos valencianos (Hermoso de Mendoza et al., 1997; Marroquín et al., 2004) y ambas especies son las principales responsables de la dispersión natural de CTV en España (Cambra et al., 2000a). En mayo 2006, al observar que era el mes con mayor número de capturas, se identificaron los pulgones según las especies presentes en los cítricos valencianos (Hermoso de Mendoza et al., 1997), se incluyó la especie *Hyalopterus pruni* en el estudio al confirmarse su presencia en la parcela.

La estima del porcentaje de pulgones virulíferos se realizó con las especies *A. spiraecola* y *A. gossypii* (Capítulo 3, apartado 3.3.2).

### **5.3.4 Medición de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones**

Se tomaron cinco plantas cada mes para medir la superficie foliar o de aterrizaje para los pulgones, tal y como se detalla en el apartado 3.6 del Capítulo 3. Las mediciones se efectuaron entre los meses de abril de 2006 a febrero de 2007. Durante los meses de abril a julio de 2006 la medida del área foliar se realizó como se detalla en el apartado 3.6.1, ya que las plantas estaban poco desarrolladas y no habían desarrollado ramas. En el resto de meses las mediciones se realizaron como se detalla en el apartado 3.6.2 (ambos apartados dentro del Capítulo 3 de Materiales y métodos generales).

### **5.3.5. Métodos estadísticos**

En el estudio de la superficie foliar o de aterrizaje disponible para los pulgones en *Citrus macrophylla*, se utilizó la técnica ANOVA con un modelo mixto con un factor (Mes), permitiendo la heterogeneidad de varianzas. Se utilizó el método de Kenward y Roger (1997) para la estima de los grados de libertad. En la comparación de todos los meses entre sí se utilizó la corrección de Bonferroni (Bonferroni, 1936) para proteger al análisis del error de Tipo I. Se utilizó el programa para PC, SAS.9.2.

## 5.4 RESULTADOS

### 5.4.1 Incidencia viral

No se detectó la presencia de CTV en la parcela después de su plantación mediante Inmunoimpresión-ELISA. En la Tabla 5.1 se presenta la incidencia de CTV alcanzada en la parcela entre las plantas que no fueron tratadas con aceites (véase Capítulo 3, apartado 3.1.3). Esta incidencia aumentó desde 0% en marzo de 2006 hasta 24,37% en poco más de un año de cultivo (mayo 2007).

**Tabla 5.1: Incidencia de CTV alcanzada en la parcela de Moncada determinada mediante Inmunoimpresión-ELISA.**

Mes	Incidencia CTV <sup>a</sup>
Marzo 2006	0/350 <sup>b</sup> (0,00%) <sup>c</sup>
Diciembre 2006	8 / 314 (2,55%)
Mayo 2007	77 / 316 (24,37%)

<sup>a</sup> Incidencia calculada entre las plantas no tratadas con aceites minerales (Capítulo 3, apartado 3.1.3)

<sup>b</sup> Número de plantas positivas / Número total de plantas analizadas

<sup>c</sup> Porcentaje de plantas infectadas respecto a las muestreadas (incidencia)

### 5.4.2 Estudio de la relación de algunos de los factores que condicionan la incidencia viral

#### 5.4.2.1 Estima de la población de pulgones visitantes y porcentaje de individuos virulíferos

##### 5.4.2.1.1 Capturas mediante trampa Moericke

El número de pulgones capturados en la parcela durante el período que duró el muestreo mediante trampa amarilla de Moericke se indica en la Tabla 5.2. El número total de pulgones capturados fue de 7.164, de los cuales el 91,82% fueron de la especie *Aphis spiraecola*.

El mes con un mayor número de capturas mediante trampa de Moericke fue el de mayo de 2006 con el 60,89% de las capturas totales del período estudiado. Le siguió el mes de mayo de 2007 con el 18,90%, y a continuación los meses de abril de 2007 y 2006 con el 10,15% y el 4,66% de las capturas totales, respectivamente. Otro mes destacable por el número de capturas fue noviembre de 2006 con el 2,78% de las capturas totales. El resto de meses muestreados el porcentaje de capturas fue inferior al 1% aunque en todos ellos se produjeron capturas.

**Tabla 5.1: Número de pulgones capturados durante el periodo 2006-2007 mediante trampa amarilla de Moericke en la parcela de Moncada (Valencia)**

Mes	<i>Aphis spiraecola</i>	<i>A. gossypii</i>	Otros	Total	%Capturas/Mes
<b>Abril 2006</b>	119	1	214	334	4,66%
<b>Mayo 2006</b>	4.099	2	261	4.362	60,89%
<b>Junio 2006</b>	26	0	0	26	0,36%
<b>Julio 2006</b>	6	0	0	6	0,08%
<b>Agosto 2006</b>	17	0	1	18	0,25%
<b>Septiembre 2006</b>	7	0	0	7	0,10%
<b>Octubre 2006</b>	61	1	7	69	0,96%
<b>Noviembre 2006</b>	152	0	47	199	2,78%
<b>Diciembre 2006</b>	15	2	2	19	0,27%
<b>Enero 2007</b>	20	0	6	26	0,36%
<b>Febrero 2007</b>	0	1	1	2	0,03%
<b>Marzo 2007</b>	4	3	8	15	0,21%
<b>Abril 2007</b>	702	0	25	727	10,15%
<b>Mayo 2007</b>	1.350	0	4	1.354	18,90%
<b>Total</b>	<b>6.578</b>	<b>10</b>	<b>576</b>	<b>7.164</b>	<b>100,00%</b>
<b>%Capturas/Especie</b>	<b>91,82%</b>	<b>0,14%</b>	<b>8,04%</b>	<b>100,00%</b>	

#### 5.4.2.1.2 Capturas mediante el método de la planta pegajosa

El número de pulgones capturados mediante el método de la planta pegajosa en 10 plantas de *Citrus macrophylla* en los últimos 10 días de cada mes durante un año de cultivo y clasificados en las especies vectoras *Aphis spiraecola* y *A. gossypii* y “otros pulgones”, se puede observar en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3: Número y porcentaje de pulgones capturados mediante el método de la planta pegajosa en la parcela de Moncada durante los últimos 10 días de cada mes durante un año de cultivo clasificados en *Aphis spiraecola*, *A. gossypii* y otros**

Mes	<i>Aphis spiraecola</i>	<i>A. gossypii</i>	Otros	Total	% Capturas / Mes
<b>Abril 2006</b>	86	8	64	158	8,57%
<b>Mayo 2006</b>	704	226	363	1.293	70,16%
<b>Junio 2006</b>	7	1	11	19	1,03%
<b>Julio 2006</b>	9	4	1	14	0,76%
<b>Agosto 2006</b>	79	80	29	188	10,20%
<b>Septiembre 2006</b>	37	0	2	39	2,12%
<b>Octubre 2006</b>	34	10	0	44	2,39%
<b>Noviembre 2006</b>	65	6	6	77	4,18%
<b>Diciembre 2006</b>	4	28	1	7	0,38%
<b>Enero 2007</b>	2	0	0	2	0,11%
<b>Febrero 2007</b>	0	0	2	2	0,11%
<b>Total</b>	<b>1.027</b>	<b>337</b>	<b>479</b>	<b>1.843</b>	<b>100,00%</b>
<b>% Capturas/Especie</b>	<b>55,72%</b>	<b>18,29%</b>	<b>25,99%</b>	<b>100,00%</b>	

El número total de pulgones capturados durante un año mediante el método de la planta pegajosa fue de 1.843. La especie de pulgón más abundante fue *A. spiraecola* con el 55,72% de las capturas. El 18,29% de las capturas fueron de la especie *A. gossypii* y el 25,99% de otros pulgones. El mes con mayor número de capturas fue el mes de mayo con el 70,16% de las capturas totales.

En la Tabla 5.4 se puede observar el número y porcentaje de pulgones capturados durante el mes de mayo de 2006, mes con mayor número de capturas, mediante el método de la planta pegajosa clasificados por especies. Las especies *A. spiraecola* y *A. gossypii*, anteriormente citadas, son las especies más abundantes junto con *Hyalopterus pruni* (17,79% de las capturas durante el mes de mayo de 2006).

**Tabla 5.4: Número y porcentaje de pulgones capturados mediante el método de la planta pegajosa en la parcela de Moncada durante los últimos 10 días del mes de mayo de 2006.**

<b>Especie</b>	<b>Mayo 2006</b>
<i>Aphis spiraecola</i>	704 (54,45%)
<i>A. gossypii</i>	226 (17,48%)
<i>Hyalopterus pruni</i>	230 (17,79%)
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	42 (3,25%)
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	15 (1,16%)
<i>Myzus persicae</i>	7 (0,54%)
<i>A. craccivora</i>	0 (0,00%)
<i>A.fabae</i>	0 (0,00%)
<i>Toxoptera aurantii</i>	0 (0,00%)
<b>Otros</b>	69 (5,34%)
<b>Total</b>	<b>1.293</b>

Se puede observar en la Tabla 5.5 que una planta de vivero del patrón *C. macrophylla* recibió la visita estimada de 552,9 pulgones durante un año de cultivo. El mes con mayor número de visitas fue el de mayo con una estima de 387,9 pulgones por planta.

**Tabla 5.5: Estima del número de pulgones totales que aterrizan en una planta de *C. macrophylla* en la parcela de Moncada durante un año**

<b>Mes</b>	<b><i>Aphis spiraecola</i></b>	<b><i>A. gossypii</i></b>	<b>Otros</b>	<b>Total</b>
<b>Abril 2006</b>	25,8	2,4	19,2	47,4
<b>Mayo 2006</b>	211,2	67,8	108,9	387,9
<b>Junio 2006</b>	2,1	0,3	3,3	5,7
<b>Julio 2006</b>	2,7	1,2	0,3	4,2
<b>Agosto 2006</b>	23,7	24,0	8,7	56,4
<b>Septiembre 2006</b>	11,1	0,0	0,6	11,7
<b>Octubre 2006</b>	10,2	3,0	0,0	13,2
<b>Noviembre 2006</b>	19,5	1,8	1,8	23,1
<b>Diciembre 2006</b>	1,2	0,6	0,3	2,1
<b>Enero 2007</b>	0,6	0,0	0,0	0,6
<b>Febrero 2007</b>	0,0	0,0	0,6	0,6
<b>Total</b>	<b>308,1</b>	<b>101,1</b>	<b>143,7</b>	<b>552,9</b>

En la Tabla 5.6 se muestra el número y porcentaje de pulgones capturados durante los últimos diez días de cada mes en la parcela de Moncada, clasificados según la parte de la planta donde aterrizaron.

**Tabla 5.6: Número y porcentaje de pulgones capturados durante los últimos diez días de cada mes en las parcela de Moncada, clasificados según la parte de la planta donde aterrizaron**

Mes	Brote <sup>a</sup>	Madera 2 <sup>o</sup> b	Madera 1 <sup>o</sup> c	Total
<b>Abril 2006</b>	55	n.d <sup>d</sup>	103	158
<b>Mayo 2006</b>	809	n.d	484	1.293
<b>Junio 2006</b>	17	n.d	2	19
<b>Julio 2006</b>	14	n.d	0	14
<b>Agosto 2006</b>	188	0	0	188
<b>Septiembre 2006</b>	37	2	0	39
<b>Octubre 2006</b>	44	0	0	44
<b>Noviembre 2006</b>	77	0	0	77
<b>Diciembre 2006</b>	6	0	1	7
<b>Enero 2007</b>	2	0	0	2
<b>Febrero 2007</b>	2	0	0	2
<b>Total</b>	<b>1.263</b>	<b>2</b>	<b>590</b>	<b>1.855</b>
<b>%</b>	<b>68,09%</b>	<b>0,11%</b>	<b>31,80%</b>	<b>100,00%</b>

<sup>a</sup> Hojas + superficie de brotes no lignificada

<sup>b</sup> Superficie lignificada (concepto aplicado a partir del mes de agosto)

<sup>c</sup> Tronco hasta la primera ramificación

<sup>d</sup> No determinado

Se puede observar que al principio de la plantación los pulgones también aterrizaron sobre el tronco de la planta. Sin embargo, conforme la planta creció y se desarrolló su parte foliar, y la parte del tronco se fue lignificando, los pulgones mostraron predilección por la parte foliar.

#### 5.4.2.1.3 Estima del número de pulgones virulíferos que visitaron las plantas de la parcela experimental.

En la Tabla 5.7 se puede observar el porcentaje estimado de pulgones CTV-virulíferos que aterrizaron en plantas de la parcela de Moncada durante mayo de 2006.

**Tabla 5.7: Número de pulgones CTV-virulíferos respecto al número de pulgones totales analizados mediante “Squash” RT-PCR a tiempo real en la parcela localizada en Moncada**

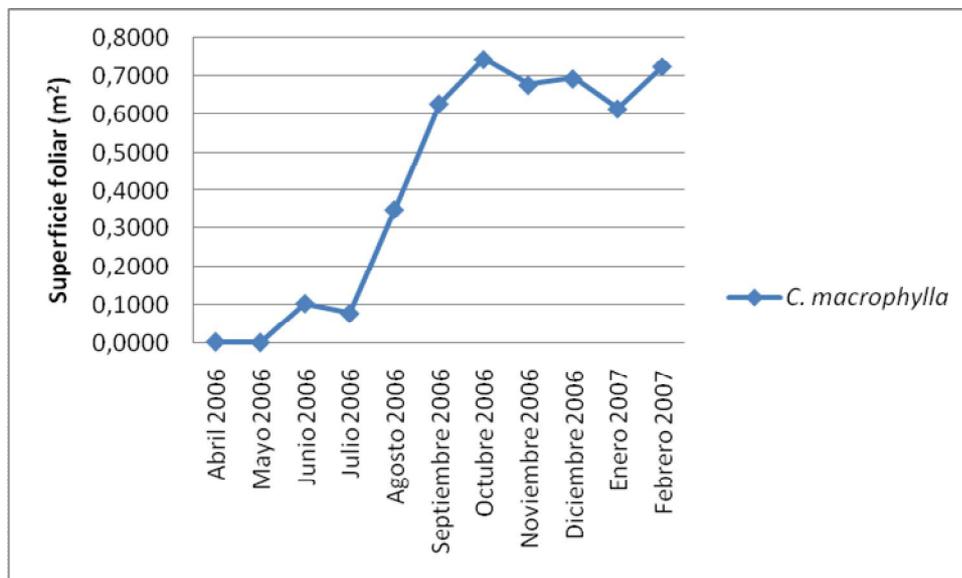
Mayo 2006		
Trampa / Especie	<i>Aphis spiraecola</i>	<i>A. gossypii</i>
<b>Moericke</b>	8 / 40 <sup>a</sup> (20,00%)	0 / 0 (0,00%)
<b>Planta pegajosa</b>	7 / 40 (17,50%)	6 / 40 (15,00%)
<b>Total</b>	<b>21 / 120 (17,50%)</b>	

<sup>a</sup> Número total de pulgones PPV-virulíferos / Número total de pulgones analizados

#### 5.4.2.2 Estima de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones

La superficie foliar estimada para el patrón *Citrus macrophylla* durante un año de cultivo al aire libre en la parcela de Moncada, se puede observar en la Figura 5.1.

**Figura 5.1: Estima de la superficie foliar (m<sup>2</sup>) de una planta de vivero de *Citrus macrophylla* a lo largo de un año**



**Tabla 5.8: Estima de la superficie foliar (m<sup>2</sup>) en una planta de *Citrus macrophylla* durante un año de cultivo en la parcela de Moncada. Resumen salida del programa SAS**

Efecto	g.l. numerador	g.l. denominador	F-Valor	Pr > F <sup>a</sup>
Mes	10	13,3	187,07	<.0001

Mes	Superficie foliar (m <sup>2</sup> )
Abril 2006	0,005 ± 0,003 <sup>b</sup> a <sup>c</sup>
Mayo 2006	0,003 ± 0,001 a
Junio 2006	0,105 ± 0,073 a b
Julio 2006	0,079 ± 0,017 b
Agosto 2006	0,351 ± 0,042 c
Septiembre 2006	0,628 ± 0,208 c d
Octubre 2006	0,745 ± 0,140 d
Noviembre 2006	0,677 ± 0,058 d
Diciembre 2006	0,693 ± 0,060 d
Enero 2007	0,614 ± 0,072 d
Febrero 2007	0,726 ± 0,100 d

<sup>a</sup>(Pr > F) < 0,05 indica diferencias significativas mediante la técnica ANOVA (n=5) aplicando un modelo mixto

<sup>b</sup>Media ± Desviación típica

<sup>c</sup> Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas mediante ANOVA (n=5) aplicando un modelo mixto (p total < 0,05 usando la corrección de Bonferroni)

Se puede observar en la Figura 5.1 y Tabla 5.8 que la superficie foliar estimada aumentó a lo largo del año, siendo los meses de octubre de 2006 (0,745 m<sup>2</sup>) y febrero de 2007 (0,726 m<sup>2</sup>) aquellos en los que una planta de vivero de *C. macrophylla* presentó una mayor superficie foliar.

Al realizar un análisis ANOVA utilizando un modelo mixto (Tabla 5.8) se observa que existieron diferencias significativas en la superficie foliar estimada en los diferentes meses estudiados. Además, al aplicar la corrección de Bonferroni, se puede apreciar entre qué meses existen diferencias significativas en la superficie foliar estimada en una planta de *C. macrophylla* a lo largo de un año. Se observa que a partir del mes de septiembre no existen diferencias significativas en la superficie foliar entre los meses de estudio, además durante los primeros meses de estudio (abril, mayo, junio) no existieron diferencias significativas en la superficie foliar estimada en cada uno de ellos.

#### 5.4.2.3 Relación entre la superficie de aterrizaje disponible para los pulgones y el número de pulgones visitantes

Al relacionar los datos de las Tablas 5.5 y 5.8 en las que se indica el número estimado de pulgones que aterrizaron en una planta de vivero de *Citrus macrophylla* (número de pulgones) y la superficie foliar estimada por planta ( $m^2$ ), respectivamente, se obtiene el número estimado de pulgones que aterrizaron y/o visitaron una planta de *C. macrophylla* por  $m^2$  a lo largo del año ( $n^\circ$  pulgones/ $m^2$ ).

**Tabla 5.9. Estima del número de pulgones que aterrizan en una planta de vivero de *Citrus macrophylla* por  $m^2$  de superficie foliar en la parcela de Moncada durante un año de cultivo**

Mes	N° pulgones / $m^2$			
	<i>Aphis spiraecola</i>	<i>A. gossypii</i>	Otros	Total
<b>Abril 2006</b>	5.599,8	520,9	4.167,3	10.288,0
<b>Mayo 2006</b>	64.803,7	20.803,5	33.414,4	119.021,6
<b>Junio 2006</b>	20,0	2,9	31,4	54,3
<b>Julio 2006</b>	34,2	15,2	3,8	53,2
<b>Agosto 2006</b>	67,6	68,5	24,8	160,9
<b>Septiembre 2006</b>	17,7	0,0	1,0	18,6
<b>Octubre 2006</b>	13,7	4,0	0,0	17,7
<b>Noviembre 2006</b>	28,8	2,7	2,7	34,1
<b>Diciembre 2006</b>	1,7	0,9	0,4	3,0
<b>Enero 2007</b>	1,0	0,0	0,0	1,0
<b>Febrero 2007</b>	0,0	0,0	0,8	0,8

Se puede observar que el mayor número de pulgones/ $m^2$  se capturó en mayo (aproximadamente 120.000 pulgones/ $m^2$ ), seguido por abril (10.300 pulgones/ $m^2$ ). Esto contrasta con la estima registrada para los meses invernales de diciembre, enero y febrero en los cuales únicamente se capturaron 3,0, 1,0 y 0,8 pulgones/ $m^2$ , respectivamente. Las especies vectoras se capturaron en todos los meses excepto en el mes de febrero de 2007.

## 5.5 DISCUSIÓN

En el presente Capítulo de esta Tesis Doctoral se ha estudiado la epidemiología de CTV en bloques de vivero, y más concretamente en bloques de vivero del patrón *Citrus macrophylla*, durante un año de cultivo. En poco más de un año la incidencia de CTV en la parcela experimental aumentó de un 0% en marzo de 2006 a 24,37% en mayo de 2007. Esta rápida dispersión del virus en la parcela puede deberse a varios factores, pero principalmente a la susceptibilidad del patrón *C. macrophylla* frente a CTV, ya comentada anteriormente, y a la existencia de una fuente de inóculo abundante en la proximidades de la parcela experimental.

Otro de los factores que influyen en la dispersión del virus es la intensidad vectorial de los pulgones presentes en la zona (Irwin y Ruesink, 1986). Como se explicó en el Capítulo 4, la intensidad vectorial se define como la verdadera probabilidad de transmisión del virus al cultivo por parte de los pulgones presentes en la zona. Por tanto, el conocimiento de las especies de pulgones, su dinámica poblacional y la tasa de individuos virulíferos presentes en la parcela son factores que determinan la dispersión viral en una zona determinada.

Los resultados obtenidos con los dos tipos de trampas empleadas muestran que la especie de pulgón más abundante fue *Aphis spiraecola*, aunque con diferentes porcentajes. Así, el 91,82% de los pulgones capturados mediante trampas de Moericke fueron de la especie *A. spiraecola*, mientras por el método de la planta pegajosa fueron 55,72%. Esta diferencia en el porcentaje de capturas de *A. spiraecola* entre ambas trampas ya se apreció en los resultados obtenidos en bloques de vivero de frutales de hueso (Capítulo 4). La diferencia en el porcentaje de las capturas puede deberse a las diferentes características de ambas trampas: el color amarillo de las trampas de Moericke atrae a ciertas especies de pulgones como *A. spiraecola* (Labonne et al., 1989; Hermoso de Mendoza et al., 1998), produciendo una sobreestimación de ciertas especies de pulgones. No obstante este método ha sido empleado frecuentemente en estudios de dinámica poblacional en cultivo de cítricos (Hermoso de Mendoza et al., 1997; Cambra et al., 2000a; Marroquín et al., 2004).

*A. gossypii* constituyó otra especie importante hallada en la parcela, ya que representó el 18,29% de las capturas obtenidas mediante el método de la planta pegajosa a lo largo de un año. En total, el 74,01% de las capturas obtenidas mediante el método de la planta pegajosa durante un año de cultivo, correspondieron a individuos pertenecientes a *A. spiraecola* y *A. gossypii*.

Los resultados obtenidos en la parcela de estudio coinciden con los resultados obtenidos en plantaciones de cítricos adultos por Hermoso de Mendoza et al. (1997) y Marroquín et al. (2004), ya que citaron a estas dos especies como las más abundantes de la fauna afídica valenciana de cítricos.

Ambas especies de pulgones son vectoras de CTV, aunque con diferentes eficacias de transmisión (Hermoso de Mendoza et al., 1984; Yokomi y Garnsey 1987). En todos ellos *A. gossypii* ha resultado ser un vector mucho más eficiente en la transmisión de CTV que *A. spiraecola*. A pesar de esta diferencia en la eficiencia en la transmisión la gran abundancia de *A. spiraecola* en la zona contribuyó seguramente a la rápida dispersión del virus en la parcela, junto con la presencia de un eficiente vector como *A. gossypii*. Este importante papel jugado por *A. spiraecola*, debido a su abundancia, en la dispersión de CTV a pesar de su baja tasa de transmisión, fue previamente descrito en España (Hermoso de Mendoza et al., 1984; Cambra et al., 2000a), Florida (Yokomi y Garnsey, 1987) y California (Yokomi y Oldfield, 1991).

Otra especie abundante en la parcela fue *Hyalopterus pruni*, especie habitual en frutales de hueso, aunque no habitual en cítricos. El método de la planta pegajosa captura aquellas especies que aterrizan o visitan el cultivo, lo cual no quiere decir que el cultivo sea hospedador de la especie de pulgón capturada. Por tanto, la presencia de *H. pruni* en la parcela de estudio puede deberse a la presencia de frutales de hueso en las proximidades. Hermoso de Mendoza et al. (1984) demostraron que *H. pruni* no era capaz de transmitir CTV, aunque era capaz de adquirir el virus (Cambra et al., 1982). Por tanto su relativa abundancia en la parcela no influye en la dispersión de CTV.

La alta actividad vectorial registrada parece influir notablemente en la rápida dispersión del virus en la parcela experimental. Se ha estimado en 552,9 el número de pulgones que visitaron una planta de vivero de *C. macrophylla* a lo largo del año. Si esta estimación se extrapolara a una parcela de vivero comercial, una hectárea de vivero situada en la misma zona recibiría la visita de 34.556.250 pulgones/ha durante un año (tomando como marco de plantación 0,2 x 0,8 m = 62.500 plantas/ha (Agustí, 2000)).

El alto porcentaje de individuos CTV-virulíferos presentes en la parcela, también fue fundamental para alcanzar la alta incidencia viral calculada. Se estimó un porcentaje del 17,5% de individuos virulíferos durante el mes mayo, mes dónde se registró el mayor número de las principales especies vectoras de CTV (*A. spiraecola* y *A. gossypii*). Por tanto, con esta tasa de individuos virulíferos y una estimación de la actividad vectorial en 279 pulgones/planta (17.437.500 pulgones / ha) durante el mes de mayo, el número de individuos virulíferos de las especies *A. spiraecola* y *A. gossypii* que aterrizaron en una planta de vivero de *C. macrophylla* durante el mes de mayo fue de 48,8 pulgones/planta, lo que representaría 3.050.000 pulgones/ha.

En resumen, la alta susceptibilidad de *C. macrophylla* a la infección natural por CTV, la abundante presencia de especies vectoras en el cultivo, la alta actividad vectorial estimada y la alta tasa de pulgones CTV-virulíferos parecen ser los factores responsables de la alta incidencia de CTV alcanzada en el cultivo en tan poco espacio de tiempo.

Además se estimó la superficie foliar de una planta de *C. macrophylla* durante un año, observándose que a lo largo del año la superficie foliar aumentó hasta septiembre; a partir de este mes no existieron diferencias significativas entre los diferentes meses muestreados (hasta febrero). Esto puede ser debido a la finalización de las brotaciones de la planta debido a la entrada en los meses de otoño, aunque las yemas en los cítricos brotan en cualquier época del año cuando la temperatura del suelo supera los 12°C, con independencia de la del aire (Agustí, 2000), o la sensibilidad de este patrón a las bajas temperaturas (Agustí, 2000) que impidió un mayor crecimiento de la planta.

Como sucedió en bloques de vivero de frutales de hueso (Capítulo 4), se observó un importante número de pulgones que aterrizó en el tronco de las plantas de vivero al principio de la plantación. Esto puede deberse a dos motivos: 1) En ese momento la superficie foliar disponible para los pulgones es muy pequeña y la actividad vectorial es muy alta, esto hace que todos los pulgones no puedan aterrizar en la parte foliar de las plantas y 2) el tronco de la planta no está totalmente lignificado, por tanto puede ser apetecible para los pulgones. Estas circunstancias hacen que el tronco sea un área alternativa para el aterrizaje/visita de los pulgones en los primeros estadios del cultivo. Conforme se completa el desarrollo de la planta, la predilección de los pulgones se centra en la parte foliar.

Se observó también que las mayores densidades de pulgones por m<sup>2</sup> se dieron en los primeros estadios de crecimiento de la planta (abril y mayo), puesto que la superficie foliar de la planta era muy pequeña mientras el número de pulgones que las visitaron/aterrizaron era muy grande. En los meses de invierno sucedió lo contrario, disminuyendo el número de pulgones mientras la superficie foliar fue mayor, lo que se tradujo en unas bajas capturas de pulgones por m<sup>2</sup>.

A modo de resumen, en este Capítulo se ha confirmado la susceptibilidad natural del patrón *C. macrophylla* en una zona con una alta densidad de inóculo. Además, se ha podido estimar la actividad vectorial de los pulgones presentes en la zona a lo largo de un año de cultivo en un bloque de vivero y la tasa de pulgones CTV-virulíferos de las principales especies vectoras presentes en la zona durante el mes de mayo.

Con estos resultados se puede asegurar que en zonas con una alta actividad vectorial y abundancia de especies vectoras de CTV, se hace necesario la aplicación de medidas de control en el cultivo de plantas de *C. macrophylla* en campo abierto. Así, en una parcela de vivero de *C. macrophylla*, la sola presencia de una tasa de 0,1% de individuos CTV-virulíferos y con una actividad vectorial similar a la observada en la parcela experimental de estudio, significaría la presencia aproximada de 17.400 pulgones CTV-virulíferos/ha durante el mes de mayo, suficientes sin duda para infectar un cierto porcentaje de plantas. Estas medidas podrían ser: producción de los plantones bajo malla anti-pulgón, utilización de aceites minerales (evaluación realizada en esta Tesis Doctoral) y combinación en

campo de patrones de cítricos con diferente susceptibilidad. Los métodos biológicos (utilización de enemigos naturales de los pulgones vectores) y químicos son menos eficaces en disminuir la incidencia de CTV (Powell et al., 1997, 2005a) al tratarse de un virus semipersistente. No obstante, la combinación de varias estrategias podría contribuir a disminuir drásticamente el número de vectores y por tanto la incidencia final del virus en el bloque de vivero.

Los resultados obtenidos en este Capítulo aportan conocimientos de la epidemiología de CTV en bloques de vivero útiles para diseñar sistemas de protección contra el virus. Útiles sobre todo en aquellos patrones susceptibles al virus como *C. macrophylla*, aunque también aplicables a otros tipo de patrones.

## **CAPÍTULO 6.**

# **VALIDACIÓN DE “SPOT” Y “TISSUE-PRINT” RT-PCR A TIEMPO REAL. COMPARACIÓN CON TÉCNICAS SEROLÓGICAS Y CÁLCULO DE PARÁMETROS DE DIAGNÓSTICO**



## CAPÍTULO 6

# VALIDACIÓN DE “SPOT” Y “TISSUE-PRINT” RT-PCR A TIEMPO REAL. COMPARACIÓN CON TÉCNICAS SEROLÓGICAS Y CÁLCULO DE PARÁMETROS DE DIAGNÓSTICO

---

### 6.1 INTRODUCCIÓN

La utilización de técnicas de detección precisas es fundamental para garantizar un correcto estado fitosanitario de las plantas en vivero, y de esta forma impedir la comercialización de material vegetal infectado, principal causa de la dispersión de enfermedades vegetales a grandes distancias y su introducción en parcelas de nueva plantación.

La creciente utilización de técnicas moleculares en la detección y diagnóstico de patógenos vegetales hace necesaria su validación para conocer sus características y precisión, y de esta forma orientar su uso.

Al mismo tiempo, un aspecto importante en la utilización de una técnica de detección cuando se utilizan extractos de material vegetal es conocer el número máximo de muestras (en este caso plantas de vivero) que se pueden mezclar (en un extracto) para tener un adecuada precisión de la técnica. Esto es fundamental cuando se analizan una gran cantidad de muestras para ahorrar tiempo de recolección, procesamiento y posterior análisis, lo que se traduce en menor coste económico. Por eso en este Capítulo se determinaron también el número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar en un extracto utilizando las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV en diferentes períodos del cultivo a lo largo de un año.

Los parámetros de diagnóstico de una técnica se obtienen al compararlos con otra técnica que se toma como referencia o “gold-standard”. En ocasiones, para determinadas enfermedades este “gold-standard” no existe, o su uso es muy caro y por tanto no puede ser utilizada en procesos de validación (Hui y Walter, 1980; Hui y Zhou, 1998; Singer et al., 1998; Hadgu et al., 2005; Reitsma et al., 2009). Por ello, dentro de las ciencias médica y veterinaria se han desarrollado diversas métodos para poder estimar los parámetros de diagnóstico sin necesidad de una “gold standard” (Hui y Zhou, 1998; Enøe et al., 2000; Reitsma et al., 2009).

Uno de estos métodos es el **análisis discrepante** o **resolución discrepante** (“discrepant analysis”). Este método ha sido el más utilizado en la validación de métodos de diagnóstico en medicina (Hadgu, 1996; Lipman y Astles, 1998; Alonzo y

Pepe, 1999). El método a validar se compara en un primer momento con un método de detección con una alta especificidad (método de referencia, “reference”). Los individuos que han resultado positivos o negativos por ambos métodos se clasifican como verdaderos positivos o verdaderos negativos, respectivamente. A continuación, los individuos discrepantes se analizan de nuevo mediante una prueba molecular muy sensible (método resolutivo, “resolver”). Los individuos positivos por este método se vuelven a clasificar como verdaderos positivos y los individuos negativos como verdaderos negativos. Este método ha sido criticado porque estima unos valores de sensibilidad y especificidad superiores a los reales para la técnica a validar. Únicamente los individuos discrepantes son analizados por el método resolutivo. De esta forma, muchos de los individuos clasificados como verdaderos negativos, en realidad no lo son ya que únicamente son analizados por la técnica evaluada y el método de referencia (Hadgu, 1997; Lipman y Astles, 1998; Miller, 1998). Green et al. (1998) evaluaron los sesgos producidos por este método.

Alonzo y Pepe (1999) propusieron el método de **composición de pruebas de referencia** (“composite reference standards”). La técnica evaluada se compara con una técnica de referencia con una alta especificidad, clasificándose como verdaderos positivos los individuos positivos por ambas. A continuación, se vuelven a analizar no sólo los individuos discrepantes sino también los individuos negativos por ambas técnicas por una técnica resolutiva con una alta sensibilidad. Un individuo se clasificará definitivamente como positivo si resulta positivo por la técnica resolutiva y verdadero negativo si es clasificado como negativo por ésta. Con este método todos los individuos son analizados por una técnica con una alta especificidad y la mayoría por una técnica con una alta sensibilidad (Hawkings et al., 2001; Baughman et al., 2008).

Otro procedimiento utilizado son los **modelos latentes** (“latent models”). Greenberg y Jekel (1969) sugirieron que el índice de falsos positivos estimados por una nueva técnica podía ser estimado al evaluarla en una población con una baja prevalencia, y lo mismo ocurría con el índice de falsos negativos al evaluarla en una población con una alta prevalencia. Posteriormente, Hui y Walter (1980) (Anejo A.2) demostraron estadística y empíricamente que es posible estimar la sensibilidad y la especificidad de dos métodos diferentes de detección cuando eran aplicados simultáneamente a individuos pertenecientes a dos poblaciones con distinta prevalencia de la enfermedad mediante funciones de máxima verosimilitud (“maximum likelihood”). Para ello asumieron dos premisas: 1) los dos métodos son condicionalmente independientes entre sí. Dos pruebas son condicionalmente independientes, cuando la sensibilidad (o especificidad) de la segunda prueba (T2) no depende de si los resultados de la primera prueba (T1) son positivos o negativos entre los individuos infectados (o no infectados) (Gardner et al., 2000). Es decir, los resultados del primer ensayo no condicionan los resultados del segundo y viceversa. Esto se debe a que ambas pruebas miden diferentes procesos biológicos. Por ejemplo, una prueba serológica que detecta anticuerpos producidos por un animal

ante la infección de un virus determinado y una prueba molecular que detecta el ácido nucleico de ese mismo virus; y 2) la sensibilidad y la especificidad de ambos ensayos se mantienen constantes en ambas poblaciones. Los valores estimados por las funciones de máxima verosimilitud se pueden obtener mediante el algoritmo de Newton-Raphson (NR) (Tanner, 1996) y el algoritmo Esperanza-Maximización “Expectation-Maximization” (EM) (Dempster et al., 1977), actualmente implementados en varios paquetes estadísticos.

Joseph et al. (1995) y Johnson et al. (2001) aplicaron el modelo de Hui y Walter al análisis bayesiano. En el análisis bayesiano los parámetros de interés son estimados a partir de combinar las funciones de máxima verosimilitud con distribuciones de probabilidad beta (caracterizadas por los parámetros  $a$  y  $b$ ), obtenidas a partir de información previa, distribuciones previas (“prior distributions”) y recogida de varias fuentes (opinión expertos, otros trabajos realizados, etc...). Esto se logra mediante el algoritmo del muestreo de Gibbs (“Gibbs sampling”) (Gelfand y Smith, 1990). Se trata de un proceso iterativo (basado en cadenas de Markov), por el cual a partir de un valor inicial se genera el siguiente y así sucesivamente. De esta forma se generan las distribuciones de probabilidad beta posteriores (“posterior distribution”) que estimarán los valores para cada parámetro. El valor obtenido como mediana en la distribución de probabilidad beta posterior será el valor estimado mediante métodos bayesianos del parámetro estudiado. Así se obtiene un 95% de probabilidad de que el valor del parámetro estudiado se encuentre entre los valores situados entre los puntos 2,5% y 97,5% de la posterior distribución beta generada (Brascum et al., 2005). Por tanto, cuanto menor sea este intervalo mayor será la precisión de nuestra estimación.

Sin embargo, en ocasiones ocurre que los ensayos evaluados son condicionalmente dependientes. Dos pruebas de diagnóstico son condicionalmente dependientes cuando la sensibilidad o la especificidad de la segunda prueba (T2) varía al analizar individuos previamente analizados por la primera prueba (T1) y viceversa (Gardner et al., 2000). Esto puede ocurrir cuando los ensayos evaluados miden los mismos procesos biológicos. A modo de ejemplo, si analizamos 100 individuos positivos con una prueba de diagnóstico con una sensibilidad del 80%, teóricamente 20 de esos individuos serán clasificados como negativos cuando en realidad no lo son. Si a continuación esos 20 individuos son evaluados por un técnica de diagnóstico con una sensibilidad del 90%, si las dos técnicas son condicionalmente independientes el segundo test tendría que identificar como positivos 18 individuos. Por el contrario, si los dos test son condicionalmente dependientes, el segundo test identificaría un número inferior a 18 individuos positivos, ya que su sensibilidad se ve alterada por los resultados del primer test. Cuanto menor sea el número de individuos identificados por la segunda prueba mayor será la dependencia entre los dos ensayos, si la segunda prueba no identifica ningún individuo la dependencia será total (Gardner et al., 2000).

Cuando se estima la sensibilidad y la especificidad entre pruebas de diagnóstico condicionalmente dependientes con un modelo que asume que las pruebas son condicionalmente independientes, ambos parámetros pueden ser sobreestimados (Vacek, 1985; Torrance-Rynard y Walter, 1997). Por lo tanto, a la hora de aplicar un modelo latente para estimar las sensibilidades y especificidades entre diferentes pruebas de diagnóstico es importante conocer el grado de dependencia o independencia entre las pruebas. Dendukuri y Joseph (2001) y Georgiadis et al. (2003) desarrollaron dos modelos latentes mediante métodos bayesianos para estimar la sensibilidad y especificidad entre dos pruebas de diagnóstico condicionalmente dependientes para el caso de una población y de dos poblaciones, respectivamente. En ellos se mide la covarianza entre las dos pruebas en su sensibilidad (resultados positivos;  $\rho_D$ ) y en su especificidad (resultados negativos;  $\rho_{Dc}$ ).

A su vez, las razones de verosimilitud al ser funciones de la sensibilidad y de la especificidad se pueden calcular al estimar éstas en cada iteración mediante el muestreo de Gibbs, dando lugar también a distribuciones beta posteriores, pudiéndose obtener su mediana y su intervalo de probabilidad (Joseph y Giorkos, 1996).

Los modelos latentes son utilizados en medicina y veterinaria para estimar la sensibilidad y la especificidad de diferentes pruebas de diagnóstico utilizando: funciones de máxima verosimilitud (Bruce et al., 1987; Claes et al., 2005; Nérette et al., 2005; Chu et al., 2009), métodos bayesianos (Orr et al., 2003; Sanford et al., 2006; Frey et al., 2009; de Clare Blonsvoort et al., 2010; Rose et al., 2010; van der Goot et al., 2010) o ambos (Enøe et al., 2001; Delaney et al., 2003; Monti et al., 2005; Engel et al., 2006; Mainar-Jaime y Barberán, 2007; Gari et al., 2008; Drewe et al., 2009).

La aplicación de modelos latentes en la estimación de parámetros de diagnóstico en ausencia de “gold standard” ha sido revisada por Enøe et al. (2000) y más específicamente en la utilización de modelos bayesianos Brascum et al. (2005).

En este Capítulo se determinaron los diferentes parámetros de diagnóstico de las pruebas moleculares “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV y “tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección de CTV, mediante diferentes métodos. Al mismo tiempo se compararon estas dos técnicas moleculares con las técnicas serológicas ELISA-DASI utilizando el anticuerpo monoclonal específico para PPV 5B-IVIA e Inmunoimpresión-ELISA utilizando la mezcla de los anticuerpos monoclonales específicos para CTV 3DF1 y 3CA5.

## 6.2 OBJETIVOS

- Determinar el número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar en un extracto para tener una adecuada precisión en el muestreo de PPV a lo largo del año (período vegetativo y dormancia invernal).
- Validar y comparar las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV en condiciones de vivero. Estimación de los parámetros de diagnóstico en primavera.
- Validar y comparar las técnicas Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección de CTV en plantas de vivero y en árboles adultos. Estimación de los parámetros de diagnóstico en vivero.

## 6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.3.1 Determinación del número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar en un extracto para tener una adecuada precisión de detección de PPV

Para la toma de muestras de detección, se seleccionaron tres plantas del patrón Nemaguard y tres plantas del patrón Mariana GF8-1 positivas a PPV en los análisis realizados en octubre de 2006 (Capítulo 3, apartado 3.2), de la parcela de estudio localizada en la localidad de Lliria (Valencia) (Capítulo 3, apartado 3.1.1). El material muestreado dependió de la época del año en el que se realizaron los muestreos: hojas en primavera, verano y otoño y yemas latentes en invierno.

Por cada planta se tomaron más de 40 hojas o yemas latentes de cada planta. Se prepararon grupos de tres hojas o yemas positivas (unidad básica de la experiencia=una planta) procedentes del patrón infectado a las que se iban añadiendo, en grupos de tres hasta un número de 27, hojas o yemas negativas (procedentes de plantas libres de PPV) de la misma variedad (Tabla 6.1). A su vez, también se formaron un grupo de hojas o yemas por variedad y por número de plantas mezcladas en los que todas las hojas procedían de plantas sanas.

**Tabla 6.1: Número de grupos formados mezclando plantas positivas (infectadas por PPV) con plantas negativas (sanas) por época del año para determinar el número máximo de plantas de vivero que pueden mezclarse**

Mezcla de plantas positivas			
Nº plantas positivas	Nº plantas negativas	Total plantas	Repeticiones
1 <sup>a</sup>	0	1	6
1	1	2	6
1	2	3	6
1	3	4	6
1	4	5	6
1	5	6	6
1	6	7	6
1	7	8	6
1	8	9	6
1	9	10	6

<sup>a</sup> Cada grupo de plantas estaba compuesto por tres hojas o yemas según la época del año

Todos los grupos formados se analizaron mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real según se detalla en los apartados 3.3.1.1.1 y 3.3.1.1.2 del Capítulo 3, respectivamente.

#### **6.3.1.1 Métodos estadísticos**

Para determinar el número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar en un extracto, se empleó un modelo lineal generalizado (Molenberghs y Verbeke, 2005) suponiendo que la variable de interés (grupos que resultaron positivos) sigue una distribución binomial. Se utilizaron cuatro factores: Patrón, Técnica, Estación del año y Número de plantas por muestra con sus interacciones. Cuando existieron diferencias significativas en un factor, para apreciar entre que niveles dentro de cada factor había diferencias, se aplicaron los intervalos LSD “Least Significant Difference”. Se utilizó el programa para PC, SAS 9.2.

### **6.3.2 Validación de “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV. Comparación con la técnica ELISA-DASI y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero**

#### ***6.3.2.1 Material vegetal: parcelas experimentales***

Se utilizaron los resultados obtenidos en los diferentes muestreos efectuados en las distintas parcelas experimentales situadas en Lliria y Carlet (Capítulo 3, apartado 3.2). A su vez, se estableció una nueva parcela plantada en la zona de Lliria en diciembre de 2007. Ésta estaba formada por 500 plantas de vivero procedentes de la parcela de Carlet que resultaron negativas por ambas técnicas en el último muestreo realizado en noviembre de 2007. En abril de 2008, cuando las plantas brotaron, se analizaron tanto por ELISA-DASI como por “Spot” RT-PCR a tiempo real. Por tanto, se utilizaron un total de 5.047 muestras.

#### ***6.3.2.2 Cálculo de la concordancia entre técnicas***

Para medir la concordancia entre técnicas se utilizó el índice de kappa (k) de Cohen (1960). Se utilizó la prueba de Mc Nemar (1947) para detectar diferencias entre los valores marginales de la tabla de contingencia. Si la prueba de Mc Nemar fue significativa se calculó el índice BAK (Byrt et al., 1993). En aquellos casos en los que la prevalencia de la población era mayor de 80% ó menor de 20% se calculó el índice PABAK (Byrt et al., 1993).

#### ***6.3.2.3 Cálculo de los parámetros de diagnóstico de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en condiciones de vivero***

El cálculo de los parámetros de diagnóstico de las dos técnicas evaluadas se realizó por dos procedimientos diferentes en primavera, época del año dónde normalmente se inspeccionan los viveros para detectar plantas infectadas por PPV:

1) Se compararon los resultados obtenidos en 729 plantas de vivero que se analizaron en la parcela de Lliria en dos primaveras consecutivas (mayo de 2007 y abril de 2008). Para esta comparación se tomó como verdadera positiva a toda planta que había resultado positiva por ambos métodos en mayo de 2007. De la misma forma se tomó como verdadera negativa toda planta que había sido negativa por ambos métodos en mayo de 2007. Para resolver las discrepancias entre ambas técnicas se utilizaron los resultados obtenidos en mayo de 2008. Se siguió el protocolo OEPP/EPPO (2004b), considerándose que eran verdaderos positivos aquellas plantas positivas por ambos métodos en mayo de 2008 y verdaderos negativos si fueron negativas por ambas técnicas o al menos por una de ellas.

La sensibilidad (proporción de verdaderos positivos detectados por la técnica) y la especificidad (proporción de verdaderos negativos detectados por la técnica) y sus intervalos de confianza (95%) fueron calculados según Altman y Brand (1994a). La razón de verosimilitud positiva (proporción de verdaderos positivos detectados

por la técnica dividido por la proporción de falsos positivos detectados por la técnica) y la razón de verosimilitud negativa (proporción de verdaderos negativos detectados por la técnica dividido por la proporción de falsos negativos detectados por la técnica) fueron calculadas según Deeks y Altman (2004). Los intervalos de confianza (95%) fueron calculados según Simel et al. (1991). La combinación de varias razones de verosimilitud se realizó según Neves et al. (2004).

2) Mediante modelos latentes. Se emplearon tanto las funciones de máxima verosimilitud como métodos bayesianos. Para ello se utilizaron tres poblaciones. La primera población ( $P_1$ ) fue la correspondiente al análisis de mayo de 2007 en la parcela de Llíria; la segunda población ( $P_2$ ) fue la correspondiente al análisis de la misma parcela en abril de 2008 y la tercera población ( $P_3$ ) la correspondiente a la parcela plantada en Llíria en diciembre de 2007 y formada por plantas procedentes de Carlet y analizada en abril de 2008.

Para estimar la sensibilidad y la especificidad mediante funciones de máxima verosimilitud implementando los algoritmos NR y EM, se empleó el programa “TAGS” “Test in Absense of a Gold Standard” (Pouillot et al., 2002), dentro de la plataforma estadística R (<http://www.R-project.org>). Para estimar los intervalos de confianza se utilizaron los intervalos “bootstrap” con 1.000 muestras (Shao y Tu, 1995). El programa TAGS asume las mismas asunciones que el modelo de Hui y Walter, es decir los test son condicionalmente independientes y la sensibilidad y especificidad no varía entre las poblaciones.

Para estimar la sensibilidad y especificidad mediante métodos bayesianos, se utilizó el programa Winbugs 1.4 (Spiegelhalter et al., 2003), el cual implementa la herramienta del algoritmo del muestreo de Gibbs. Para comprobar la independencia o dependencia entre las pruebas diagnósticas, se utilizó el modelo de Johnson et al. (2001) para pruebas condicionalmente independientes (dos pruebas independientes en dos poblaciones (Brascum et al., 2005)) y el modelo de Georgiadis et al. (2003) para pruebas condicionalmente dependientes (dos pruebas dependientes en dos poblaciones (Brascum et al., 2005)). Ambos modelos se adaptaron para tres poblaciones. Las razones de verosimilitud se introdujeron dentro de los modelos para poder ser calculadas (Joseph y Gyorkos, 1996). Se implementaron tres cadenas por modelo para comprobar la convergencia mediante el método de Gelman-Rubin (Brooks y Gelman, 1998). Se desecharon las 10.000 primeras iteraciones al comprobar que la convergencia se lograba antes de estas iteraciones y posteriormente se aplicaron 100.000 iteraciones más para estimar los parámetros.

Para caracterizar las distribuciones beta de probabilidad previas, es decir, obtener sus parámetros  $a$  y  $b$  (beta ( $a$ ;  $b$ )) se utilizaron los datos de sensibilidad y especificidad de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real obtenidos por Capote et al. (2009) (sensibilidad=0,86 y especificidad=0,99 para ELISA-DASI y sensibilidad=0,93 y especificidad=0,98 para “Spot” RT-PCR a tiempo real). Así, se asumió que el valor de la sensibilidad de ELISA-DASI, con un 95% de probabilidad,

era  $> 0,80$  partiendo de un valor de  $0,86$ ; esto dio lugar a una distribución beta ( $108,41$ ;  $18,49$ ). Se asumió que la especificidad de ELISA-DASI, con un 95% de probabilidad, era  $> 0,90$  partiendo de un valor de  $0,99$ ; esto dio lugar a una distribución beta ( $34,17$ ;  $1,34$ ). En el caso de “Spot” RT-PCR se asumió que el valor de la sensibilidad, con un 95% de probabilidad, era  $> 0,90$  partiendo de un valor de  $0,93$ ; esto dio lugar a una distribución beta ( $262,96$ ;  $20,72$ ). Además, se asumió que la especificidad de “Spot” RT-PCR a tiempo real, con un 95% de probabilidad, era  $> 0,90$  partiendo de un valor de  $0,98$ ; esto dio lugar a una distribución beta ( $42,11$ ;  $1,84$ ). La obtención de las distribuciones beta se realizó mediante el programa Betabuster (<http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/>). Al mismo tiempo las prevalencias de las tres poblaciones también se caracterizaron ( $P_1 = \text{beta}(79,55; 146,88)$ ;  $P_2 = \text{beta}(50,69; 35,53)$ ;  $P_3 = \text{beta}(1,84; 42,11)$ ). Para comprobar la robustez de los modelos aplicados se desarrollaron modelos con distribuciones uniformes (0;1) (beta (1,1)), para los parámetros de sensibilidad y especificidad de ambas pruebas. Esto quiere decir que no se asumió ninguna distribución previa de estos parámetros al aplicar estos modelos.

Para determinar el ajuste del modelo a los datos experimentales se aplicó el criterio de información de la deviance “Deviance Information Criterion” (DIC) (Spiegelhalter et al., 2002). Cuanto menor sea éste, mayor será el ajuste del modelo (Menten et al., 2008).

Para comprobar que la sensibilidad y especificidad era la misma en todas las poblaciones se aplicó el mismo modelo individualmente a cada una de las poblaciones estudiadas ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ) con las mismas distribuciones previas.

### **6.3.3 Validación de “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección de CTV. Comparación con Inmunoimpresión-ELISA y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero**

#### ***6.3.3.1 Material vegetal: parcelas experimentales***

Se analizaron dos parcelas de naranjos dulces adultos situadas en el condado de Tulare (California, EEUU). La primera parcela de 11 años de edad estaba constituida por 288 plantas de Powell Navel sobre citrange Carrizo. La segunda parcela de la misma edad estaba formada por 300 plantas de Lanelate sobre citrange Carrizo. Ambas parcelas se muestrearon en junio de 2008, por ambas técnicas de detección, según se explica en los apartados 3.3.1.2.1 y 3.3.1.2.2 del Capítulo 3. Además, plantas procedentes de ambas parcelas se injertaron sobre plantas indicadoras de lima mejicana (tres limas con tres inóculos por planta analizada). A los cuatro meses se observaron síntomas y además se analizaron por Inmunoimpresión-ELISA. Las plantas seleccionadas para este análisis fueron: siete plantas positivas únicamente por Inmunoimpresión y negativas por “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real, 12 plantas negativas por Inmunoimpresión y positivas por “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real, cuatro plantas positivas por ambos métodos y cuatro plantas negativas por ambos métodos.

A su vez también se muestreó la parcela situada en Moncada en las instalaciones del IVIA (Capítulo 3, apartado 3.1.3) en diciembre de 2008 por ambas técnicas.

En total se analizaron 1.246 plantas por ambas técnicas de detección de CTV.

#### ***6.3.3.2 Cálculo de la concordancia entre técnicas***

Se realizaron los mismos procedimientos que en la comparación de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real (apartado 6.3.2.2).

#### ***6.3.3.3 Cálculo de los parámetros de diagnóstico de las técnicas Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real en condiciones de vivero***

El cálculo de los parámetros de diagnóstico se realizó en invierno, época del año en la que se comercializa gran parte del material vegetal.

Se analizó en primer lugar la parcela situada en las instalaciones del IVIA en Moncada en diciembre de 2008 por ambas técnicas. Aquellas plantas que dieron positivo por ambas técnicas se consideraron verdaderos positivos, de la misma forma si dieron negativo por ambas técnicas se consideraron verdaderos negativos. Posteriormente las plantas se podaron como se hace en un vivero comercial y se cubrieron con malla anti-pulgón para impedir la posible inoculación de CTV por pulgones visitantes. Cuando las plantas ya habían brotado (julio 2009), se retiró la

mallas y se volvieron a muestrear aquellas que con resultados diagnósticos discrepantes en el anterior análisis (diciembre 2008) mediante Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real. Además, se injertó en lima mexicana material procedente de las mismas (una lima mexicana con cuatro inóculos por planta). A los cuatro meses de la inoculación se comprobó la infección de las limas mediante observación de síntomas e Inmunoimpresión-ELISA. Con estos resultados, siguiendo las recomendaciones del protocolo EPPO (2004a), se tomó como verdadera positiva aquella planta que había producido reacción positiva al menos por dos de las tres técnicas empleadas.

La sensibilidad y la especificidad se calcularon según Altman y Brand (1994a) y las razones de verosimilitud según Deeks y Altman (2004). La combinación de varias razones de verosimilitud se realizó según Neves et al. (2004).

**Figura 6.1: Parcela situada en Moncada (*Citrus macrophylla*) tras su poda y cubierta con malla**



## 6.4 RESULTADOS

### 6.4.1 Determinación del número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar en un extracto para tener una adecuada precisión de detección de PPV

En la Tabla 6.2 y Tabla 6.2 bis se exponen los resultados correspondientes a los grupos formados por combinación de plantas positivas y negativas.

**Tabla 6.2: Resultados obtenidos en primavera y verano al combinar hojas procedentes de plantas infectadas con plantas sanas**

Muestras	Primavera					
	Mariana GF8-1		Nemaguard		TOTAL	
	ELISA <sup>a</sup>	Spot <sup>b</sup>	ELISA	Spot	ELISA	Spot
1 / 0 <sup>c</sup>	3/3 <sup>d</sup> (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)
1 / 1	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)
1 / 2	1/3 (33,3%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	3/3 (100,0%)	2/6 (33,3%)	6/6 (100,0%)
1 / 3	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	4/6(66,7%)	5/6 (83,3%)
1 / 4	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	4/6(66,7%)	5/6 (83,3%)
1 / 5	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	4/6(66,7%)	5/6 (83,3%)
1 / 6	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	5/6 (83,3%)	5/6 (83,3%)
1 / 7	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	1/3 (33,3%)	2/6 (33,3%)	4/6 (66,7%)
1 / 8	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	4/6(66,7%)	5/6 (83,3%)
1 / 9	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	2/3 (66,7%)	3/6 (50,0%)	5/6 (83,3%)
<b>TOTAL</b>	<b>25/30 (83,3%)</b>	<b>30/30 (100%)</b>	<b>14/30 (46,6%)</b>	<b>22/30 (73,3%)</b>	<b>39/60 (65,0%)</b>	<b>52/60 (86,7%)</b>

Muestras	Verano					
	Mariana GF8-1		Nemaguard		TOTAL	
	ELISA	Spot	ELISA	Spot	ELISA	Spot
1 / 0	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	2/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)
1 / 1	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)
1 / 2	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)
1 / 3	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	4/6 (66,7%)	6/6 (100,0%)
1 / 4	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	4/6 (66,7%)	6/6 (100,0%)
1 / 5	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	4/6 (66,7%)	5/6 (83,3%)
1 / 6	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)
1 / 7	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	4/6 (66,7%)	5/6 (83,3%)
1 / 8	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	2/6 (33,3%)	4/6 (66,7%)
1 / 9	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	3/6 (50,0%)	4/6 (66,7%)
<b>TOTAL</b>	<b>23/30 (76,7%)</b>	<b>27/30 (90,0%)</b>	<b>21/30 (70,0%)</b>	<b>27/30 (90,0%)</b>	<b>44/60 (73,3%)</b>	<b>54/60 (90,0%)</b>

<sup>a</sup>ELISA-DASI

<sup>b</sup>“Spot” RT-PCR a tiempo real

<sup>c</sup>Número de plantas positivas/Número de plantas negativas (tres hojas por planta)

<sup>d</sup> Número de grupos positivos / Número de grupos totales

**Tabla 6.2 bis: Resultados obtenidos en otoño e invierno al combinar hojas o yemas (invierno) procedentes de plantas infectadas con hojas o yemas de plantas negativa**

Otoño						
Muestras	Mariana GF8-1		Nemaguard		TOTAL	
	ELISA <sup>a</sup>	Spot <sup>b</sup>	ELISA	Spot	ELISA	Spot
1 / 0 <sup>c</sup>	2/3 <sup>d</sup> (66,7%)	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	5/6 (83,3%)	5/6 (83,3%)
1 / 1	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)
1 / 2	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	1/3 (33,3%)	2/6 (33,3%)	4/6(66,7%)
1 / 3	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)
1 / 4	1/3 (33,3%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	3/3 (100,0%)	2/6 (33,3%)	6/6 (100,0%)
1 / 5	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	2/6 (33,3%)	6/6 (100,0%)
1 / 6	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	3/6 (50,0%)	6/6 (100,0%)
1 / 7	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	3/6 (50,0%)	6/6 (100,0%)
1 / 8	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	2/3 (66,7%)	2/6 (33,3%)	5/6 (83,3%)
1 / 9	1/3 (33,3%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	2/3 (66,7%)	1/6 (16,7%)	5/6 (83,3%)
<b>TOTAL</b>	<b>21/30 (70,0%)</b>	<b>29/30 (96,7%)</b>	<b>9/30 (30,0%)</b>	<b>26/30 (86,7%)</b>	<b>30/60 (50,0%)</b>	<b>55/60 (91,7%)</b>

Invierno						
Muestras	Mariana GF8-1		Nemaguard		TOTAL	
	ELISA	Spot	ELISA	Spot	ELISA	Spot
1 / 0	1/3 (33,3%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	2/6 (33,3%)	5/6 (83,3%)
1 / 1	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	5/6 (83,3%)	5/6 (83,3%)
1 / 2	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	4/6(66,7%)	6/6 (100,0%)
1 / 3	1/3 (33,3%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	3/6 (50,0%)	6/6 (100,0%)
1 / 4	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	1/6 (16,7%)	5/6 (83,3%)
1 / 5	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	0/6 (0,0%)	6/6 (100,0%)
1 / 6	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	0/6 (0,0%)	6/6 (100,0%)
1 / 7	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	0/6 (0,0%)	6/6 (100,0%)
1 / 8	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	0/3 (0,0%)	2/3 (66,7%)	0/6 (0,0%)	5/6 (83,3%)
1 / 9	0/3 (0,0%)	2/3 (66,7%)	0/3 (0,0%)	3/3 (100,0%)	0/6 (0,0%)	5/6 (83,3%)
<b>TOTAL</b>	<b>6/30 (20,0%)</b>	<b>28/30 (93,3%)</b>	<b>9/30 (30,0%)</b>	<b>27/30 (90,0%)</b>	<b>15/60 (25,0%)</b>	<b>55/60 (91,7%)</b>

<sup>a</sup>ELISA-DASI

<sup>b</sup>”Spot” RT-PCR a tiempo real

<sup>c</sup> Número de plantas positivas / Número de plantas negativas (tres hojas o tres yemas por planta)

<sup>d</sup> Número de grupos positivos / Número de grupos totales

Se puede observar que en todas las estaciones del año se obtuvieron grupos positivos por ambas técnicas, aunque con diferentes porcentajes de éxito en la detección. Únicamente en el caso de ELISA-DASI no se detectaron grupos positivos a partir de la combinación de una planta positiva con cinco plantas negativas en invierno. Además, todos los grupos compuestos únicamente por plantas sanas o no infectadas por PPV resultaron negativos por ambas técnicas.

En la Tabla 6.3 se puede observar el resultado del análisis estadístico empleando un modelo lineal generalizado.

**Tabla 6.3: Resumen de la salida del programa SAS (modelo lineal generalizado) para la determinación del número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar para tener una adecuada precisión en la detección de PPV mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real, en muestreos realizados en diferentes épocas del año**

Efecto	g.l. numerador	g.l. denominador	F-Valor	Pr > F <sup>a</sup>
Estación	3	139	3,27	0,0231
Técnica	1	139	71,03	< ,0001
Patrón	1	139	15,32	0,0001
Muestra	9	139	4,36	< ,0001
Técnica x Estación	3	139	4,87	0,0030
Estación x Patrón	3	139	5,41	0,0015

<sup>a</sup>(Pr > F) < 0,05 indica diferencias significativas mediante un modelo lineal generalizado asumiendo que la variable estudiada sigue una distribución binomial

Existen diferencias entre los factores Estación, Técnica, Patrón y Muestra, y las interacciones Técnica x Estación y Estación x Patrón. Al analizar estos resultados, y observar diferencias significativas entre las dos técnicas, se optó por realizar un análisis de cada técnica por separado para estudiar como influyeron el resto de los factores en la técnica de diagnóstico empleada.

En las Tablas 6.4 y 6.5 se presentan los resultados obtenidos en estos análisis. En el caso de “Spot” RT-PCR a tiempo real, no se obtuvieron diferencias significativas para los factores Muestra y Estación, aunque sí para el factor Patrón. También se puede observar que el 90,0% de los grupos analizados por esta técnica resultaron positivos. Para la técnica ELISA-DASI, se obtuvieron diferencias significativas en los tres factores estudiados, aparte de la interacción Patrón x Estación. El 53,3% de los grupos analizados por esta técnica resultaron positivos.

**Tabla 6.4: Resumen de la salida del programa SAS (modelo lineal generalizado) para la determinación del número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar para tener una adecuada precisión en la detección de PPV mediante “Spot” RT-PCR a tiempo real, en muestreos realizados en diferentes épocas del año**

	<b>Efecto</b>	<b>g,l, numerador</b>	<b>g,l, denominador</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F<sup>a</sup></b>
	Estación	3	66	0,39	0,7573
	Patrón	1	66	6,37	0,0140
	Muestra	9	66	0,96	0,4817

<b>Muestras</b>	<b>PRIMAVERA</b>	<b>VERANO</b>	<b>OTOÑO</b>	<b>INVIERNO</b>	<b>TOTAL</b>
1 / 0 <sup>c</sup>	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	5/6 (83,3%)	5/6 (83,3%)	22/24 (91,7%) a
1 / 1	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	5/6 (83,3%)	23/24 (95,8%) a
1 / 2	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	4/6 (66,7%)	6/6 (100,0%)	21/24 (87,5%) a
1 / 3	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	23/24 (95,8%) a
1 / 4	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	5/6 (83,3%)	22/24 (91,7%) a
1 / 5	5/6 (83,3%)	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	22/24 (91,7%) a
1 / 6	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	23/24 (95,8%) a
1 / 7	4/6 (66,7%)	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	21/24 (87,5%) a
1 / 8	5/6 (83,3%)	4/6 (66,7%)	5/6 (83,3%)	5/6 (83,3%)	19/24 (79,2%) a
1 / 9	5/6 (83,3%)	4/6 (66,7%)	5/6 (83,3%)	5/6 (83,3%)	19/24 (79,2%) a
<b>TOTAL</b>	<b>52/60 (86,7%) a</b>	<b>54/60 (90,0%)a</b>	<b>55/60 (91,7%) a</b>	<b>55/60 (91,7%) a</b>	<b>216/240 (90,0%)</b>

<sup>a</sup>(Pr > F) < 0,05 indica diferencias significativas mediante un modelo lineal generalizado siguiendo una distribución binomial

<sup>b</sup>Número de plantas positivas / Número de plantas negativas (de cada planta se recogieron tres hojas o tres yemas)

<sup>c</sup>Número de grupos positivos / Número de grupos totales

<sup>d</sup>Letras diferentes en la misma fila o columna representan diferencias significativas mediante un modelo lineal generalizado siguiendo una distribución binomial (p < 0,05), la comparación de medias se realizó mediante intervalos LSD

**Tabla 6.5: Resumen de la salida del programa SAS (modelo lineal generalizado) para la determinación del número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar para tener una adecuada precisión en la detección de PPV mediante ELISA-DASI, en muestreos realizados en diferentes épocas del año**

	<b>Efecto</b>	<b>g.l. numerador</b>	<b>g.l. denominador</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F<sup>a</sup></b>
	Estación	3	63	11,14	< ,0001
	Patrón	1	63	8,86	0,0041
	Muestra	9	63	3,7	0,0009
	Patrón x Estación	3	63	4,14	0,0097

<b>Muestras</b>	<b>PRIMAVERA</b>	<b>VERANO</b>	<b>OTOÑO</b>	<b>INVIERNO</b>	<b>TOTAL</b>
1 / 0 <sup>b</sup>	6/6 <sup>c</sup> (100,0%)	5/6 (83,3%)	5/6 (83,3%)	2/6 (33,3%)	18/24 (75%) a <sup>d</sup> , b
1 / 1	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)	5/6 (83,3%)	5/6 (83,3%)	21/24 (87,5%) a
1 / 2	2/6 (33,3%)	6/6 (100,0%)	2/6 (33,3%)	4/6(66,7%)	14/24 (58,3%) b, c
1 / 3	4/6(66,7%)	4/6(66,7%)	5/6 (83,3%)	3/6 (50,0%)	16/24 (66,7%) a, b, d
1 / 4	4/6(66,7%)	4/6(66,7%)	2/6 (33,3%)	1/6 (16,7%)	11/24 (45,8%) c, d
1 / 5	4/6(66,7%)	4/6(66,7%)	2/6 (33,3%)	0/6 (0,0%)	10/24 (41,7%) c, e, f
1 / 6	5/6 (83,3%)	6/6 (100,0%)	3/6 (50,0%)	0/6 (0,0%)	14/24 (58,3%) b, c, e
1 / 7	2/6 (33,3%)	4/6(66,7%)	3/6 (50,0%)	0/6 (0,0%)	9/24 (37,5%) c, e, f
1 / 8	4/6(66,7%)	2/6 (33,3%)	2/6 (33,3%)	0/6 (0,0%)	8/24 (33,3%) f
1 / 9	3/6 (50,0%)	3/6 (50,0%)	1/6 (16,7%)	0/6 (0,0%)	7/24 (29,2%) f
<b>TOTAL</b>	<b>39/60 (65,0%) a</b>	<b>44/60 (73,3%) a</b>	<b>30/60 (50,0%) b</b>	<b>15/60 (25,0%) c</b>	<b>128/240 (53,3%)</b>

<sup>a</sup>(Pr > F) < 0,05 indica diferencias significativas mediante un modelo lineal generalizado siguiendo una distribución binomial

<sup>b</sup>Número de plantas positivas / Número de plantas negativas (de cada planta se recogieron 3 hojas o 3 yemas)

<sup>c</sup>Número de grupos positivos / Número de grupos totales

<sup>d</sup>Letras diferentes en la misma fila o columna representan diferencias significativas mediante un modelo lineal generalizado siguiendo una distribución binomial (p< 0.05), la comparación de medias se realizó mediante intervalos LSD

### 6.4.2 Validación de “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV. Comparación con la técnica ELISA-DASI y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero

#### 6.4.2.1 Resultados obtenidos en las diferentes parcelas y concordancia entre técnicas

En la Tabla 6.6 se pueden observar los diferentes resultados obtenidos en cada uno de los análisis realizados a las plantas de las diferentes parcelas, además de un resumen con la suma de todos ellos. La suma total de muestras analizadas fue de 5.047.

**Tabla 6.6: Resultados obtenidos al comparar ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en las diferentes parcelas muestreadas y sumatorio de todos ellos**

		ELISA -DASI		
		+	-	
“Spot” RT-PCR a tiempo real	+	66	31	1.269
	-	8	1.164	
Parcela Llíria octubre 2006 (A1)				
		ELISA -DASI		
		+	-	
“Spot” RT-PCR a tiempo real	+	449	118	1.289
	-	1	721	
Parcela Llíria mayo 2007 (A2)				
		ELISA -DASI		
		+	-	
“Spot” RT-PCR a tiempo real	+	433	26	729
	-	0	270	
Parcela Llíria abril 2008 (A3)				
		ELISA -DASI		
		+	-	
“Spot” RT-PCR a tiempo real	+	8	1	1.305
	-	0	1.296	
Parcela Carlet noviembre 2007 (A4)				
		ELISA -DASI		
		+	-	
“Spot” RT-PCR a tiempo real	+	11	8	455
	-	1	435	
Nueva parcela en Llíria abril 2008 (A5)				
		ELISA -DASI 5B		
		+	-	
“Spot” RT-PCR a tiempo real	+	967	184	5.047
	-	10	3.886	
Suma de todos los análisis (AT)				

A su vez, en la parcela situada en Lliria, al analizar las plantas en varios años consecutivos, se pudo comprobar el estado sanitario de las plantas que proporcionaron resultados discrepantes en los análisis mediante las dos técnicas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.7.

**Tabla 6.7: Estado sanitario en un segundo análisis de diferentes plantas de vivero de la parcela de Lliria con resultados discrepantes en un primer análisis**

Plantas únicamente positivas por ELISA-DASI							
Muestreo <sup>a</sup>	Análisis 1	Análisis 2	No muestreadas <sup>b</sup>	ELISA PCR <sup>c</sup> (+)	ELISA (-) PCR (+) <sup>d</sup>	ELISA PCR <sup>e</sup> (-)	
1	8	8	0	1	0	7	
2	1	1	0	1	0	0	
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	

Plantas únicamente positivas "Spot" RT-PCR a tiempo real							
Muestreo	Análisis 1	Análisis 2	No muestreadas	ELISA PCR (+)	ELISA (-) PCR (+)	ELISA PCR (-)	
1	31	30	1	15	3	12	
2	65	61	4	38	5	18	
Total	96	91	5	53	8	30	

<sup>a</sup> Muestro 1: Análisis 1 (octubre 2006); Análisis 2 (mayo 2007)

Muestro 2: Análisis 1 (mayo 2007); Análisis 2 (abril 2008)

<sup>b</sup> Plantas que no se pudieron muestrear por estar muertas o no disponer de material para recoger

<sup>c</sup> Plantas con resultado positivo mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real

<sup>d</sup> Plantas con resultado negativo mediante ELISA-DASI y positivo mediante “Spot” RT-PCR a tiempo real

<sup>e</sup> Plantas con resultado negativo mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real

Así, de nueve plantas discrepantes por ELISA-DASI con respecto a la técnica molecular, al analizarse al año siguiente, dos plantas resultaron positivas por ambas técnicas, por tanto, se consideran como verdaderos positivos. Sin embargo siete resultaron negativas por ambas técnicas considerándose como falsos positivos de la técnica serológica. Por el contrario, en el caso de “Spot” RT-PCR a tiempo real de 91 plantas discrepantes que se analizaron, 53 resultaron positivas por ambas técnicas, por tanto se considerarían como verdaderos positivos. Ocho únicamente fueron positivas mediante “Spot” RT-PCR a tiempo real y 30 fueron negativas por ambas técnicas, por tanto, estas últimas 38 plantas se considerarían como falsos positivos de la técnica molecular.

En la Tabla 6.8 se muestra la coincidencia entre las dos pruebas de diagnóstico medidas mediante el índice kappa de Cohen y los índices BAK y PABAK según el caso en las diferentes parcelas muestreadas y el porcentaje de coincidencia obtenido con todas las muestras analizadas durante esta Tesis Doctoral.

**Tabla 6.8: Medición de la coincidencia entre ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real**

	A1 <sup>a</sup>	A2	A3	A4	A5	AT
<b>Pr<sup>b</sup></b>	5,20%	34,83%	59,40%	0,61%	2,42%	19,16%
<b>C<sup>c</sup></b>	96,93%	90,77%	96,43%	99,92%	98,02%	96,16%
<b>K</b>	0,76 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,81 ± 0,03	0,93 ± 0,04	0,94 ± 0,03	0,70 ± 0,05	0,88 ± 0,01
<b>MN<sup>e</sup></b>	13,56; < 0,001 <sup>e</sup>	115,03; < 0,001	26,00; < 0,001	1,00; 0,3727	5,44; 0,019	156,06; < 0,001
<b>BAK</b>	-	0,81 ± 0,03 <sup>f</sup>	0,93 ± 0,04	-	-	-
<b>PABAK</b>	0,94 ± 0,03 <sup>g</sup>	-	-	1,00 ± 0,03	0,96 ± 0,05	0,92 ± 0,01

<sup>a</sup>Población a la que hace referencia (véase Tabla 6.6)

<sup>b</sup>Prevalencia estimada en la población: número de plantas con detección positiva de PPV coincidentes por ambas técnicas dividido por el número total de plantas analizadas

<sup>c</sup>Porcentaje de coincidencias entre las dos técnicas en la población: número de plantas con resultado coincidente en el diagnóstico (positivo y negativo) mediante ambas técnicas dividido por el número total de plantas analizadas

<sup>d</sup>Índice kappa de Cohen ± desviación típica

<sup>e</sup>Prueba de Mc Nemar; p-value (p-value < 0,05 indica diferencias significativas entre los valores marginales de la tabla de contingencia)

<sup>f</sup>Índice BAK ± desviación típica

<sup>g</sup>Índice PABAK ± desviación típica

Se puede observar que el porcentaje de coincidencia no bajó del 90% en ninguna de las poblaciones estudiadas, siendo la coincidencia total de 96,16%. El índice kappa de Cohen total de todos los análisis realizados es 0,88 ± 0,01 con un índice PABAK de 0,92 ± 0,01.

#### **6.4.2.2 Cálculo de la sensibilidad y especificidad de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en primavera**

La determinación de los parámetros de diagnóstico se realizó mediante dos métodos diferentes.

##### **6.4.2.2.1 Cálculo de la sensibilidad y la especificidad de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en primavera mediante análisis de las plantas con resultados analíticos discrepantes**

En la Tabla 6.9 se presentan los resultados obtenidos tras analizar 729 plantas de la parcela de Llíria en mayo de 2007.

**Tabla 6.9: Resultado del análisis de 729 plantas del vivero situado en la parcela de Llíria efectuado en mayo de 2007 mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real**

#### **Análisis Llíria mayo 2007 (A3)**

		<b>ELISA -DASI</b>	
		<b>+</b>	<b>-</b>
<b>“Spot” RT-PCR a tiempo real</b>	<b>+</b>	234	61
	<b>-</b>	1	433
		729	

En abril de 2008 esas mismas plantas se muestrearon y de esta forma se pudo conocer el estado sanitario real de las plantas con resultados discrepantes (Tabla 6.10).

**Tabla 6.10: Resultado del análisis de 62 plantas del vivero situado en la parcela de Llíria efectuado en abril de 2008 que resultaron discrepantes mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en mayo de 2007**

	Plantas	ELISA PCR <sup>b</sup> (+)	ELISA (-) PCR (+) <sup>c</sup>	ELISA PCR <sup>d</sup> (-)
Elisa (+) PCR (-) <sup>a</sup>	1	1	0	0
Elisa(-) PCR (+)	61	38	5	18

<sup>a</sup> Resultado obtenido en el análisis realizado en mayo 2007

<sup>b</sup> Plantas con resultado positivo mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en el análisis efectuado en abril 2008

<sup>c</sup> Plantas con resultado negativo mediante ELISA-DASI y positivo mediante “Spot” RT-PCR a tiempo real en el análisis efectuado en abril 2008

<sup>d</sup> Plantas con resultado negativo mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en el análisis efectuado en abril 2008

De las 61 plantas positivas únicamente por “Spot” RT-PCR a tiempo real, se consideraron como verdaderas positivas 38, el resto se consideraron falsos positivos. A su vez la única planta positiva únicamente por ELISA-DASI en mayo de 2007 se consideró como verdadera positiva. Así se construyeron las tablas de contingencia expuestas en la Tabla 6.11.

**Tabla 6.11: Tablas de contingencia para el cálculo de los parámetros de diagnóstico de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en condiciones de vivero mediante análisis de plantas discrepantes en primavera**

		Análisis abril 2008			
		Infectados	No infectados		
Análisis mayo 2007	+	Verdaderos Positivos	Falsos Positivos	Total plantas analizadas	
	-	Falsos Negativos	Verdaderos Negativos		
				729	

		ELISA-DASI Análisis abril 2008		"Spot" RT-PCR a tiempo real Análisis abril 2008	
		Infectados	No infectados	Infectados	No Infectados
Análisis mayo 2007	+	235	0	272	23
	-	38	456	1	433
		729		729	

Con estos resultados obtenemos los siguientes parámetros de diagnóstico para las dos técnicas de detección evaluadas (Tabla 6.12).

**Tabla 6.12: Estima de la sensibilidad y especificidad de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real determinados mediante análisis de plantas con resultados analíticos discrepantes**

	Sensibilidad	Especificidad
<b>ELISA-DASI<sup>a</sup></b>	0.861 (0.820-0.902) <sup>b</sup>	1.000
<b>“Spot” RT-PCR<sup>c</sup></b>	0.996 (0.989-1.000)	0.948 (0.929-0.970)

<sup>a</sup> ELISA-DASI

<sup>b</sup> Media (Intervalos de confianza (95%))

<sup>c</sup> “Spot” RT-PCR a tiempo real

En la Tabla 6.12 se puede observar que la técnica más sensible resultó ser “Spot” RT-PCR a tiempo real con una sensibilidad de 0,996 (0,989-1,000), frente a 0,8608 (0,8197-0,9019) de ELISA-DASI. Sin embargo la técnica más específica resultó ELISA-DASI, con una especificidad de 1,000 frente a 0,9483 (0,9295-0,9696) de “Spot” RT-PCR a tiempo real.

6.4.2.2.2 *Determinación de la sensibilidad y de la especificidad de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en primavera mediante modelos latentes*

Para el análisis mediante modelo latentes se emplearon los resultados obtenidos en muestreos producidos en primavera. Por tanto las poblaciones incluidas en este estudio fueron las expuestas en la Tabla 6.13.

**Tabla 6.13: Poblaciones utilizadas para el cálculo de la sensibilidad y la especificidad de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR mediante métodos latentes**

Parcela situada en Lliria muestreada en mayo 2007 (P <sub>1</sub> )	Parcela situada en Lliria muestreada en abril 2008 (P <sub>2</sub> )
<b>ELISA -DASI</b>	<b>ELISA -DASI</b>
+      -	+      -
“Spot” RT-PCR a tiempo real	“Spot” RT-PCR a tiempo real
+      449    118	+      433    26
-      1      721	-      0      270
1.289	729
Nueva parcela situada en Lliria muestreada en abril 2008 (P <sub>3</sub> )	
<b>ELISA -DASI</b>	
+      -	
“Spot” RT-PCR a tiempo real	+      11    8
-      1      435	-      1      435
455	

Los resultados obtenidos aplicando los diferentes modelos latentes se pueden observar en la Tabla 6.14.

**Tabla 6.14: Estima de la sensibilidad y especificidad de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real mediante modelos latentes**

	Modelo 1 <sup>a</sup>	Modelo 2 <sup>b</sup>	Modelo 3 <sup>c</sup>	Modelo 4 <sup>d</sup>	Modelo 5 <sup>e</sup>	Modelo 6 <sup>f</sup>	Modelo 7 <sup>g</sup>
<b>DIC</b>	121,45	121,45	96,63	121,41	120,75	94,96	96,93
<b>Se<sub>1</sub></b>	0,894 (0,861-0,952) <sup>h</sup>	0,889 (0,861-0,917) <sup>1</sup>	0,908 (0,871-0,952) <sup>1</sup>	0,884 (0,856-0,915) <sup>1</sup>	0,891 (0,864-0,919) <sup>1</sup>	0,876 (0,832-0,912) <sup>1</sup>	0,847 (0,807-0,890) <sup>1</sup>
<b>Sp<sub>1</sub></b>	0,999 (0,997-1,000)	0,999 (0,996-0,999)	0,998 (0,995-1,000)	0,999 (0,996-1,000)	0,998 (0,993-0,999)	0,992 (0,971-1,000)	0,987 (0,967-0,998)
<b>Se<sub>2</sub></b>	1,000 (1,000-1,000)	0,982 (0,973-0,988)	0,999 (0,995-1,000)	0,975 (0,967-0,982)	0,981 (0,971-0,988)	0,971 (0,915-0,997)	0,939 (0,911-0,962)
<b>Sp<sub>2</sub></b>	0,968 (0,933-0,990)	0,969 (0,948-0,985)	0,958 (0,928-0,981)	0,968 (0,946-0,985)	0,965 (0,943-0,984)	0,951 (0,919-0,976)	0,950 (0,918-0,976)
<b>Pr<sub>1</sub></b>	0,413 (0,361-0,450)	0,405 (0,375-0,433)	0,394 (0,361-0,427)	0,406 (0,376-0,435)	0,403 (0,373-0,432)	0,402 (0,369-0,436)	0,413 (0,376-0,448)
<b>Pr<sub>2</sub></b>	0,624 (0,590-0,659)	0,622 (0,587-0,655)	0,618 (0,583-0,652)	0,625 (0,590-0,659)	0,621 (0,587-0,655)	0,633 (0,592-0,679)	0,650 (0,610-0,690)
<b>Pr<sub>3</sub></b>	0,026 (0,012-0,041)	0,027 (0,015-0,045)	0,026 (0,014-0,043)	0,027 (0,015-0,045)	0,026 (0,013-0,044)	0,020 (0,004-0,040)	0,017 (0,003-0,038)
<b>rhoD</b>			0,111 (0,053-0,179)	0,024 (-0,005-0,066)	0,438 (0,072-0,717)	0,584 (0,464-0,714)	
<b>rhoDc</b>			0,001 (-0,007-0,023)	0,115 (0,004-0,312)	0,330 (0,015-0,640)	0,431 (0,054-0,691)	

(DIC: Deviance information criterion; Se<sub>1</sub>: Sensibilidad de ELISA-DASI; Sp<sub>1</sub>: Especificidad de ELISA-DASI; Se<sub>2</sub>: Sensibilidad de “Spot” RT-PCR a tiempo real; Sp<sub>2</sub>: Especificidad de “Spot” RT-PCR a tiempo real; Pr<sub>1</sub>: Prevalencia población n°1; Pr<sub>2</sub>: Prevalencia población n°2; Pr<sub>3</sub>: Prevalencia población n°3; rhoD: Correlación entre resultados positivos (Sensibilidad); rhoDc: Correlación entre resultados negativos (Especificidad))

<sup>a</sup> Modelo 1: basado en razones de máxima verosimilitud (Hui y Walter, 1980)

<sup>b</sup> Modelo 2: modelo bayesiano asumiendo independencia condicional entre pruebas, con las siguientes distribuciones previas: Se<sub>1</sub> (β (108,41; 18,49)), Sp<sub>1</sub> (β (34,17; 1,34)), Se<sub>2</sub> (β (262,96; 20,72)), Sp<sub>2</sub> (β (42,11; 1,84)), Pr<sub>1</sub> (β (79,55; 146,88)), Pr<sub>2</sub> (β (50,69; 35,53)), Pr<sub>3</sub> (β (1,84; 42,11))

<sup>c</sup> Modelo 3: modelo bayesiano asumiendo independencia condicional entre pruebas, no asumiendo ninguna distribución previa (β (1,1)) para Se<sub>1</sub>, Sp<sub>1</sub>, Se<sub>2</sub> y Sp<sub>2</sub>. En el resto de parámetros mismas distribuciones previas que en Modelo 2

<sup>d</sup> Modelo 4: modelo bayesiano asumiendo dependencia condicional entre pruebas, asumiendo mismas distribuciones previas que en Modelo 2. Pruebas 1 (ELISA-DASI), Pruebas 2 (“Spot” RT-PCR)

<sup>e</sup> Modelo 5: modelo bayesiano asumiendo dependencia condicional entre pruebas, asumiendo mismas distribuciones previas que en Modelo 2. Pruebas 1 (“Spot” RT-PCR), Pruebas 2 (ELISA-DASI)

<sup>f</sup> Modelo 6: modelo bayesiano asumiendo dependencia condicional entre pruebas, no asumiendo ninguna distribución previa para Se<sub>2</sub> y Sp<sub>2</sub>. En el resto de parámetros mismas distribuciones previas que en Modelo 2. Pruebas 1 (ELISA-DASI), Pruebas 2 (“Spot” RT-PCR)

<sup>g</sup> Modelo 7: modelo bayesiano asumiendo dependencia condicional entre pruebas, no asumiendo ninguna distribución previa para Se<sub>1</sub> y Sp<sub>1</sub>. En el resto de parámetros mismas distribuciones previas que en Modelo 2. Pruebas 1 (“Spot” RT-PCR), Pruebas 2 (ELISA-DASI)

<sup>h</sup> Valor estimado mediante razones de máxima verosimilitud e intervalos de confianza bootstrap

<sup>i</sup> Mediana e intervalo de probabilidad (95%) estimado mediante métodos bayesianos

No hubo grandes diferencias entre los valores estimados de sensibilidad y especificidad de ambas técnicas empleando los diferentes modelos. Únicamente se observa que aplicando el Modelo 7, la estimación de la sensibilidad en ambas pruebas de diagnóstico fue menor que con los otros modelos.

El programa TAGS (Modelo 1) tiene la cualidad de poder indicar si las dos asunciones que asumen las razones de verosimilitud de Hui y Walter (1980) (independencia entre los test y sensibilidad y especificidad entre las poblaciones son constantes) se cumplen. Para ello se aplica un test  $\chi^2$  de la Deviance (Pouillot et al., 2002). En nuestro caso el test fue significativo, por tanto alguna de las dos asunciones puede no estar justificada.

Así, en la Tabla 6.15 se exponen los resultados al analizar las tres poblaciones independientemente. Se empleó un modelo asumiendo independencia condicional entre las pruebas y asumiendo distribuciones previas (mismas aplicadas en el Modelo 2).

**Tabla 6.15: Estima de la sensibilidad y especificidad de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en cada una de las tres poblaciones mediante métodos bayesianos**

	$P_1^a$	$P_2^b$	$P_3^c$
$Se_1^d$	0,858 (0,807-0,907) <sup>h</sup>	0,928 (0,903-0,950)	0,856 (0,789-0,910)
$Sp_1^e$	0,999 (0,994-1,000)	0,997 (0,986-1,000)	0,997 (0,998-1,000)
$Se_2^f$	0,971 (0,957-0,982)	0,971 (0,957-0,982)	0,930 (0,897-0,955)
$Sp_2^g$	0,942 (0,902-0,982)	0,987 (0,960-0,998)	0,984 (0,970-0,994)

<sup>a</sup>Población 1: Parcela situada en Lliria muestreada en abril de 2007

<sup>b</sup>Población 2: Parcela situada en Lliria muestreada en mayo de 2008

<sup>c</sup>Población 3: Nueva parcela situada en Lliria muestreada en abril de 2008

<sup>d</sup>Sensibilidad de ELISA-DASI

<sup>e</sup>Especificidad de ELISA-DASI

<sup>f</sup>Sensibilidad de “Spot” RT-PCR a tiempo real

<sup>g</sup>Especificidad de “Spot” RT-PCR a tiempo real

<sup>h</sup>Mediana e intervalo de probabilidad (95%) estimado mediante métodos bayesianos

Se puede observar en la Tabla 6.15 que la variación en la sensibilidad y en la especificidad de las dos técnicas comparadas en las tres poblaciones por separado varió de 0,00 a 0,07. Debido a esta baja variación se puede admitir que la sensibilidad y la especificidad permanecieron constantes en las tres poblaciones estudiadas.

Las dos pruebas evaluadas han resultado ser condicionalmente dependientes, ya que se puede observar en los modelos 6 y 7 (Tabla 6.14) que el intervalo de probabilidad (95%) de la correlación tanto de los resultados positivos ( $\rho_D$ ) como de los resultados negativos ( $\rho_{Dc}$ ) no incluye el valor 0. Por tanto, existió correlación y se acepta la hipótesis de dependencia condicional entre pruebas de Gardner et al. (2000).

Sin embargo, se puede observar en la Tabla 6.15 que no hubo diferencias en el ajuste entre los modelos bayesianos, que asumen independencia condicional o dependencia condicional entre las pruebas, puesto que ambos tipos de modelos se ajustan de la misma forma a los datos puesto que sus valores DIC son prácticamente iguales (Modelo 2,4 y 5 con distribuciones previas y modelos 3,6 y 7 sin distribuciones previas).

De la misma forma se puede observar que los modelos bayesianos que mejor se ajustan a los datos son aquellos que no asumen distribuciones previas en todos sus parámetros (Modelos 3,6 y 7), puesto que sus valores DIC son menores.

#### ***6.4.2.3 Cálculo de las razones de verosimilitud y de las probabilidades post-test de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real***

En la Tabla 6.16 se pueden observar las diferentes razones de verosimilitud calculadas mediante los diferentes métodos utilizados en esta Tesis Doctoral (análisis de las plantas con resultados diagnósticos discrepantes y modelos latentes), obtenidas tanto al aplicar una sola prueba de diagnóstico como dos. Aunque las dos pruebas de diagnóstico han resultado ser condicionalmente dependientes para este estudio en el caso de modelos latentes se utilizaron los modelos 3, 6, 7 (véase Tabla 6.14), puesto que fueron aquellos con un menor valor DIC.

**Tabla 6.16: Razones de verosimilitud obtenidas mediante análisis de plantas discrepantes y modelos latentes bayesianos para ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real**

	Plantas con diagnósticos discrepantes <sup>a</sup>	Modelo 3 <sup>b</sup>	Modelo 6 <sup>c</sup>	Modelo 7 <sup>d</sup>
<b>LR<sub>1</sub>+</b>	∞	567,90 (189,40-3.937) <sup>f</sup>	103,90 (30,23-911) <sup>f</sup>	65,37 (25,82-425,10) <sup>f</sup>
<b>LR<sub>1</sub>-</b>	0,139 (0,104-0,187) <sup>e</sup>	0,092 (0,048-0,129)	0,125 (0,089-0,170)	0,156 (0,111-0,197)
<b>LR<sub>2</sub>+</b>	19,28 (12,95-28,7)	23,78 (13,83-53,63)	19,83 (11,61-41,40)	18,83 (11,42-39,44)
<b>LR<sub>2</sub>-</b>	0,004 (0,000-0,027)	0,001 (0,000-0,006)	0,030 (0,003-0,090)	0,064 (0,040-0,094)
<b>LR++</b>	∞	14.130 (3.947-107.900)	2.173 (409-24.430)	339,60 (11,65-1.276)
<b>LR+-</b>	∞	0,66 (0,02-10,27)	3,06 (0,23-35,07)	4,190 (1,53-27,19)
<b>LR-+</b>	2,68 (1,34-5,37)	2,20 (0,687-6,56)	2,48 (1,26-5,76)	2,94 (1,41-6,90)
<b>LR--</b>	0,001 (0,000-0,005)	0,000 (0,000-0,001)	0,004 (0,000-0,014)	0,001 (0,005-0,017)

(LR<sub>1</sub>+: Razón de verosimilitud positiva para ELISA-DASI; LR<sub>1</sub>- : Razón de verosimilitud negativa para ELISA-DASI; LR<sub>2</sub>+: Razón de verosimilitud positiva para “Spot” RT-PCR a tiempo real; LR<sub>2</sub>-: Razón de verosimilitud negativa para “Spot” RT-PCR a tiempo real ; LR++: Razón de verosimilitud de un planta con resultado positivo mediante ambas técnicas; LR+-: Razón de verosimilitud de una planta con resultado positivo mediante ELISA-DASI y negativo mediante “Spot” RT-PCR a tiempo real; LR-+: Razón de verosimilitud de una planta con resultado negativo mediante ELISA-DASI y positivo mediante “Spot” RT-PCR a tiempo real; LR--: Razón de verosimilitud de un planta con resultado negativo mediante ambas técnicas)

<sup>a</sup> Análisis mediante plantas con diagnósticos discrepantes

<sup>b</sup> Análisis mediante Modelo 3 (véase Tabla 6.14)

<sup>c</sup> Análisis mediante Modelo 6 (véase Tabla 6.14)

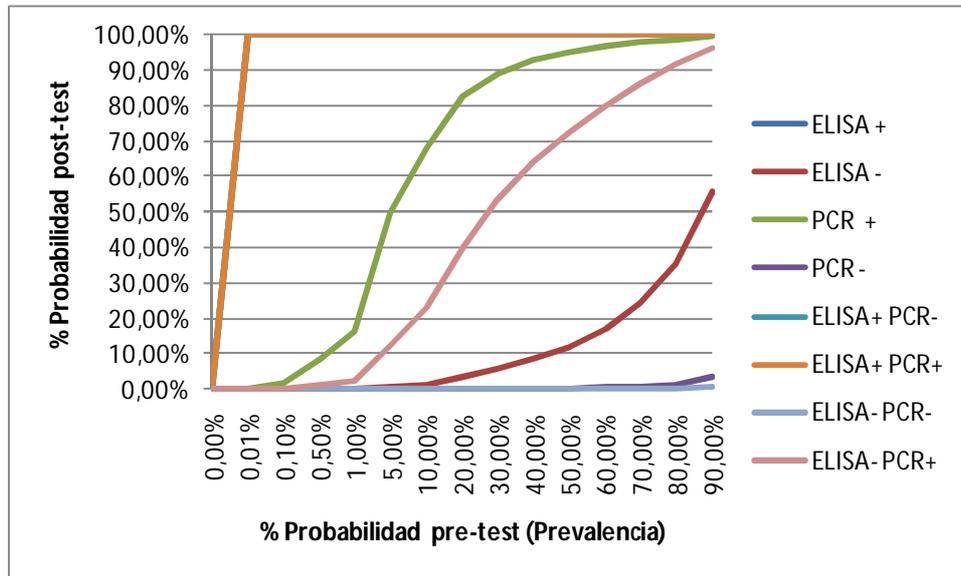
<sup>d</sup> Análisis mediante Modelo 7 (véase Tabla 6.14)

<sup>e</sup> Razón de verosimilitud e intervalo de confianza (95%)

<sup>f</sup> Mediana e intervalo de probabilidad (95%) estimado mediante métodos bayesianos

Una vez obtenidas las razones de verosimilitud se puede estimar la probabilidad post-test de que una planta esté infectada por PPV según el resultado del test y en función de la prevalencia de la enfermedad (probabilidad pre-test). La representación gráfica se muestra en la Figuras 6.2, 6.3, 6.4, 6.5.

**Figura 6.2: Probabilidad post-test de infección por PPV de una planta en función de la prevalencia de la enfermedad utilizando razones de verosimilitud estimadas mediante análisis de plantas con resultados diagnósticos discrepantes. Representación gráfica**



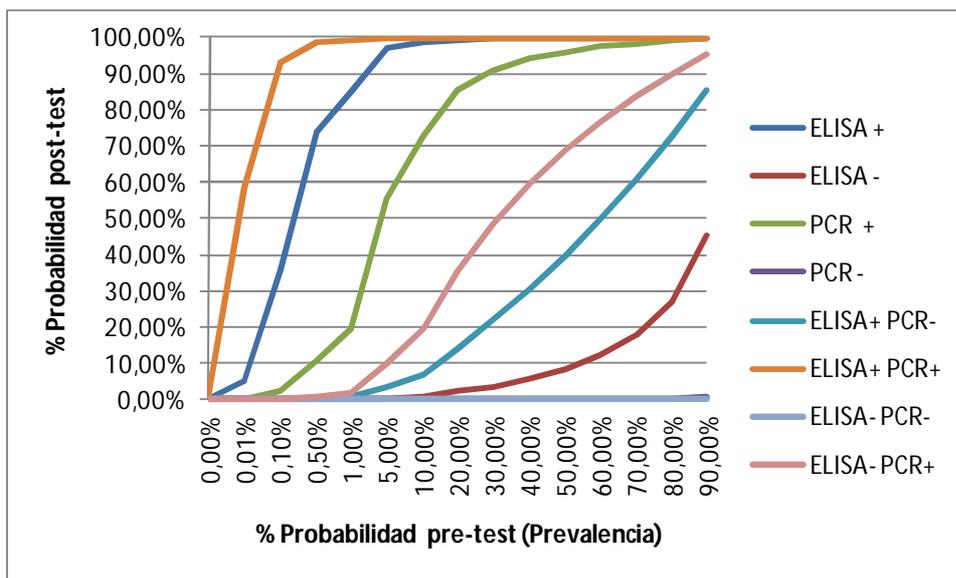
Probabilidad de infección por PPV										
Prevalencia	0,01%	0,10%	0,50%	1,00%	5,00%	10,00%	20,00%	30,00%	60,00%	90,00%
<b>ELISA<sup>a</sup> +<sup>b</sup></b>	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
<b>ELISA -</b>	0,00%	0,01%	0,07%	0,14%	0,73%	1,52%	3,36%	5,63%	17,27%	55,61%
<b>PCR<sup>c</sup> +</b>	0,19%	1,89%	8,83%	16,30%	50,37%	68,18%	82,82%	89,20%	96,66%	99,43%
<b>PCR -</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,04%	0,10%	0,17%	0,58%	3,39%
<b>ELISA+ PCR-</b>	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
<b>ELISA+ PCR+</b>	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
<b>ELISA- PCR-</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,02%	0,08%	0,49%
<b>ELISA- PCR+</b>	0,03%	0,27%	1,33%	2,64%	12,38%	22,97%	40,15%	53,49%	80,10%	96,02%

<sup>a</sup>ELISA-DASI

<sup>b</sup>Resultado de la prueba

<sup>c</sup>“Spot” RT-PCR a tiempo real

**Figura 6.3: Probabilidad post-test de infección por PPV de una planta en función de la prevalencia de la enfermedad utilizando razones de verosimilitud estimadas mediante modelos bayesianos (Modelo 3). Representación gráfica**



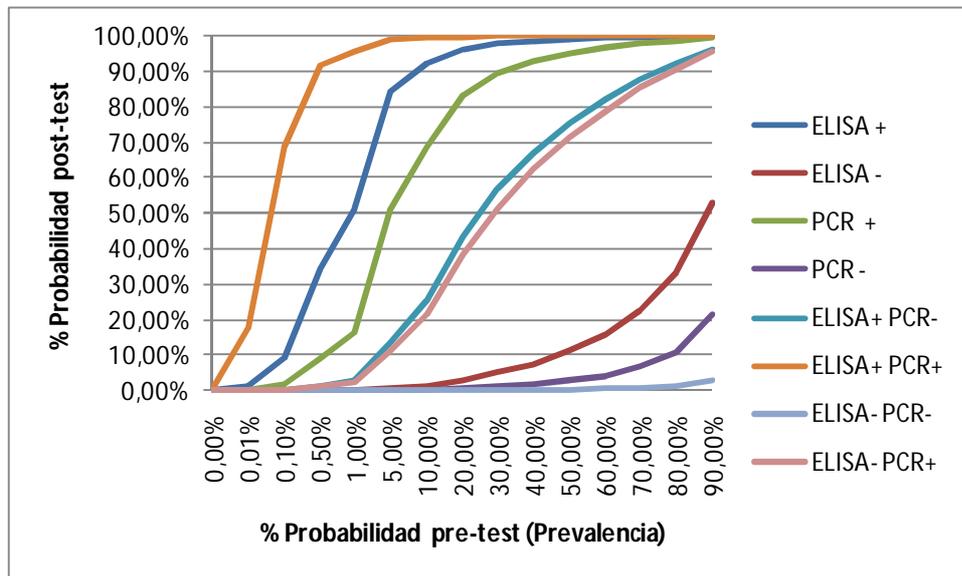
Probabilidad de infección por PPV										
Prevalencia	0,01%	0,10%	0,50%	1,00%	5,00%	10,00%	20,00%	30,00%	60,00%	90,00%
<b>ELISA<sup>a</sup> +<sup>b</sup></b>	5,37%	36,24%	74,05%	85,16%	96,76%	98,44%	99,30%	99,59%	99,88%	99,98%
<b>ELISA -</b>	0,00%	0,01%	0,05%	0,09%	0,48%	1,01%	2,25%	3,80%	12,15%	45,34%
<b>PCR<sup>c</sup> +</b>	0,24%	2,33%	10,67%	19,37%	55,59%	72,54%	85,60%	91,06%	97,27%	99,53%
<b>PCR -</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,03%	0,05%	0,18%	1,07%
<b>ELISA+ PCR-</b>	0,01%	0,07%	0,33%	0,66%	3,36%	6,84%	14,18%	22,08%	49,79%	85,61%
<b>ELISA+ PCR+</b>	58,56%	93,40%	98,61%	99,30%	99,87%	99,94%	99,97%	99,98%	100,00%	100,00%
<b>ELISA- PCR-</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,09%
<b>ELISA- PCR+</b>	0,02%	0,22%	1,09%	2,17%	10,36%	19,62%	35,45%	48,50%	76,72%	95,19%

<sup>a</sup>ELISA-DASI

<sup>b</sup>Resultado de la prueba

<sup>c</sup>“Spot” RT-PCR a tiempo real

**Figura 6.4: Probabilidad post-test de infección por PPV de una planta en función de la prevalencia de la enfermedad utilizando razones de verosimilitud estimadas mediante modelos bayesianos (Modelo 6). Representación gráfica**



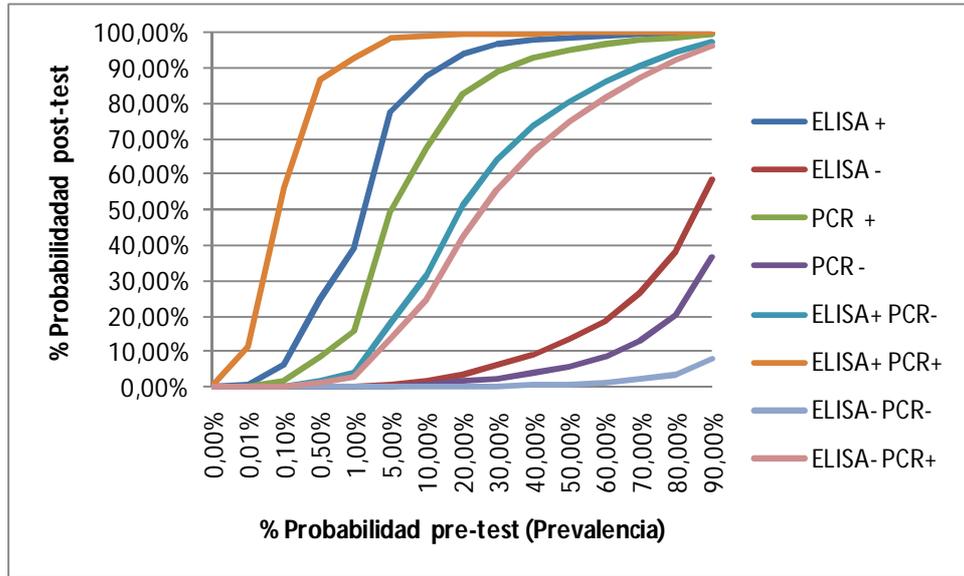
Probabilidad de infección por PPV										
Prevalencia	0,01%	0,10%	0,50%	1,00%	5,00%	10,00%	20,00%	30,00%	60,00%	90,00%
<b>ELISA<sup>a</sup> +<sup>b</sup></b>	1,03%	9,42%	34,30%	51,21%	84,54%	92,03%	96,29%	97,80%	99,36%	99,89%
<b>ELISA -</b>	0,00%	0,01%	0,06%	0,13%	0,65%	1,37%	3,04%	5,09%	15,81%	52,98%
<b>PCR<sup>c</sup> +</b>	0,20%	1,95%	9,06%	16,69%	51,07%	68,78%	83,21%	89,47%	96,75%	99,44%
<b>PCR -</b>	0,00%	0,00%	0,02%	0,03%	0,16%	0,34%	0,76%	1,29%	4,37%	21,53%
<b>ELISA+ PCR-</b>	0,03%	0,30%	1,51%	2,99%	13,85%	25,34%	43,30%	56,70%	82,09%	96,49%
<b>ELISA+ PCR+</b>	17,85%	68,51%	91,61%	95,64%	99,13%	99,59%	99,82%	99,89%	99,97%	99,99%
<b>ELISA- PCR-</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,04%	0,09%	0,16%	0,56%	3,25%
<b>ELISA- PCR+</b>	0,02%	0,25%	1,23%	2,45%	11,56%	21,63%	38,31%	51,56%	78,84%	95,72%

<sup>a</sup>ELISA-DASI

<sup>b</sup>Resultado de la prueba

<sup>c</sup>“Spot” RT-PCR a tiempo real

**Figura 6.5: Probabilidad post-test de infección por PPV de una planta en función de la prevalencia de la enfermedad utilizando razones de verosimilitud estimadas mediante modelos bayesianos (Modelo 7). Representación gráfica**



Probabilidad de infección por PPV										
Prevalencia	0,01%	0,10%	0,50%	1,00%	5,00%	10,00%	20,00%	30,00%	60,00%	90,00%
<b>ELISA<sup>a</sup> +<sup>b</sup></b>	0,65%	6,14%	24,73%	39,77%	77,48%	87,90%	94,23%	96,55%	98,99%	99,83%
<b>ELISA -</b>	0,00%	0,02%	0,08%	0,16%	0,81%	1,70%	3,74%	6,25%	18,92%	58,34%
<b>PCR<sup>c</sup> +</b>	0,19%	1,85%	8,64%	15,98%	49,78%	67,66%	82,48%	88,97%	96,58%	99,41%
<b>PCR -</b>	0,00%	0,01%	0,03%	0,06%	0,34%	0,70%	1,57%	2,66%	8,74%	36,50%
<b>ELISA+ PCR-</b>	0,04%	0,42%	2,06%	4,06%	18,06%	31,76%	51,15%	64,23%	86,27%	97,42%
<b>ELISA+ PCR+</b>	11,32%	56,09%	86,51%	92,80%	98,53%	99,30%	99,69%	99,82%	99,95%	99,99%
<b>ELISA- PCR-</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,05%	0,11%	0,25%	0,42%	1,45%	8,13%
<b>ELISA- PCR+</b>	0,03%	0,29%	1,46%	2,89%	13,41%	24,64%	42,38%	55,77%	81,53%	96,36%

<sup>a</sup>ELISA-DASI

<sup>b</sup>Resultado de la prueba

<sup>c</sup>“Spot” RT-PCR a tiempo real



**Tabla 6.18: Medición de la coincidencia entre Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real**

	<b>Tulare<sup>a</sup></b>	<b>Moncada</b>	<b>Total</b>
<b>Pr<sup>b</sup></b>	42,69%	46,20%	44,54%
<b>C<sup>c</sup></b>	95,07%	81,00%	87,64%
<b>k</b>	0,90 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,63 ± 0,04	0,76 ± 0,03
<b>MN</b>	7,76; < 0,001 <sup>e</sup>	95,05; < 0,001	99,84; < 0,001
<b>BAK</b>	0,90 ± 0,04 <sup>f</sup>	0,62 ± 0,04	0,75 ± 0,03

<sup>a</sup>Población a la que hace referencia (Tulare, California, EEUU; Moncada, Valencia, España)

<sup>b</sup>Prevalencia estimada en la población: número de plantas con detección positiva de PPV coincidentes por ambas técnicas dividido por el número total de plantas analizadas

<sup>c</sup>Porcentaje de coincidencias entre las dos técnicas en la población: número de plantas con resultado coincidente en el diagnóstico (positivo y negativo) mediante ambas técnicas dividido por el número total de plantas analizadas

<sup>d</sup>Índice kappa de Cohen ± desviación típica

<sup>e</sup>Prueba de Mc Nemar; p-value (p-value < 0,05 indica diferencias significativas entre los valores marginales de la tabla de contingencia)

<sup>f</sup>Índice BAK ± desviación típica

La coincidencia entre todos los análisis realizados fue de un 87,64%, con un índice de kappa de Cohen de 0,76 y un índice BAK de 0,75, lo que nos indica una coincidencia substancial entre la técnica Inmunoimpresión-ELISA, técnica valida (OEPP/EPPO, 2004a) y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real. Ello indica la idoneidad de la técnica molecular ensayada.

**6.4.3.2 Resultados obtenidos mediante injerto en lima mejicana de material de las parcelas situadas en Tulare (EEUU)**

Los resultados obtenidos al injertar sobre lima mejicana material procedente de árboles de la parcela de Tulare en junio de 2008 se pueden observar en la Tabla 6.19.

**Tabla 6.19: Resultados de las pruebas biológicas en lima mejicana (parcela de Tulare (EEUU) en Junio de 2008**

Material <sup>a</sup>	Nº Árboles	Resultado sobre lima	
		Positivo	Negativo
IP-ELISA <sup>b</sup> (+) “TP” RT-PCR <sup>c</sup> (+)	4	4	0
IP-ELISA (-) “TP” RT-PCR (-)	4	0	4
IP-ELISA (+) “TP” RT-PCR (-)	7	7	0
IP-ELISA (-) “TP” RT-PCR (+)	12	2	10
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>13</b>	<b>14</b>

<sup>a</sup>Resultados obtenidos al analizar los árboles mediante Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real en junio 2008

<sup>b</sup>Inmunoimpresión-ELISA

<sup>c</sup>“Tissue-print” RT-PCR a tiempo real

Como se puede deducir de los resultados de la Tabla 6.19, de los 12 árboles que resultaron únicamente positivos por “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real en junio de 2008, dos de ellos resultaron positivos al test biológico mediante lima mejicana. De los 7 árboles que resultaron únicamente positivos por Inmunoimpresión-ELISA los 7 resultaron positivos al biológico. Los ocho árboles coincidentes por ambos métodos en el análisis de junio de 2008 coincidieron también en el resultado mediante el test en lima mejicana. Por tanto, tomando como referencia el protocolo OEPP/EPPO (2004a), Inmunoimpresión-ELISA proporcionó dos falsos negativos, mientras que “Tissue-print” RT-PCR proporcionó siete falsos positivos.

**6.4.3.3 Determinación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas Inmunoimpresión-ELISA y "Tissue-print" RT-PCR en condiciones de vivero**

En la Tabla 6.20 se pueden observar los resultados obtenidos al analizar en diciembre de 2008 la parcela situada en las instalaciones del IVIA en Moncada (Capítulo 3, apartado 3.1.3).

**Tabla 6.20 Resultados al analizar la parcela situada en el IVIA (Moncada) en diciembre de 2008**

		Inmunoimpresión-ELISA	
		+	-
"Tissue-print" RT-PCR a tiempo real	+	304	117
	-	8	229
			658

Al analizar de nuevo las 125 plantas discrepantes en julio de 2009 mediante Inmunoimpresión-ELISA, "Tissue-print" RT-PCR a tiempo real y test biológico mediante lima mejicana se obtuvieron los resultados expuestos en las Tablas 6.21 y 6.22.

**Tabla 6.21: Resultados obtenidos en julio de 2009 al reanalizar 8 plantas sólo positivas por Inmunoimpresión-ELISA en diciembre de 2008**

IP-ELISA <sup>a</sup>	"TP"RT-PCR <sup>b</sup>	Lima mejicana <sup>c</sup>	Nº plantas
(+)	(+)	(+)	7
(-)	(-)	(-)	1
<b>Total</b>			<b>8</b>

<sup>a</sup> Inmunoimpresión-ELISA

<sup>b</sup> "Tissue-print" RT-PCR a tiempo real

<sup>c</sup> Test biológico en lima mejicana evaluado 4 meses después de la inoculación mediante visualización de síntomas e Inmunoimpresión-ELISA

**Tabla 6.22: Resultados obtenidos en julio de 2009 al reanalizar 117 plantas sólo positivas por “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real en diciembre de 2008**

IP-ELISA <sup>a</sup>	“TP” RT-PCR <sup>b</sup>	Lima mejicana <sup>c</sup>	Nº plantas
(+)	(+)	(+)	72
(+)	(+)	(-)	3
(+)	(-)	(+)	2
(+)	(-)	(-)	2
(-)	(+)	(-)	4
(-)	(-)	(-)	34
<b>Total</b>			<b>117</b>

<sup>a</sup> *Inmunoimpresión-ELISA*

<sup>b</sup> *“Tissue-print” RT-PCR a tiempo real*

<sup>c</sup> *Test biológico en lima mejicana evaluado 4 meses después de la inoculación mediante visualización de síntomas e Inmunoimpresión-ELISA*

De las 8 plantas únicamente positivas por Inmunoimpresión-ELISA en diciembre de 2008, resultaron verdaderas positivas 7 (Tabla 6.21). De las 117 plantas únicamente positivas mediante “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real en diciembre de 2008, resultaron verdaderas positivas 77, ya que resultaron positivas al menos por dos técnicas de las utilizadas (Tabla 6.22). Posteriormente, se construyeron las tablas de contingencia que se pueden observar en la Tabla 6.23 para determinar la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas.

**Tabla 6.23: Tablas de contingencia para el cálculo de los parámetros de diagnóstico de Inmunoimpresión-ELISA y "Tissue-print" RT-PCR a tiempo real en condiciones de vivero**

		Análisis julio 2009			
		Infectados	No infectados		
Análisis diciembre 2008	+	Verdaderos Positivos	Falsos Positivos	Total plantas Analizadas	
	-	Falsos Negativos	Verdaderos Negativos		
Inmunoimpresión-ELISA		Análisis julio 2009		"Tissue-print" RT-PCR a tiempo real	
		Análisis julio 2009		Análisis julio 2009	
		Infectados	No infectados	Infectados	No infectados
Análisis diciembre 2008	+	311	1	381	40
	-	77	269	7	230
		658		658	

Con estos resultados obtenemos los siguientes parámetros de diagnóstico para las dos técnicas de detección evaluadas (Tabla 6.24).

**Tabla 6.24: Estima de la sensibilidad y de la especificidad de Inmunoimpresión-ELISA y "Tissue-print" RT-PCR a tiempo real**

	Sensibilidad	Especificidad
IP-ELISA <sup>a</sup>	0,802 (0,762-0,842) <sup>b</sup>	0,996 (0,989-1,000)
"TP" RT-PCR <sup>c</sup>	0,982 (0,969-0,995)	0,852 (0,810-0,894)

<sup>a</sup>Inmunoimpresión-ELISA

<sup>b</sup>Media e intervalos de confianza (95%)

<sup>c</sup>"Tissue-print" RT-PCR a tiempo real

**6.4.3.4 Cálculo de las razones de verosimilitud y de las probabilidades post-test de Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real**

En la Tabla 6.25 se pueden observar las diferentes razones de verosimilitud calculadas para Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real tanto al aplicar una sola prueba de diagnóstico como dos.

**Tabla 6.25: Razones de verosimilitud obtenidas para Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real**

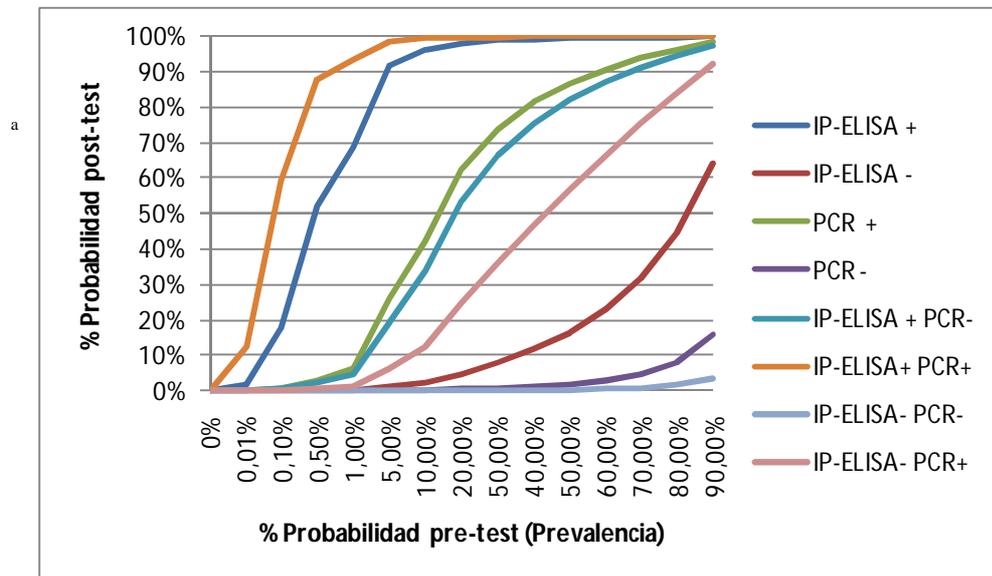
<b>LR<sub>1</sub>+</b>	216,42 (30,58-1.521) <sup>a</sup>
<b>LR<sub>1</sub>-</b>	0,199 (0,163-0,243)
<b>LR<sub>2</sub>+</b>	6,63 (4,98-8,83)
<b>LR<sub>2</sub>-</b>	0,021 (0,010-0,044)
<b>LR++</b>	1.434 (152,29-13.437)
<b>LR+ -</b>	4,59 (0,31-67,26)
<b>LR- +</b>	1,32 (0,81-2,14)
<b>LR- -</b>	0,004 (0,002-0,011)

(LR<sub>1</sub>+: Razón de verosimilitud positiva para Inmunoimpresión-ELISA; LR<sub>1</sub>- : Razón de verosimilitud negativa para Inmunoimpresión-ELISA; LR<sub>2</sub>+: Razón de verosimilitud positiva para “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real; LR<sub>2</sub>-: Razón de verosimilitud negativa para “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real ; LR++: Razón de verosimilitud de un planta con resultado positivo mediante ambas técnicas; LR+-: Razón de verosimilitud de una planta con resultado positivo mediante Inmunoimpresión-ELISA y negativo mediante “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real; LR-+: Razón de verosimilitud de una planta con resultado negativo mediante Inmunoimpresión-ELISA y positivo mediante “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real; LR--: Razón de verosimilitud de un planta con resultado negativo mediante ambas técnicas)

<sup>a</sup>Razón de verosimilitud e intervalo de confianza (95%)

Con las razones de verosimilitud estimadas se pueden calcular las probabilidades post-test de que una planta esté infectada por CTV según la prevalencia. Esto se puede observar en la Figura 6.6.

**Figura 6.6: Probabilidad post-test de infección por CTV de una planta en función de la prevalencia de la enfermedad. Representación gráfica**



Probabilidad de infección por CTV										
Prevalencia	0,01%	0,10%	0,50%	1,00%	5,00%	10,00%	20,00%	30,00%	60,00%	90,00%
<b>IP-ELISA<sup>a</sup> +<sup>b</sup></b>	2,12%	17,81%	52,10%	68,61%	91,93%	96,01%	98,10%	98,93%	99,69%	99,95%
<b>IP-ELISA -</b>	0,00%	0,02%	0,10%	0,20%	1,04%	2,17%	4,74%	7,87%	23,01%	64,19%
<b>PCR<sup>c</sup> +</b>	0,07%	0,66%	3,22%	6,28%	25,87%	42,42%	62,37%	73,97%	90,86%	98,35%
<b>PCR -</b>	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	0,11%	0,24%	0,53%	0,90%	3,08%	16,02%
<b>IP-ELISA + PCR-</b>	0,05%	0,46%	2,25%	4,43%	19,45%	33,77%	53,42%	66,29%	87,31%	97,64%
<b>IP-ELISA+ PCR+</b>	12,55%	58,95%	87,82%	93,55%	98,69%	99,38%	99,72%	99,84%	99,95%	99,99%
<b>IP-ELISA- PCR-</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,04%	0,10%	0,17%	0,60%	3,47%
<b>IP-ELISA- PCR+</b>	0,01%	0,13%	0,66%	1,32%	6,50%	12,79%	24,81%	36,13%	66,44%	92,24%

<sup>a</sup> Inmunoimpresión-ELISA

<sup>b</sup> Resultado de la prueba

<sup>c</sup> “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real

## 6.5 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que la precisión de la técnica “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV no varían a lo largo del año, al menos al mezclar diez plantas en la misma muestra. Sin embargo, sí que se observaron diferencias significativas en la precisión de la técnica entre los patrones estudiados (Mariana GF8-1 y Nemaguard).

Es conocido que las infecciones producidas por PPV se distribuyen por el árbol de forma irregular (Hadidi y Candresse, 2001). Por ello, el mayor número de grupos positivos detectados compuestos por mezcla de hojas positivas y negativas procedentes del patrón Mariana GF8-1 mediante “Spot” RT-PCR puede ser debido a la mejor distribución del virus en este patrón. Este hecho podría estar también relacionado con la mayor susceptibilidad del patrón Mariana GF8-1 frente a PPV ya descrita en el Capítulo 4.

Sin embargo, con la técnica de detección ELISA-DASI se observaron diferencias significativas en el número de grupos detectados según la época del año en las que se realizó el muestreo. Así, las épocas más favorables para el análisis resultaron ser primavera y verano con un 65% y un 73,3% de los grupos muestreados detectados como positivos, respectivamente, seguida de otoño (50%) siendo la menos favorable invierno (25%). ELISA-DASI fue capaz de detectar algún grupo positivo en todas las épocas del año, excepto en invierno que a partir de la mezcla de 5 plantas (1 planta positiva y 4 negativas) no fue capaz de detectar el virus. Este hecho puede deberse a que en invierno el título del virus es menor y su detección fiable únicamente es posible con técnicas más sensibles como “Spot” RT-PCR a tiempo real.

Además, se observaron diferencias significativas en la precisión en la detección mediante ELISA-DASI entre una planta positiva y la mezcla de varias plantas a partir de la mezcla de 4 plantas (1 positiva y 3 negativas). Se observó que la precisión descendía del 50%, exceptuando el caso puntual de la mezcla de 7 plantas (1 positiva y 6 negativas) con una precisión del 58,3%. Por tanto, siendo muy conservador no sería recomendable mezclar más de 4 plantas de vivero en una misma muestra. También se detectaron diferencias significativas en el número de grupos positivos detectados entre los dos patrones muestreados, las mismas consideraciones utilizadas para el caso de “Spot” RT-PCR a tiempo real serían válidas.

Además, en esta Tesis Doctoral se ha demostrado que “Spot” RT-PCR a tiempo real es capaz de detectar PPV en la mezcla de diez plantas, nueve de las cuales sean negativas, este hecho permite la mezcla de varias plantas sin perder precisión en la detección, esto implica la posibilidad de analizar un mayor número de plantas en un menor número de análisis y por tanto, un ahorro económico.

Con respecto a la validación de “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV, se ha observado que la coincidencia con ELISA-DASI (técnica validada, OEPP/EPPO (2004b)) no fue menor del 90% en todas las poblaciones, oscilando el índice kappa de Cohen entre 0,70 y 0,94 en las diferentes poblaciones.

En dos de las poblaciones analizadas (A1 y A5) el índice kappa de Cohen fue menor (0,70) que en las demás. Estas dos mismas poblaciones fueron aquellas con una menor prevalencia, lo que coincide con la primera paradoja de Feinstein y Cichetti (1990), según la cual aunque la coincidencia entre las técnicas evaluadas sea alta, con bajas prevalencias cabe esperar un índice kappa de Cohen más bajo de lo esperado. Al resolver esta paradoja empleando el índice PABAK, se puede observar que éste aumentó en ambas poblaciones a más del 0,81. Esto indica que la coincidencia entre ambas técnicas es casi perfecta, puesto que los índices kappa de Cohen y PABAK utilizados, según el caso, son superiores a 0,81 en todas las poblaciones. Todo esto se corrobora con los valores estimados para el índice kappa de Cohen total e índice PABAK total de 0,88 y 0,92, respectivamente.

La prueba de Mc Nemar fue significativa en todas las poblaciones muestreadas, exceptuando la población A4. Esto indicaría la existencia de diferencias significativas en el número de positivos detectados entre ambas técnicas y por lo tanto, en su sensibilidad o en su especificidad (Zhou, 1998). No obstante ello puede ocurrir aunque la concordancia entre ambas técnicas sea casi perfecta (Mainar-Jaime y Barberán, 2007; Gari et al., 2008). También se observó que aunque exista un efecto de sesgo, éste no influye en el índice de Cohen puesto que no hubo diferencias entre los índices de Cohen y BAK calculados. Esto es debido a que el efecto de sesgo en el índice de Cohen sólo es apreciable cuando existe una baja coincidencia entre las técnicas (Byrth et al., 1993; Hoehler, 2000).

La sensibilidad y la especificidad de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real han sido estimadas mediante dos procedimientos diferentes. Mediante el análisis de plantas con resultados discrepantes y mediante modelos latentes. Por ambos procedimientos se ha estimado que la sensibilidad de “Spot” RT-PCR a tiempo real fue mayor que la de ELISA-DASI. Lo contrario ocurre con la especificidad de ambas técnicas. También se puede observar que los valores estimados por ambos métodos no difieren. Los valores estimados mediante análisis de plantas con resultados discrepantes y sus intervalos de confianza (95%) se solapan o difieren en apenas un 0,02 con los valores calculados y sus intervalos “bootstrap” o de probabilidad, según el caso, estimados mediante modelos latentes.

Hay que resaltar que es la primera vez que se emplean en fitopatología modelos latentes para calcular la sensibilidad y especificidad de una técnica de diagnóstico, aunque sean habitualmente utilizados en medicina y en veterinaria. La principal ventaja de la utilización de modelos latentes es que ninguna de las técnicas evaluadas es considerada como “gold-standard” evitando los problemas de sesgo que se pudieran producir. Si el test a evaluar es más sensible que el “gold-standard”, se

reducirá la especificidad de éste. Por otra parte si el test a evaluar es más específico que el “gold-standard” se reducirá la sensibilidad de éste (Conraths y Schares, 2006). Por tanto, este procedimiento parece muy objetivo, tal y como indican Reitsma et al. 2009.

La principal desventaja de la utilización de modelos latentes es que se tienen que cumplir las diferentes premisas que se toman al aplicarlos. Entre éstas, se debe de comprobar la independencia o dependencia entre las pruebas evaluadas para evitar una sobredimensión de la sensibilidad o especificidad estimadas (Georgiadis et al., 2003; Brascum et al., 2005). Además, es recomendable comprobar si la sensibilidad y la especificidad son constantes en todas las poblaciones utilizadas en el estudio para evitar sesgos en la estimación de los parámetros (Toft et el., 2005). Por último, resulta muy importante comprobar la robustez de los modelos utilizando modelos sin distribuciones previas cuando se utilizan modelos bayesianos (Georgiadis et al., 2003; Brascum et al., 2005).

En nuestro caso, se comprobó la posible dependencia condicional entre las dos pruebas diagnósticas aplicando modelos bayesianos que asumían esta premisa, junto con modelos bayesianos que asumían la independencia condicional entre las pruebas. Además se utilizaron modelos latentes con funciones de máxima verosimilitud que asumen la independencia condicional entre las dos pruebas. Las dos pruebas de diagnóstico han resultado ser condicionalmente dependientes, esto podría llevar a sobreestimar algunos de los parámetros estudiados si se emplean modelos latentes con la asunción de condicional independencia entre las pruebas (Vacek, 1985; Gardner et al., 2000; Georgiadis et al., 2003). Sin embargo, en nuestro caso, se puede observar que en la mayoría de los modelos los intervalos “bootstrap” o los intervalos de probabilidad (95%), según el caso, se solaparon. Exceptuando, el Modelo 1 (condicionalmente independiente) que estimó un valor superior para la sensibilidad de “Spot” RT-PCR a tiempo real y el Modelo 7 (condicionalmente dependiente) que estimó unos valores menores para la sensibilidad de ambas pruebas. Los resultados obtenidos estarían de acuerdo con lo expuesto por Georgiadis et al. (2003), que describieron que al estimar la sensibilidad y la especificidad de dos pruebas de diagnóstico con altas precisiones (en torno a 1) no habría diferencias en la precisión entre modelos condicionalmente independientes y dependientes. También se ha observado que al aplicar modelos sin distribuciones previas los parámetros estimados no variaron e incluso se ajustaron mejor, dando robustez a las estimaciones logradas.

La dependencia condicional entre dos pruebas de diagnóstico puede deberse a que ambas pruebas evalúan un mismo fenómeno biológico (Gardner et al., 2000). En nuestro caso, la presencia del virus fue detectada mediante dos métodos, serológico en el caso de ELISA-DASI y molecular en el caso de “Spot” RT-PCR. Cabría esperar que la mayoría de las pruebas diagnóstica usadas en fitopatología tuvieran un cierto grado de condicional dependencia, puesto que en todas se evalúa la presencia

del patógeno, no como en medicina o veterinaria donde se puede evaluar aparte de la presencia del patógeno (antígeno) la presencia de anticuerpos producidos por el individuo, produciéndose de este forma pruebas condicionalmente independientes. Sin embargo, puede ocurrir que dos pruebas que miden el mismo proceso biológico muestren condicional independencia entre ellas cuando existe una gran diferencia en la sensibilidad de ambas (Brascum et al., 2005). Por esta razón, si se emplean modelos latentes para la estimación de los parámetros de diagnóstico de pruebas diagnósticas usadas en fitopatología, es interesante la utilización de ambos tipos de modelos (condicionalmente independientes y dependientes) para comprobar esta independencia o dependencia. Además, los modelos independientes son más sencillos al carecer de parámetros de covarianza entre las técnicas (Gardner et al., 2000; Georgiadis et al., 2003; Brascum et al., 2005) y como detallan Geordiadis et al. 2003 es preferible su utilización en el caso de comparación de técnicas con una alta precisión o baja dependencia.

Con respecto a las razones de verosimilitud, se puede observar que se encontraron diferencias entre los diferentes métodos estudiados (mediante plantas con resultados analíticos discrepantes y modelos latentes), sobre todo entre las razones de verosimilitud positivas. Esto es debido a las características del parámetro, debido a que las razones de verosimilitud no son valores lineales sino valores logarítmicos (Dujardin et al., 1994; Grimes y Schulz, 2005). Por tanto, una razón de verosimilitud positiva de 100 no aumenta la probabilidad de post-test de la prueba en 10 veces frente a una razón de verosimilitud de 10. Así, las diferencias encontradas entre las razones de verosimilitud de los diferentes modelos estudiados no se reflejan en la probabilidad post-test estimadas como se discutirá a continuación.

Se ha observado que mediante los diferentes modelos estudiados las razones de verosimilitud positivas de ambas pruebas resultaron  $>10$ , lo que muestran una muy buena precisión en la estimación de los individuos positivos (Sackett et al., 2000; Jaeschke et al., 2002) en ambas técnicas. También se puede observar que la razón de verosimilitud positiva de ELISA-DASI fue siempre superior a la de “Spot” RT-PCR a tiempo real, lo que indica la mayor precisión de esta técnica en los resultados positivos. Por lo contrario, en la misma tabla se puede observar que las razones de verosimilitud negativas de “Spot” RT-PCR son muy inferiores a 0,1, lo que indica muy buena precisión en la estimación de los individuos negativos (Sackett et al., 2000; Jaeschke et al., 2002), mejor que cuando se utiliza ELISA-DASI.

Se ha observado que la probabilidad post-test de infección en función de la prevalencia cumple el mismo patrón en los cuatro modelos estudiados. Con prevalencias muy bajas, en torno al 0,01% y 0,1%, la probabilidad post-test de infección tras obtener un resultado positivo siempre fue más alta en el caso de ELISA-DASI que en el caso de “Spot” RT-PCR, debido al mayor valor de su razón de verosimilitud positiva en todos los modelos. Sin embargo, la probabilidad post-test de infección tras un resultado negativo es prácticamente igual entre ambas

técnicas. No obstante, a partir de prevalencias superiores al 0,5%, se puede observar que la probabilidad post-test de infección (tras obtener un resultado negativo) es menor en el caso de “Spot” RT-PCR debido a su menor razón de verosimilitud negativa. Esta diferencia aumenta conforme se incrementa la prevalencia en la población, siendo aproximadamente del 0,5% con una prevalencia del 5% y llegando hasta el 1% con una prevalencia del 10% y así sucesivamente. También se puede destacar que a partir de una prevalencia de un 5% la probabilidad post-test de infección (tras un resultado positivo por “Spot” RT-PCR a tiempo real) resultó aproximadamente de un 50% o más, según el modelo.

En condiciones de vivero, la prevalencia de la enfermedad es baja debido a la no presencia de huéspedes infectados en las cercanías, siendo la tolerancia a PPV cero según Real Decreto 929/1995. En estas condiciones, con una baja prevalencia, la técnica ELISA-DASI fue la que ofreció mayor probabilidad post-test de infección tras un resultado positivo. Por tanto, sería la idónea para el muestreo rutinario de los plantones a comercializar, sin necesidad de comprobación de los resultados positivos por otra técnica. Sin embargo, la probabilidad post-test de infección tras un resultado negativo fue mayor para ELISA-DASI (incluso con prevalencias bajas > 0,01%). Por tanto, cuando se requiera una muy buena precisión en cuanto a la fiabilidad de sus individuos negativos será necesario analizar además por “Spot” RT-PCR a tiempo real. Además, se puede observar que cuando se utilizan las dos pruebas de diagnóstico conjuntamente aumentan la precisión y la fiabilidad de los resultados. Así, la probabilidad de que una planta positiva por ambos métodos esté verdaderamente infectada es mucho mayor, que la probabilidad de estarlo en una planta que sólo ha sido analizada por un solo método, incluso con prevalencias bajas. Esto es debido a que el valor de la curva de probabilidades post-test alcanza un valor cercano al 100%, en todos los modelos, con prevalencias no mayores al 1%. Lo mismo ocurriría con un resultado negativo, pero a la inversa. Al mismo tiempo, se puede observar que cuando existen resultados de diagnóstico discrepantes entre ambas técnicas, existe una alta probabilidad de estar la planta verdaderamente infectada. Por todo ello, con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, en condiciones de vivero, se recomienda el análisis por ambas técnicas de las plantas madres, el material vegetal de multiplicación y material vegetal (plantas de vivero) para exportación.

Los resultados obtenidos gracias a las razones de verosimilitud estimadas en este trabajo también se pueden extrapolar a otros ámbitos que no sea el viverístico. Así, en el caso de programas de erradicación de PPV sería interesante utilizar en un primer momento la técnica “Spot” RT-PCR a tiempo real, puesto que su fiabilidad en los resultados negativos es mayor que la de ELISA-DASI. Es la técnica que produce un menor número de escapes de plantas verdaderamente positivas, que son las causantes de nuevas inoculaciones del virus. Sin embargo, cuando la prevalencia de la enfermedad es menor al 5%, como se ha detallado anteriormente, ELISA-DASI ofrece mejor confianza en los resultados positivos y sería más adecuada para

mantener los niveles de infección por debajo de este nivel hasta su completa erradicación.

En el caso de la comparación entre Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección de CTV se puede observar que el comportamiento de ambas técnicas es diferente según la población estudiada. Así la concordancia en los análisis de árboles adultos en Tulare (EEUU) muestra una concordancia perfecta, con un índice kappa de Cohen de 0,90, mientras en el caso de la parcela de vivero situada en Moncada (IVIA), la concordancia es substancial, con un índice kappa de Cohen de 0,63. Cuando se calcula el índice kappa de Cohen global se obtiene un índice de 0,76 que indica una concordancia substancial entre ambas técnicas. La menor concordancia entre ELISA-DASI y “Tissue-print” RT-PCR durante diciembre de 2008 (81%), se podría deber a varios factores: al hospedador, la época del año en la que se realizó el análisis o la conjunción de ambos. Es conocido la sensibilidad al frío del patrón *Citrus macrophylla* (Agustí, 2000). Debido a las bajas temperaturas registradas en la zona durante la época en que se analizó la parcela (se registraron 273 horas frío ( $< 7^{\circ}\text{C}$ ) en Moncada durante el mes de diciembre de 2008) puede que el estado fisiológico de las plantas condicionase la replicación viral, haciendo que su título fuese bajo y sólo fuese detectable por una técnica muy sensible como “Tissue-print” RT-PCR.

En cuanto a la prueba de Mc Nemar, se puede observar que resultó significativa en ambas poblaciones. Por tanto, se extraerían las mismas conclusiones que se extrajeron en la comparación de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real. Es decir, se dieron diferencias en la sensibilidad y en la susceptibilidad de las técnicas, además el sesgo en ambas poblaciones no es apreciable como indica la coincidencia entre los índices de Cohen y BAK.

Al calcular la sensibilidad y la especificidad de ambas técnicas, se observó que Inmunoimpresión-ELISA fue la técnica más específica con una especificidad de 0,996 frente a 0,852 de “Tissue-print” RT-PCR. Por el contrario, “Tissue-print” RT-PCR fue la técnica más sensible con una sensibilidad de 0,982, superior a la de Inmunoimpresión-ELISA (0,802).

La alta especificidad estimada para Inmunoimpresión-ELISA se debió a que de las 8 plantas únicamente positivas por ELISA-DASI en diciembre de 2008, 7 resultaron ser verdaderas positivas cuando se analizaron en julio de 2009 mediante Inmunoimpresión-ELISA, “Tissue-print”-RT-PCR a tiempo real y test biológico en lima mejicana. Este hecho, estaría de acuerdo con los resultados obtenidos con las plantas que dieron diagnósticos discrepantes por Inmunoimpresión-ELISA en la parcela de Tulare (EEUU) que fueron positivas mediante el test biológico en planta indicadora lima mejicana.

La alta sensibilidad de la técnica “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real fue debido a que de las 117 plantas únicamente positivas por “Tissue-print” RT-PCR a

tiempo real en diciembre de 2008, 77 resultaron ser positivas al menos por dos técnicas de las evaluadas cuando se analizaron en julio de 2009, lo que indica que esta técnica es capaz de detectar un mayor número de verdaderos positivos que Inmunoimpresión-ELISA. Al mismo tiempo 40 plantas positivas en diciembre de 2008 no resultaron ser verdaderos positivos. Esta discrepancia entre los resultados obtenidos en diciembre de 2008 y julio de 2009 en estas plantas pudiera ser debida al tratarse de infecciones recientes y por tanto, con un bajo título viral, sólo detectable por “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real o a infecciones que fueron controladas posteriormente por diferentes mecanismos de defensa natural de la planta (Bruening, 2006).

Estos resultados también confirman la mejor precisión de “Tissue-print” RT-PCR frente a otras técnicas de detección moleculares ya validadas (OEPP/EPPO, 2004a) como Inmuncaptura-Nested RT-PCR en un solo tubo (Olmos et al., 1999). Así, Cambra et al. (2002) compararon Inmunoimpresión-ELISA con Inmuncaptura-Nested RT-PCR en 111 clementinas de reciente infección, se produjeron 12 plantas con análisis discrepantes, 6 por técnica. Ninguna planta positiva mediante Inmuncaptura-Nested RT-PCR fue confirmada en análisis posteriores mediante test biológico en lima mejicana, esto nos muestra la mayor precisión de “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real. Además, Bertolini et al. (2008), ya demostraron la mayor sensibilidad en la detección de CTV mediante “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real frente a Inmuncaptura-Nested RT-PCR en material vegetal.

Con los valores de sensibilidad se lograron calcular las razones de verosimilitud. En este caso se observó que la razón de verosimilitud positiva para Inmunoimpresión-ELISA fue de 216,42 ( $>10$ ) lo que indica una alta fiabilidad de los resultados positivos de la técnica. Mientras, la razón de verosimilitud negativa para ELISA-DASI fue de 0,199 ( $>0,1$ ) lo que indica una modera confianza para los resultados negativos de la técnica. Para el caso de “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real los resultados son los inversos, la razón de verosimilitud positiva fue de 6,63 indicando una moderada confianza para los resultados positivos. Sin embargo, la razón de verosimilitud negativa resultó del 0,021, indicando una alta confianza para los resultados negativos. Con estas razones de verosimilitud se puede concluir que la técnica Inmunoimpresión-ELISA es la que ofreció mayor fiabilidad para los resultados positivos a bajas prevalencias, pero la técnica “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real es la que ofrece mayor confianza para los resultados negativos a bajas prevalencias.

Como se ha comentado anteriormente la prevalencia en un vivero normalmente será muy baja y por tanto la técnica Inmunoimpresión-ELISA es la idónea para un muestreo rutinario. Sin embargo, la técnica “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real será la más adecuada para cuando interese cerciorarse o garantizar la ausencia del virus en material de vital importancia como: plantas madre, material de

multiplicación y material de exportación. Así, una combinación de ambas técnicas dará una mayor confianza y fiabilidad prácticamente total en los resultados.

A modo de resumen de este Capítulo se han comparado dos tipos de técnicas de detección: serológicas y moleculares. Se han podido estimar los parámetros de diagnóstico de las cuatro técnicas evaluadas y por diferentes métodos. En este sentido, en nuestro conocimiento, es la primera vez que en fitopatología se emplean modelos latentes para estimar los parámetros de diagnóstico de una técnica de detección, demostrándose que pueden ser empleados en la estimación de estos parámetros en otras técnicas de detección utilizadas en fitopatología. Además, se ha validado “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real como técnica de detección para CTV al haberse comparado, con éxito, frente a Inmunoimpresión-ELISA con anticuerpos monoclonales específicos.



## **CAPÍTULO 7.**

# **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS CON ACEITES MINERALES SOBRE LA INCIDENCIA VIRAL Y SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS PLANTAS EN BLOQUES DE VIVERO**



## CAPÍTULO 7

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS CON ACEITES MINERALES SOBRE LA INCIDENCIA VIRAL Y SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS PLANTAS EN BLOQUES DE VIVERO

---

### 7.1 INTRODUCCIÓN

Los aceites minerales son plaguicidas orgánicos obtenidos del refinamiento del petróleo (Barberá, 1989). Se han aplicado en muchos ámbitos de la protección vegetal, utilizándose en el control de plagas, hongos y virosis.

Las propiedades insecticidas de los aceites minerales son conocidas desde hace más de cien años. El uso de los aceites derivados del petróleo se remonta a mediados del siglo XIX. El primer aceite mineral que se utilizó fue el queroseno en cítricos contra cóccidos y pulgones (Chapman, 1967; Agnello, 2002; Rae, 2002), el cual producía grandes problemas por su fitotoxicidad en tratamientos estivales. Desde ese momento se ha intentado reducir el daño producido a las plantas por los aceites, pero sin perder su eficacia contra los insectos.

La aparición de los plaguicidas de síntesis después de la II Guerra Mundial redujo el interés por los aceites minerales. El DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis (4 - clorofenil)-etano) y sus derivados ofrecían un amplio espectro de acción, eran persistentes y no eran fitotóxicos. La aparición de resistencias en los insectos y de problemas relacionados con la salud pública provocó un nuevo interés por los aceites minerales (Rae, 2002).

Los aceites minerales se han empleado en protección vegetal solos o mezclados con diferentes insecticidas, acaricidas o fungicidas, según el caso, dando diferentes resultados. Una amplia revisión sobre el tema ha sido publicada por Rae (2002).

Los aceites minerales han sido utilizados frente a un gran número de plagas como cóccidos (Beattie et al., 2002; Grafton-Cardwell y Reagan, 2002; Chueca et al., 2009), pulgones (Karagounis et al., 2006; Najar-Rodríguez et al., 2007), trips (Liu et al., 2002; Clift et al., 2002), el minador de los cítricos *Phyllocnistis citrella* (Beattie et al., 1995; Liu et al., 2001, 2006), el cicadélido *Diaphorina citri* (Rae et al., 1997), moscas blancas (Liang y Liu, 2002; Stansly et al., 2002, Schuster et al., 2009) y ácaros (Scott Lawson y Weires, 1991; Herron et al., 1998; Urbaneja et al., 2008).

El motivo de este amplio espectro de usos es el modo físico de acción frente a las plagas de artrópodos. La acción plaguicida se produce mediante asfixia o anoxia (Davidson et al., 1991; Taverner, 2002) debido a que los aceites taponan las tráqueas de los insectos impidiendo su respiración. Otro modo de acción aceptado, expone que la muerte del insecto se produce por penetración del aceite a través de su cutícula y acumulación en el cuerpo del mismo (Najar-Rodríguez et al., 2008; Stadler y Buteler, 2009). Además, se ha citado su acción ovicida al penetrar en los huevos (Scott Lawson y Weires, 1991; Riedl et al., 1995), además de cambios en el comportamiento alimenticio y en el de oviposición de algunos insectos como *Helicoverpa armigera* (Mensha et al., 1995) y *P. citrella* (Beattie et al., 1995; Liu et al., 2006). Una de las ventajas del uso de aceites minerales en el control de plagas es la no aparición de resistencias, derivada de su modo físico de acción (Davidson et al. 1991, Chueca et al., 2009).

También se ha reportado la acción fungida de los aceites minerales principalmente frente a oídios (Northover y Scheider, 1996; Pasini et al., 1997; Grove y Boal, 2002; Hernández Riesco et al., 2002, Nicetic et al., 2002).

El empleo de los aceites minerales para el control de virus vegetales se ha centrado en virus no persistentes. Bradley (1963) probó la inhibición de la transmisión del Virus Y de la patata (*Potato virus Y*, PVY; *Potyvirus*) mediante el uso de aceites. Desde entonces, se ha probado con éxito el uso de aceites minerales en el control de virus no persistentes (Simons y Zitter, 1980; Lowery et al., 1990; Webb y Linda, 1993; Umesh et al., 1995, Asjes, 2000; Asjes y Blom-Barnhoorn, 2002) o combinándolos con cultivos barrera (Boiteau et al., 2009).

El modo de acción de los aceites minerales en la prevención de la transmisión de virus vegetales todavía no está completamente determinado, pero se ha comprobado que los aceites tienen efecto en los procesos de adquisición e inoculación de virus no persistentes (Martín et al., 2004). Para virus no persistentes Wang y Pirone (1996) demostraron que los aceites minerales alteran la estructura de la superficie del estilete del pulgón, interfiriendo con la habilidad de éste para su unión con la partícula viral y por tanto, reduciendo la capacidad de transmisión.

En diferentes estudios también se ha observado una reducción en la transmisión de virus semipersistentes y persistentes (Allen et al., 1993; Powell et al., 1997; Asjes y Blom-Barnhoorn, 2001; Clift et al., 2002; Schuster et al., 2009). El efecto de los aceites frente a virus semipersistentes y persistentes se puede deber a la reducción de la población de insectos vectores (Perring et al., 1999), implicando una reducción en la tasa de transmisión.

Sin embargo, el uso de aceites minerales como método de control también tiene algunas desventajas. No se recomienda su uso a temperaturas superiores a 35°C, especialmente con vientos secos o con humedades superiores a 90% puesto que pueden producir estrés a la planta, ni en situaciones de sequía o estrés hídrico ya que

puede producir desarreglos en la planta, produciendo caída de hojas en cítricos (Johnson et al., 2002; Beattie, 2005).

Además, debido a su modo de físico de acción es necesario un correcto y total recubrimiento de la planta para lograr el efecto deseado y para ello es imprescindible utilizar la maquinaria adecuada (Furness y Combellack, 2002). El momento y las condiciones en las que se produce la aplicación también es determinante en el efecto conseguido. Así, por ejemplo, la lluvia excesiva puede quitar la película de aceite, y en cultivos hortícolas donde el crecimiento es muy rápido los tejidos jóvenes que han crecido después de la aplicación del aceite quedarían desprovistos de él, y por tanto de protección (Hooks y Fereres, 2006).

Con todo ello, las características de los aceites minerales hacen que estén permitidos o autorizados para una gran cantidad de programas de control integrado de plagas y enfermedades en todo tipo de cultivos (Furness y Combellack, 2002; Northover y Timmer, 2002; Thwaite et al, 2002; Beattie et al, 2002). No obstante, en relación a ello, se ha observado que algunos aceites tienen efecto sobre la fauna útil, aunque mucho menor que el de los insecticidas convencionales (Davidson et al., 1991; Stansly et al., 2002; Urbaneja et al., 2008) evitando algunas de las consecuencias del control químico como la aparición de brotes de las plagas tras su uso.

Las características anteriormente descritas vienen dadas por la composición de los aceites minerales empleados en protección vegetal. Los aceites minerales están compuestos principalmente por la mezcla de cuatro tipos de hidrocarburos: parafínicos, nafténicos, olefínicos y aromáticos (Primo y Carrasco, 1990) (Tabla 7.1).

**Tabla 7.1: Tipos de hidrocarburos presentes en la composición de los aceites minerales**

	<b>Saturados</b>	<b>Insaturados</b>
<b>Lineales</b>	Parafínicos	Olefínicos
<b>Cíclicos</b>	Nafténicos	Aromáticos

El porcentaje relativo de estos hidrocarburos determina las características del aceite. Gray y de Ong (1926) demostraron que la fracción insaturada (hidrocarburos olefínicos y aromáticos) estaba relacionada con la fitotoxicidad causada por los aceites minerales. Así, los compuestos insaturados reaccionan con el oxígeno del aire pudiendo desarrollar compuestos nocivos para las plantas. Mientras, los compuestos saturados (parafínicos y nafténicos) son muy estables y se alteran poco cuando se exponen al aire, al calor ambiental o a la luz, presentando poca fitotoxicidad (Barberá, 1989; Sánchez y Pina, 1996).

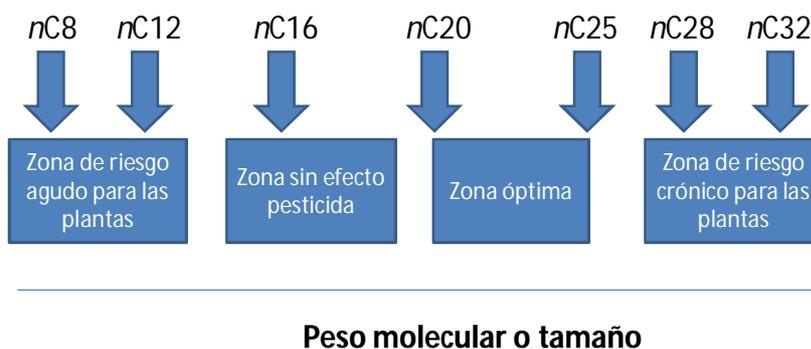
Según las estructuras de sus átomos de carbono los aceites se pueden clasificar en: aceites parafínicos (> 60% de sus estructuras son parafínicas),

nafténicos (> 35% son nafténicas) y aromáticos (> 35% son aromáticas) (Agnello, 2002). Se ha demostrado que la fracción parafínica ofrece mayor eficacia contra los insectos (Pearce et al., 1942; Riehl y LaDue, 1952), de ahí las recomendaciones de empleo de aceites parafínicos para el control de plagas (Agnello, 2002).

Agnello (2002) describe ampliamente las diferentes características de los aceites minerales empleados en protección vegetal. Aquí sólo vamos a nombrar algunas de ellas.

**Número equivalente de carbonos parafínicos (*nCy*):** se refiere al número de carbonos parafínicos (alcanos) que ebulen a la temperatura a la que destila el 50% de un volumen de aceite determinado mediante destilación simulada por cromatografía de gases según la norma ASTM D 2887 (ASTM American Society for Testing and Materials). Así, si los alcanos que ebulen a la temperatura de destilación a la cual ebulle el 50% del volumen de aceite tratado son C21 (cadenas con 21 átomos de carbono) el aceite mineral se caracterizará como *nC21*. Con la norma ASTM D 2887 se puede caracterizar también toda la curva de destilación del aceite mineral, se puede calcular el rango de destilación del aceite, es decir los *nCy* para el 10% y el 90% del volumen de aceite destilado. Actualmente es la forma más común de caracterizar a los aceites minerales (Kuhlmann y Jacques, 2002). Esta característica puede ser utilizada para caracterizar la respuesta de los aceites frente a las plagas y a las plantas (Jacques y Kuhlmann, 2002) (Figura 7.1).

**Figura 7.1: Efecto del *nCy* de los aceites minerales sobre la eficacia y riesgo en las plantas. Fuente: Jacques y Kuhlmann (2002)**



Para comprender mejor la respuesta de los aceites frente a las plantas hay que comentar que la fitotoxicidad producida en las plantas por los aceites minerales se puede clasificar en: 1) fitotoxicidad aguda, producida por los compuestos insaturados presentes en el aceite y se refleja en manchas o “quemaduras” en las hojas y frutos e incluso en la caída de los mismos y 2) fitotoxicidad crónica, producida por compuestos más pesados que provocan síntomas como pérdida de vigor en la planta, reducción de la cosecha o alternancia de la misma. Estos últimos efectos son observables a más largo plazo (Hodgkinson et al., 2002).

**Residuo insulfonable:** es una estimación del grado de refinamiento del aceite y de la cantidad de compuestos insaturados, potencialmente fitotóxicos, que están presentes en el aceite después del proceso de refinamiento. Se hace reaccionar el aceite mineral con ácido sulfúrico concentrado (según norma ASTM D 483), los compuestos insaturados más volátiles e inestables reaccionan con el ácido, mientras los compuestos saturados (parafínicos y nafténicos) más estables permanecen al no reaccionar. El porcentaje en volumen de aceite que no reacciona con el ácido sulfúrico se llama residuo insulfonable. Se aconseja la utilización de aceites minerales con residuos insulfonables  $\geq 92\%$ ; por debajo de este porcentaje el aceite es potencialmente fitotóxico (Agnello, 2002).

Kuhlmann y Jacques (2002) proponen una clasificación de los aceites minerales, actualmente la más aceptada, atendiendo a sus características. Así clasifica a los aceites minerales de menor a mayor nivel de refinado en: aceites minerales, aceites minerales agrícolas y aceites minerales hortícolas.

**Aceites minerales:** procedentes de la destilación de petróleo virgen, con un punto mínimo de destilación inicial de  $232^{\circ}\text{C}$  (1,33kPa), con un índice de color  $\leq 5.5$  según ATSM D 1500 y deben de cumplir con los límites de absorbancia (UV) para excluir los compuestos aromáticos cancerígenos. Dentro de este grupo estarían los aceites de invierno, cuyo uso se ha prohibido recientemente.

**Aceites minerales agrícolas:** no hay especificaciones referentes a la destilación pero para que un aceite mineral pueda ser considerado como aceite mineral agrícola tiene que cumplir unas especificaciones más estrictas. Se requiere que se trate de un aceite mineral parafínico, es decir con un 60% o más de estructuras parafínicas (norma ASTM D 2140) y debe de tener un residuo insulfonable  $\geq 92\%$  (norma ASTM D 483), esto implica que debe ser un aceite mineral parafínico con muy baja concentración en compuestos olefínicos y aromáticos.

**Aceites minerales hortícolas:** son aceites más refinados. Por tanto, junto con los requisitos anteriores (aceites parafínicos y residuo insulfonable  $\geq 92\%$ ), deben de cumplir otras especificaciones: Número medio de  $n\text{Cy}$  de 21, 23 y 25 determinado con la norma ASTM D 2887 y entre el 10% y 90% de volumen de aceite destilado un rango de  $n\text{Cy}$  entre 5 y 6 carbonos usando la misma norma.

El control de virosis en el caso de los viveros es más complicado debido a su marco de plantación más reducido. Sin embargo, dicho control es fundamental para impedir la comercialización de plántones infectados y así evitar las pérdidas económicas derivadas por la dispersión del virus en la zona de cultivo. Por ello, en este Capítulo se evalúa el efecto de la aplicación de aceites minerales en la incidencia de PPV y CTV en bloques de vivero, como posible medida integrada de control en los mismos. Además, se evalúa su posible efecto sobre el desarrollo vegetativo del

cultivo, por si la aplicación de aceites llevara consigo un detrimento en el desarrollo de las plantas.

## **7.2 OBJETIVOS**

- Evaluación del efecto de la aplicación de tratamientos con aceites minerales en la transmisión de PPV y CTV en bloques de vivero.
- Evaluación del efecto de la aplicación de aceites en el desarrollo vegetativo de los plantones, concretamente en la superficie foliar y en la altura.

## **7.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.3.1 Localización de las parcelas**

Los estudios planteados se realizaron en tres parcelas experimentales localizadas en las localidades valencianas de Lliria y Carlet para el caso de frutales de hueso y Moncada para el caso de cítricos. Sus características se describen en el Capítulo 3, apartados 3.1.1, 3.1.2.y 3.1.3, respectivamente.

### **7.3.2 Tratamiento con aceites minerales**

El producto empleado para los tratamientos fue el aceite mineral hortícola (nC21) Sunspray Ultrafine, 85% (EC) P/V con nº registro 19.422.

En el año 2006, las aplicaciones de los tratamientos empezaron a partir de las primeras brotaciones en las tres parcelas, hasta la caída total de las hojas en el caso de frutales de hueso y hasta el mes de diciembre en el caso del bloque de cítricos. Con esto se pretendía mantener durante todo el año las parcelas protegidas con el aceite, además de observar el comportamiento a lo largo del año de los patrones frente a la aplicación reiterada de aceites minerales. Los tratamientos se efectuaron cada 10-12 días, a una concentración del 1%. En el año 2007 se optó por tratar las parcelas semanalmente, a la misma concentración y únicamente durante los meses de primavera (abril, mayo, junio), por ser los de mayor incidencia de pulgones según los datos obtenidos en el año 2006. Además, en la parcela de Carlet los tratamientos se continuaron en septiembre y octubre de 2007. La periodicidad de tratamientos fue disminuida debido a la volatilidad y poca persistencia del aceite observada en el año 2006. Todas las aplicaciones se realizaron mediante la misma pistola, a la cual iba unido un manómetro para controlar la presión de trabajo, y así evitar las pérdidas de carga. La pistola y su tubo de conexión estaban unidos a la toma de fuerza de un tractor. La presión de trabajo elegida fue de 10 bares. Se seleccionó un ángulo de apertura de 40°, ya que la plaga contra la cual iba destinado el tratamiento (pulgones)

es exterior, y por tanto, se consideró necesario mojar muy bien toda la planta. Este ángulo permitió aplicar el caldo perfectamente por toda la superficie de la planta. Se emplearon boquillas de disco de cerámica de 1 mm de diámetro. Los tanques utilizados fueron tanques suspendidos con una capacidad de 600 litros con dos agitadores, uno superior y otro inferior. Antes de realizar cada tratamiento se midió el volumen de caldo que pulverizaba la pistola durante un minuto (aproximadamente 1,8 l/min). Después del tratamiento se realizó la misma operación. De esta forma se comprobó que la pistola pulverizaba la misma cantidad de caldo fitosanitario a lo largo del tratamiento. Al finalizar el tratamiento se midió el volumen de caldo sobrante en el tanque. De esta forma, sabiendo el volumen inicial y final, se pudo calcular el volumen de caldo real pulverizado en cada aplicación.

En la Figura 7.2 se puede observar el tractor utilizado en los tratamientos con tanque suspendido y los diferentes materiales utilizados en los tratamientos, como cubo y matraces graduados, cronómetro y pistola con manómetro.

**Figura 7.2: Materiales utilizados para la pulverización con aceites**



### 7.3.3 Muestreo vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo

Los muestreos de las parcelas experimentales se realizaron en diferentes épocas del año a lo largo del estudio según se describe en el apartado 3.2 del Capítulo 3.

### 7.3.4 Medición de parámetros relacionados con el desarrollo vegetativo (superficie foliar y altura de la planta)

En las tres parcelas objeto de estudio se tomaron al azar cinco plantas del grupo de no tratadas y cinco plantas del grupo de tratadas por cada patrón estudiado y mes muestreado, para medir su superficie foliar y su altura. Por tanto, en la parcela de Lliria se muestrearon 20, en Carlet 60 y en Moncada 10 plantas por mes, respectivamente.

Las mediciones de la superficie foliar en la parcela de Lliria se efectuaron entre los meses de abril a noviembre del 2006 y el mes de mayo del 2007. Durante el

mes de abril de 2006 la medición de la superficie foliar se realizó como se detalla en el apartado 3.6.1. Debido a la brotación de las plantas, en el resto de meses las mediciones se realizaron como se detalla en el apartado 3.6.2 (ambos apartados dentro del Capítulo 3). En la parcela de Carlet las mediciones de la superficie foliar se efectuaron los meses de mayo, junio, julio, agosto, septiembre y noviembre del 2006 y mayo del 2007. Durante el mes de mayo del 2006 la medición de la superficie foliar se realizó como se detalla en el apartado 3.6.1, ya que las plantas estaban brotando. En el resto de meses las mediciones se realizaron como se detalla en el apartado 3.6.2 del Capítulo 3. En la parcela de Moncada, las mediciones se efectuaron entre los meses de abril de 2006 a febrero de 2007. Durante los meses de abril a julio de 2006 la medición de la superficie foliar se realizó como se detalla en el apartado 3.6.1, ya que las plantas estaban poco desarrolladas y no habían formado ramas. Debido al desarrollo de las plantas, en el resto de meses las mediciones se realizaron como se detalla en el apartado 3.6.2 (ambos apartados dentro del Capítulo 3). La altura de las plantas muestreadas se midió con una cinta métrica.

### **7.3.5 Análisis estadísticos**

En el estudio del efecto de la aplicación de tratamientos con aceites en la incidencia viral de PPV y CTV en las parcelas de Lliria y Moncada, respectivamente, se aplicaron modelos lineales mixtos generalizados o modelo lineales generalizados (Molenberghs y Verbeke, 2005), según el caso. En la parcela de Lliria se aplicó un modelo lineal mixto generalizado con cuatro factores: Bloque como factor aleatorio y Fila, Patrón y Tratamiento como fijos. En la parcela de Moncada se aplicó un modelo lineal generalizado con un solo factor fijo: Tratamiento. Se asumió que la variable de interés (infección viral por PPV o CTV según el caso) sigue una distribución binomial. No se realizó ningún procedimiento estadístico en la parcela de Carlet por la muy baja infección detectada.

En el estudio del efecto de la aplicación de aceites en la superficie foliar y en la altura de los patrones, se utilizó la técnica ANOVA con un modelo mixto, permitiendo heterogeneidad de varianzas en las interacciones según el caso. En las parcelas de Lliria y de Carlet con tres factores: Patrón, Mes y Tratamiento y sus interacciones. En el caso de la parcela de Moncada los factores fueron: Mes y Tratamiento y su interacción. Se utilizó el método de Kenward y Roger (1997) para la estimación de los grados de libertad. Si la interacción Mes x Tratamiento fue significativa, los datos se analizaron mes a mes aplicando un análisis de la varianza (ANOVA) clásico con homogeneidad de varianzas. En el caso de los datos de la parcela de Carlet se aplicó la corrección de Bonferroni (Bonferroni, 1936) al comparar las variedades entre sí para protegernos del error de Tipo-I.

Para todos los análisis se utilizó el programa para PC, SAS.9.2.

## 7.4 RESULTADOS

### 7.4.1 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en la incidencia viral en las parcelas experimentales

#### 7.4.1.1 Parcela de Lliria (PPV, alta densidad de inóculo)

En la Tabla 7.2 se muestran los resultados obtenidos en la parcela de Lliria durante los dos períodos de muestreo. Se puede observar que en ambos años se produjo un menor porcentaje de plantas infectadas entre las plantas tratadas con aceites que entre las plantas control. Sólo se detectaron diferencias significativas entre las plantas del patrón Mariana GF8-1 en el muestro realizado en mayo de 2007. Además, hay resaltar que se obtuvieron los mismos resultados con los dos métodos de detección utilizados.

**Tabla 7.2: Efecto del tratamiento con aceites en la incidencia viral de *Plum pox virus* en los patrones Mariana GF8-1 y Nemaguard, bajo una alta densidad de inóculo, determinado mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real**

Tratamientos	ELISA-DASI			
	Octubre 2006		Mayo 2007	
	Mariana GF8-1	Nemaguard	Mariana GF8-1	Nemaguard
Plantas no tratadas	24 / 222 <sup>a</sup> (10,8 %) a <sup>b</sup>	13 / 225 (5,8%) a	148 / 233 (63,5%) a	63 / 236 (26,7%) a
Plantas tratadas	20 / 255 (7,8%) a	9 / 257 (3,5%) a	123 / 252 (48,8%) b	66 / 258 (25,6%) a

Tratamientos	“Spot” RT-PCR a tiempo real			
	Octubre 2006		Mayo 2007	
	Mariana GF8-1	Nemaguard	Mariana GF8-1	Nemaguard
Plantas no tratadas	30 / 222 (13,5%) a	13 / 225 (5,8%) a	170 / 233 (73,0%) a	94 / 236 (39,8%) a
Plantas tratadas	33 / 255 (12,9%) a	7 / 257 (2,7%) a	145 / 252 (57,5%) b	98 / 258 (38,0%) a

<sup>a</sup>Número de plantas infectadas por PPV / Número total de plantas analizadas

<sup>b</sup>Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas de acuerdo con un modelo lineal mixto generalizado siguiendo una distribución binomial ( $p < 0,05$ )

#### 7.4.1.2 Parcela de Carlet (PPV, baja densidad de inóculo)

La incidencia viral alcanzada en la parcela de Carlet fue muy baja como se puede observar en la Tabla 7.3. Durante el primer año se detectaron sólo dos plantas infectadas entre las plantas no tratadas. En el segundo año se detectaron cuatro plantas infectadas entre las plantas no tratadas y cuatro más entre las plantas tratadas en los análisis efectuados mediante ELISA-DASI, mientras que en el análisis

realizado mediante “Spot” RT-PCR a tiempo real una planta más fue detectada entre las plantas no tratadas.

**Tabla 7.3: Efecto de los tratamientos con aceite en la incidencia viral de *Plum pox virus* en diferentes patrones de frutales de hueso bajo una baja densidad de inóculo determinado mediante ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real**

Noviembre 2006				
Patrones	Plantas no tratadas		Plantas tratadas	
	ELISA-DASI <sup>a</sup>	Spot r-t <sup>a</sup>	ELISA-DASI	Spot r-t
Mariana GF8-1	0 / 222 <sup>b</sup> (0,0%)	n.d <sup>c</sup>	0 / 255 (0,0%)	n.d
Adesoto 101	2 / 231 (0,9%)	n.d	0 / 229 (0,0%)	n.d
Nemaguard	0 / 174 (0,0%)	n.d	0 / 187 (0,0%)	n.d
Mirobolan 29C	0 / 225 (0,0%)	n.d	0 / 238 (0,0%)	n.d
Cadaman	0 / 261 (0,0%)	n.d	0 / 270 (0,0%)	n.d
Garnem	0 / 228 (0,0%)	n.d	0 / 211 (0,0%)	n.d
<b>Total</b>	<b>2 / 1366 (0,1%)</b>	<b>n.d</b>	<b>0 / 1390 (0,0%)</b>	<b>n.d</b>

Noviembre 2007				
Patrones	Plantas no tratadas		Plantas tratadas	
	ELISA-DASI	Spot r-t	ELISA-DASI	Spot r-t
Mariana GF8-1	0 / 240 (0,0%)	0 / 240 (0,0%)	1 / 247 (0,4%)	1 / 247 (0,4%)
Adesoto 101	3 / 216 (1,4%)	4 / 216 (1,8%)	3 / 231 (1,3%)	3 / 231 (1,3%)
Nemaguard	1 / 159 (0,6%)	1 / 159 (0,6%)	0 / 167 (0,0%)	0 / 167 (0,0%)
Mirobolan 29C	0 / 205 (0,0%)	0 / 205 (0,0%)	0 / 218 (0,0%)	0 / 218 (0,0%)
Cadaman	0 / 260 (0,0%)	0 / 260 (0,0%)	0 / 269 (0,0%)	0 / 269 (0,0%)
Garnem	0 / 169 (0,0%)	0 / 169 (0,0%)	0 / 180 (0,0%)	0 / 180 (0,0%)
<b>Total</b>	<b>4 / 1249 (0,3%)</b>	<b>5 / 1249 (0,4%)</b>	<b>4 / 1312 (0,3%)</b>	<b>4 / 1312 (0,3%)</b>

<sup>a</sup> ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real

<sup>b</sup> Número de plantas infectadas por PPV / Número total de plantas analizadas

<sup>c</sup> No determinado

#### 7.4.1.3 Parcela de Moncada (CTV, alta densidad de inóculo)

El tratamiento con aceites minerales no produjo un claro efecto en la incidencia viral de CTV en el cultivo como se puede observar en la Tabla 7.4. En el primer muestreo en diciembre de 2006 el número de plantas infectadas por CTV fue mayor entre las plantas tratadas que entre las no tratadas, mientras en el siguiente

muestreo realizado en mayo de 2007 ocurrió lo contrario. No se apreció diferencias significativas entre el número de plantas infectadas entre los diferentes tratamientos en ambas ocasiones.

**Tabla 7.4: Efecto de los tratamientos con aceite en la incidencia viral de *Citrus tristeza virus* en *Citrus macrophylla* bajo una alta densidad de inóculo determinado mediante Inmunoimpresión-ELISA**

Tratamientos	Diciembre 2006	Mayo 2007
Plantas no tratadas	8 / 314 <sup>a</sup> (2,55%) a <sup>b</sup>	77 / 316 (24,37%) a
Plantas tratadas	17 / 317 (5,36%) a	71 / 319 (22,26%) a

<sup>a</sup> Número de plantas infectadas por CTV / el número total de plantas analizadas

<sup>b</sup> Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas de acuerdo con un modelo lineal generalizado siguiendo una distribución binomial ( $p < 0,05$ )

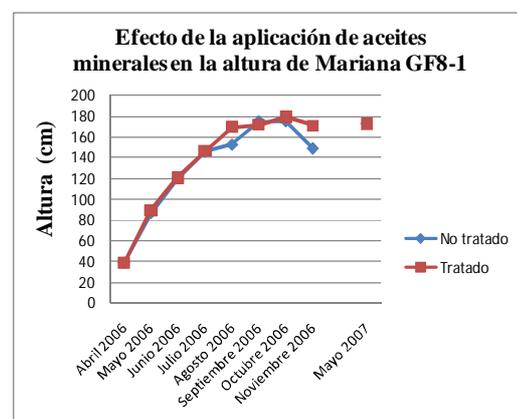
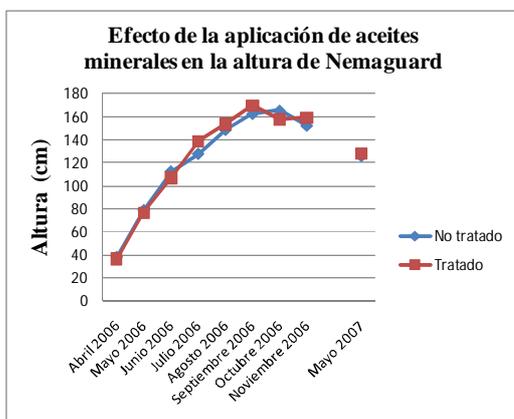
#### 7.4.2 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en el desarrollo vegetativo de los patrones.

##### 7.4.2.1 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en la altura de los patrones

###### 7.4.2.1.1 Parcela de Lliria

En la Figura 7.3 y en la Tabla 7.5 se observa el valor medio de la altura alcanzada por cinco plantas tratadas con aceites y cinco plantas no tratadas con aceites en los patrones Mariana GF8-1 y Nemaguard, respectivamente.

**Figura 7.3: Altura media alcanzada (cm) por plantas tratadas y plantas no tratadas de los patrones Mariana GF8-1 y Nemaguard en la parcela de Lliria a lo largo de un período vegetativo (2006) y mayo 2007**



**Tabla 7.5: Media y desviación típica (cm) de la altura alcanzada por los patrones Mariana GF8-1 y Nemaguard en la parcela de Llíria durante un período vegetativo (2006) y mayo 2007**

Fecha medida	Mariana GF8-1		Nemaguard	
	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado
<b>Abril 2006</b>	39,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	38,8 ± 3,5	37,7 ± 2,8	36,4 ± 4,7
<b>Mayo 2006</b>	86,8 ± 1,9	89,4 ± 23,2	78,6 ± 8,5	76,6 ± 14,2
<b>Junio 2006</b>	120,0 ± 22,4	121,0 ± 24,2	112,4 ± 10,0	106,8 ± 17,0
<b>Julio 2006</b>	145,8 ± 27,4	146,6 ± 44,1	127,6 ± 14,4	138,4 ± 12,6
<b>Agosto 2006</b>	152,6 ± 23,9	169,8 ± 17,1	148,6 ± 27,0	153,4 ± 27,9
<b>Septiembre 2006</b>	174,8 ± 16,5	171,8 ± 27,4	162,4 ± 12,8	169,6 ± 24,2
<b>Octubre 2006</b>	175,0 ± 6,8	179,4 ± 11,8	165,4 ± 13,8	157,6 ± 33,4
<b>Noviembre 2006</b>	149,0 ± 12,8	171,2 ± 24,1	152,2 ± 25,4	159,2 ± 10,5
<b>Mayo 2007</b>	172,6 ± 7,0	172,8 ± 7,5	125,8 ± 25,7	127,8 ± 13,5

<sup>a</sup>Media ± Desviación típica (cm) (n=5)

En la Tabla 7.6 se muestran un resumen de los resultados obtenidos por el programa SAS al analizar los datos mediante un ANOVA empleando un modelo mixto. No hay efecto del Tratamiento, ni de sus interacciones, por tanto se puede decir que el empleo de aceites minerales no tiene ningún efecto en la altura alcanzada por los patrones. Los factores Mes y Variedad sí que son significativos junto con su interacción.

**Tabla 7.6: Resumen salida programa SAS, para el análisis (ANOVA modelo mixto) del efecto de la aplicación de aceites minerales en la altura alcanzada por los patrones Mariana GF8-1 y Nemaguard en la parcela de Llíria durante un ciclo vegetativo (2006) y mayo 2007**

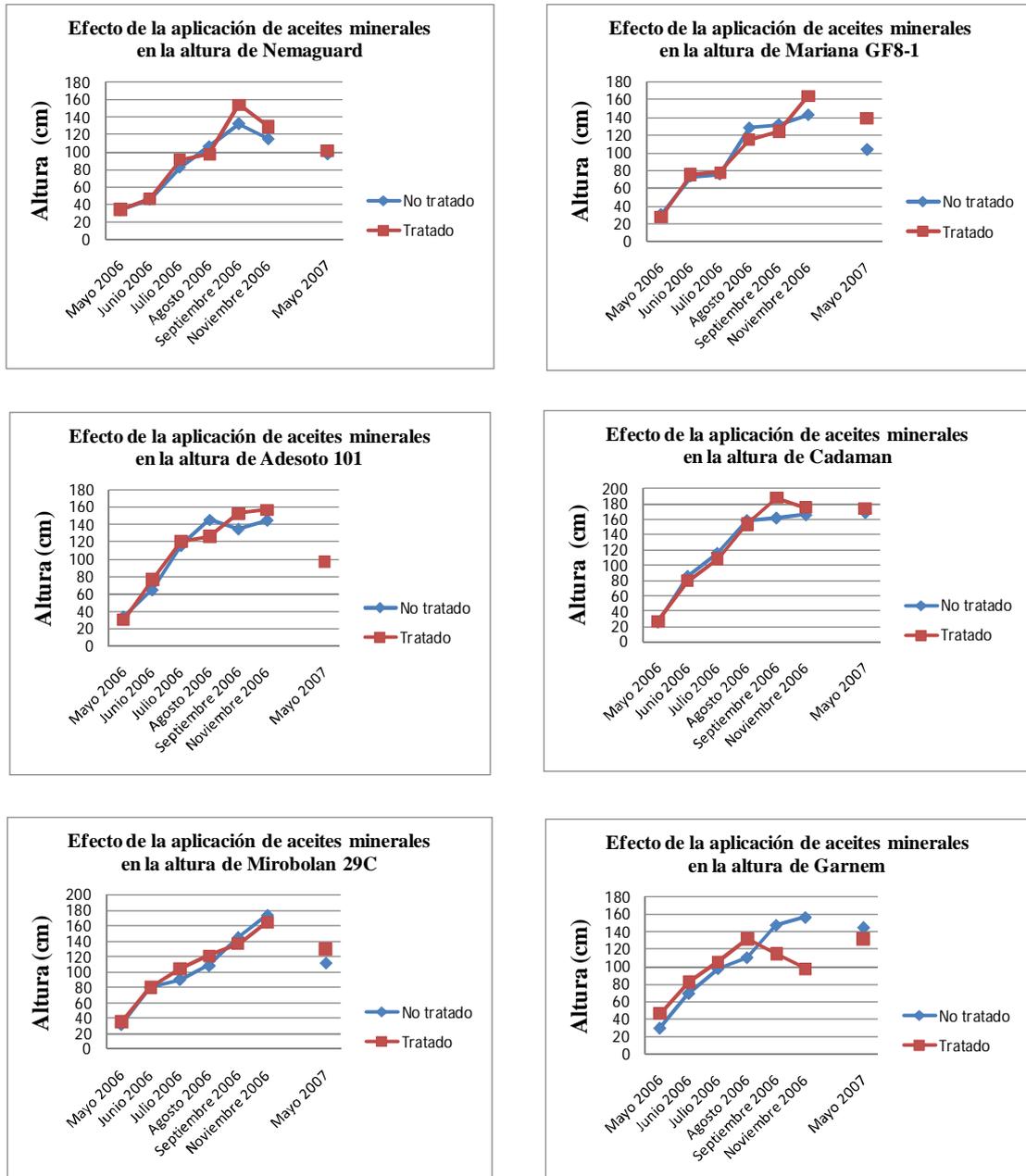
Efecto	g.l. numerador	g.l. denominador	F-Valor	Pr > F <sup>a</sup>
<b>Mes</b>	8	93,5	22,56	<,0001
<b>Patrón</b>	1	42,4	467,05	<,0001
<b>Tratamiento</b>	1	97,1	2,56	0,1132
<b>Mes x Patrón</b>	8	42,4	5,26	<,0001
<b>Mes x Tratamiento</b>	8	42,6	0,67	0,7178
<b>Patrón x Tratamiento</b>	1	22	0,31	0,5836

<sup>a</sup>(Pr > F) < 0,05 indica diferencias significativas mediante la técnica ANOVA (n=5) aplicando un modelo mixto

7.4.2.1.2 Parcela de Carlet

El valor medio de la altura alcanzada por cinco plantas tratadas con aceites y cinco plantas no tratadas con aceites por patrón estudiado en la parcela de Carlet se muestra en la Figura 7.4.

**Figura 7.4: Altura alcanzada (cm) por plantas tratadas y plantas no tratadas de diferentes patrones de frutales de hueso en la parcela de Carlet a lo largo de un período vegetativo (2006) y mayo 2007**



En la Tabla 7.7 se exponen los resultados obtenidos al analizar los datos mediante el programa SAS.

**Tabla 7.7: Resumen salida programa SAS, para el análisis (ANOVA modelo mixto) del efecto de la aplicación de aceites minerales en la altura alcanzada por diferentes patrones de frutales de hueso en la parcela de Carlet durante un ciclo vegetativo (2006) y mayo 2007**

<b>Efecto</b>	<b>g.l. numerador</b>	<b>g.l. denominador</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F<sup>a</sup></b>
<b>Mes</b>	5	73,6	804,37	<,0001
<b>Patrón</b>	6	72,6	43,31	<,0001
<b>Tratamiento</b>	1	153	6,57	0,0113
<b>Mes x Patrón</b>	30	71,4	11,05	<,0001
<b>Mes x Tratamiento</b>	6	76,3	2,03	0,0712
<b>Patrón x Tratamiento</b>	5	26,7	1,77	0,1543

<sup>a</sup>(Pr > F) < 0,05 indica diferencias significativas mediante la técnica ANOVA (n=5) aplicando un modelo mixto

Los factores Mes, Patrón y Tratamiento y la interacción Mes x Patrón resultaron ser significativos. Además la interacción Mes x Tratamiento es significativa a un nivel de significación del 10%. Se realizó un análisis mes a mes y se aplicó la corrección de Bonferroni para las comparaciones entre las variedades (Tabla 7.8). Se observaron diferencias significativas en la altura entre los diferentes patrones de frutales de hueso a lo largo del período muestreado. En el caso del tratamiento con aceites minerales, sólo se encontraron diferencias significativas entre las plantas tratadas y no tratadas en septiembre de 2006 y únicamente en el patrón Cadaman, siendo mayor la altura en las plantas tratadas que en las no tratadas.

**Tabla 7.8: Media y desviación típica (cm) de la altura alcanzada por diferentes patrones de frutales de hueso en la parcela de Carlet durante un período vegetativo (2006) y mayo 2007**

Mes	Nemaguard		Mariana GF8-1		Adesoto 101		Cadaman		Mirobolan 29C		Garnem	
	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado
Mayo 2006	34,0 ± 7,5 <sup>a</sup>	34,1 ± 7,6 a	30,0 ± 2,7 a, b	27,4 ± 1,1 a, b	34,4 ± 5,0 a	30,4 ± 3,2 a	25,6 ± 1,1 b	27,0 ± 1,6 b	31,8 ± 4,2 a	35,6 ± 1,7 a	30,2 ± 5,3 a, b	46,2 ± 15,0 a, b
Junio 2006	46,2 ± 15,0 a	46,6 ± 22,2 a	73,2 ± 8,2 b	75,4 ± 3,0 b	65,2 ± 21,8 b	76,8 ± 35,8 b	85,6 ± 5,1 b	79,8 ± 4,3 b	80,2 ± 8,2 b	80,4 ± 9,7 b	70,0 ± 11,9 b	82,4 ± 4,6 b
Julio 2006	82,4 ± 4,6 a	91,6 ± 7,7 a	75,6 ± 6,4 a	78,0 ± 9,7 a	116,0 ± 8,7 b	120,8 ± 18,5 b	116,0 ± 8,5 b, c	108,4 ± 16,5 b, c	90,6 ± 7,1 b, c	104,4 ± 25,2 b, c	98,4 ± 10,6 a, b	106,2 ± 32,4 a, b
Agosto 2006	106,2 ± 32,4 a	97,6 ± 21,9 a	128,0 ± 15,4 a, b	115,2 ± 15,3 a, b	145,6 ± 17,6 b, c	126,2 ± 12,2 b, c	158,6 ± 7,9 c	153,6 ± 18,3 c	108,6 ± 20,3 a, b	121,4 ± 16,4 a, b	111,0 ± 18,1 a, b	132,0 ± 14,8 a, b
Septiembre 2006	132,0 ± 14,8 a, b	154,0 ± 23,0 a, b	131,8 ± 38,3 a	124,6 ± 24,9 a	135,2 ± 23,9 a, b	153,0 ± 34,6 a, b	161,8 ± 18,2 b	187,6 ± 11,9 c	145,2 ± 19,4 a, b	136,6 ± 28,3 a, b	148,0 ± 32,7 b	114,8 ± 39,6 b
Noviembre 2006	114,8 ± 39,6 a	129,0 ± 37,2 a	142,8 ± 21,4 b	164,4 ± 37,8 b	145,2 ± 15,8 a, b	157,0 ± 23,1 a, b	165,8 ± 6,1 b	174,8 ± 10,5 b	174,2 ± 16,0 b	164,6 ± 5,2 b	157,0 ± 16,8 b	97,6 ± 28,5 b
Mayo 2007	97,6 ± 28,5 a	101,4 ± 9,6 a	103,6 ± 34 a, b	139,0 ± 12,4 a, b	n.d <sup>c</sup>	97,0 ± 21,6 a	169,0 ± 14,1 c	173,8 ± 12,1 c	112,0 ± 10,2 a, b	130,0 ± 20,3 a, b	145,4 ± 27,1 b	132,0 ± 11,7 b

<sup>a</sup> Media ± Desviación típica (cm) (n=5)

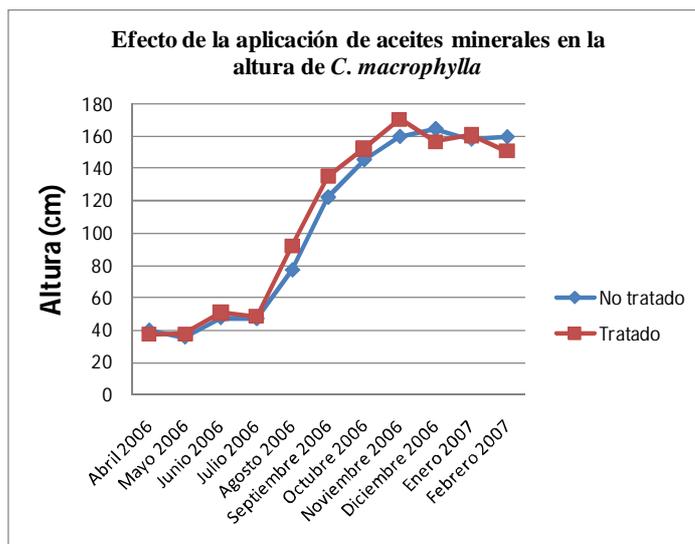
<sup>b</sup> Letras diferentes en la misma fila representan diferencias significativas mediante ANOVA (n=5) (p total < 0,05 aplicando la corrección de Bonferroni)

<sup>c</sup> No determinado

#### 7.4.2.1.3 Parcela de Moncada

En la Figura 7.5 y Tabla 7.9 se observa la evolución de la altura media alcanzada por cinco plantas tratadas con aceites y cinco plantas no tratadas con aceites del patrón de cítricos *Citrus macrophylla*.

**Figura 7.5: Altura alcanzada (cm) por plantas tratadas y plantas no tratadas de *Citrus macrophylla* en la parcela de Moncada desde abril 2006 a febrero 2007**



**Tabla 7.9: Media y desviación típica (cm) de la altura alcanzada por plantas tratadas y plantas no tratadas de *Citrus macrophylla* en la parcela de Moncada desde abril 2006 a febrero 2007**

Mes	No tratado	Tratado
<b>Abril 2006</b>	39,7 ± 9,4 <sup>a</sup>	37,3 ± 2,8
<b>Mayo 2006</b>	35,7 ± 2,1	37,6 ± 6,6
<b>Junio 2006</b>	47,6 ± 8,8	51,1 ± 3,0
<b>Julio 2006</b>	47,0 ± 7,4	48,4 ± 3
<b>Agosto 2006</b>	77,0 ± 22,8	92,0 ± 9,7
<b>Septiembre 2006</b>	122,0 ± 15,9	135,2 ± 6,8
<b>Octubre 2006</b>	145,4 ± 10,9	152,4 ± 11,7
<b>Noviembre 2006</b>	159,6 ± 11,6	170,6 ± 4,9
<b>Diciembre 2006</b>	164,4 ± 23,9	156,8 ± 13,2
<b>Enero 2007</b>	157,8 ± 13,7	160,8 ± 9,7
<b>Febrero 2007</b>	159,4 ± 9,7	151,0 ± 9,1

<sup>a</sup>Media ± Desviación típica (cm) (n=5)

En la Tabla 7.10 se muestra un resumen del análisis realizado con el programa SAS. Se puede observar que no hay efecto del factor Tratamiento en la altura alcanzada por las plantas, mientras que la altura de éstas depende del Mes. Por lo tanto, se puede decir, que el tratamiento con aceites minerales no ha afectado a la altura alcanzada por las plantas tratadas.

**Tabla 7.10: Resumen salida programa SAS, para el análisis (ANOVA modelo mixto) del efecto de la aplicación de aceites minerales en la altura alcanzada por *Citrus macrophylla* en la parcela de Moncada desde abril 2006 a febrero 2007**

Efecto	g.l. numerador	g.l. denominador	F-Valor	Pr > F <sup>a</sup>
Mes	10	17,9	336,71	< ,0001
Tratamiento	1	38,3	2,50	0,1222
Mes x Tratamiento	10	17,9	0,88	0,5711

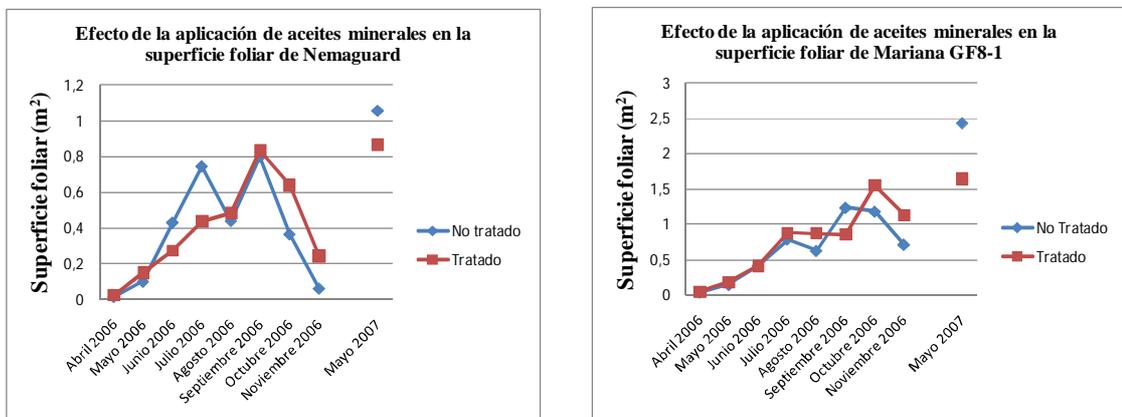
<sup>a</sup> ( $Pr > F$ ) < 0,05 indica diferencias significativas con la técnica ANOVA ( $n=5$ ) mediante un modelo mixto

#### 7.4.2.2 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en la superficie foliar de los patrones

##### 7.4.2.2.1 Parcela de Llíria

En la Figura 7.6 se muestra el valor medio de la superficie foliar alcanzado por cinco plantas tratadas y cinco plantas no tratadas de los patrones de frutales de hueso Mariana GF8-1 y Nemaguard en la parcela de Llíria.

**Figura 7.6: Media de la superficie foliar alcanzada (m<sup>2</sup>) por plantas tratadas y plantas no tratadas de los patrones Mariana GF8-1 y Nemaguard en la parcela de Llíria a lo largo de un período vegetativo (2006) y mayo 2007**



En la Tabla 7.11 se muestran los resultados obtenidos al analizar los datos con el programa SAS. El factor Tratamiento no resultó significativo. Sin embargo, se puede observar que los factores Mes y Patrón y las interacciones Mes x Patrón y Mes x Tratamiento sí lo fueron.

**Tabla 7.11: Resumen salida programa SAS, para el análisis (ANOVA modelo mixto) de la superficie foliar alcanzada por diferentes patrones de frutales de hueso en la parcela de Llíria durante un ciclo vegetativo (2006) y mayo 2007**

Efecto	g.l. numerador	g.l. denominador	F-Valor	Pr > F <sup>a</sup>
Mes	8	31,5	37,01	< ,0001
Patrón	1	37	60,28	< ,0001
Tratamiento	1	53,6	0,17	0,6787
Mes x Patrón	8	36,4	7,20	< ,0001
Mes x Tratamiento	8	34,2	2,75	0,0186
Patrón x Tratamiento	1	152	0,00	0,9972

<sup>a</sup>(Pr > F) < 0,05 indica diferencias significativas con la técnica ANOVA (n=5) mediante un modelo mixto

Debido a la significación de la interacción Mes x Tratamiento, se analizaron los datos mes a mes (Tabla 7.12). Existieron diferencias significativas en la superficie foliar entre las plantas tratadas y no tratadas en los meses de octubre y noviembre, la plantas tratadas siempre presentaron una mayor superficie foliar.

**Tabla 7.12: Media y desviación típica (m<sup>2</sup>) de la superficie foliar alcanzada por los patrones Mariana GF8-1 y Nemaguard en la parcela de Llíria durante un período vegetativo (2006) y mayo 2007**

	Mariana GF8-1		Nemaguard	
	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado
<b>Abril 2006</b>	0,040 ± 0,207 <sup>a</sup> <sup>b</sup>	0,048 ± 0,016a	0,015 ± 0,006b	0,0249 ± 0,0097b
<b>Mayo 2006</b>	0,152 ± 0,067a	0,183 ± 0,045a	0,101 ± 0,432a	0,1496 ± 0,0587a
<b>Junio 2006</b>	0,418 ± 0,156a	0,413 ± 0,234a	0,431 ± 0,118a	0,2735 ± 0,1011a
<b>Julio 2006</b>	0,792 ± 0,316a	0,878 ± 0,178a	0,746 ± 0,379a	0,4365 ± 0,1517a
<b>Agosto 2006</b>	0,629 ± 0,278a	0,873 ± 0,327a	0,440 ± 0,317a	0,4850 ± 0,2345b
<b>Septiembre 2006</b>	1,235 ± 0,314a	0,855 ± 0,262a	0,802 ± 0,449a	0,8322 ± 0,6220a
<b>Octubre 2006</b>	1,181 ± 0,319a	1,554 ± 0,481b	0,365 ± 0,225c	0,6375 ± 0,1982d
<b>Noviembre 2006</b>	0,714 ± 0,300a	1,135 ± 0,497b	0,062 ± 0,053c	0,2431 ± 0,1457d
<b>Mayo 2007</b>	2,428 ± 1,275a	1,645 ± 0,904a	1,057 ± 0,364b	0,8662 ± 0,2999b

<sup>a</sup> Media ± Desviación típica (m<sup>2</sup>) (n=5)

<sup>b</sup> Letras diferentes en la misma fila representan diferencias significativas mediante ANOVA (n=5)

Se puede apreciar en las Figuras 7.7 y 7.8 que la diferencia estadísticamente demostrada en la superficie foliar entre las plantas tratadas y no tratadas en los meses de octubre y noviembre se observó a simple vista en campo. Se observó un retraso en la caída de las hojas en las plantas tratadas, sobretodo de la variedad Mariana GF8-1.

**Figura 7.7: Aspecto de bloque no tratado (izquierda) y bloque tratado (derecha) de Mariana GF8-1 en la parcela de Lliria en noviembre de 2006**



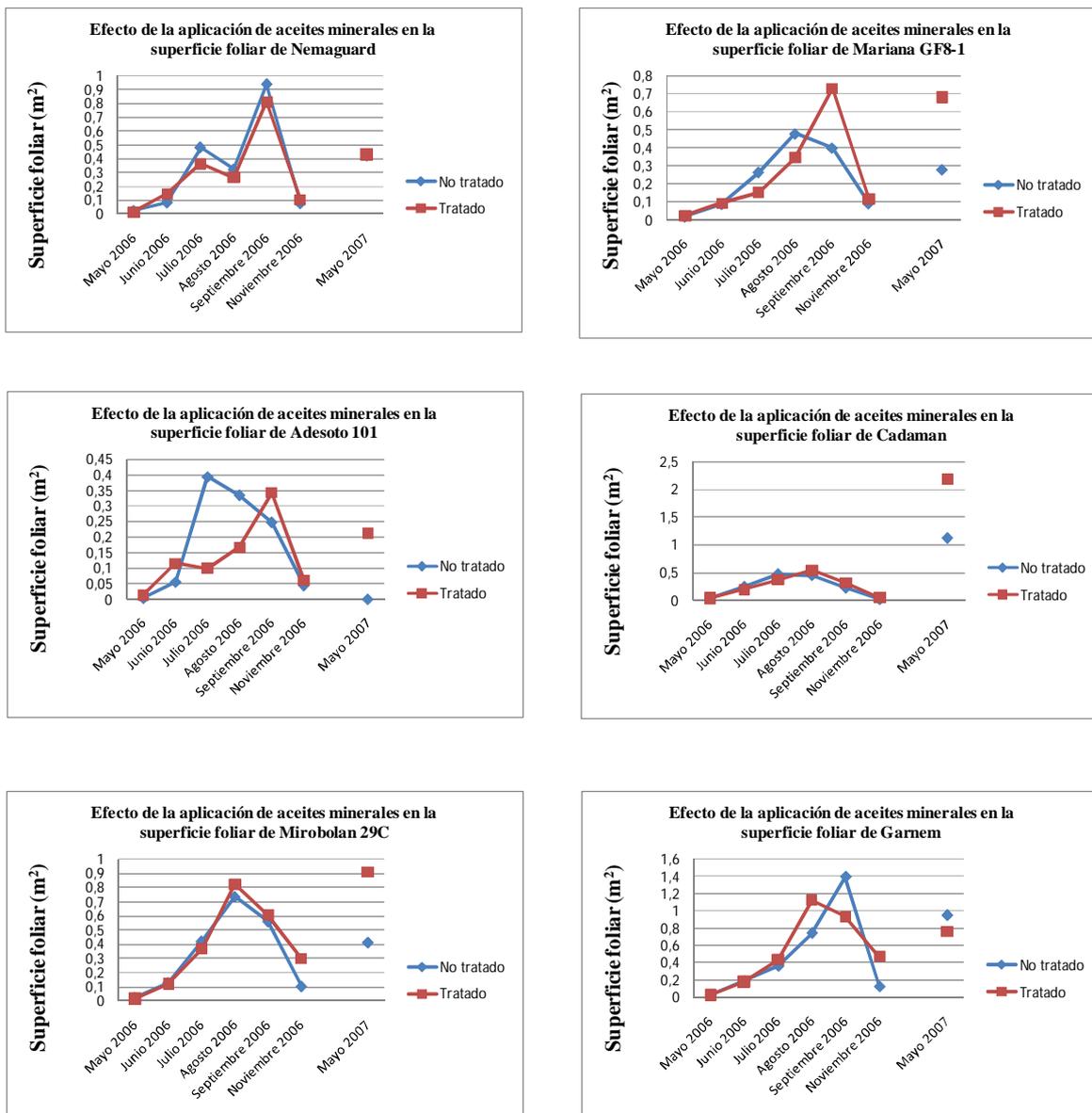
**Figura 7.8: Foto de bloque no tratado (izquierda) y bloque tratado (derecha) de Mariana GF8-1 en la parcela de Lliria en diciembre de 2006**



7.4.2.2 Parcela de Carlet

En la Figura 7.9 se muestra el valor medio de la superficie foliar alcanzado por cinco plantas tratadas y cinco plantas no tratadas de los patrones de frutales de hueso estudiados en la parcela de Carlet.

**Figura 7.9: Media de la superficie foliar alcanzada (m<sup>2</sup>) por plantas tratadas y plantas no tratadas de diferentes patrones de frutales de hueso estudiados en la parcela de Carlet a lo largo de un período vegetativo (2006) y mayo 2007**



En la Tabla 7.13 se puede observar un resumen de los resultados obtenidos por el programa SAS al analizar los datos. Se observa que los factores Tratamiento, Patrón y Mes son significativos. Además las interacciones Tratamiento x Mes y Mes x Variedad son significativas también. Debido a la significación de la interacción Tratamiento x Mes se analizó los datos mes a mes.

**Tabla 7.13: Resumen salida programa SAS, para el análisis (ANOVA modelo mixto) del efecto de la aplicación de aceites minerales en la superficie foliar alcanzada por diferentes patrones de frutales de hueso en la parcela de Carlet durante un ciclo vegetativo (2006) y mayo 2007**

Efecto	g.l. numerador	g.l. denominador	F-Valor	Pr > F <sup>a</sup>
Mes	5	146	35,58	< ,0001
Patrón	6	212	70,17	< ,0001
Tratamiento	1	221	5,32	0,0220
Mes x Patrón	30	241	9,81	< ,0001
Mes x Tratamiento	6	172	7,68	< ,0001
Patrón x Tratamiento	5	146	2,05	0,0753

<sup>a</sup> ( $Pr > F$ ) < 0,05 indica diferencias significativas con la técnica ANOVA ( $n=5$ ) mediante un modelo mixto

Al analizar los datos mes a mes mediante ANOVA y aplicando la corrección de Bonferroni (Tabla 7.14), se observó que existían diferencias significativas entre los diferentes patrones según el mes. Únicamente se detectaron diferencias significativas en la superficie foliar entre las plantas tratadas y no tratadas del patrón Garnem en noviembre de 2006 y en el patrón Cadaman en mayo de 2007. En ambas ocasiones la superficie foliar fue mayor en las plantas tratadas que en las no tratadas

**Tabla 7.14: Media y desviación típica (m<sup>2</sup>) de la superficie foliar alcanzada por diferentes patrones de frutales de hueso estudiados en la parcela de Carlet durante un período vegetativo (2006) y mayo 2007**

Mes	Nemaguard		Mariana GF8-1		Adesoto 101		Cadaman		Mirobolan 29C		Garnem	
	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado
<b>Mayo 2006</b>	0,026 <sup>a</sup> ± 0,014 <sup>a</sup>	0,0150 ± 0,012a	0,020 ± 0,006a	0,024 ± 0,014a	0,003 ± 0,004b	0,013 ± 0,009b	0,046 ± 0,023c	0,046 ± 0,012c	0,024 ± 0,005 a	0,019 ± 0,012a	0,0280 ± 0,013a	0,031 ± 0,006a
<b>Junio 2006</b>	0,087 ± 0,052a,c	0,1450 ± 0,170a,c	0,089 ± 0,049a	0,094 ± 0,054a	0,055 ± 0,0320a	0,116 ± 0,0791a	0,246 ± 0,1405b	0,200 ± 0,1183b	0,129 ± 0,066a, c	0,120 ± 0,041a, c	0,193 ± 0,091b, c	0,185 ± 0,702b, c
<b>Julio 2006</b>	0,482 ± 0,202a	0,365 ± 0,082a	0,266 ± 0,132a	0,154 ± 0,107a	0,394 ± 0,203a	0,100 ± 0,027a	0,482 ± 0,379a	0,374 ± 0,115a	0,421 ± 0,301a	0,370 ± 0,156a	0,364 ± 0,180a	0,438 ± 0,232a
<b>Agosto 2006</b>	0,324 ± 0,163a	0,264 ± 0,089a	0,480 ± 0,304a	0,347 ± 0,133a	0,336 ± 0,107a	0,166 ± 0,030a	0,457 ± 0,129a, b	0,545 ± 0,087a, b	0,737 ± 0,282b	0,824 ± 0,559b	0,749 ± 0,398b	1,125 ± 0,753b
<b>Septiembre 2006</b>	0,937 ± 0,245b	0,810 ± 0,133a, b	0,401 ± 0,181a, c	0,730 ± 0,428a, c	0,248 ± 0,119a	0,342 ± 0,162a	0,227 ± 0,078a	0,316 ± 0,075a	0,564 ± 0,218a, c	0,608 ± 0,210a, c	1,396 ± 0,448b	0,934 ± 0,386b, c
<b>Noviembre 2006</b>	0,080 ± 0,045a, c	0,104 ± 0,091a, c	0,093 ± 0,056a, c	0,118 ± 0,080a, c	0,044 ± 0,029a, c	0,062 ± 0,034a, c	0,017 ± 0,018a	0,051 ± 0,041a, c	0,103 ± 0,047a, c	0,298 ± 0,130b, c	0,129 ± 0,132a, c	0,476 ± 0,309b
<b>Mayo 2007</b>	0,424 ± 0,344a, b	0,431 ± 0,208a, b	0,281 ± 0,134a	0,682 ± 0,292a, b	n.d. <sup>c</sup>	0,214 ± 0,101a	1,135 ± 0,448b	2,180 ± 0,655c	0,414 ± 0,290a, b	0,908 ± 0,402a, b	0,952 ± 0,456a, b	0,766 ± 0,298a, b

<sup>a</sup> Media ± Desviación típica (m<sup>2</sup>) (n=5)

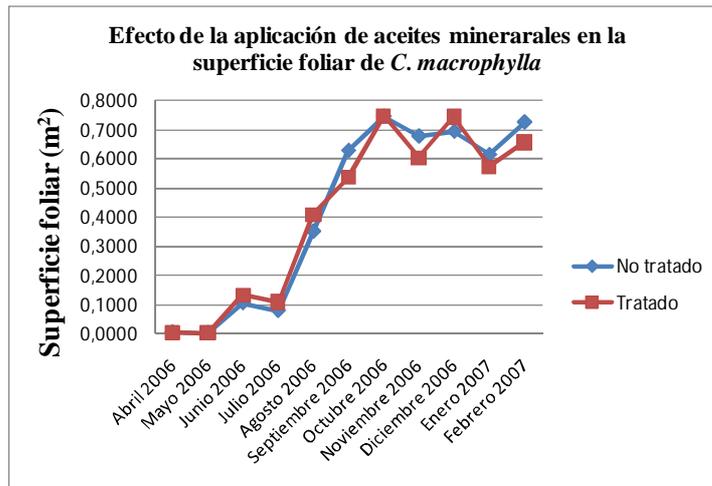
<sup>b</sup> Letras diferentes en la misma fila representan diferencias significativas mediante ANOVA (n=5) (p total < 0,05 aplicando la corrección de Bonferroni)

<sup>c</sup> No determinado

7.4.2.2.3 Parcela de Moncada

En la Figura 7.10 y en la Tabla 7.15 se puede observar el valor medio de la superficie foliar estimada en cinco plantas no tratadas y cinco plantas tratadas del patrón de cítricos *Citrus macrophylla* en la parcela de Moncada desde abril de 2006 a febrero de 2007.

**Figura 7.10: Media de la superficie foliar alcanzada (m<sup>2</sup>) por plantas tratadas y plantas no tratadas de *Citrus macrophylla* en la parcela de Moncada desde abril 2006 a febrero 2007**



**Tabla 7.15: Media y desviación típica (m<sup>2</sup>) de la superficie foliar estimada en plantas tratadas y plantas no tratadas de *Citrus macrophylla* en la parcela de Moncada desde abril 2006 a febrero 2007**

Mes	No tratado	Tratado
<b>Abril 2006</b>	0,005 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,005 ± 0,001
<b>Mayo 2006</b>	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,001
<b>Junio 2006</b>	0,105 ± 0,073	0,134 ± 0,050
<b>Julio 2006</b>	0,079 ± 0,017	0,109 ± 0,016
<b>Agosto 2006</b>	0,351 ± 0,042	0,409 ± 0,071
<b>Septiembre 2006</b>	0,628 ± 0,208	0,535 ± 0,063
<b>Octubre 2006</b>	0,745 ± 0,141	0,748 ± 0,126
<b>Noviembre 2006</b>	0,677 ± 0,058	0,605 ± 0,078
<b>Diciembre 2006</b>	0,693 ± 0,060	0,744 ± 0,248
<b>Enero 2007</b>	0,614 ± 0,073	0,573 ± 0,063
<b>Febrero 2007</b>	0,726 ± 0,100	0,658 ± 0,196

<sup>a</sup> Media ± Desviación típica (m<sup>2</sup>) (n=5)

**Tabla 7.16: Resumen salida programa SAS, para el análisis (ANOVA modelo mixto) del efecto de la aplicación de aceites minerales en la superficie foliar estimada para *Citrus macrophylla* en la parcela de Moncada desde abril 2006 a febrero 2007**

Efecto	g.l. numerador	g.l. denominador	F-Valor	Pr > F <sup>a</sup>
Mes	10	88	87,90	< ,0001
Tratamiento	1	88	0,23	0,6317
Mes x Tratamiento	10	88	0,88	0,7766

<sup>a</sup> ( $Pr > F$ ) < 0,05 indica diferencias significativas con la técnica ANOVA ( $n=5$ ) mediante un modelo mixto

Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en la superficie foliar estimada entre las plantas tratadas y no tratadas. Por tanto, se puede decir que el tratamiento con aceites minerales no ha afectado a la superficie foliar desarrollada por las plantas.

#### **7.4.3 Otros efectos producidos por el tratamiento con aceites minerales en las plantas**

A parte de los efectos evaluados, altura y superficie foliar, se observaron otros efectos provocados por la reiterada aplicación de aceites minerales en las plantas.

En la parcela de Lliria se observó en los meses de octubre y noviembre de 2006 que en algunas plantas de Mariana GF8-1 de los bloques tratados aparecieron quemaduras en la punta de sus hojas, en la zona donde se acumula el aceite (Figura 7.11).

**Figura 7.11: Bloque de Mariana GF8-1 tratado con aceites minerales en octubre 2006**

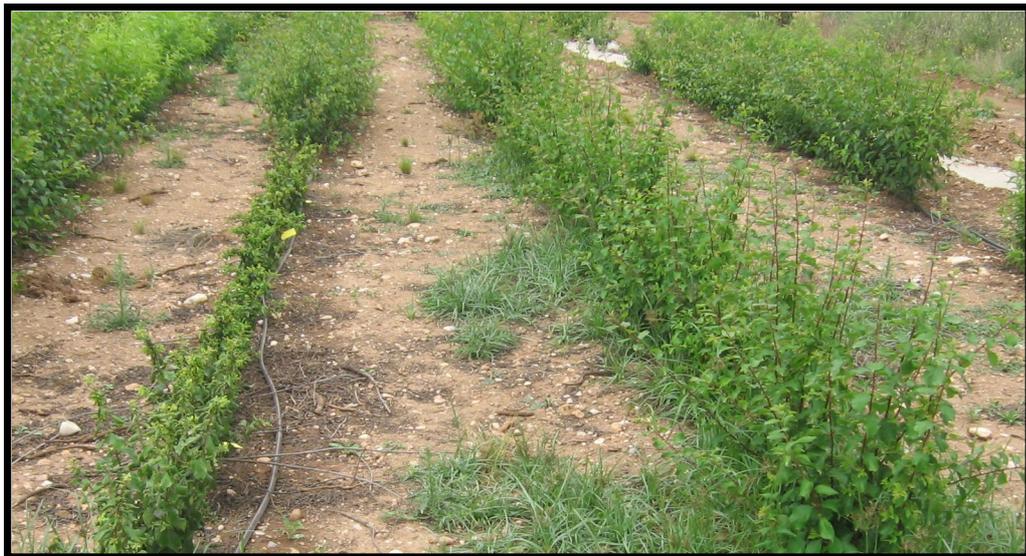


En la parcela de Carlet se produjo un ataque muy importante de *Aphis spiraecola* en mayo de 2007. El patrón más afectado fue Adesoto 101, en el cual se apreciaron daños masivos en las plantas no tratadas (Figuras 7.12 y 7.13). En los bloques tratados de todos los patrones, no se apreció la formación de colonias del pulgón ni daños (Figuras 7.13 y 7.14).

**Figura 7.12: Plantas de Adesoto 101 atacadas por el pulgón *A. spiraecola* en mayo 2007 en la parcela de Carlet**



**Figura 7.13: Bloques de Adesoto 101 no tratado (izquierda) y tratado (derecha) en mayo de 2007 en la parcela de Carlet**



**Figura 7.14: Bloque de Mirobolan 29C no tratado (izquierda) y tratado (derecha) en mayo de 2007 en la parcela de Carlet**



Además se observó una reducción en la incidencia de oídio en los veranos de 2006 y 2007 en las plantas tratadas en ambas parcelas en los patrones Nemaguard y Garnem (únicos patrones afectados por dicha enfermedad) (Figura 7.15).

**Figura 7.15: Bloques de Nemaguard no tratado (izquierda) y tratado (derecha) en julio de 2007 en la parcela de Lliria**



## 7.5 DISCUSIÓN

En el presente Capítulo se ha evaluado el efecto de los tratamientos con aceites minerales sobre la incidencia viral de dos virus con dos modos de transmisión distintos, PPV (no persistente) y CTV (semipersistente). En ambos casos el tratamiento con aceites minerales no ha logrado impedir la infección, aunque pueden extraerse diferentes conclusiones en cada uno de ellos.

En el caso de PPV se estudió la respuesta de los aceites minerales en dos escenarios totalmente diferentes, uno con alta densidad de inóculo viral y otro con baja densidad. Con una alta densidad de inóculo no se logró impedir la infección, pero sí que se redujo significativamente la infección en el patrón Mariana GF8-1, después de un año de cultivo. Estos resultados animarían al uso de aceites minerales para la reducción de la dispersión viral en zonas donde la presión de inóculo fuera menor, como el caso de los viveros. Sin embargo, los resultados obtenidos bajo una baja densidad de inóculo, no mostraron diferencias significativas entre las plantas tratadas y las no tratadas.

El efecto de la aplicación de aceites minerales en el control de la dispersión de virus vegetales depende de varios factores (Vanderveken, 1977; Simons, 1982). Uno de estos factores es la presión de inóculo presente en la zona. Cuando el inóculo viral aumenta, la efectividad del tratamiento con aceites minerales para el control del virus disminuye (Simons y Zitter, 1980; Umesh et al., 1995). Por tanto, la alta presión de inóculo presente en la parcela de vivero experimental de Llíria podría explicar el fracaso en el control de PPV en las condiciones ensayadas. Simons y Zitter (1980), citaron que bajo las condiciones de Florida (EEUU), los tratamientos con aceites minerales llegan a ser inefectivos contra virus no persistentes en cultivos hortícolas cuando el nivel de infección oscila entre el 10-20%. Sin embargo, uno de los factores más importantes a la hora de instalar un vivero de frutales de hueso es la ausencia de huéspedes infectados por PPV en la vecindad del mismo.

En la actualidad, hay pocos estudios epidemiológicos dedicados a evaluar el efecto de una zona de seguridad (“buffer”) entre una planta huésped infectada y una parcela de vivero. El consenso general es que 500 metros es una distancia prudente para minimizar el riesgo de contaminación. Sin embargo, según la legislación vigente (Real Decreto 929/1995), “las parcelas de producción de plantas de vivero certificadas tendrán un aislamiento mínimo de 3 metros con cualquier plantación comercial o plantas aisladas del mismo género. Dicha distancia de aislamiento se mantendrá en barbecho total. Las plantas madre de planta certificada estarán separadas al menos 100 metros de cualquier otra planta del mismo género no certificada. En el caso de patrones ésta distancia podrá ser de 50 metros”.

Estas distancias de seguridad quizás no sean suficientes para asegurar un riesgo mínimo de contaminación. Por lo tanto, solamente la ausencia de huéspedes infectados de PPV dentro de las instalaciones del vivero puede garantizar la

producción de plantas libres de PPV. Así, la combinación de una baja densidad de inóculo, lograda con un adecuado aislamiento de las zonas de cultivo y/o de *Prunus* aislados, junto a la aplicación de tratamientos con aceites minerales podría ayudar a reducir la dispersión de PPV en los bloques de vivero.

En la parcela situada en Carlet, con baja densidad de inóculo, durante los primeros 6 meses de cultivo no se produjo dispersión de PPV entre las plantas tratadas, ya que sólo hubo infecciones entre las plantas situadas en los bloques control. En noviembre de 2007 un número similar de infecciones ocurrieron entre las plantas tratadas y control. Las plantas tratadas infectadas estuvieron localizadas muy cerca de las primeras plantas infectadas en noviembre de 2006 (Anejos, Figura A.2). Este fenómeno podría ser explicado por la cercanía de los bloques tratados y los bloques control (Simons y Zitter, 1980; Web y Linda, 1993). Los bloques de plantas tratadas con aceites fueron constantemente expuestos a pulgones que podrían haber adquirido el virus de los bloques control (Web y Linda, 1993). Otro hecho que apoya esta hipótesis, fue la detección de un nuevo foco de infección, relativamente alejado del primero entre las plantas no tratadas, carentes de protección frente a los pulgones virulíferos (Anejos, Figura A.2).

La lluvia influye en la efectividad de los tratamientos con aceites, ya que puede eliminar la capa de aceite que recubre la planta (Hooks y Fereres, 2006). La mayor cantidad de agua caída en abril de 2007 en comparación con abril de 2006 (64 mm en abril 2006 y 135 mm en abril de 2007, Anejos, Figura A.1) pudo haber influido también negativamente en la efectividad lograda por el aceite en la parcela de Lliria.

Otro factor importante involucrado en la efectividad de la aplicación de aceites minerales es la cobertura de las plantas (Vanderveken, 1977; Simons, 1982). Bradley (1963) y Vanderveken (1968), observaron que las características de las plantas tratadas no tienen influencia en el efecto de los tratamientos con aceites minerales contra virus no persistentes en cultivos hortícolas (tabaco, patata, pimiento, colza, guisantes). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales en la parcela de Lliria, se observó que la persistencia del aceite mineral era mayor en el patrón Mariana GF8-1 que en Nemaguard. Este hecho podría explicar las diferencias en el efecto de los aceites minerales en ambos patrones ensayados. La orientación, tamaño, forma y características de la superficie de las hojas, además de la flexibilidad de las ramas pueden influir en la uniformidad de la deposición del aceite (Furness y Combella, 2002). Asjes y Blom-Barnhoorn (2002) observaron diferencias en la efectividad de la aplicación de aceites minerales contra el virus asintomático del lirio (*Lily symptomless virus, Carlavirus*) y el virus del moteado del lirio (*Lily mottle virus, Potyvirus*) entre dos variedades de lirio debido a la estructura y características foliares, siendo el control superior en la variedad "Vivaldi" que tenía un mayor número de hojas superiores que impedían el acceso de pulgones a las hojas inferiores, donde la pulverización fue menos efectiva.

La gran densidad de plantas presentes en un vivero de frutales de hueso hace difícil la aplicación de aceites minerales. Por esta razón, es fundamental utilizar correctos sistemas de aplicación para cubrir toda la superficie de la planta. Hay una gran variedad de tecnología disponible para la aplicación de aceites minerales (Furness y Combellack, 2002). Esta tecnología debe ser evaluada y ensayada para mejorar la eficiencia del tratamiento en explotaciones comerciales de viveros de frutales de hueso.

Con CTV, se ha observado que el tratamiento con aceites minerales, no ha evitado ni reducido la incidencia viral entre las plantas tratadas y no tratadas, en las condiciones ensayadas, con alta presión de inóculo. Por tanto, las mismas consideraciones expuestas para PPV se harían para el caso de CTV. La alta presión de inóculo en la zona, hizo que la aplicación de aceites minerales no pudiera controlar la dispersión del virus. El efecto de aceites minerales en la dispersión de CTV fue probado por Powell et al. (1997) en árboles adultos, junto con otros productos. Se observó que el aceite no logró impedir la infección tras cinco años, aunque el número de árboles infectados en los bloques tratados con aceites era menor que en los bloques control o en bloques tratados con Aldicarb (Temik). Estas diferencias se observaron para aislados suaves del virus pero no para los virulentos. Por lo tanto, la aplicación de tratamientos con aceites minerales para impedir la dispersión de CTV en bloques de vivero debería ser evaluado en condiciones de inóculo menos intensas.

No se observaron colonias de pulgones en las plantas tratadas con aceites minerales en mayo 2007 en la parcela de Carlet, sugiriendo una reducción de las poblaciones de pulgones debido a los tratamientos con aceites minerales. Este fenómeno también fue observado por Najjar-Rodríguez et al. (2007) con *Aphis gossypii* en algodón, tanto en condiciones de invernadero como de campo. Este hecho podría ser determinante en el caso de virus semipersistentes, como el caso de CTV, o persistentes. Según Perring et al. (1999) la reducción lograda en la transmisión de virus semipersistentes o persistentes mediante aceites minerales, se produce por la reducción en la población de insectos vectores.

La aplicación reiterada de aceites minerales puede desarrollar efectos no deseados en las plantas tratadas. Así se ha citado que el uso de aceites minerales puede disminuir la tasa fotosintética (Gudin et al., 1976; Feree y Hall, 1975; Feree, 1976). Esta reducción en la tasa fotosintética se traduce en una pérdida de cosecha (Spotts et al., 1975; Web y Linda, 1993). Además el empleo de aceites mineral puede retrasar la concentración de sólidos solubles en las uvas de vides tratadas con aceites contra el oidio o reducir la transpiración de las plantas (Northover y Scheider, 1996; Finger et al., 2002, Hodkinson, 2002a).

En este estudio se ha observado que la aplicación reiterada de aceites minerales no redujo la altura de las plantas tratadas frente a las plantas control tanto en patrones de frutales de hueso como en *Citrus macrophylla* como patrón de

cítricos. La superficie foliar de las plantas tratadas no se vio afectada por los tratamientos con aceites minerales en el caso de *C. macrophylla*. Sin embargo, se observó que la aplicación de aceites minerales produce un retraso de la caída de la hoja en algunos de los patrones estudiados de frutales de hueso. Este último hecho no había sido citado hasta el momento.

La abscisión y la senescencia están determinadas por los equilibrios entre las hormonas reguladoras del crecimiento: etileno, auxinas, ácido abscísico y citoquininas. La aplicación de aceites minerales puede variar los equilibrios entre ellas (Johnson et al., 2002). En cítricos, la aplicación de aceites minerales en situaciones de estrés para la planta (como estrés hídrico), puede estimular la segregación de etileno y provocar la senescencia de las hojas (Johnson et al., 2002). Del mismo modo una falta de transpiración, producida por la aplicación de aceites minerales, produce que el aporte de citoquininas (responsables de la división celular) a las hojas se vea disminuido. Si en las hojas, los procesos de degradación de las citoquininas son dominantes a los procesos de aporte se iniciará la senescencia (Johnson et al., 2002). En nuestro caso sucede lo contrario. Los factores que pueden determinar la respuesta de las plantas a los aceites son variables y depende de las características de la propia planta, del aceite empleado, de la dosis usada y de las condiciones ambientales (Hodgkinson et al., 2002).

Como citamos en la introducción, los aceites minerales se usan en el control de hongos como oídios (Northover y Scheider, 1996; Hernández Riesco et al., 2002, Nicetic et al., 2002). Esto explicaría la reducción de los efectos del oídio entre los bloques tratados con aceite en los patrones Nemaguard y Garnem.

En conclusión, el tratamiento con aceites minerales es un método de protección de cultivos “limpio” y que no implica ningún tipo de perjuicio para las plantas de vivero. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que junto con otras medidas de control como adecuadas distancias de separación entre el vivero y los bloques de otras parcelas, cultivo bajo malla, utilización de patrones resistentes etc..., podría aplicarse en bloques de vivero, al menos de frutales de hueso contra PPV. En el caso de CTV se tendría que evaluar su eficiencia con otras condiciones experimentales.

Para aplicarse a gran escala los tratamientos con aceites minerales, deben de ensayarse con otro tipo de patrones y con otras condiciones meteorológicas. Al mismo tiempo, la optimización de la maquinaria y de las condiciones de trabajo son esenciales para lograr el éxito en los tratamientos. No obstante, en un futuro, muy probablemente pueden llegar a ser de los pocos tratamientos autorizados, ya que no implican la aparición de residuos.

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

---

1) Los patrones Adesoto 101 y Mariana GF8-1 resultaron los más susceptibles a la infección natural por PPV-D, seguidos por Nemaguard y Mirobolan 29C que presentaron una susceptibilidad media. Los patrones Cadaman y Garnem se comportaron como resistentes frente a los aislados de PPV-D presentes en el área experimental. Esta evaluación es la primera que se efectúa en condiciones naturales en patrones de *Prunus* cultivados en vivero. Los datos obtenidos confirman la alta sensibilidad de los ciruelos previamente determinada por inoculación por injerto y muestra la susceptibilidad de Mirobolán 29C, no reportada previamente. También se puso de manifiesto el interés del uso de los patrones híbridos Cadaman y Garnem debido a su resistencia a PPV-D.

2) El pico poblacional de pulgones, estimado tanto con trampas amarillas de Moericke como por el método de la planta pegajosa, se produjo en el mes de mayo, en los dos viveros experimentales de frutales de hueso establecidos. El número medio de pulgones totales que visitaron una planta de vivero en la parcela de Lliria durante el mes de mayo de dos años consecutivos fue de 38,1 mientras en el caso de la parcela de Carlet fue de 36,7.

3) *Aphis spiraecola* Pagenstecher resultó la especie de pulgón predominante en la zona de establecimiento de los viveros experimentales de frutales de hueso, (estimada mediante trampas de Moericke) y fue la especie que más aterrizó o visitó los patrones establecidos en vivero (estimada mediante plantas pegajosas). Otras especies abundantes fueron *A. gossypii* Glover y *Hyalopterus pruni* Geoffroy. Las especies encontradas en vivero coinciden con los previamente determinadas en plantaciones comerciales, aunque no su frecuencia relativa ya que en vivero se capturaron poblaciones menores de *A. gossypii*.

4) El porcentaje de pulgones PPV-virulíferos que sobrevolaron el vivero de frutales de hueso y/o aterrizaron en plantas, fue tres veces superior en la zona con una alta densidad de inóculo (30,32%) que en la zona con una baja densidad de inóculo (7,98%). El método de “Squash” RT-PCR a tiempo real ha sido efectivo en la determinación indirecta de la densidad de inóculo y pudiera ser utilizado como sistema de alerta en viveros para detección temprana de la visita de pulgones virulíferos.

5) No se ha demostrado preferencia de los pulgones visitantes por ningún tipo de patrón de frutal de hueso. Los pulgones parecen aterrizar sobre las plantas en un vivero de frutales de forma aleatoria. Del mismo modo, la proporción de pulgones PPV-virulíferos capturada en los diferentes patrones de hueso analizados en las dos localidades de muestreo, no fue significativamente distinta.

- 6) No se ha encontrado una relación directa entre el número de pulgones que aterrizan en una planta de vivero y la superficie foliar de los patrones de *Prunus* estudiados, a pesar de observarse diferencias significativas entre la superficie foliar de los mismos.
- 7) Se confirmó la alta susceptibilidad de *Citrus macrophylla* a la infección natural por CTV. Esto implica que en zonas con inóculo, por escaso que sea, y alta intensidad vectorial sea necesario establecer medidas de control para evitar la infección de esta especie muy utilizada como patrón de cítricos.
- 8) Las capturas realizadas en el mes de mayo mediante trampas amarillas de Moericke y el método de la planta pegajosa registraron el mayor pico poblacional de pulgones en el vivero experimental de *C. macrophylla*. Siendo el número medio de pulgones totales que visitaron una planta de vivero durante ese mes de 387,9.
- 9) La especie de pulgón predominante en el vivero experimental de *C. macrophylla* fue *A. spiraecola* tanto en trampas de Moericke como en plantas pegajosas. Otras especies predominantes mediante plantas pegajosas fueron *A. gossypii* y *H. pruni*.
- 10) La técnica molecular “Spot” RT-PCR a tiempo real se ha validado, en comparación con la técnica serológica ELISA-DASI, para su uso en la detección de PPV en plantas de vivero. Se ha obtenido una coincidencia casi perfecta entre ambas, calculada mediante el índice kappa de Cohen. La técnica molecular ha resultado ser más sensible mientras que la técnica serológica ha resultado más específica. Por ello, se recomienda el uso de ELISA-DASI en inspección rutinaria para la detección de PPV y el análisis por ambas técnicas en muestras donde se requiera precisión casi total en los individuos negativos (plantas madre, material base y plantas para exportación).
- 11) La técnica ELISA-DASI permite la mezcla en muestras compuestas de cuatro plantas sin pérdida de precisión en la detección de PPV. Existen diferencias significativas en la precisión en la detección de muestras compuestas mediante ELISA-DASI a lo largo del año. Las mejores épocas para detección son primavera y verano, seguida de otoño. En invierno no se aconseja el empleo de muestras compuestas debiendo analizarse las plantas individualmente.
- 12) La técnica de detección molecular “Spot” RT-PCR a tiempo real fue capaz de detectar PPV en muestras compuestas de hasta 10 plantas independientemente del número de plantas negativas presentes sin perder precisión. No se encontraron diferencias en la precisión de la detección de PPV al utilizar muestras compuestas a lo largo del periodo vegetativo incluido el periodo de dormancia.

13) Se han aplicado con éxito los modelos latentes en la estimación de los parámetros de diagnóstico de PPV de ambas técnicas de detección de PPV. Este sistema puede aplicarse a cualquier método de detección y de diagnóstico de agentes fitopatógenos.

14) La técnica molecular “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real se ha validado para detección de CTV en plantas de vivero y en árboles adultos y se ha comparado con Inmunoimpresión-ELISA. La coincidencia en los resultados de ambas técnicas, medida mediante el índice kappa de Cohen, es substancial (0,76). La técnica molecular ha resultado ser más sensible, mientras que la técnica serológica ha resultado ser más específica. Se recomienda el uso de Inmunoimpresión-ELISA para la detección rutinaria de CTV y el análisis por ambas técnicas en muestras donde se requiera precisión casi total de los individuos negativos.

15) La aplicación de aceites minerales ha logrado reducir significativamente la infección natural de PPV en el patrón Mariana GF8-1 en condiciones de alta densidad de inóculo, aunque no logró impedirla.

16) El uso de aceites minerales en condiciones de alta presión de inóculo de CTV no ha logrado reducir la infección natural en el patrón *C. macrophylla*. No obstante, antes de descartar el uso de aceites minerales en el control de CTV se deberían ensayar otras condiciones experimentales con menor nivel de inóculo.

17) La aplicación reiterada de aceites minerales como medida de control no ha perjudicado al desarrollo vegetativo de los patrones cultivados. Se ha observado un retraso en la caída de las hojas en plantas tratadas en algunos patrones de frutales de hueso como Mariana GF8-1 y Nemaguard. Además, no se han observado colonias establecidas de pulgones en las plantas tratadas y se ha observado una reducción de síntomas causados por oídio en los patrones Nemaguard y Garnem.

18) El conocimiento básico generado en esta Tesis Doctoral podrá servir para diseñar estrategias de control con base epidemiológica que con la aplicación de las técnicas de detección validadas, contribuirá decisivamente en el control integrado de PPV y CTV en plantas de vivero. El uso de aceites minerales en los momentos de visita de pulgones virulíferos, conjuntamente con otras medidas (utilización de mallas anti-pulgón, uso de patrones poco susceptibles o resistentes, intercalado de patrones resistentes entre bloques de susceptibles, emplazamiento del vivero en zonas sin huéspedes infectados), puede ser aplicado en la reducción y/o control de PPV y CTV en vivero, como una estrategia más de control integrado de plagas con residuo cero

## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

---

- **Abraira, V. 2001.** El índice kappa. *SEMERGEN* **27**: 247-249.
- **Agnello, A.M. 2002.** Petroleum-derived spray oils: chemistry, history, refining and formulation *In: Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 2-18.
- **Agustí, M. 2000.** Citricultura, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 416p.
- **Albertini, D., Vogel, R., Bové, C., Bové, J.M. 1988.** Transmission and preliminary characterization of *Citrus tristeza strain K*. *In: Proceedings of the 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists*. Edited by Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L. IOCV, Riverside, USA. pp. 17-21.
- **Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., Hermoso de Mendoza, A., Laigret, F., Ballester-Olmos, J.F., Moreno, P. 2000.** Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* **90**: 134-138.
- **Allen, W.R., Tehrani, B., Luft, R. 1993.** Effects of horticultural oil, insecticidal soap and film-forming products on western flower thrips and *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease* **77**: 915-918.
- **Altman, D.G., Bland, J.M. 1994a.** Diagnostic tests 1: Sensitivity and specificity. *British Medical Journal* **308**: 1552.
- **Altman, D.G., Bland, J.M. 1994b.** Diagnostic tests 2: Predictive values. *British Medical Journal* **309** : 102.
- **Alonzo, T.A., Pepe, M.S. 1999.** Using a combination of reference tests to assess the accuracy of a new diagnostic test. *Statistics in Medicine* **18**: 2987-3003.
- **Álvarez-Álvarez, A., Feito, I., Seco-Fernández, M.V. 2004.** Dinámica de vuelo de los áfidos (*Homoptera: Aphididae*) plaga de la judía de Asturias (*Phaseolus vulgaris* L.) y su relación con las condiciones ambientales. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **30**: 533-546.

- **Anónimo. 2009.** Anuario de Estadística 2008. Ministerio de Medio Ambiente Medio Rural y Marino. Madrid, Spain. <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2008/indice.asp>.
- **Asíns, M.J., Bernet, G.P., Ruiz, C., Cambra, M., Guerri, J., Carbonell, E. 2004.** QTL analysis of *Citrus tristeza virus*–citradia interaction. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 1145-1154.
- **Asjes, C.J. 2000.** Control of aphid-borne *Lily symptomless virus* and *Lily mottle virus* in *Lilium* in the Netherlands. *Virus Research* **71**:23-32.
- **Asjes, C.J., Blom-Barnhoorn, G.J. 2001.** Control of aphid-vectored and thrips-borne virus spread in lily, tulip, iris and dahlia by sprays of mineral oil, polydimethylsiloxane and pyrethroid insecticide in the field. *Annals of Applied Biology* **139**: 11-19.
- **Asjes, C.J., Blom-Barnhoorn, G.J. 2002.** Use of agricultural mineral oils and pyrethroid insecticides to control aphid vector spread of *Lily symptomless virus* and *Lily mottle virus* in *Lilium*. In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R. N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 547-551.
- **Atanassov, D. 1932.** Plum pox. A new virus disease. *Annals of the University of Sofia: Faculty of Agriculture and Silviculture* **11**: 49-69.
- **Avinent, L., Hermoso de Mendoza, A., Llácer, G. 1993.** Comparison of traps for capture of alate aphids (*Homoptera, Aphidinea*) in apricot tree orchards. *Agronomie* **11**: 613-618.
- **Avinent, L., Hermoso de Mendoza, A., Llácer, G. 1994.** Transmission of plum pox potyvirus in Spain. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **24**: 669-674.
- **Badenes, M.L., Llácer, G. 2006.** Breeding for resistance: breeding for *Plum pox virus* resistant apricots (*Prunus armeniaca*) in Spain. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**: 323-326.
- **Ballester-Olmos, J. F., Pina, J.A., Carbonell, E., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M., Navarro, L. 1993.** Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology* **42**: 219-229.
- **Barberá, C. 1989.** Pesticidas agrícolas. Editorial Omega, Barcelona, Spain, 603p.
- **Bar-Joseph, M., Marcus, R., Lee, R.F. 1989.** The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology* **27**: 291-316.

- **Baughman, A.L., Bisgard, K.M., Cortese, M.M., Thompson, W.W., Sanden, G. N., Strebel, P. M. 2008.** Utility of composite reference standards and latent class analysis in evaluating the clinical accuracy of diagnostic tests for Pertussis. *Clinical and Vaccine Immunology* **15**: 106-114.
- **Beattie, G.A.C. 2005.** Using petroleum-based spray oils in citrus. *Series Agfact: H2.AE.5*. Estate of New South West, Department of Primary Industries, Australia.
- **Beattie, G.A.C., Clift, A.D., Parkes, R.A., Jiang, L. 2002.** Impacts of spray volume and horticultural mineral oil concentration on control of pink wax and red scale in citrus orchards. In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 582-591.
- **Beattie, G.A.C., Liu, Z., Watson, D., Clift, A.D, Jiang, L. 1995.** Evaluation of PSOs and polysaccharides for control of *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae). *Journal of the Australian Entomological Society* **34**: 349-353.
- **Benavente, A., Ato, M., López, J.J. 2006.** Procedimientos para detectar y medir el sesgo entre observadores. *Anales de Psicología* **22**: 161-167.
- **Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., de Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J., Cambra, M. 2008.** Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* **120**: 177-188.
- **Bianchi, M.T., Alexander, B.M. 2006.** Evidence based diagnosis: does the language reflect the theory? *British Medical Journal* **333**: 442-445.
- **Boeglin, M., Dallot, S., Quiot, J.B. 2006.** Plum pox virus susceptibility of several *Prunus* rootstocks used for apricot. *Acta Horticulturae* **701**: 485-488.
- **Boiteau, G. 1990.** Effect of trap color and size on relative efficiency of water-pan traps for sampling alate aphids (*Homoptera: Aphididae*) on potato. *Journal of Economic Entomology* **83**: 937-942.
- **Boiteau, G., Singh, M., Lavoie, J. 2009.** Crop border and mineral oil spray used in combination as physical control methods of the aphid transmitted *Potato virus Y* in potato. *Pest Management Science* **65**: 255-259.
- **Boiteau, G., Vernon, R.S. 2001.** Physical barriers for the control of insect pests. In: *Physical control methods in plant protection*. Edited by Vincent, C., Panneton, B., Fleurat-Lessard, F. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp.224-247.

- **Bonferroni, C.E. 1936.** Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. *Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze* **8**: 3-62.
- **Boscia, D., Zeramdini, H., Cambra, M., Potere, O., Gorris, M.T., Myrta A. 1997.** Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of Plum pox potyvirus. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 447-480.
- **Bové, C., Vogel, R., Albertini, D., Bové, J.M. 1988.** Discovery of a strain of tristeza virus (K) inducing no symptoms in Mexican lime. *In: Proceedings of the 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists.* Edited by Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L. IOCV, Riverside, USA. pp. 14-16.
- **Bradley, R.H.D. 1963.** Some ways in which paraffin oil impedes aphid transmission of *Potato virus Y.* *Canadian Journal of Microbiology* **9**: 369-380.
- **Brascum, A.J., Gardner, I.A., Johnson, W.O. 2005.** Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through bayesian modelling. *Preventive of Veterinary Medicine* **68**: 145-163.
- **Brault, V., Ziegler-Graff, V., Richards, K.E. 2001.** Viral determinants involved in Luteoviurs-aphid interactions. *In: Virus-Insect-Plant Interactions.* Edited by Harris, K. F., Smith, O. P., Duffus, J. E. Academic Press, San Diego, pp. 207-232.
- **Broadbent, P., Bevington, K.B., Coote, B.G. 1991.** Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain cross protection. *In: Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists.* Edited by Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. IOCV, Riverside, USA. pp. 67-70.
- **Brooks, S.P., Gelman, A. 1998.** Alternative methods for monitoring convergence of iterative simulations. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **7**: 434-455.
- **Bruce, R., Teresa, L., Keenan, P., Keenan, J. 1987.** Diagnostic test comparisons in patients with deep venous thrombosis. *The Journal of Nuclear Medicine* **38**: 89-92.
- **Bruening, G. 2006.** Resistance to infection. *In: Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses.* Edited by Loebenstein, G., Carr, J.P. Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 211-240.

- **Bruessow, F., Asins, M.J., Jacas, J.A, Urbaneja, A. 2010.** Replacement of CTV-susceptible sour orange rootstock by CTV-tolerant ones may have triggered outbreaks of *Tetranychus urticae* in Spanish citrus. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **137**: 93-98.
- **Budnik, K., Laing, M.D., da Graça, J.V. 1996.** Reduction of yield losses in pepper crops caused by *Potato virus Y* in Kwazula-Natal, South Africa, using plastic mulch and yellow sticky traps. *Phytoparasitica* **24**: 119-124.
- **Byrt, T., Bishop, J., Carlin, J.B. 1993.** Bias, prevalence and kappa. *Journal of Clinical Epidemiology* **46**: 423-429.
- **Calvet, C., Estaún, V., Camprubí, A., Hernández-Dorrego, A., Pinochet, J., Moreno, M.A. 2004.** Aptitude for mycorrhizal root colonization in *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae* **100**: 39-49.
- **Cambra, M. 1983.** Diagnóstico del virus de la tristeza (CTV) mediante la técnica ELISA: interés y aplicaciones. *Levante Agrícola* **245**: 11-17.
- **Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J.A., Moyá, J.J., Vela, C., Sanz, A. 1994.** Detection of *Plum pox virus* using monoclonal antibodies to structural and no structural proteins. *OEPP Bulletin/EPPO Bulletin* **24**: 569-577.
- **Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., Gorris, M.T., Capote, N. 2006a.** Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. *OEPP Bulletin/EPPO Bulletin* **36**: 254-261.
- **Cambra, M., Capote, N., Cambra, M.A., Llácer, G., Botella, P., López, A. 2006b.** Epidemiology of sharka disease in Spain. *OEPP Bulletin/EPPO Bulletin* **36**: 271-275.
- **Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., Llácer, G. 2006c.** *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *OEPP Bulletin/EPPO Bulletin* **36**: 202-204.
- **Cambra, M., Garnsey, S.M., Permar, T.A., Henderson, C.T., Gumpf, D., Vela, C. 1990.** Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology* **80**: 103.
- **Cambra, M., Gorris, M.T., Capote, N., Asensio, M., Martínez, M.C., Bertolini, E., Collado, C., Hermoso de Mendoza, A., Mataix, E., López, A. 2004.** Epidemiology of Plum pox virus in Japanese plums in Spain. *Acta Horticulturae* **657**:195-200.

- **Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquín, C., Román, M.P., Olmos, A., Martínez, M.C., Hermoso de Mendoza, A., López, A., Navarro, L. 2000a.** Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencia Community of Spain. *Virus Research* **71**: 75-85.
- **Cambra, M., Gorris, M.T., Olmos, A., Martínez, M.C., Román, M.P., Bertolini, E., López A., Carbonell E. A. 2002.** European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. In: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Edited by Durán-Vila, N., Milne, R. G., da Graça, J.V. IOCV, Riverside, USA. pp. 69-77.
- **Cambra, M., Gorris, M.T., Román, M.P., Terrada, E., Garnsey, S.M., Camarasa, E., Olmos, A., Colomer, M. 2000b.** Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct Immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. In: *Proceedings 14th International Conference of the Organization of Citrus Virologists*. Edited by da Graça, J.V., Lee, R.F., Yokomi, R.K. IOCV, Riverside, USA. pp. 34-41.
- **Cambra, M., Hermoso de Mendoza, A., Moreno, P., Navarro, L. 1982.** Use of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of citrus tristeza virus (CTV) in different aphid species. *Proceeding of the International Society of Citriculture* **1**: 444-448.
- **Cambra, M., Moreno, P. 2000.** Tristeza. In: *Enfermedades de los Cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología N°2*. Edited by Durán-Vila, N., Moreno, P. Mundiprensa, Madrid, Spain. pp.77-81.
- **Cambra, M.A., Serra, J., Cano, A., Cambra, M. 2006d.** Plum pox virus (PPV) in Spain. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**: 215.
- **Cambra, R. 1970.** Selección de Pollizos de Murcia y otros ciruelos españoles. *Información Técnica Económica Agraria* **1**: 115-126.
- **Cambra, R. 1979.** Selección clonal de Pollizo de Murcia. *Información Técnica Económica Agraria* **36**: 21-30.
- **Candresse, T., Cambra, M. 2006.** Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *OEPP Bulletin/EPPO Bulletin* **36**: 239-246.
- **Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M. T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J.B., Dunez, J. 1998.** Comparison of Monoclonal Antibodies and Polymerase Chain Reaction assays for typing of isolates belonging to the D and M serotypes of *Plum pox virus*. *Phytopathology* **88**: 198-204.

- **Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M.C., Cambra, M. 2009.** Direct simple preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology* **12**: 1-6.
- **Capote, N., Cambra, M.A., Botella, P., Gorris, M.T., Martínez, M.C., López-Quílez, A., Cambra, M. 2010.** Detection, characterization, epidemiology and eradication of *Plum pox virus* M type in Spain. *Journal of Plant Pathology* (in press).
- **Capote, N., Gorris, M.T., Martínez, M.C., Asensio, M., Olmos, A., Cambra, M. 2006.** Interference between D and M types of *Plum pox virus* in Japanese plum. Assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology* **96**: 321-325.
- **Capote, N., Pérez-Panadés, J., Monzó, C., Carbonell, E.A., Urbaneja, A., Scorza, R., Ravelonandro, M., Cambra M. 2008.** Assessment of the diversity and dynamics of *Plum pox virus* and aphid populations in transgenic European plums under Mediterranean conditions. *Transgenic Research* **17**: 367-377.
- **Cervera, M., Esteban, O., Gil, M., Gorris, M.T., Martínez, M.C., Peña, L., Cambra, M. 2010.** Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to *Citrus tristeza virus* confers virus resistance. *Transgenic Research* (in press).
- **Chapman, A.V., Kuhar, T.P., Schultz, P.B., Leslie, T.W., Eleischer, S.J., Dively, G.P., Whalen, J. 2009.** Integrating chemical and biological control of European corn borer in bell pepper. *Journal of Economic Entomology* **102**: 287-295.
- **Chapman, P.J. 1967.** Petroleum oils for the control of orchard pests. *New York State Agricultural Experiment Station Bulletin* **814**: 1-24.
- **Chien, P.F.W., Khan, K.S. 2001.** Evaluation of a clinical test. II: Assessment of validity. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* **108**: 568-572.
- **Chu, H. 2009.** Estimation and inference for case-control studies with multiple non-gold standard exposure assessments: with an occupational health application. *Biostatistics* **10**: 591-602.
- **Chueca, P., Crafton-Cardwell, E.E., Moltó, E. 2009.** Influence of spray equipment and water volume on coverage of citrus and control of citricola scale, *Coccus pseudomagnoliarum* (Hemiptera: Coccidae) with mineral oil. *Journal of Economical Entomology* **102**: 296-303.

- **Cicchetti, D.V., Feinstein, A.R. 1990.** High agreement but low kappa, II: resolving the paradoxes. *Journal of Clinical Epidemiology* **43**: 551-558.
- **Claes, F., Ilgekbayeva, G.D., Verloo, D., Saidoulin, T.S., Geerts, S., Buscher, P., Goddeeris, B.M. 2005.** Comparison of serological tests for equine trypanosomosis in naturally infected horses from Kazakhstan. *Veterinary Parasitology* **131**: 221-225.
- **Clift, A.D., Singh, P., Bowyer, J., Rose, H., Tesoriero, L., Beattie, G.A.C., Rajakulendran, V. 2002.** Use of horticultural mineral oils to control tospovirus and phytoplasma-associated disease of tomato. In *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 556-561.
- **Cloyd, R.A. 2006.** Compatibility of insecticides with natural enemies to control pests of greenhouses and conservatories. *Journal of Entomological Science* **41**: 189-197.
- **Cohen, J. 1960.** A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement* **20**: 37-46.
- **Compton, S.G. 2002.** Sailing with the wind: dispersal by small flying insects. In: *Dispersal Ecology*. Edited by Bullock, J.M., Kenward, R.E., Hails, R.S. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 113-133.
- **Conraths, F.J., Schares, G. 2006.** Validation of molecular diagnostic techniques in the parasitological laboratory. *Veterinary Parasitology* **136**: 91-98.
- **Cook, S.M., Zeyaur, R.K., Pickett, J.A. 2007.** The use of the Push-Pull strategies in Integrated Pest Management. *Annual Review of Entomology* **52**: 375-400.
- **Costa, A.S., Grant, T.J. 1951.** Studies on transmission of the tristeza virus by the vector *Aphis citricidus*. *Phytopathology* **41**: 103-115.
- **Dal Zotto, A., Ortego, J.M., Raigón, J.M., Caloggero, S., Rossini, M., Duchase D.A. 2006.** First report in Argentina of *Plum pox virus* causing sharka disease in *Prunus*. *Plant Disease* **90**: 523.
- **Damsteegt, V.D., Waterworth, H.E., Mink, G.I., Howell, W.E., Levy, L. 1997.** *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Disease* **81**: 329-332.

- **Davidson, N.A., Dibble, J.E., Flint, M.L., Marer, P.J., Guye, A. 1991.** Managing insects and mites with spray oils. Publication n° 3347. Oakland: University of California.
- **de Clare, B.M., von Wissmann, B., Fevre, E.M., Handel, I.G., Picozzi, K., Welburn S.C. 2010.** No gold standard estimation of the sensitivity and specificity of two molecular diagnostic protocols for *Trypanosoma brucei* spp. in Western Kenya. *PLoS ONE* 5(1): e8628. doi:10.1371/journal.pone.0008628 5: 1-8.
- **Decroocq, V., Ion, L., Lansac, M., Eyquard, J.P., Schurdi- Levraud, V. 2006.** Unravelling the *Prunus*/ Plum pox interactions. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 36: 346-349.
- **Deeks, J.J., Altman, D.G. 2004.** Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *British Medical Journal* 329: 168-169.
- **De la Guardia, M.D., Felipe, A.J., Alcántara, E., Fournier, J.M., Romera, F.J. 1995.** Evaluation of experimental peach rootstocks grown in nutrient solutions for tolerance to iron stress. In: *Iron nutrition in soils and plants*. Edited by Abadía, J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 201-205.
- **Delaney, B.C., Holder, R.L., Allan, T.F., Kenkre, J.E., Hobbs, F.D. 2003.** A comparison of bayesian and maximum likelihood methods to determine the performance of a point of care test for *Helicobacter pylori* in the office setting. *Medical Decision Making* 23: 21-30.
- **Dempster, A., Laird, N., Rubin, D., 1977.** Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of Royal Statistics Society* 39: 1-38.
- **Dendukuri, N., Joseph, L. 2001.** Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics* 57: 158-167.
- **Díaz, B.M., Biurrún, R., Moreno, A., Nebreda, M., Fereres, A. 2006.** Impact of Ultraviolet-blocking plastic films on insect vectors of virus diseases infecting crisp lettuce. *Hortscience* 41: 711-716.
- **Díaz, B.M., Fereres, A. 2007.** Ultraviolet-blocking materials as a physical barrier to control insect pests and plant in pathogens in protected crops. *Pest Technology* 1: 85-95.

- **Dodds, J.A., Jarupat, T., Lee, J.G., Roistacher, C.N. 1987.** Effects of strain, host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* **77**: 442-447.
- **Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H. 2003.** Veterinary epidemiologic research. AVC Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, 706p.
- **Döring, T.F., Kirchner, S.M., Kuhne, S., Saucke, H., 2004.** Response of alate aphids to green targets on coloured backgrounds. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **113**: 53-61.
- **DOUE, 2009.** Documento Oficial de la Unión Europea. Directiva 2009/128/CE del Parlamento europeo y del consejo de 21 de octubre de 2009 por la que se establece el marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. *Doce 24-XI-2009 L309*: 71-86.
- **Drewe, J.A., Dean, G.S., Michel, A.L., Pearce, G.P. 2009.** Accuracy of three diagnostic tests for determining *Mycobacterium bovis* infection status in live-sampled wild meerkats (*Suricata suricatta*). *Journal of Veterinarian Diagnostic Investigation* **21**: 31-39.
- **Drobatz, K.J. 2009.** Measures of accuracy and performance of diagnostic tests. *Journal of Veterinary Cardiology* **11**: 533-540.
- **Dujardin, B., van den Ende, J., van Gompel, A., Unger, J.P., van der Stuyft, P. 1994.** Likelihood ratios: A real improvement for clinical decision making? *European Journal of Epidemiology* **10**: 29-36.
- **Edin, M., Garcin, A. 1996.** Un nuovo portinnesto ibrido per il pesco: 'Cadaman' Avimag. *Frutticoltura* **58**: 33-35.
- **Engel, B., Swildens, B., Stegeman, A., Buist, W. de Jong, M. 2006.** Estimation of sensitivity and specificity of three conditionally dependent diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* **11**: 360-380.
- **Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O. 2000.** Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine* **45**: 61-81.
- **Enøe, C., Søren, A., Sørensen, V., Willeberg, P. 2001.** Estimation of sensitivity, specificity and predictive values of two serological test for the detection of antibodies against *Antibacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in the absence of a reference test (gold standard). *Preventive Veterinary Medicine* **51**: 227-243.

- **Esteban, O., García, J.A., Gorris, M.T., Domínguez, E., Cambra, M. 2003.** Generation and characterisation of functional recombinant antibody fragments against RNA replicase N1b from *Plum pox virus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **301**: 167-175.
- **Fang, D.Q., Roose, M.L. 1999.** A novel gene conferring *Citrus tristeza virus* resistance in *Citrus máxima* (Burm.) Merrill. *HortScience* **34**: 334-335.
- **FAOSTAT. 2007.** [www.fao.org](http://www.fao.org). (última visita, 15 de Noviembre de 2009)
- **Feinstein, A.R., Cicchetti, D.V. 1990.** High agreement but low kappa: I. The problems with two paradoxes. *Journal of Clinical Epidemiology* **43**: 543-549.
- **Felipe, A.J. 1989.** Patrones para frutales de pepita y hueso. Ediciones Técnicas Europeas, Barcelona, Spain, 181p.
- **Felipe, A.J. 2009.** ‘Felinem’, ‘Garnem’, and ‘Monegro’ almond x peach hybrid rootstocks. *Hortscience* **44**: 196-197.
- **Fereres, A. 2000.** Barrier crops as a cultural control measure of non-persistently transmitted aphid-borne viruses. *Virus Research* **71**: 221-231.
- **Fereres, A. 2007.** The role of aphid salivation in the transmission of plant viruses. *Phytoparasitica* **35**: 3-7.
- **Fereres, A., Avilla, C., Collar, J.L., Duque, M., Fernández-Quintanilla, C. 1996.** Impact of various yield-reducing agents on open-field sweet peppers. *Environmental Entomology* **25**: 983-986.
- **Fereres, A., Kampmeier, G.E., Irwin, M.E. 1999.** Aphid attraction and preference for soybean and pepper plants infected with Potyviridae. *Annals of Entomological Society of America* **92**: 542-548.
- **Fereres, A., Moreno, A. 2009.** Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research* **141**: 158-168.
- **Fereres, A., Sánchez-Ponz, J.L. 2002.** SIDIPVY: una aplicación informática que permite la simulación de una epidemia y las pérdidas de cosecha producidas por el virus PVY en cultivo de pimiento al aire libre. *Phytoma* **138**: 67-71.
- **Ferree, D.C., Hall, F.R. 1975.** Influence of benomyl and oil on photosynthesis of apple leaves. *HortScience* **10**: 128-129.

- **Ferree, D.C., Hall, F.R., Spotts, R.A. 1976.** Influence of spray adjuvants and multiple applications of benomyl and oil on photosynthesis of apple leaves. *HortScience* **11**: 391-392.
- **Finger, S., Wolf, T. K., Baudoin, A.B. 2002.** Effects of horticultural oils on the photosynthesis, fruit maturity, and crop yield of winegrapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **53**: 116-124.
- **Fleiss, J.L. 1981.** Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons 2nd ed. New York, USA, 321p.
- **Forner, M.A., Forner, J.B. 2003.** Comportamiento de nuevos patrones frente a enfermedades y fisiopatías. *Comunitat Valenciana Agraria* **23**: 9-14.
- **Fraser, L. 1952.** Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus. *Agricultural Gazette of New South Wales* **63**: 125-131.
- **Frey, C.F., Schuppers, M.E., Nöckler, K., Marinculié, A., Pozio, E., Kihm, U., Gottstein, B. 2009.** Validation of a Western Blot for the detection of *anti-Trichinella spp.* antibodies in domestic pigs. *Parasitology Research* **104**:1269-1277.
- **Furness, G.O., Combellack, J.H. 2002.** Spray application: review of opportunities and challenges for spray oils. *In: Spray oils beyond 2000.* Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 564-581.
- **García, J.A., Cambra, M. 2007.** Plum pox virus and sharka disease. *Plant Viruses* **1**: 69-79.
- **García, J.A., Lucini, C., García, B., Alamillo, J.M., López-Moya, J.J. 2006.** The use of Plum pox virus as a plant expresión vector. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**: 341-345.
- **Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T. 2000.** Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Preventive Veterinary Medicine* **45**: 107-122.
- **Gari, G., Biteau-Coroller, F., LeGoff, C., Caufour, P., Roger, F. 2008.** Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method. *Veterinary Microbiology* **129**: 269-280.
- **Garnsey, S.M., Cambra, M. 1991.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. *In: Graft-Transmissible Diseases of Citrus.*

*Handbook for Detection and Diagnosis*. Edited by Roistacher, C.N. FAO, Rome, Italy. pp. 193-216.

- **Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Paul, C., Hilf, M-E-, Lee, R.F., Bransky, R.H., Yokomi, R.K. Hartung, J.S. 2005.** Biological characterization of an International Collection of Citrus tristeza virus (CTV) isolates. *In: Proceedings of the 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists*. Edited by Hilf, M. E., Duran-Vila, N., Rocha-Peña, M.A. IOCV, Riverside, USA. pp. 75-93.
- **Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M., Henderson, C.T. 1993.** Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). *In: Proceedings 12th International Conference of the Organization of Citrus Virologists*. Edited by Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W. IOCV, Riverside, USA. pp. 39-50.
- **Gelfand, A., Smith, A.F.M., 1990.** Sampling-based approaches to calculating marginal densities. *Journal of American Statistics Association* **85**: 398-409.
- **Gentit, P. 2006.** Detection of *Plum pox virus*: biological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**: 251–253.
- **Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., Gardner, I.A., Singh, R. 2003.** Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Journal of the Royal Statistical Society* **52**: 63-76.
- **Giard, R.W.M., Hermans, J. 1996.** The Diagnostic Information of Tests for the Detection of Cancer: the Usefulness of the Likelihood Ratio Concept. *European Journal of Cancer* **32**: 2042-2048.
- **Gibson, R.W., Rice, A.D. 1989.** Modifying aphid behavior. *In: Aphids: their biology, natural enemies and control*. Edited by Minks, A.K., Harewijn, P. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp. 209-224.
- **Gillings, M., Broadbent, P., Indsto, J., Lee, R. 1993.** Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **44**: 305-317.
- **Gottwald, T.R., Avinent, L., Llácer, G., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. 1995.** Analysis of the spacial spread of sharka (plum pox virus) in apricot and peach orchards in eastern Spain. *Plant Disease* **79**: 266-277.
- **Grafton-Cardwell, E.E., Reagan, C.A. 2002.** Efficacy of insecticides against citrcola scale, 2000. *Arthropod Managagement Tests* **27**: D6.

- **Gray, G.P., de Ong, E.R. 1926.** California petroleum insecticides. *Industrial and Engineering Chemistry* **18**: 175-180.
- **Gray, S.M. 1996.** Plant virus proteins involved in natural vector transmission. *Trends in Microbiology* **4**: 259-264.
- **Gray, S.M., Banerjee, N., 1999.** Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiology and Molecular Biology Review* **63**: 128-142.
- **Green, T.A., Black, C.M., Johnson, R.E. 1998.** Evaluation of bias in diagnostic-test sensitivity and specificity estimates computed by discrepant analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 375-381.
- **Greenberg, R.A., Jekel, J.F. 1969.** Some problems in the determination of the false positive and false negative rates of tuberculin tests. *American Review of Respiratory Disease* **100**: 645-650.
- **Grimes, D.A., Schulz, K.F. 2005.** Refining clinical diagnosis with likelihood ratios. *Lancet* **365**: 1500-1505.
- **Grove, G.G., Boal, R.J. 2002.** Use of horticultural mineral oils in management of powdery mildew of cherries in Washington orchards and nurseries. In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C, Watson, D.M, Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 539-546.
- **Gudin, C., Syratt, W. J., Boize, L. 1976.** The mechanism of photosynthetic inhibition and the development of scorch in tomato plants treated with spray oils. *Annals of Applied Biology* **84**: 213-219.
- **Guerri, J., Moreno, P., Muñoz, N., Martínez, M.E. 1991.** Variability among Spanish *Citrus tristeza virus* isolates revealed by double-stranded RNA analysis. *Plant Pathology* **40**: 38-44.
- **Gumpf, D.J., Zheng, C.Y., Moreno, P., Díaz, J.M. 1987.** Production and evaluation of specific monoclonal antibodies to *Citrus tristeza virus* strains. *Phytophylactica* **19**: 159-161.
- **Hadgu, A. 1996.** The discrepancy in discrepant analysis. *The Lancet* **348**: 592-593.
- **Hadgu, A. 1997.** Bias in the evaluation of DNA-amplification tests for detecting *Chlamidia trachomatis*. *Statistics in Medicine* **16**: 1391-1399.

- **Hadgu, A., Dendukuri, N., Hilden, J. 2005.** Evaluation of Nucleic Acid amplification tests in the absence of a perfect gold-standard test: A review of the statistical and epidemiologic issues. *Epidemiology* **6**: 604-612.
- **Hadidi, A., Candresse, T. 2001.** Plum pox. In: *Encyclopedia of Plant Pathology*. Edited by Maloy, O.C., Murray, T.D. John Wiley and Sons, New York, USA. pp. 788-791.
- **Halbert, S.E., Genc, H., Çevik, B., Brown, L.G., Rosales, I.M., Manjunath, K.L., Pomerinke, M., Davison, D.A., Lee, R.F., Niblett, C.L. 2004.** Distribution and characterization of *Citrus tristeza virus* in South Florida following establishment of *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* **88**: 935-941.
- **Halkin, A., Reichman, J., Schwaber, M., Paltiel, O., Brezis, M. 1998.** Likelihood ratios: getting diagnostic testing into perspective. *QJM* **91**: 247-258.
- **Hartmann, W., Neumüller, M. 2006.** Breeding for resistance: breeding for *Plum pox virus* in plums (*Prunus domestica*) in Germany. *Bulletin OEPP/ EPPO Bulletin* **36**: 332-336.
- **Hawkins, D.M., Garrett, J.A., Stephenson, B. 2001.** Some issues in resolution of diagnostic tests using an imperfect gold standard. *Statistics in Medicine* **20**: 1987-2001.
- **Hermoso de Mendoza, A., Álvarez, A., Michelena, J.M., González, P., Cambra, M. 2008.** Dispersión, biología y enemigos naturales (*Hemiptera, Aphididae*) de *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **34**: 77-87.
- **Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A. 1984.** Transmission of *Citrus tristeza virus* by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. In: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Edited by: Garnsey, S.M, Timmer, L.W., Dodds, J.A. IOCV, Riverside, USA. pp. 23-27.
- **Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A. 1988.** Comparative aphid transmission of a common *Citrus tristeza virus* isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. In: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Edited by Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L. IOCV, Riverside, USA. pp. 68-70.
- **Hermoso de Mendoza, A., Pérez, E., Carbonell, E.A., Real, V. 1998.** Sampling methods to establish percentages of species and population patterns

- in citrus aphids. *In: Aphids in natural and managed ecosystems*. Edited by: Nieto Nafría, J.M., Dixon, A.F.G. Universidad de León, León, Spain. pp. 561-568.
- **Hermoso de Mendoza, A., Pérez, E., Real, V. 1997.** Composición y evolución de la fauna afídica (*Homoptera, Aphidinea*) de los cítricos valencianos. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **23**: 363-375.
  - **Hernández, S., Cabaleiro, C., Jacas, J., Martín-López, B. 2002.** El empleo de aceites minerales, vegetales y de pescado en el Control Integrado de plagas y enfermedades del viñedo. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **28**: 223-237.
  - **Herrero, J. 1970.** Patrones de otras especies de hueso. *ITEA* **1**: 137-152.
  - **Herron, G.A., Beattie, G.A.C., Kallianpur, A., Barchia, I. 1998.** A Potter spray tower assay of two petroleum spray oils against adult female *Panonychus ulmi* Koch and *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* **22**: 553.
  - **Hilf, M.E., Karasev, A.V., Albiach-Martí, M.R., Dawson, W.O., Garnsey, S.M. 1999.** Two paths of sequence divergence in the *Citrus tristeza virus* complex. *Phytopathology* **89**: 336-342.
  - **Hilf, M.E., Mavrodieva, V.A., Garnsey, S.M. 2005.** Genetic marker analysis of a global collection of isolates of *Citrus tristeza virus*: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* **95**: 909-917.
  - **Hodkinson, M.C., Johnson, D., Smith, G. 2002.** Causes of phytotoxicity induced by petroleum-derived spray oil. *In: Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C, Watson, D.M, Stevens, M.L, Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 170-178.
  - **Hoehler, F.K. 2000.** Bias and prevalence effects on kappa viewed in terms of sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Epidemiology* **53**: 499-503
  - **Hooks, C.R.R., Fereres, A. 2006.** Protecting crops from non persistently aphid transmitted viruses: A review on the use of barrier plants as a management tool. *Virus Research* **120**: 1-16.
  - **Hui, S.L., Walter, S.D. 1980.** Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* **36**: 167-171.
  - **Hui, S.L., Zhou, X.H. 1998.** Evaluation of diagnostic tests without gold standards. *Statistical Methods in Medical Research* **7**: 354-370.

- **Hull, R. 2002.** Matthews' Plant Virology. Academic Press, New York, USA, 1056p.
- **Irwin, M.E. 1999.** Implications of movement in developing and deploying integrated pest management strategies. *Agricultural and Forest Meteorology* **97**: 235-248.
- **Irwin, M.E., Kampmeier, G.E., Weisser, W.W. 2007.** Aphid movement: process and consequences. In: *Aphids as Crop Pests*. Edited by van Emden, H. F., Harrington, R. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 153-186.
- **Irwin, M.E., Ruesink, W.G. 1986.** Vector intensity: a product of propensity and activity. In: *Plant Virus epidemics: Monitoring, modelling and predicting outbreaks*. Edited by Mc Lean, G.D., Garrett, R.G., Ruesink, W.G. Academic Press, Sydney, Australia. pp. 13-33.
- **ISAV. 2007.** Informe del Sector Agrario Valenciano 2007. Generalitat Valenciana, Conselleria de Agricultura Pesca y Alimentación. (<http://www.agricultura.gva.es/coyuntura/cast/publicaciones/ISAV/ISAV-2007>).
- **Jacques, D.F., Kuhlmann, B. 2002.** ExxonMobil experience with horticultural mineral oil. In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C, Watson, D.M, Stevens, M.L, Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 39-51.
- **Jaeschke, R., Guyatt, G., Lijmer, J. 2002.** Diagnostic tests. In: *Users' guides to the medical literature*. Edited by Guyatt, G., Rennie, D. AMA Press, Chicago, USA. pp. 121-140.
- **James, D., Glassa, M. 2006** Causal agent of sharka disease: new and merging events associated with *Plum pox virus* characterization. *OEPP Bulletin/EPPO Bulletin* **36**: 247-250.
- **James, D., Thompson, D. 2006.** Host and symptoms of *Plum pox virus*: ornamental and wild *Prunus* species. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**: 222-224.
- **Johnson, D., Hodgkinson, M.C., Joyce, D. 2002.** Potential effects of petroleum-derived spray oils on abscission, senescence and stress physiology of citrus. In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C, Watson, D.M, Stevens, M.L, Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 185-192.

- **Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., Pearson, L.M. 2001.** Screening without a “Gold Standard”: The Hui-Walter paradigm revisited. *American Journal of Epidemiology* **153**: 921-924.
- **Jones, D.R. 2003.** Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 195–219.
- **Joseph, L., Gyorkos, T.W. 1996.** Inferences for Likelihood Ratios in the absence of a “Gold Standard”. *Medical Decision Making* **16**: 412-417.
- **Joseph, L. Gyorkos T.W., Coupal, L. 1995.** Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *American Journal of Epidemiology* **141**: 263-272.
- **Karagounis, C., Kourdoumbalos, A.K., Margaritopoulos, J.T., Nanos, G.D., Tsitsipis, J.A. 2006.** Organic farming-compatible insecticides against the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) in peach orchards. *Journal of Applied Entomology* **130**: 150-154.
- **Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L. Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., Dawson, W.O. 1995.** Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* **208**: 511-520.
- **Kegler, H., Fuchs, E., Grüntzig, M., Schwarz, S. 1998.** Some results of 50 years' research on resistance to plum pox potyvirus. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **31**: 479-506.
- **Kennedy, J.S., Booth, C.O., Kershaw, W.J.S. 1959.** Host finding by aphids in the field II. *Aphis fabae* Scop. (Gynoparae) and *Brevicoryne brassicae* L.; with a reappraisal of the role of host finding behaviour in virus spread. *Annals of Applied Biology* **47**: 424-444.
- **Kennedy, J.S., Booth, C.O., Kershaw, W.J.S. 1961.** Host finding by aphids in the field III. Visual attraction. *Annals of Applied Biology* **49**: 1-21.
- **Kennedy, J.S., Day, M.F., Eastop, V.F. 1962.** A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London, UK.
- **Kenward, M.G., Roger, J.H. 1997.** Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics* **53**: 983-997.
- **Kollerová, E., Nováková, S., Subr, Z., Glassa, M. 2006.** Plum pox virus mixed infection detected on apricot in Pakistan. *Plant Disease* **90**: 1108.

- **Kraemer, H.C. 1992.** Evaluating Medical Tests: Objective and Quantitative Guidelines. Sage, Beverley Hills, USA, 294p.
- **Kring, J.B. 1972.** Flight behaviour of aphids. *Annual Review of Entomology* **17**: 461–492.
- **Kuhlmann, B., Jacques, D.F. 2002.** Classifications, standards and nomenclature (mineral oils, agriculture mineral oils and horticultural mineral oils). In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 29-38.
- **Labonne, G., Lauriaut, F., Quiot, J. 1989.** Comparison de trois types de pieges pour l'échantillonnage des populations de pucerons ailes. *Agronomie* **9**: 547-557.
- **Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J., Avinent, L., Llácer, G. 1995.** Aphids as potential vector of *Plum pox virus*: Comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae* **386**: 207-218.
- **Landis, J.R., Koch, G.G. 1977.** The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**:159-174.
- **Lantz, C.A., Nebenzahl, E. 1996.** Behavior and interpretation of the  $\kappa$  statistics: resolution of the two paradoxes. *Journal of Clinical Epidemiology* **49**: 431-434.
- **Lee, R.F., Branlsky, R.H., Garnsey, S.M., Yokomi, R.K. 1987.** Traits of citrus tristeza virus important for mild strain cross protection of citrus: the Florida approach. *Phytophyllactica* **19**: 215-218.
- **Levy, L., Damsteegt, V., Welliver, R. 2000.** First report of plum pox virus (Sharka disease) in *Prunus persicae* in the United States. *Plant Disease* **84**: 202.
- **Levy, Y., Lifshitz, J. 1995.** Alemow (*Citrus macrophylla* Wester), compared with six other rootstocks for nucellar “Minneola” tangelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Citrus reticulata* Blanco ). *Scientia Horticulturae* **61**: 131-137.
- **Ley 43/2002**, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal. (B.O.E. de 21 de noviembre de 2002).
- **Liang, G., Liu, T. 2002.** Repellency of a kaolin particle film, Surround, and a mineral oil, Sunspray Oil, to silverleaf whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on melon in the laboratory. *Journal of Economical Entomology* **95**: 317-324.

- **Lipman, H.B., Astles, J.R. 1998.** Quantifying the bias associated with use of discrepant analysis. *Clinical Chemistry* **44**: 108-115.
- **Liu, Z.M., Beattie, G.A.C., Hodgkinson, M., Rose, H.A., Jiang, L. 2001.** Influence of petroleum-derived spray oil aromaticity, equivalent *n*-paraffin carbon number and emulsifier concentration on oviposition by citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton (*Lepidoptera: Gracillariidae*). *Australian Journal of Entomology* **40**: 193–197.
- **Liu, Z.M., Beattie, G.A.C., Spooner-Hart, R.N. 2002.** Feeding and oviposition responses of greenhouse thrips to horticultural mineral oil deposits on Valencia orange fruit and mango leaves. *In: Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. 147-151.
- **Liu, Z. M., Meats, A., Beattie, G. A. C. 2006.** Modification of host finding and oviposition behavior of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* by horticultural mineral oil. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **121**: 243-251.
- **López, M.M., Llop, P., Olmos, A., Marco-Noales, E., Cambra, M., Bertolini, E. 2008.** Are Molecular Tools Solving the Challenges Posed by Detection of Plant Pathogenic Bacteria and Viruses?. *Current Issues in Molecular Biology* **11**: 13-46.
- **López-Moya, J.J., Fernández-Fernández, M.R., Cambra, M., García, J.A. 2000.** Biotechnological aspects of *Plum pox virus*. *Journal of Biotechnology* **76**: 121-136.
- **Loretti, F., Massai R. 1995.** Orientamenti per la scelta dei portinnesti del pesco. *L'Informatore Agrario* (suplemento) **32**: 37-42.
- **Lowery, D.T., Sears, M.K., Harmer, C.S. 1990.** Control of Turnip mosaic virus of rutabaga with application of oil, whitewash and Insecticides. *Journal of Economical Entomology* **83**: 2352-2356.
- **Llácer, G., Avinent, L., Hermoso de Mendoza, A. 1992.** Epidemiology of plum pox (sharka) virus in Valencia (Spain). *Acta Horticulturae* **309**: 129-134.
- **Ludbrook, J. 2004.** Detecting systematic bias between two raters. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **31**: 113-115.

- **Madden, L.V., Jeger, M.J., van den Bosch, J. 2000.** A Theoretical Assessment of the Effects of Vector-Virus Transmission Mechanism on Plant Virus Disease Epidemics. *Phytopathology* **90**: 577-594.
- **Madden, L.V., Raccach, B., Pirone, T.P. 1990.** Modelling plant disease increase as a function of vector numbers: Nonpersistent viruses. *Researches on Population Ecology* **32**: 47-65.
- **Mainar-Jaime, R.C., Barberán, M. 2007.** Evaluation of the diagnostic accuracy of the modified agglutination test (MAT) and an indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep through Bayesian approaches. *Veterinary Parasitology* **148**: 122-129.
- **Malinowski, T., Cambra, M., Capote, N., Zawadzka, B., Gorris, M.T., 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.
- **Marcus, R., Raccach, B. 1986.** A model for spread of non-persistent virus diseases. *Journal of Applied Statistics* **13**:167-175.
- **Marroquín, C., Olmos, A., Gorris, M.T., Bertolini, E., Martinez, C., Carbonell, E. A, Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. 2004.** Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research* **100**: 101-108.
- **Martin, S. 1984.** Estimating disease prevalence and interpretation of screening test results. *Preventive Veterinary Medicine* **2**: 463-472.
- **Martín, B., Collar, J.L., Tjallingii, W.F., Fereres, A. 1997.** Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *Journal of General Virology* **78**: 2701-2705.
- **Martín, B., Varela, I., Cabaleiro, C. 2004.** Effects of various oils on survival of *Myzus persicae* Sulzer and its transmisión of *Cucumber mosaic virus* on pepper. *Journal of Hortscience and Biotechnology* **79**: 855-858.
- **Mc Clean, A.P.D. 1960.** Seedling-yellows in South African citrus trees. *South African Journal of Science* **3**: 259-279.
- **Mc Clean, A.P.D. 1975.** Tristeza virus complex: its transmission by aphid *Toxoptera citricidus*. *Phytophylactica* **7**: 109-113.
- **Mc Nemar, Q. 1947.** Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika* **12**: 153-157.

- **Mensah, R.K., Harris, W.E., Beattie, G.A.C. 1995.** Response of *Helicoverpa spp* (Lep: Noctuidae) and their natural enemies to pretroleum spray oil. *Entomophaga* **40**: 263-272.
- **Menten, J., Boelaert, M., Lesaffre, E. 2008.** Bayesian latent class models with conditionally dependent diagnostic tests: A case study. *Statistics in Medicine* **27**: 4469-4488.
- **Mestre, P.F., Asins, M.J., Pina, J.A., Carbonell, E.A., Navarro, L. 1997a.** Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Theoretical and Applied Genetics* **94**: 458-464.
- **Mestre, P.F., Asins, M.J., Pina, J.A., Navarro, L. 1997b.** Efficient search for new resistant genotypes to the citrus tristeza closterovirus in the orange subfamily *Aurantioideae*. *Theoretical and Applied Genetics* **95**: 1282-1288.
- **Miller, W.C. 1998.** Bias in discrepant analysis: When two wrongs don't make a right. *Journal of Clinical Epidemiology* **51**: 219-231.
- **Minoiu, M., Maxim, A., Vladianu, D., Platon, I., Balaci, R. 1998.** New results concerning the *Plum pox virus* epidemiology and resistance of plum cultivars, hybrids and rootstocks. *Acta Virologica* **42**: 244-247.
- **Moericke, V. 1955.** Über die Labensgewohnheiten der geflügelten Blattläuse (Aphidina) unter besonderer Berucksichtigung des Verhaltens beim Lande. *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie* **37**: 29-91.
- **Molenberghs, G., Verbeke, G. 2005.** *Models for Discrete Longitudinal Data*. New York, USA: Springer.
- **Monti, G.E., Frankena, K., Engel, B., Buist, W., Tarabla, H.E., de Jong, M. C. M. 2005.** Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. *Journal of Veterinarian Diagnostic Investigation* **17**: 451-457.
- **Moreno, A. 2005.** Incidencia y dispersión de virus transmitidos por pulgones en hortícolas de invierno y sus relaciones virus-vector. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Departamento de Biotecnología.
- **Moreno, A., Bertolini, E., Olmos, A., Cambra, M., Fereres, A. 2007.** Estimation of vector propensity for *Lettuce mosaic virus* based on viral detection in single aphids. *Spanish Journal of Agricultural Research* **5**: 376-384.

- **Moreno, A., Fereres, A., Cambra, M. 2009.** Quantitative estimation of Plum pox virus targets acquired and transmitted by a single *Myzus persicae*. *Archives of Virology* **154**: 1391-1399.
- **Moreno, A., Palacios, I., Blanc, S., Fereres, A., 2005.** Intracellular salivation is the mechanism involved in the inoculation of Cauliflower mosaic virus by its major vectors, *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae*. *Annals of the Entomological Society of America* **98**: 763-769.
- **Moreno, M.A. 2003.** Mejora y selección de patrones de frutales de hueso en la estación experimental de Aula Dei. *ITEA* **99**: 11-22.
- **Moreno, M.A., Tabuenca, M.C., Cambra, R. 1995.** Adesoto 101, a plum rootstock for peaches and other fruits. *Hortscience* **30**: 1314-1315.
- **Moreno, P., Ambrós, S., Martí-Albiach, M.R., Guerri, J., Peña, L. 2008.** Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* **9**: 251-268.
- **Moreno, P., Guerri, J., Muñoz, N. 1990.** Identification of Spanish strains of *Citrus tristeza virus* (CTV) by analysis of double-stranded RNAs (dsRNA). *Phytopathology* **80**: 477-482.
- **Moreno, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J.F., Albiach, R., Martínez, M.E. 1993.** Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* **42**: 35-41.
- **Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M., Savino, V. 1998.** Production of a monoclonal antibody specific to the EC Amar strain of *Plum pox virus*. *Acta Virologica* **42**: 248-250.
- **Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M., Boscia, D. 2000.** Production of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of *Plum pox virus* (PPV-C). *Journal of Plant Pathology* **82**: 95-103.
- **Najar-Rodríguez, A.J., Gimme, H.W., Mensah, R.K. 2007.** The efficacy of petroleum sprays oil against *Aphis gossypii* Glover on cotton. Part 1: Mortality rates and sources of variation. *Pest Management Science* **63**: 586-595.
- **Najar-Rodríguez, A.J., Lavidis, N.A., Mensah, R.K., Choy, P.T., Gimme, H. W. 2008.** The toxicological effects of petroleum spray oils on insects – Evidence for an alternative mode of action and possible new control options. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 3003-3014.

- **Narváez, G., Skander, B.S., Ayllón, M.A., Rubio, L., Guerri, J., Moreno, P. 2000.** A new procedure to differentiate citrus tristeza virus isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods* **85**: 83-92.
- **Nault, L.R. 1997.** Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America*. **90**: 521-541.
- **Navarro, L., Pina, J.A., Juárez, J., Ballester-Olmos, J.F., Arregui, J.M., Ortega, C., Navarro, A., Duran-Vila, N., Guerri, J., Moreno, P., Cambra, M., Medina, A., Zaragoza, S. 2002** The Citrus Variety Improvement program in Spain in the period 1975-2001. In: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Edited by: Duran-Vila, N., Milne, R. G., da Graça, J. V. IOCV, Riverside, USA. pp. 306-316.
- **Navrátil, M., Safarova, D., Karesova, R., Petrzik, K. 2005.** First incidence of *Plum pox virus* on apricot tree in China. *Plant Disease* **89**: 338.
- **Nebreda, M., Moreno, A., Pérez, N., Palacios I., Seco-Fernández, V., Fereres, A. 2004.** Activity of aphids associated with lettuce and broccoli in Spain and their efficiency as vectors of *Lettuce mosaic virus*. *Virus Research* **100**: 83-88.
- **Nèrette, P., Dohoo, I., Hammell, L. 2005.** Estimation of specificity and sensitivity of three diagnostic tests for infectious salmon anaemia virus in the absence of a gold standard. *Journal of Fish Diseases* **28**: 89-99.
- **Neves, D.D., Dias, R.M., da Cunha, A.J., Preza, P.C. 2004.** What is the probability of a patient presenting a pleural effusion due to tuberculosis? *Brazilian Journal of Infectious Disease* **8**: 311-318.
- **Ng, J.C.K., Falk, B.W. 2006.** Virus-Vector interactions mediating Non-persistent and Semipersistent transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 183-212.
- **Nicetic, C., Watson, D.M., Beattie, G.A.C. 2002.** Control of powdery mildew on tomato with a horticultural mineral oil. In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 527-531.
- **Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Garnsey, S.M., Lee, R.F. 1998.** Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Disease* **82**: 1276-1280.

- **Nolasco, G., de Blas, C., Torres, V., Ponz, F. 1993.** A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the routine diagnosis of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods* **45**: 201-218.
- **Northover, J., Schneider, K.E. 1996.** Physical modes of action of petroleum and plants oils on Powdery and Downy mildew of grapevines. *Plant Disease* **80**: 544-550.
- **Northover, J., Timmer, L.W. 2002.** Control of plant diseases with petroleum and plant derived oils. In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. 512-526.
- **Nyczepir, A.P., Beckman, T.G. 2000.** Host status of Guardian peach rootstocks to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Hortscience* **35**: 772.
- **Nyczepir, A.P., Zehr, E.I., Lewis, S.A., Harshman, D.C. 1983.** Short life of peach trees induced by *Criconebella xenoplax*. *Plant Disease* **67**: 507-508.
- **OEPP/EPPO. 2004a.** Diagnostic protocol for regulated pests. *Citrus tristeza virus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**: 239-246.
- **OEPP/EPPO. 2004b.** Diagnostic protocol for regulated pests. *Plum pox potyvirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**: 247-256.
- **Ohnesorg, W.J., Johnson, K.D., O'Neal, M.E. 2009.** Impact of reduced-risk insecticides on soybean aphid and associated natural enemies. *Journal of Economic Entomology* **102**: 1816-1826.
- **Olmos, A., Bertolini, E., Cambra, M. 2002.** Simultaneous and Co-operational amplification (Co-PCR) for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods* **106**: 51-59.
- **Olmos, A., Bertolini, E., Cambra, M. 2007.** Isothermal amplification coupled with rapid flow-through hybridisation for sensitive diagnosis of *Plum pox virus*. *Journal of Virological Methods* **139**:111-115.
- **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.
- **Olmos, A., Cambra, M., Dasí, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T., Asensio, M. 1997.** Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by hemi-nested PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods* **68**: 127-137.

- **Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T., Terrada, E. 1999.** New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research* **27**: 1564-1565.
- **Olmos, A., Capote, N., Candresse, T. 2006.** Detection and characterization of Plum pox virus: molecular methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**: 262-266.
- **Orr, K.A., O'Reilly K.L., Scholl, D.T. 2003.** Estimation of sensitivity and specificity of two diagnostics tests for bovine immunodeficiency virus using Bayesian techniques. *Preventive Veterinary Medicine* **61**: 79-89.
- **Osman, F., Rowhani, A. 2006.** Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* **133**: 130-136.
- **Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A., Fereres, A. 2002.** *Cauliflower mosaic virus* is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *Journal of General Virology* **83**: 3163-3171.
- **Pappu, H.R., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Niblett, C.L. 1993.** Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 3641-3644.
- **Parker, W. E., Howard, J. J., Foster, S. P., Denholm, I. 2006.** The effect of insecticide application sequences on the control and insecticide resistance status of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), on field crops of potato. *Pest Management Science* **62**: 307-315.
- **Pascal, T., Kervella, J., Pfeiffer, F., Sauge, M. H., Esmenjaud, D. 1998.** Evaluation of the interspecific progeny *Prunus.persica* cv. *Summergrand* x *Prunus davidiana* for disease resistance and some agronomic features. *Acta Horticulturae* **465**: 185-192.
- **Pascal, T., Pfeiffer, F., Kervella, J. 2002.** Preliminary observations on the resistance to sharka in peach and related species. *Acta Horticulturae* **592**: 699-704.
- **Pasini, C., D'Aquila, F., Curir, P., Gullino, M. L. 1997.** Effectiveness of antifungal compounds against rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) in glasshouses. *Crop Protection* **16**: 251-256.
- **Pérez, P., Collar, J.L., Avilla, C., Duque, M., Fereres, A. 1995.** Estimation of vector propensity of *Potato virus Y* (PVY) in open field pepper crops of central of Spain. *Journal of Economical Entomology* **88**: 986-991.

- **Perring, T.M., Gruenhagen, T.M., Farrar, C.A. 1999.** Management of plant viral diseases through chemical control of insect. *Annual Review of Entomology* **44**: 457-481.
- **Pearce, G.W., Chapman, P.J., Avens, W.S. 1942.** The efficiency of dormant type oils in relation to their composition. *Journal of Economic Entomology* **35**: 211-220.
- **Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J., Lee, R.F. 1990.** A monoclonal antibody which discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* **80**: 224-228.
- **Piquer, J., Pina, J.A., Pérez-Panadés, J., Carbonell, E.A., Guerra, J., Moreno, P. 2005.** Preliminary evaluation of the sensitivity of alemow rootstock to *Citrus tristeza virus* in Spain. In: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Edited by Hilf M E, Duran-Vila N, Rocha-Peña M A. IOCV, Riverside, USA, pp. 94-100.
- **Pina, J.A., Moreno, P., Juárez, J. Guerri, J., Cambra, M., Gorris, M.T., Navarro, L. 2005.** A new procedure to index for *Citrus tristeza virus* induced decline on sour orange rootstock. In: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Edited by Hilf M E, Duran-Vila N, Rocha-Peña M A. IOCV, Riverside, USA, pp. 491.
- **Pinochet, J. 1997.** Breeding and selection for resistance to root-knot and lesion nematodes in *Prunus* rootstocks adapted to Mediterranean conditions. *Phytoparasitica* **25**: 271-274.
- **Pinochet, J., Calvet, C., Hernández-Dorrego, A., Bonet, A., Felipe, A.J., Moreno, M.A. 1999.** Resistance of peach and plum rootstocks from Spain, France and Italy to rootknot nematode *Meloidogyne javanica*. *Hortscience* **34**: 1259-1262.
- **Pinochet, J., Fernández, C., Alcañiz, E., Felipe, A.J. 1996.** Damage by a lesion nematode, *Pratylenchus vulnus*, to *Prunus* rootstocks. *Plant Disease* **80**: 754-757.
- **Planes, S., González-Sicília, E., Martí, F. 1965.** Studies of citrus virus diseases. In: *Proceedings of the 3rd International Conference Organ Citrus Virology*. Edited by Price W, C. IOCV, University of Florida Press, Gaineville, USA. pp. 226-227.
- **Pouillot, R., Gerbier, G.A., Gardner, I.A., 2002.** ‘TAGS’ a program for the evaluation of test accuracy in the absence of a gold standard. *Preventive Veterinary Medicine* **53**: 67-81.

- **Powell, C.A., Pelosi, R.R., Bullock, R.C. 1997.** Natural field spread of mild and severe isolates of *Citrus tristeza virus* in Florida. *Plant Disease* **81**: 18-20.
- **Powell, C.A., Pelosi, R.R., Burton, M.S., Rundell, P.A., Ritenhour, M.A., Bullock R.C. 2005a.** Natural field spread of decline and non-decline inducing isolates of citrus tristeza virus in Florida after the introduction of the brown citrus aphid. *Hortscience* **40**: 691-693.
- **Powell, C.A., Pelosi, R.R., Rundell, P.A., Stover, E., Cohen, M. 1999.** Cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of *Citrus tristeza virus*. *Plant Disease* **83**: 989-991.
- **Powell, G., 2005b.** Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses. *Journal of General Virology* **86**: 469-472.
- **Powell, G., Tosh, C.R., Hardie, J. 2006.** Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary and applied perspectives. *Annual Review of Entomology* **51**: 309-330.
- **Primo, E., Carrasco, J.M. 1990.** Química agrícola II (plaguicidas y fitoreguladores). Ediciones Alhambra, Madrid, Spain, 639p.
- **Raccah, B., Gal-On, A., Eastop, V.F. 1985.** The role of flying aphid vector in the transmission of *Cucumber mosaic virus* and *Potato virus Y* in Israel. *Annals of Applied Biology* **106**: 451-460.
- **Raccah, B., Loebenstein, G., Bar-Joseph, M. 1976.** Transmission of *Citrus tristeza virus* by melon aphid. *Phytopathology* **66**: 1102-1104.
- **Rae, D.J. 2002.** Use of spray oils with synthetic insecticides, acaricides and fungicides. In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D. M, Stevens, M.L, Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, pp. 248-266.
- **Rae, D. J., Liang, W. G., Watson, D. M., Beattie, G. A. C., Huang, M. D. 1997.** Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), in China. *International Journal of Pest Management* **43**: 71-75.
- **Rai, M. 2006.** Refinement of the *Citrus tristeza virus* resistance gene (Ctv) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Molecular Biology* **61**: 399-414.

- **Ramming, D.W., Tanner, O. 1983.** ‘Nemared’ peach rootstock. *HortScience* **18**: 376.
- **Ravelonandro, M., Scorza, R., Bachelier, J.C., Labonne, G., Levy, L., Damsteegt, V., Callahan, A.M., Dunez, J. 1997.** Resistance of transgenic *Prunus domestica* to Plum pox virus infection. *Plant Disease* **81**: 1231-1235.
- **Real Decreto 929/1995**, de 9 de junio, por el que se aprueba el Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de frutales. (B.O.E. de 14 de Junio de 1995).
- **Real Decreto 1201/2002**, de 21 de noviembre de 2002, por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas. (B.O.E. de 30 de noviembre de 2002).
- **Reighard, G.L, Loreti, F. 2008.** Rootstock development. In: *The Peach: Botany, Production and Uses*. Edited by Layne, D. R., Bassi, D. CAB Intl, Wallingford, U.K. pp. 193-220.
- **Reitsma, J.B., Rutjes, A.W. S, Khan, K.S., Coomarasamy, A., Bossuyt, P.M. 2009.** A review of solutions for diagnostic accuracy studies with an imperfect or missing reference standard. *Journal of Clinical Epidemiology* **62**: 797-806.
- **Riedl, H., Halaj, J., Kreowski, W.B., Hilton, R.J., Westigard, P.H. 1995.** Laboratory evaluation of mineral oils for control of codling moth (*Lepidoptera: Tortricidae*). *Journal of Economic Entomology* **88**: 140-147.
- **Riehl, L.A., LaDue, J.P. 1952.** Evaluation of petroleum fractions against California red scale and citrus red mite. *Advances in Chemistry Series n°7*: 25-36.
- **Robert, Y., Woodford, J.A., Ducray-Bourdin, D.G. 2000.** Some epidemiological approaches to the control of aphid-borne virus diseases in seed potato crops in northern Europe. *Virus Research* **71**: 33-47.
- **Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Lastra, R., Niblet, C.L., Ochoa-Corona, F.M., Garnsey, S.M., Yokomi, R.K. 1995.** Citrus tristeza virus and its vector *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* **79**: 437-445.
- **Rodríguez, A., Gorris, M.T., Serra, J., Román, M.P., Collado, C., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. 2005.** Estimation of the number of *Citrus tristeza virus*-viruliferous aphids landing on individual citrus seedlings and viral incidence in different citrus rootstocks in Spain. In: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*.

Edited by Hilf M E, Duran-Vila N, Rocha-Peña M A. IOCV, Riverside, pp. 399-403.

- **Roistacher, C.N. 1991.** Graft-Transmissible Diseases of Citrus. Handbook for Detection and Diagnosis. FAO, Rome, Italy, 286p.
- **Roistacher, C.N., Bar-Joseph, M. 1984.** Transmission of tristeza and seedling yellows tristeza virus by *Aphis gossypii* from sweet orange, grapefruit and lemon to Mexican lime, grapefruit and lemon. In: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Edited by: Garnsey S M, Timmer L W, Dodds J A. IOCV, Riverside, USA. pp.9-18.
- **Román, M.P., Cambra, M., Juárez, J., Moreno, P., Duran-Vila, N., Tanaka, F.A.O., Alves, E., Kitajima, E.W., Yamamoto, P.T., Bassanezi, R.B., Teixeira, D.C., Junior, W.C.J., Ayres, A.J., Gimenes-Fernandes, N., Rabenstein, F., Girotto, L.F., Bové, J.M. 2004.** Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. *Plant Disease* **88**: 453-467.
- **Rose, N., Boutrouille, A., Fablet, C., Madec, F., Eloit, M., Pavio, N. 2010.** The use of Bayesian methods for evaluating the performance of a virus-like particles-based ELISA for serology of hepatitis E virus infection in swine. *Journal of Virological Methods* **16**: 329-335.
- **Rosner, A., Bar-Joseph, M. 1984.** Diversity of *Citrus tristeza virus* strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences. *Virology* **139**: 189-193.
- **Rosner, A., Lee, R.F., Bar-Joseph, M. 1986.** Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **76**: 820-ha824.
- **Rosner, A., Shilboleth, Y., Spiegel, S., Krisbai, L., Kölber, M. 1998.** Evaluating the use of immunocapture and sap-dilution PCR for the detection of *Prunus Necrotic Ringspot Virus*. *Acta Horticulturae* **472**: 227-233.
- **Roy, A., Ramachandran, P., Brlansky, R.H. 2003.** Grouping and comparison of Indian *Citrus tristeza virus* isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. *Archives of Virology* **148**: 707-722.
- **Roy, A.S., Smith, I.M. 1994.** Plum pox situation in Europe. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **24**,515-523.
- **Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F. 2003.** Resistance of almond cultivars to Plum pox virus (sharka). *Plant Breeding* **122**: 462-464.

- **Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Pinochet, J., Dicenta, F. 2005.** Evaluation of resistance to sharka (*Plum pox virus*) of several *Prunus* rootstocks. *Plant Breeding* **124**: 67-70.
- **Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., Ambrós, S. 2007.** A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of Citrus tristeza virus in different plant tissues. *Journal of Virological Methods* **145**: 96-105.
- **Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., Ambrós, S. 2009.** Discrimination between mild and severe *Citrus tristeza virus* isolates with a rapid and highly specific real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method using TaqMan LNA probes. *Phytopathology* **99**: 307-315.
- **Sackett, D.L., Straus, S.E., Richardson, W.S., Rosenberg, W., Haynes, R.B. 2000.** Evidence-based medicine: how to practice and teach EBM. 2nd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, pp 67-93.
- **Sánchez, M., Pina, J. 1996.** Los aceites minerales en los cultivos leñosos. *Levante Agrícola* **336**: 205-213.
- **Sanford, C.J., Keefe, G.P., Sánchez, J., Dingwell, R.T., Barkema, H.W., Leslie, K.E., Dohoo, I.R. 2006.** Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test. *Preventive Veterinary Medicine* **77**: 96-108.
- **Saponari, M., Keremane, M.L., Yokomi, R.K. 2008.** Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* **147**: 43-53.
- **Schneider, W.L., Sherman, D.J., Stone, A.L., Damsteegt, V.D., Frederick, R.D. 2004.** Specific detection and quantification of *Plum pox virus* by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods* **120**: 97-105.
- **Schuster, D.J., Thompson, S., Ortega, L.D., Polston, J.E. 2009.** Laboratory evaluation of products to reduce settling of sweetpotato whitefly adults. *Journal of Economic Entomology* **102**: 1482-1489.
- **Scoot-Lawson, D., Weires, R.W. 1991.** Management of the European red mite (*Acari: Tetranychidae*) and several aphid species on apple with petroleum oils and an insecticide soap. *Journal of Economic Entomology* **84**: 1550-1557.
- **Scorza, R., Ravelonandro, M. 2006.** Control of *Plum pox virus* through of genetically modified plants. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**: 337-340.
- **Shao, J., Tu, D. 1995.** The Jackknife and the Bootstrap. Springer, New York, USA, 516p.

- **Simel, D.L., Samsa, G.P., Matchar, D.B. 1991.** Likelihood ratios with confidence: sample size estimation for diagnostic test studies. *Journal of Clinical Epidemiology* **44**: 763-770.
- **Simons, J.N. 1982.** Use of oil sprays on reflective surfaces for control of insect transmitted plant viruses. *In: Pathogens vectors, and plant diseases. Approaches to Control.* Edited by Harris, K.F., Maramorosch, K. Academic Press, New York, USA. pp.71-93.
- **Simons, J.N., Zitter, T.A. 1980.** Use of oils to control aphid-borne viruses. *Plant Disease* **64**: 542-546.
- **Singer, R.S., Walter, M.B., Gardner, I.A., Johnson, W.O., Fisher, A.M. 1998.** Evaluation of bluetongue virus diagnostic tests in free-ranging bighorn sheep. *Preventive Veterinary Medicine* **35**: 265-282.
- **Spiegel, S., Kovalenko, E., Varga, A., James, D. 2004.** Detection and partial molecular characterization of two Plum pox virus isolates from plum and wild apricot in southeast Kazakhstan. *Plant Disease* **88**: 973-979.
- **Spiegelhalter, D.J., Best, N.G., Carlin, B.P., van der Linde, A. 2002.** Bayesian measures of model complexity and fit (with discussion). *Journal of Royal Statistics Society B* **64**: 583-640.
- **Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., Lunn, D. 2003.** WinBUGS User Manual, Version 1.4. Available online at <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs>.
- **Spotts, R.A., Hall, F.A., Ferree, D.C. 1975.** Yield reduction in apples related to benomyl oil spray applications. *Plant Disease Report* **59**: 541-543.
- **Staedler, T., Buteler, M. 2009.** Modes of entry of petroleum distilled spray-oils into insects: a review. *Bulletin of Insectology* **62**: 169-177.
- **Stansly, P.A., Liu, T.X., Schuster, D.J. 2002.** Effects of the horticultural mineral oils on a polyphagous whitefly, its plant host and its natural enemies. *In: Spray oils beyond 2000.* Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 120-133.
- **Staquet, M., Rozencweig, M., Lee, Y.J., Muggia, F.M. 1981.** Methodology for the assessment of new dichotomous diagnostic tests. *Journal of Chronic Disease* **34**: 599-610.
- **Stern, V.M., Smith, R.F., van den Bosch, R., Hagen, K.S. 1959.** The integrated control concept. *Hilgardia* **29**: 81-101.

- **Syller, J. 2006.** The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyviruses and caulimoviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **67**: 119-130.
- **Sylvester, E.S., 1956.** Beet yellows virus transmission by the Green peach aphid. *Journal of Economic Entomology* **49**: 789-800.
- **Tanner, M.A., 1996.** Tools for Statistical Inference. Methods for the Exploration of Posterior Distributions and Likelihood Functions, 3rd Edition. Springer, New York, USA. pp 207.
- **Taverner, P. 2002.** Drowning or just waving? A perspective on the ways petroleum derived oils kill arthropod pest of plants. In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 78-87.
- **Thackray, D.J., Diggle, A.J., Berlandier, F.A., Jones, R.A.C. 2004.** Forecasting aphid outbreaks and epidemics of *Cucumber mosaic virus* in lupin crops in a Mediterranean-type environment. *Virus Research* **100**: 67-82.
- **Thackray, D.J., Jones, R.A.C., Bwyne, A.M., Coutts, B.A. 2000.** Further studies on the effects of insecticides on aphid vector numbers and spread of *Cucumber mosaic virus* in narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius*). *Crop Protection* **19**: 121-139.
- **Thompson, D., Mc Cann, M., Mc Leod, M., Lye, D., Green, M, James, D. 2001.** First report of plum pox potyvirus in Canada. *Plant Disease* **85**: 97.
- **Thresh, J.M. 1976.** Gradients of plant virus diseases. *Annals of Applied Biology* **82**: 381-406.
- **Thwaite, G., Eslick, M.A., Nicol, H.I. 2002.** Evaluation of petroleum-derived spray oils for integrated pest and disease management in apple orchards. In: *Spray oils beyond 2000*. Edited by Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. University of Western Sydney, New South Wales, Australia. pp. 349-355.
- **Toft, N., Jørgensen, E., Søren, H. 2005.** Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Preventive Veterinary Medicine* **68**: 19-33.

- **Torrance-Rynard, V.L., Walter, S.D., 1997.** Effects of dependent errors in the assessment of diagnostic test performance. *Statistics in Medicine* **16**: 2157-2175.
- **Tsai, M.C., Su, H.J. 1991.** Development and characterization of monoclonal antibodies to *Citrus tristeza virus* (CTV) strains in Taiwan. In: *Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists*. Edited by Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. IOCV, Riverside, USA. pp. 46-50.
- **Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., Çağlayan, K. 2009.** Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey. *Virus Research* **142**: 121-126.
- **Umesh, K.C., Valencia, J., Hurley, C., Gubler, W.D., Falk, B.W. 1995.** Stylet oil provides limited control of aphid-transmitted viruses in melons. *California Agriculture* **49**: 22-24.
- **Urbaneja, A., Pascual-Ruiz, S., Pina, T., Abad-Moyano, R., Vanaclocha, P., Montón, H., Dembilio, O., Castañera, P., Jacas, J.A. 2008.** Efficacy of five selected acaricides against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and their side effects on relevant natural enemies occurring in citrus orchards. *Pest Management Science* **64**: 834-842.
- **Uzest, M., Gargani, D., Drucker, M., Hébrard, E., Garzo, E., Candresse, T., Fereres, A., Blanc, S. 2007.** A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 17959-17964.
- **Vacek, P.M., 1985.** The effect of conditional dependence on the evaluation of diagnostic tests. *Biometrics* **41**: 959-968.
- **van der Goot, J.A., Engel, B., Van de Water, S.G.P., Buist, W., De Jong, M. C.M., Koch, G., Van Boven, M., Stegeman, A. 2010.** Validation of diagnostic tests for detection of avian influenza in vaccinated chickens using Bayesian analysis. *Vaccine* **28**: 1771-1777.
- **Vanderveken, J.J. 1968.** Inhibition de la transmission aphidienne du virus de la mosaïque jaune du haricot par l'huile. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Grembloux* **3**: 748-753.
- **Vanderveken, J.J. 1977.** Oils and other inhibitors of Nonpersistent virus transmission. In: *Aphids as virus vectors*. Edited by Harris, K.F., Maramorosch, K. Academic Press, New York, USA. pp 435-454.

- **van Vuuren, P., Collins, R.P., da Graça, J.V. 1993.** Evaluation of citrus tristeza isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease* **77**: 24-28.
- **Varga, A., James, D. 2005.** Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods* **123**: 213-220.
- **Varga, A., James, D. 2006a.** Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox virus* strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *Journal of Virological Methods* **132**: 146-152.
- **Varga, A., James, D. 2006b.** Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Plum pox virus. *Journal of Virological Methods* **138**: 184-190.
- **Varma, P.M., Rao, D.G., Capoor, S.P. 1965.** Transmission of tristeza virus by *Aphis craccivora* Koch and *Dactynotus jaceae* (L.). *Indian Journal of Entomology* **27**: 67-71.
- **Varma, P.M., Rao, D.G., Vasudeva, R.S. 1960.** Additional vectors of tristeza disease of citrus in India. *Current Science* **29**: 359.
- **Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J., Pérez de San Román, C., Sanz, A. 1986.** Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *Journal of General Virology* **67**: 91-96.
- **Wang, R.Y., Pirone, T.P. 1996.** Mineral oil interferes with retention of *Tobacco etch potyvirus* in the stylets of *Myzus persicae*. *Phytopathology* **86**: 820-823.
- **Watson, M.A., Robers, F.M. 1939.** A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus virus* 3, *Potato virus Y* and *Cucumber virus* 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton) and *Macrosiphum gei* (K). *Proceeding of the Royal Society of London B* **127**: 543-577.
- **Webb, S.E., Linda, S.B. 1993.** Effect of oil and insecticide on epidemics of potyviruses in watermelon in Florida. *Plant Disease* **77**: 869-874.
- **Weintraub, P.G., Berlinger, M.J. 2004.** Physical control in greenhouse and field crops. In: *Insect Pest Management. Field and Protected Crops*. Edited by Horowitz, R.A., Ishaaya, I. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 301-318.

- **Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., Dunez, J. 1992.** A highly sensitive immunocapture polymerase chain-reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* **39**: 27-37.
- **Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Dunez, J. 1991.** A polymerase chain-reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* **33**: 355-365.
- **Yokomi, R.K., DeBorde, R.L. 2005.** Incidence, transmissibility and genotype analysis of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates from CTV eradicated and noneradicated districts in central California. *Plant Disease* **89**: 859-866
- **Yokomi, R.K., Garnsey, S.M. 1987.** Transmission of *Citrus tristeza virus* by *A. gossypii* and *A. citricola* in Florida. *Phytophylactica* **19**: 169-172.
- **Yokomi, R.K., Garnsey, S.M. 1988.** Host Effects on Natural Spread of Citrus Tristeza Virus in Florida. In: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Edited by Timmer L W, Garnsey S M, Navarro L. IOCV, Riverside, USA, pp. 91-100.
- **Yokomi, R.K., Lastra, R., Stoetzel, M.B., Damsteegt, V.D., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Rocha-Peña, M.A., Niblett, C.L. 1994.** Establishment of the brown citrus aphid (*Homoptera, Aphididae*) in Central-America and the Caribbean Basin and transmission of *Citrus tristeza virus*. *Journal of Economic Entomology* **87**: 1078-1085.
- **Yokomi, R.K., Oldfield, G.N. 1991.** Seasonal fluctuations of alate aphid activity in California citrus groves. In: *Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists*. Edited by Brlansky R H, Lee R F, Timmer L W. IOCV, Riverside, USA, pp. 71-76.
- **Yokomi, R.K., Saponari, M., Sieburth, P.J. 2010.** Rapid Differentiation and Identification of Potential Severe Strains of *Citrus tristeza virus* by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assays. *Phytopathology* **100**: 319-327.
- **Zhou, X. H. 1998.** Correcting for verification bias in studies of a diagnostic test's accuracy. *Statistical Methods in Medical Research* **7**: 337-35.





# **ANEJOS**



**A.1 Cálculo de la probabilidad post-test a partir de las razones de verosimilitud y de la probabilidad pre-test**

Según Deeks y Altman (2004):

Probabilidad pre-test (prevalencia) =  $P_1$

Razón de probabilidades pre-test “pretest odds” ( $O_1$ ) =  $P_1 / (1-P_1)$

Razón de probabilidades post-test “posttest odds” ( $O_2$ ) =  $O_1 \times LR^a$

Probabilidad post-test =  $O_2 / (1+O_2)$

*“Razón de verosimilitud o “likelihood ratio”*

Si se combinan las razones de verosimilitud de  $i$  métodos según Neves et al. 2004:

Razón de probabilidades post-test “posttest odds” ( $O_2$ ) =  $O_1 \times LR_1 \times LR_2 \times \dots \times LR_i$

**A.2 Modelo de Hui y Walter (1980) para la estimación de la sensibilidad y de la especificidad de dos pruebas de diagnóstico ante la ausencia de “gold standard”**

El modelo de Hui y Walter estima la sensibilidad y la especificidad de dos pruebas de diagnóstico ante la ausencia de una técnica de referencia o “gold standard”, al aplicarlos simultáneamente a individuos pertenecientes a dos poblaciones con distinta prevalencia. Este modelo tiene dos premisas: 1) las dos pruebas deben de ser condicionalmente independientes; 2) la sensibilidad y la especificidad de las dos pruebas son las mismas en ambas poblaciones.

Los resultados obtenidos en cada población pueden expresarse en una tabla de contingencia 2x2 (Tabla A.1), cada tabla de contingencia tiene 3 grados de libertad. En general, para  $R$  pruebas aplicadas a  $S$  poblaciones, hay  $(2R-1) S$  grados de libertad para estimar  $(2R+1) S$  parámetros (Hui y Walter, 1980). Por tanto, cuando tenemos 2 poblaciones se dispone de 6 grados de libertad. A su vez, se dispone de seis incógnitas; la sensibilidad ( $Se_1$ ) y especificidad ( $Sp_1$ ) de la prueba 1 y la sensibilidad ( $Se_2$ ) y especificidad ( $Sp_2$ ) de la prueba 2, junto las dos prevalencias de las dos poblaciones muestreadas ( $Pr_1$  y  $Pr_2$ ). Así se tiene seis ecuaciones con seis incógnitas y por tanto el sistema de ecuaciones tiene solución (Enøe et al., 2000)

**Tabla A.1: Tabla 2x2 que relaciona el estatus de cada individuo según el resultado del test (positivo, negativo) para una población (i=1,2)**

**Técnica 2**

		Positivo	Negativo	Total
Técnica 1	Positivo	$a_i$	$b_i$	$g_i$
	Negativo	$c_i$	$d_i$	$h_i$
	Total	$e_i$	$f_i$	$n_i$

Las funciones de verosimilitud propuestas por Hui y Walter (1980), extraídas de Enøe et al. (2000) para estimar los diferentes parámetros se exponen a continuación:

$$Se_1 = [((g_1 e_2 - e_1 g_2) / n_1 n_2) + a_2 / n_2 - a_1 / n_1 + F] / 2[e_2 / n_2 - e_1 / n_1]$$

$$Se_2 = [((g_2 e_1 - e_2 g_1) / n_1 n_2) + a_2 / n_2 - a_1 / n_1 + F] / 2[g_2 / n_2 - g_1 / n_1]$$

$$Sp_1 = [((f_1 h_2 - h_1 f_2) / n_1 n_2) + d_1 / n_1 - d_2 / n_2 + F] / 2[e_2 / n_2 - e_1 / n_1]$$

$$Sp_2 = [((f_2 h_1 - h_2 f_1) / n_1 n_2) + d_1 / n_1 - d_2 / n_2 + F] / 2[g_2 / n_2 - g_1 / n_1]$$

$$Pr_1 = 0,5 - \{[(g_1 / n_1 (e_1 / n_1 - e_2 / n_2)) (e_1 / n_1 (g_1 / n_1 - g_2 / n_2)) + a_2 / n_2 - a_1 / n_1] / 2F\}$$

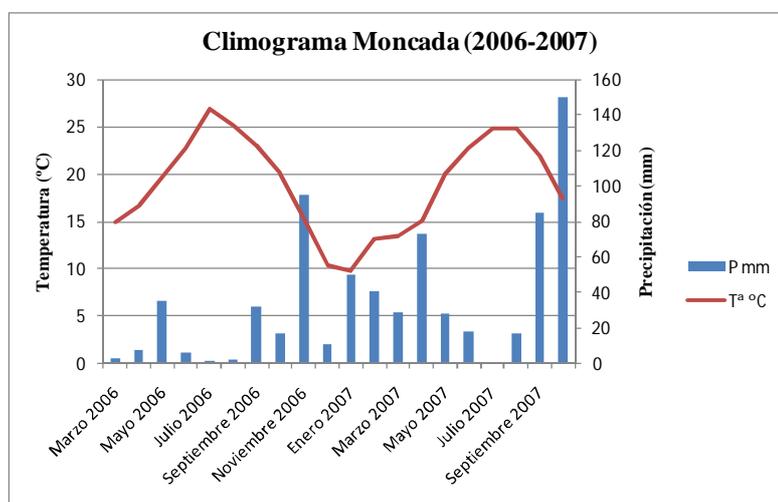
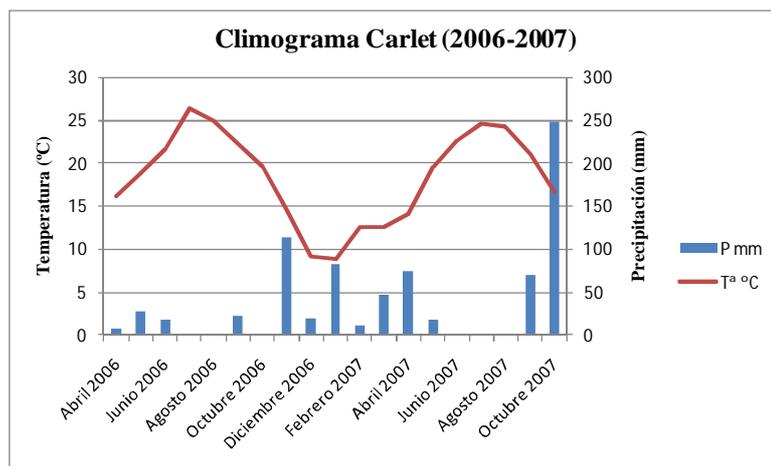
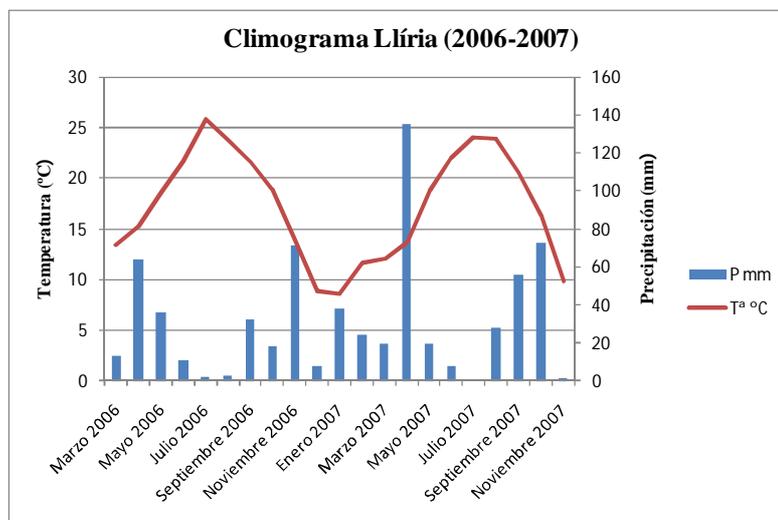
$$Pr_2 = 0,5 - \{[(g_2 / n_2 (e_1 / n_1 - e_2 / n_2)) (e_2 / n_2 (g_1 / n_1 - g_2 / n_2)) + a_2 / n_2 - a_1 / n_1] / 2F\}$$

Dónde F es igual:

$$F = \pm \{[(g_1 e_2 - g_2 e_1) / n_1 n_2 + a_1 / n_1 - a_2 / n_2]^2 - 4[(g_1 / n_1 - g_2 / n_2)((a_1 e_2 - a_2 e_1) / n_1 n_2)]\}^{0,5}$$

Se obtendrán dos sets de soluciones según se considere F como positiva o como negativa, sólo uno será el correcto asumiendo que  $Se + Sp > 1$  (Enøe et al., 2000). Para más detalles se puede consultar Hui y Walter (1980) o Enøe et al. (2000).

**Figura A.1: Climogramas de las parcelas experimentales durante los años 2006-2007**



**Tabla A.2: Volumen de caldo fitosanitario (al 1% de aceite) aplicado por planta y por hectárea en las diferentes parcelas experimentales**

<b>Lliria</b>			
<b>Mes</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>l / planta<sup>a</sup></b>	<b>l / ha<sup>b</sup></b>
<b>Abril 2006</b>	2	0,068	3.389
<b>Mayo 2006</b>	3	0,067	3.333
<b>Junio 2006</b>	2	0,118	5.913
<b>Julio 2006</b>	3	0,126	6.282
<b>Agosto 2006</b>	2	0,178	8.894
<b>Septiembre 2006</b>	3	0,165	8.237
<b>Octubre 2006</b>	2	0,234	11.683
<b>Noviembre 2006</b>	3	0,211	10.545
<b>Diciembre 2006</b>	2	0,134	6.683
<b>Abril 2007</b>	3	0,059	2.965
<b>Mayo 2007</b>	4	0,105	5.256
<b>Junio 2007</b>	4	0,108	5.385

<b>Carlet</b>			
<b>Mes</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>l / planta</b>	<b>l / ha</b>
<b>Mayo 2006</b>	2	0,062	3.117
<b>Junio 2006</b>	3	0,075	3.735
<b>Julio 2006</b>	2	0,114	5.679
<b>Agosto 2006</b>	3	0,123	6.173
<b>Septiembre 2006</b>	3	0,114	5.700
<b>Octubre 2006</b>	3	0,127	6.358
<b>Noviembre 2006</b>	2	0,103	5.154
<b>Diciembre 2006</b>	1	0,059	2.963
<b>Abril 2007</b>	3	0,035	1.770
<b>Mayo 2007</b>	5	0,068	3.420
<b>Junio 2007</b>	4	0,088	4.375
<b>Septiembre 2007</b>	3	0,075	3.735
<b>Octubre 2007</b>	3	0,073	3.652

<sup>a</sup> Media del volumen de caldo fitosanitario (litros) aplicado por planta durante ese mes

<sup>b</sup> Media del volumen de caldo fitosanitario (litros) aplicado por hectárea (50.000 plantas / ha) durante ese mes

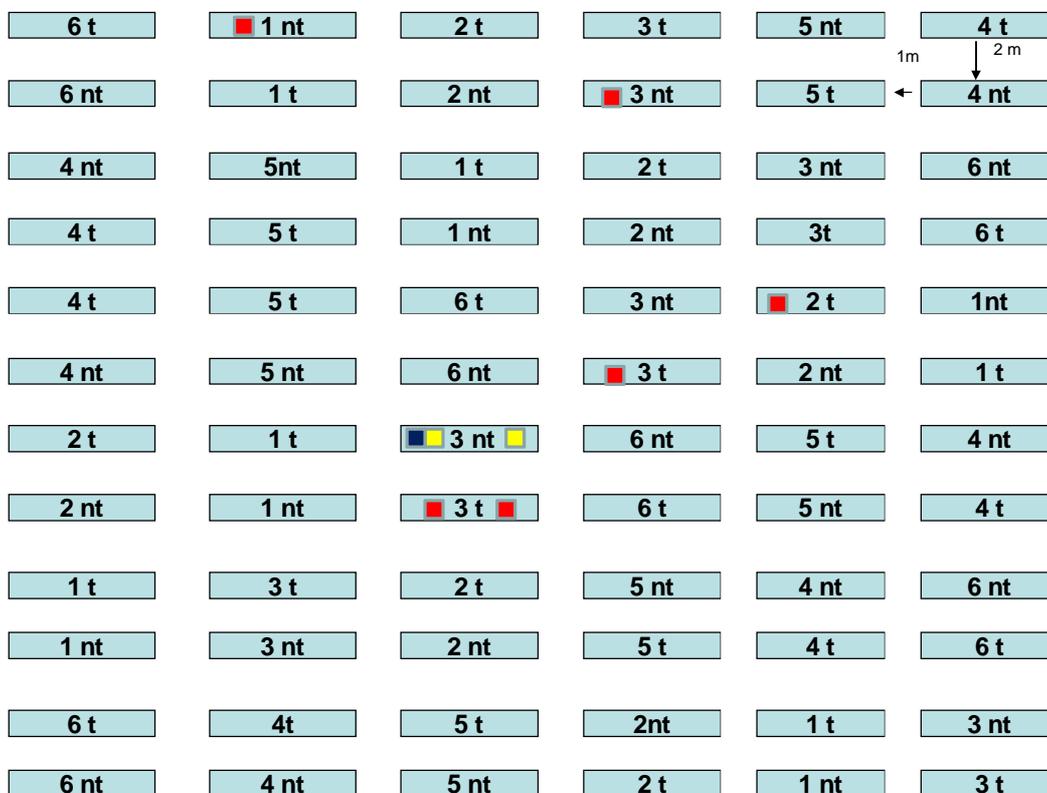
**Tabla A.2 bis: Volumen de caldo fitosanitario (al 1% de aceite) aplicado por planta y por hectárea en las diferentes parcelas experimentales**

<b>Moncada</b>			
<b>Mes</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>l / planta<sup>a</sup></b>	<b>l / ha<sup>b</sup></b>
<b>Marzo 2006</b>	3	0,091	4.548
<b>Abril 2006</b>	3	0,110	5.524
<b>Mayo 2006</b>	2	0,127	6.357
<b>Junio 2006</b>	2	0,146	7.286
<b>Julio 2006</b>	3	0,220	11.000
<b>Agosto 2006</b>	3	0,166	8.286
<b>Septiembre 2006</b>	2	0,169	8.429
<b>Octubre 2006</b>	4	0,208	10.381
<b>Noviembre 2006</b>	3	0,343	17.143
<b>Diciembre 2006</b>	2	0,350	17.500
<b>Abril 2007</b>	4	0,049	2.429
<b>Mayo 2007</b>	5	0,051	2.571

<sup>a</sup>Media del volumen de caldo fitosanitario (litros) aplicado por planta durante ese mes

<sup>b</sup>Media del volumen de caldo fitosanitario (litros) aplicado por hectárea (50.000 plantas / ha) durante ese mes

**Figura A.2: Posición de las plantas PPV-positivas detectadas en la parcela de Carlet durante el período estudiado**



<input type="text" value="1"/>	Grupo Nemaguard	<input type="text" value="4"/>	Grupo Cadaman
<input type="text" value="2"/>	Grupo Mariana GF8-1	<input type="text" value="5"/>	Grupo Mirobolan 29C
<input type="text" value="3"/>	Grupo Adesoto 101	<input type="text" value="6"/>	Grupo Garnem
<input type="text" value="nt"/>	Grupo No tratado	<input type="text" value="t"/>	Grupo Tratado

- Planta detectada en Noviembre 2006 por ELISA-DASI
- Planta detectada en Noviembre 2007 por ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real
- Planta detectada en Noviembre 2007 por “Spot” RT-PCR a tiempo real

