

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
Departamento de Producción Vegetal y
Ecosistemas Agroforestales



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**Máster Universitario en Producción Vegetal
y Ecosistemas Agroforestales**

**VIROSIS DETECTADAS EN CULTIVOS DE
CUCURBITÁCEAS EN ZAGHOUAN Y EL FAHS,
TÚNEZ**

Alumno: Silvana Cecilia Caravantes Recalde

**Directores: M^a Isabel Font San Ambrosio
Ana Alfaro Fernández**

Valencia, Septiembre 2014

Resumen

Las cucurbitáceas son una familia de plantas que incluyen diversos cultivos de gran importancia a nivel mundial, entre ellos se puede nombrar a la sandía (*Citrullus lanatus*), el melón (*Cucumis melo*), el pepino (*Cucumis sativus*), el calabacín (*Cucurbita pepo*) y la calabaza (*Cucurbita maxima* y *C. moschata*). En Túnez la producción de cultivos de cucurbitáceas ha ido aumentando significativamente con los años, detectándose un aumento de enfermedades de etiología viral en estos cultivos; reduciendo los rendimientos y la calidad de los cosechas, ocasionando pérdidas económicas al generar productos no comerciales.

En el año 2013, en la zona norte de Túnez, concretamente en Zaghouan y El Fahs se observó en diferentes cultivos de cucurbitáceas un incremento de plantas con síntomas de enfermedades virales. Se tomaron muestras de dieciocho plantas sintomáticas de seis parcelas (tres de cada zona) y se analizaron mediante técnicas moleculares (PCR y RT-PCR) y serológicas (DAS – ELISA). Los análisis incluyeron los principales virus que afectan a las cucurbitáceas en el área mediterránea, entre ellos: *Papaya ring spot virus* (PRSV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow fleck virus* (ZYFV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Moroccan watermelon mosaic virus* (MWMV), *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV), *Beet yellows virus* (BYV), *Beet pseudoyellows virus* (BPYV), *Cucumber yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cucumber leaf spot virus* (CLSV), *Melon necrotic spot virus* (MNSV), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Cucumber aphid-borne yellows virus* (CABYV) y *Tomate leaf curl Nueva Delhi virus* (ToLCNDV). Se incluyeron además análisis para determinar la presencia de *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) y *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), recientemente detectados en cultivos de sandía de Túnez. En este estudio se detectó CABYV en una muestra de melón en Zaghouan y en cinco de pepino de El Fahs. Tres de las muestras de pepino infectadas con CABYV estaban coinfectadas con CMV del tipo 1A. En las demás muestras no se detectó ningún otro virus de los analizados en el presente trabajo.

Palabras clave: DAS ELISA; RT – PCR; PCR; diagnóstico; virus vegetales; *Cucurbitaceae*

Abstract

Family *Cucurbitaceae* includes important crops worldwide; among them it can be mentioned watermelon (*Citrullus lanatus*), melon (*Cucumis melo*), cucumber (*Cucumis sativus*), zucchini (*Cucurbita pepo*) and pumpkin (*Cucurbita maxima* and *C. moschata*). In Tunisia, cucurbit production have increased significantly over the past few years, but lately it has been found cucurbit plants with symptoms of different viral diseases which reduce the yield and quality of crops, making some products unmarketable.

In 2013, symptomatic cucurbit plants were observed in Zhagouan and El Fahs. A total of 18 leaves samples were collected in 2013 in six different fields (three in each area). Samples were analyzed by molecular (PCR and RT-PCR) and serological methods (DAS – ELISA). The analysis included viruses that typically affect cucurbits in the Mediterranean area, such as: *Papaya ring spot virus* (PRSV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow fleck virus* (ZYFV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Moroccan watermelon mosaic virus* (MWMV), *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV), *Beet yellows virus* (BYV), *Beet pseudoyellows virus* (BPYV), *Cucumber yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cucumber leaf spot virus* (CLSV), *Melon necrotic spot virus* (MNSV), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Cucumber aphid-borne yellows virus* (CABYV) and *Tomato leaf curl Nueva Delhi virus* (ToLCNDV). *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) y *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) were also analyzed because they have been recently reported affecting watermelon in Tunisia.. From the eighteen samples analyzed from the regions of Zaghouan and El Fahs, one and five were positive to CABYV for melon and cucumber, respectively. CMV type 1A was also detected in three cucumber samples collected in El Fahs, which were also infected with CABYV. All the other viruses tested were not detected in these regions.

Palabras Clave: DAS ELISA; RT – PCR; PCR; Diagnostic; Plant virus; *Cucurbitaceae*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron a lo largo del trabajo final de master, en especial a Isabel Font y Ana Alfaro pues de ellas aprendí todo lo que se ahora sobre los distintos virus y las técnicas que se utilizan para su identificación. Quiero agradecerles su apoyo incondicional, su paciencia y su disponibilidad de ayudarme en cualquier momento que lo necesité, sin ellas todo esto no hubiera sido posible.

Agradezco también a José Guillermo Juárez por estar creer en mi. A mi familia que han estado siempre ahí para mi y en especial a mi Madre por haberme apoyado a lo largo de los estudios de master y a lo largo de toda la carrera.

Y por último quiero agradecer a mis amigos del master porque estar lejos de casa fue difícil pero gracias a ellos tuve una familia fuera mi país.

ÍNDICE

RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE.....	V
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Las cucurbitáceas: Descripción de cultivos de cucurbitáceas e importancia económica.....	1
1.1.1. Pepino	1
1.1.2. Melón	2
1.1.3. Sandía	3
1.1.4. Calabacín	4
1.2. Enfermedades causadas por virus en cucurbitáceas	5
1.2.1. <i>Papaya ring spot virus</i> (PRSV) o Virus de las manchas anulares de la papaya	8
1.2.2. <i>Watermelon mosaic virus</i> (WMV) o Virus del mosaico 2 de la sandía	9
1.2.3. <i>Zucchini yellow fleck virus</i> (ZYFV) o Virus del punteado Amarillo del calabacín... ..	10
1.2.4. <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) o Virus del mosaico amarillo del calabacín ..	10
1.2.5. <i>Moroccan watermelon mosaic virus</i> (MWMV) o Virus marroquí del mosaico de la sandía.....	12
1.2.6. <i>Cucumber vein yellowing virus</i> (CVYV) o Virus de las venas amarillas del pepino.....	12
1.2.7. <i>Beet yellows virus</i> (BYV) o Virus del amarilleo de la remolacha	13
1.2.8. <i>Beet pseudoyellows virus</i> (BPYV) o Virus del falso amarilleo de la remolacha	13
1.2.9. <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> (CYSDV) o Virus del amarilleo y del enanismo de las cucurbitáceas.....	14
1.2.10. <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) o Virus del bronceado del tomate.....	15
1.2.11. <i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (CGMMV) o Virus del mosaico verde jaspeado del pepino.....	15
1.2.12. <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) o Virus del mosaico del pepino	16
1.2.13. <i>Cucumber leaf spot virus</i> (CLSV) o Virus de la mancha de la hoja del pepino.....	18
1.2.14. <i>Melon necrotic spot virus</i> (MNSV) o Virus de las manchas necróticas del melón ..	18
1.2.15. <i>Squash mosaic virus</i> (SqMV) o Virus del mosaico de la calabaza	19

1.2.16. <i>Cucumber aphid – borne yellows virus</i> (CABYV) o Virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones	20
1.2.17. <i>Tomato leaf curl Nueva Delhi virus</i> (ToLCNDV) o Virus del rizado del tomate de Nueva Delhi.....	21
1.3. Técnicas de detección, diagnóstico e identificación de virus vegetales.....	22
1.3.1. Técnicas moleculares.....	22
1.3.2. Técnicas serológicas: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)	24
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.2. Material vegetal.....	27
3.2. Detección de virus mediante la técnica serológica DAS - ELISA	30
3.3 Detección e identificación de virus mediante técnicas moleculares: PCR y RT-PCR	31
3.3.1. Extracción de ácidos nucleicos	31
3.3.2. Detección mediante PCR de distintas especies del género <i>Begomovirus</i>	31
3.3.3. Detección mediante RT-PCR en un paso de CABYV, CVYV, BPYV, CYSDV, BYV, CLSV y CMV	32
3.3.4. Detección e identificación del tipo de CMV mediante RT-PCR en un paso y análisis RFLP	34
3.3.5. Detección mediante RT-PCR en dos pasos de especies virales dentro del género <i>Potyvirus</i>	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5. CONCLUSIONES.....	42
6. BIBLIOGRAFÍA.....	43
7. ANEXOS.....	48
<u>Anexo 1</u> Extracción de ADN con kit E.Z.N.A.® DNA Isolation Kit de la casa comercial Omega Bio – Tek, Georgia, Estados Unidos.	48
<u>Anexo 2</u> Productos y volúmenes empleados para la PCR con cebadores degenerados para detectar diferentes especies del género <i>Begomovirus</i>	49
<u>Anexo 3</u> Protocolo de extracción de ARN con RNAeasy plant mini kit, Qiagen.....	50
<u>Anexo 4</u> Productos y volúmenes empleados para la RT PCR en un paso con cebadores específicos de diferentes virus de ARN	51

<u>Anexo 5</u> Productos y volúmenes empleados para la RT PCR en dos paso con cebadores generales para detectar diferentes especies del género <i>Potyvirus</i>	53
<u>Anexo 6</u> Protocolo de la técnica serológica DAS ELISA para antisueros suministrados por la casa comercial Loewe Biochemica GmbH (Sauerlach, Alemania).....	54
<u>Anexo 7</u> Productos y volúmenes empleados para la RT PCR en un paso con dos parejas diferentes de cebadores específicos de CMV y posterior análisis de los productos obtenidos mediante RFLPs con dos enzimas de restricción diferentes.....	57

Índice de Tablas

Tabla 1 Principales virosis que han sido citadas infectando a diferentes especies de cucurbitáceas cultivadas (Jordá y Font 2012)	6
Tabla 2 Identificación de las muestras de cucurbitáceas tomadas en Zaghouan y El Fahs, Túnez en 2013	27
Tabla 3 Resultados de los cultivos de cucurbitáceas analizados en 6 parcelas de Zaghouan y El Fahs (Túnez).....	38

Índice de figuras

Figura 1 Producción de pepino en Túnez de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)	2
Figura 2 Producción mundial de pepino de 2002 - 2012 (FAOSTAT 2014).....	2
Figura 3 Producción de melón en Túnez de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)	3
Figura 4 Producción mundial de melón de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014).....	3
Figura 5 Producción de sandía en Túnez de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014).....	4
Figura 6 Producción mundial de sandía de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014).....	4
Figura 7 Producción de calabazas y calabacines en Túnez de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)	5
Figura 8 Producción mundial de calabazas y calabacines de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)	5
Figura 9 Síntomas de anillos cloróticos en sandía atribuidos a la infección por PRSV (Gonsalves et al. 2010).....	9
Figura 10 Síntomas de deformación de frutos en calabacín WMV (Hausbeck 2011).....	10
Figura 11 Frutos de calabacín infectados por ZYMV que muestran bultos y deformaciones (Provvidenti 2014).....	11
Figura 12 Clorosis internervial causado por BPYV en pepino (Texas A&M AgriLife extention 2014).....	14
Figura 13 Abullonado en hojas de pepino infectado por CGMMV (Texas A&M AgriLife Extention 2009)	16
Figura 14 Deformación en frutos asociada a la infección por CGMMV en pepino (Vkm 2008) .	16
Figura 15 Pepinos deformes y descoloridos infectados por CMV (Zitter et al. 2009).....	18
Figura 16 Mosaico amarillo verde en pepino causado por CMV (Texas A&M AgriLife Extention 2009).....	18
Figura 17 Amarilleo internervial de las hojas de melón causado por la infección con CABYV (Lecoq 2012).....	21
Figura 18 Amarilleo internervial generalizado causado por CABYV en cucurbitáceas (Lecoq 2012).....	21
Figura 19 Mapa de Túnez donde se encuentran señaladas las dos zonas de muestreo	27
Figura 20 Muestra de hojas recogidas en Zaghouan en el campo 1 mostrando abullonado y deformación (1-1) y necrosis en hojas (1-2 y -1-3) y en el campo 2 donde se observa ligera deformación y asimetría (2-2) aunque las otras muestras eran asintomáticas (2-1 y 2-3).	29
Figura 21 Muestra de hojas de melón recogidas en el campo 3 de Zaghouan donde se observa deformación de las hojas (3-1 y 3-2) y un fuerte amarilleo internervial en la muestra 3-3. ...	29

Figura 22 Muestras de hojas de calabacín recogidas en el campo 4 de El Fahs mostrando amarilleo internervial (4-1) acompañado en ocasiones de deformación de la hoja (4-3) y necrosis marginal (4-2).....	30
Figura 23 Muestras de hojas de Pepino recogidas en el campo 5 y campo 6 de en El Fahs mostrando un bandeado de venas incipiente con una coloración internervial en verde claro (5-1), aclarado de nervios y necrosis (5-2 y 6-2) y una clorosis internervial (6-3), acompañada en ocasiones por deformación de la hoja (6-1) o únicamente localizada en la zona apical de la hoja (5-3).....	30
Figura 24 Placa para análisis de CMV por DAS - ELISA	37
Figura 25 Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en TAE 1x de los productos de RT-PCR con cebadores específicos deCABYV. En los diferentes carriles se indican el código de las muestras analizadas, incluyéndose una muestra positiva (+), un blanco (NT) y un marcador GeneRuler 100bp ladder de Fermentas (M)	39
Figura 26 Electroforesis en gel de agarosa 3% en TAE 1x de los productos obtenidos tras el análisis RFLP con enzima HpaII de los productos de RT-PCR con los cebadores específicos CMV CP for/r. En los diferentes carriles se sitúan las muestras así como controles positivos de los distintos tipos de CMv en función del patrón observado. En el carril M se incluye el marcador GeneRuler 100bp ladder de Fermentas	40
Figura 27 Electroforesis en gel de agarosa 3% en TAE 1x de los productos obtenidos tras el análisis RFLP con enzima MluI de los productos de RT-PCR con los cebadores específicos W8R/11. En los diferentes carriles se sitúan las muestras así como controles positivos de los distintos tipos de CMV en función del patrón observado. En el carril M se incluye el marcador GeneRuler 100bp ladder de Fermentas	40

1. INTRODUCCIÓN

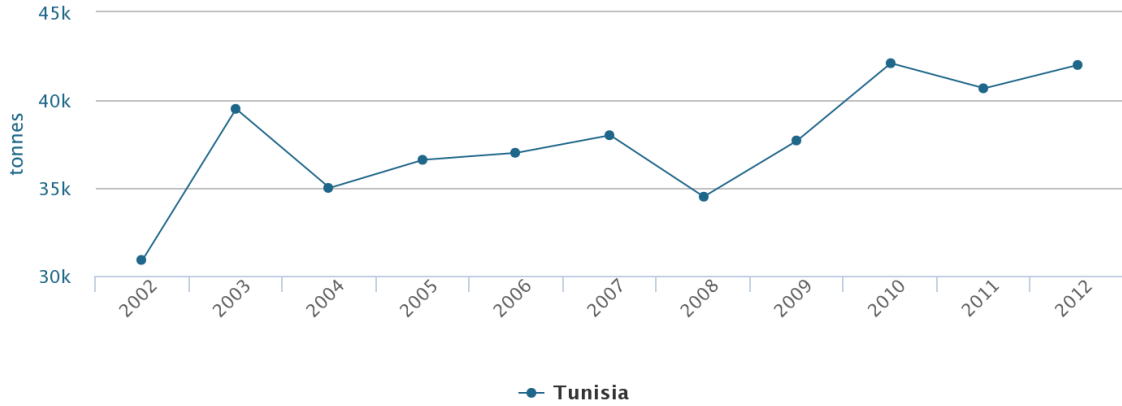
1.1. Las cucurbitáceas: Descripción de cultivos de cucurbitáceas e importancia económica

Las cucurbitáceas son una familia de plantas que forman un importante grupo de vegetales cultivados por todo el mundo. Esta familia consta de aproximadamente 800 especies agrupadas en 118 géneros. Las cucurbitáceas son plantas principalmente herbáceas, anuales con zarcillos, trepadoras o rastreras, sensibles al frío. Sus frutos son pepónides. Las principales cucurbitáceas cultivadas son: el pepino (*Cucumis sativus* L.), el melón (*Cucumis melo* L.), la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), la calabaza (*Curcubita maxima* Duch. y *Curcubita moschata* Duch.) y el calabacín (*Cucurbita pepo* L.) (Wang *et al.* 2011).

1.1.1. Pepino

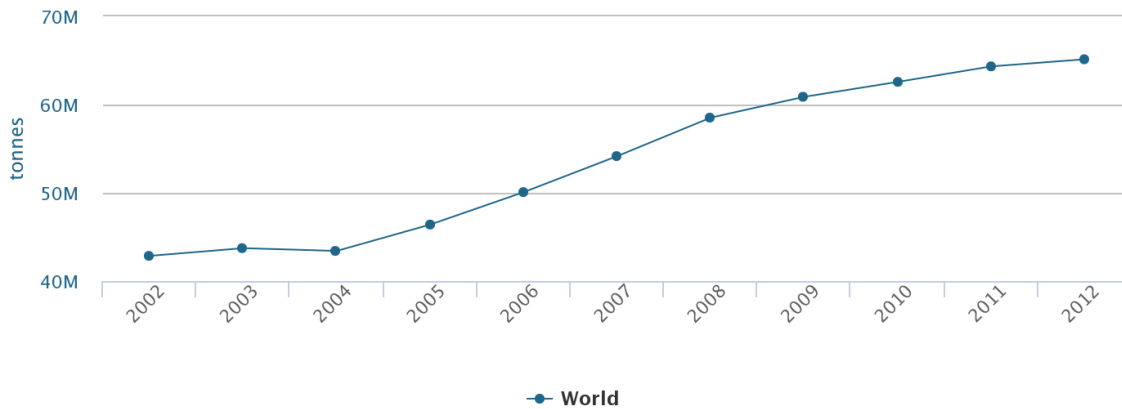
El pepino (*Cucumis sativus* L.) es una planta anual monoica originaria del norte de la India, aunque algunos autores sitúan su centro de en África tropical. El consumo del pepino es en fresco principalmente en ensaladas por su gran valor refrescante, aunque algunas variedades se utilizan como encurtidos (Maroto 2002).

En Túnez hay cultivadas 2.000 hectáreas de pepino y se producen anualmente 42.000 toneladas. En los últimos años se ha producido un incremento de la producción de este cultivo en el país (Figura 1). Alrededor del mundo hay cultivadas 2.109.651 hectáreas de pepino y se producen en promedio 308.743 hg/ha. La tendencia de producción de pepino va en aumento (Figura 2). En Asia se produce el 84% del pepino, en Europa el 9,7 %, en América el 3,9% y en África el 2% (FAOSTAT 2014).



M = Million, k = Thousand

Figura 1 Producción de pepino en Túnez de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)



M = Million, k = Thousand

Figura 2 Producción mundial de pepino de 2002 - 2012 (FAOSTAT 2014)

1.1.2. Melón

El melón (*Cucumis melo* L.) es una planta anual monoica originaria de África y del suroeste asiático. Es una planta cuyos frutos son consumidos en fresco o para la elaboración de dulces, en estadios juveniles puede ser utilizado para preparación de encurtidos. A veces los frutos son utilizados en la industria de conserva, congelados y confitados (Maroto 2002).

En la figura 4 se puede observar que en Túnez hay 10.500 hectáreas cultivadas de melón y se producen anualmente 107.000 toneladas. En el mundo hay cultivadas 1.339.006 hectáreas de melón y se producen en promedio 2.384.229 hg/ha. La tendencia general de producción de melón va en aumento (Figura 3). En Asia se produce el 72,8% del melón, en Europa el 8,1 %, en América el 12,6%, en África el 6,1% y en Oceanía 0,3% (FAOSTAT 2014).

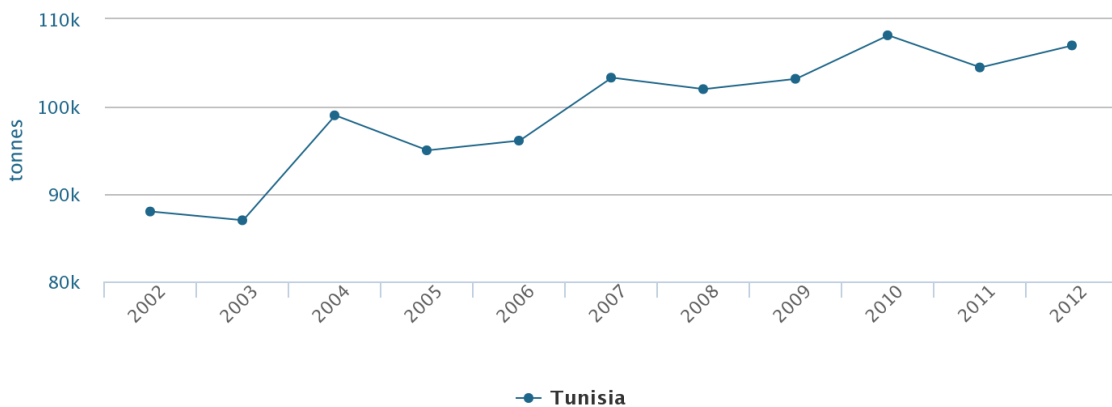


Figura 3 Producción de melón en Túnez de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)

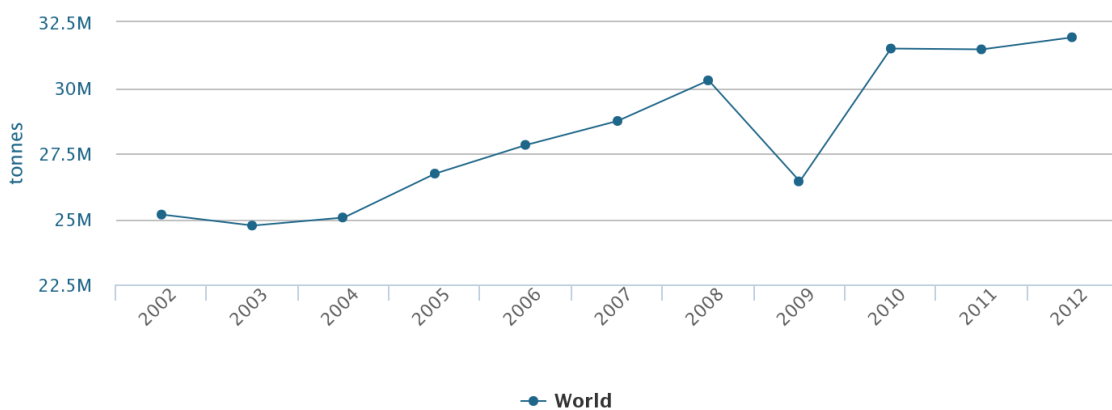
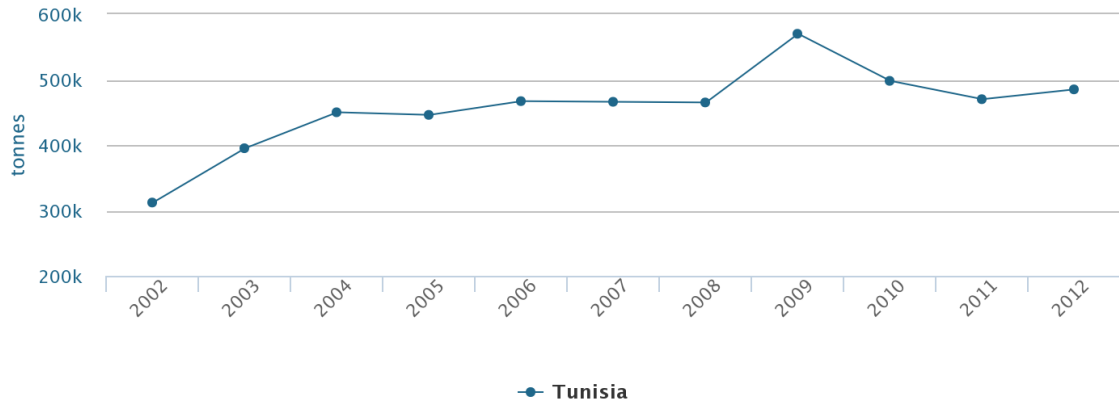


Figura 4 Producción mundial de melón de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)

1.1.3. Sandía

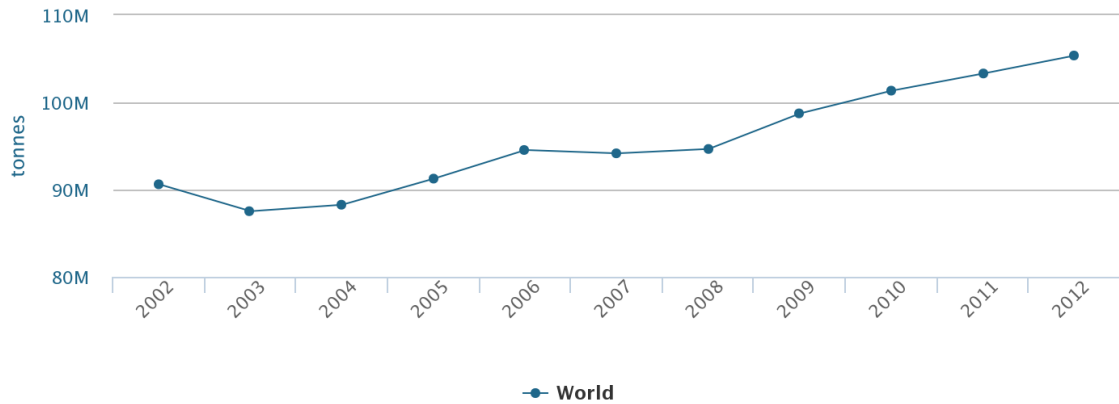
La sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) es una planta anual monoica originaria del África tropical y sus frutos son consumidos en fresco principalmente apreciados por su sabor refrescante. Posee un alto contenido de agua (Maroto 2002).

En Túnez hay cultivadas 180.00 hectáreas de sandía y se producen 485.000 toneladas cada año (figura 5). Mundialmente hay cultivadas 3.472.997 hectáreas de sandía y se producen en promedio 303.405 hg/ha. La tendencia general de producción de melón va en aumento (Figura 6). En Asia se produce el 82,9% de la sandía, en Europa el 5,4%, en América el 6,2%, en África el 5,3% y en Oceanía 0,1% (FAOSTAT 2014).



M = Million, k = Thousand

Figura 5 Producción de sandía en Túnez de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)



M = Million, k = Thousand

Figura 6 Producción mundial de sandía de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)

1.1.4. Calabacín

El calabacín (*Cucurbita pepo* L.) es una planta anual, herbácea y monoica. Es originario del continente americano en México. Sus frutos son recolectados en estado joven sin haber alcanzado su tamaño definitivo y se consumen principalmente fritos, en sopas, confituras etc. (Maroto 2002).

En Túnez hay 6.800 hectáreas cultivadas de calabazas y calabacines y su producción anual es de 50.000 toneladas (Figura 7). Mundialmente hay cultivadas 1.788.773 hectáreas de calabacines y calabazas y se producen en promedio 137.615 hg/ha. La tendencia general de producción mundial de calabacines y calabazas va en aumento (Figura 8). En Asia se produce el 63% de calabacines y calabazas, en Europa el 14,8%, en América el 12,3%, en África el 8,6% y en Oceanía 1,3% (FAOSTAT 2014).

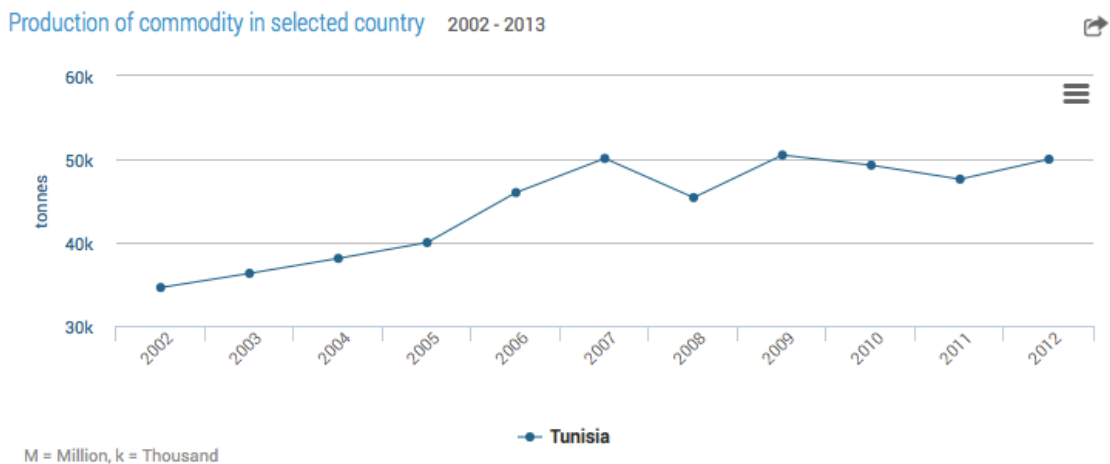


Figura 7 Producción de calabazas y calabacines en Túnez de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)

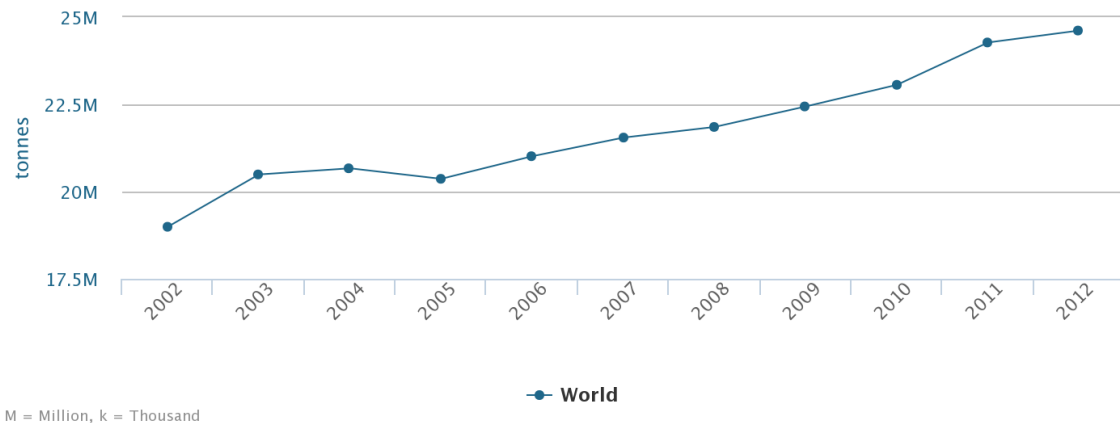


Figura 8 Producción mundial de calabazas y calabacines de 2000 - 2012 (FAOSTAT 2014)

1.2. Enfermedades causadas por virus en cucurbitáceas

Existen muchas enfermedades conocidas en diferentes especies de cucurbitáceas con etiologías diversas, destacando las causadas por virus ya que son muy difíciles de controlar y pueden ocasionar graves pérdidas económicas. La gravedad e incidencia de las enfermedades de etiología viral varían según las relaciones entre patógeno y huésped, vectores, medio ambiente y zonas en la que aparecen. Es muy importante identificar los virus que causan las enfermedades para poder adoptar estrategias para minimizar su impacto en la producción y

calidad de los cultivos de cucurbitáceas (Zitter *et al.* 2004). Las principales virosis que pueden afectar cultivos de cucurbitáceas se encuentran descritas en la Tabla 1.

Tabla 1 Principales virosis que han sido citadas infectando a diferentes especies de cucurbitáceas cultivadas (Jordá y Font 2012)

Virus	Acrónimos	Cultivo afectado	Familia (género)	Transmisión
<i>Arabid mosaic virus</i>	ArMV	Pepino Calabaza Calabacín	<i>Comoviridae</i> (<i>Nepovirus</i>)	Nematodos <i>Xiphinena diversicaudatum</i>
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	BYMV	Calabaza Calabacín	<i>Potyviridae</i> (<i>Potyvirus</i>)	Áfidos <i>Myzus persicae</i>
<i>Beet curly top virus</i>	BCTV	Melón	<i>Geminiviridae</i> (<i>Curtovirus</i>)	Cicadélidos <i>Circulifer tenellus</i>
<i>Beet pseudo-yellow virus</i>	BPYV	Melón	<i>Closteroviridae</i> (<i>Closterovirus</i>)	Aleuródidos <i>Trialeurodes vaporariorum</i>
<i>Bryonia mottle virus</i>	BryMV	Melón Pepino Etc.	<i>Potyviridae</i>	Áfidos
<i>Clover Yellow Vein virus</i>	CIYVV	Calabaza Calabacín	<i>Potyviridae</i> (<i>Potyvirus</i>)	Áfidos <i>Myzus persicae</i>
<i>Cucumber Chlorotic Spot virus</i>	CCVS	Pepino	<i>Closteroviridae</i>	Aleuródidos
<i>Cucumber Green Mottle Virus</i>	CGMV	Melón Sandía Pepino	<i>Tobamovirus</i>	Semilla Mecánica
<i>Cucumber Leaf Spot virus</i>		Pepino	<i>Tombusviridae</i> (<i>Aureusvirus</i>)	Semilla mecánica <i>Olpidium bornovanus</i>
<i>Cucumber Mosaic virus</i>	CMV	Melón Pepino Sandía Calabaza Etc.	<i>Cucumovirus</i>	Áfidos <i>Myzus persicae</i> <i>Aphis gossypii</i>
<i>Cucumber Necrosis virus</i>	CNV	Pepino	<i>Tombusviridae</i> (<i>Tombusvirus</i>)	<i>Olpidium cucurbitacearum</i>
<i>Cucumber Toad Skin virus</i>	CTSV	Pepino	<i>Rhabdovirus</i>	_____
<i>Cucumber vein yellowing virus</i>	CVYV	Pepino Melón Sandía	<i>Potyviridae</i>	Aleuródidos <i>Bemisia tabaci</i>
<i>Cucumber Yellows virus</i>	CuYV	Pepino Melón	<i>Closteroviridae</i>	Aleuródidos <i>Trialeurodes vaporariorum</i>
<i>Cucumber Aphid – Borne Yellows virus</i>	CABYV	Melón Pepino Calabaza	<i>Luteovirus</i>	Áfidos <i>Myzus persicae</i> <i>Aphis gossypii</i>
<i>Cucumber leaf crumple virus</i>	CLCV	Sandía Melón	<i>Geminiviridae</i>	Aleuródidos <i>Bemisia tabaci</i>
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	CYSDV	Melón Pepino	<i>Closteroviridae</i> (<i>Crinivirus</i>)	Aleuródidos <i>Bemisia tabaci</i>

<i>Lettuce infectious yellows virus</i>	LIYV	Melón Sandía Calabaza	<i>Closteroviridae</i> (<i>Crinivirus</i>)	Aleuródidos <i>Bemisia tabaci</i>
<i>Melon leaf curl virus</i>	MLCuV	Melón Sandía	<i>Geminiviridae</i> (<i>Begomovirus</i>)	Aleuródidos <i>Bemisia tabaci</i>
<i>Melon leaf variegation virus</i>	MLVV	Melón	<i>Rhabdoviridae</i> (<i>Rhabdovirus</i>)	
<i>Melon necrotic spot virus</i>	MNSV	Melón Sandía Pepino	<i>Carmovirus</i>	Semillas Hongos <i>Olpidium bornovanus</i>
<i>Melon rugose mosaic virus</i>	MRMV	Melón Sandía	<i>Tymovirus</i>	Coleópteros
<i>Melon vein banding mosaic virus</i>	MVBMV	Melón	<i>Potyviridae</i>	Áfidos
<i>Moroccan watermelon mosaic virus</i>	MWMV	Sandía	<i>Potyviridae</i>	<i>Myzus persicae</i> y <i>Aphis gossypii</i>
<i>Muskmelon vein necrosis virus</i>	MuVNV	Melón Pepino	<i>Carlavirus</i>	Áfidos
<i>Ourmia melon virus</i>	OuMV	Melón	<i>Ourmiavirus</i>	
<i>Papaya ring spot virus (WMV – I)</i>	PRSV	Melón Sandía Pepino Calabaza	<i>Potyviridae</i> (<i>Potyvirus</i>)	Áfidos <i>Myzus persicae</i> <i>Aphis gossypii</i>
<i>Squash leaf curl virus</i>	SLCV	Calabaza	<i>Geminiviridae</i> (<i>Begomovirus</i>)	Aleuródidos
<i>Squash mosaic virus</i>	SqMV	Melón Sandía Calabaza	<i>Comoviridae</i> (<i>Comovirus</i>)	Semilla mecánica Coleópteros
<i>Squash yellow leaf curl virus</i>	SYLCV	Calabaza	<i>Potyviridae</i>	Aleuródidos <i>Bemisia tabaci</i>
<i>Squash yellow mottle virus</i>		Calabaza	<i>Geminiviridae</i>	
<i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	Pepino	<i>Necrovirus</i>	Hongos
<i>Tobacco ring – spot virus</i>	TRSV	Pepino Melón Sandía Calabaza	<i>Comoviridae</i> (<i>Nepovirus</i>)	Nematodos <i>Xiphinema americanum</i> .
<i>Tomato Black ring virus</i>	TBRV	Calabaza	<i>Comoviridae</i> (<i>Nepovirus</i>)	Nematodos <i>Longidorus</i> sp.
<i>Tomato ring spot virus</i>	ToRSV	Pepino Melón Sandía Calabaza	<i>Comoviridae</i> (<i>Nepovirus</i>)	Nematodos <i>Xiphinema</i> sp.
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV	Sandía Melón	<i>Bunyaviridae</i> (<i>Tospovirus</i>)	Tisanópteros <i>Frankliniella occidentalis</i>
<i>Watermelon bud necrosis virus</i>	WBNV	Sandía	<i>Bunyaviridae</i>	Tisanópteros
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>	WCSV	Sandía	<i>Geminiviridae</i>	Aleuródidos
<i>Watermelon leaf mottle virus</i>	WLMV	Sandía	<i>Potyviridae</i>	Áfidos <i>Myzus persicae</i>
<i>Watermelon mosaic II virus</i>	WMV	Sandía Melón Pepino	<i>Potyviridae</i> (<i>Potyvirus</i>)	Áfidos <i>Myzus persicae</i> <i>Aphis gossypii</i>

		Calabaza		
<i>Watermelon silver mottle virus</i>	WSMoV	Sandía	<i>Bunyaviridae</i> (<i>Tospovirus</i>)	Tisanópteros <i>Thrips palmi</i>
<i>Zucchini green mottle mosaic virus</i>	ZGMMV	Calabaza	<i>Tobamovirus</i>	Semilla
<i>Zucchini yellow fleck virus</i>	ZYFV	Melón Sandía Pepino Calabaza	<i>Potyviridae</i> (<i>Potyvirus</i>)	Áfidos
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	ZYMV	Pepino Sandía Melón Calabaza	<i>Potyviridae</i> (<i>Potyvirus</i>)	Áfidos <i>Myzus persicae</i> <i>Aphis gossypii</i>

A continuación se incluye una breve descripción de los virus de cucurbitáceas más importantes debido a su gravedad en los cultivos a los que afecta o a su amplia distribución mundial:

1.2.1. *Papaya ring spot virus* (PRSV) o Virus de las manchas anulares de la papaya

El virus de las manchas anulares de la papaya pertenece al género *Potyvirus* dentro de familia *Potyviridae* y al. Al principio este virus junto con *Watermelon mosaic virus* (WMV) eran considerados como diferentes razas de un mismo virus, actualmente constituyen dos especies diferentes dentro del género *Potyvirus*. PRSV incluye dos patotipos denominados PSRV-P (papaya) y PRSV-W (sandía), este último específico de cucurbitáceas (Jordá y Font 2002). El virus consiste en una única molécula lineal de ARN de cadena sencilla y de sentido positivo de 10.3 kb. La partícula viral mide 760 – 800 nm de longitud y 12 nm de diámetro y sus partículas son filamentosas y flexuosas. Induce inclusiones en forma de molinillos (“pinwheels”) y de tubos (“scrolls”) en el citoplasma de las células de las plantas infectadas (Melgarejo *et al.* 2010).

Las plantas huéspedes de PRSV son: el melón, sandía, pepino, calabacín, calabaza y papaya (*Carica papaya* L.). Actualmente se encuentra distribuido mundialmente. La sintomatología general que muestran las plantas afectadas es mosaico y deformaciones en hojas y frutos. Según el huésped se observan ocasionalmente hojas abullonadas y frutos según el huésped. Concretamente, en pepino produce mosaico y deformaciones en hojas y frutos; en calabacín, mosaico en hojas y frutos y hojas laciniadas; en melón, amarilleo general, hojas deformes, nervios fasciados y mosaico en fruto; y en sandía causa moteados y deformación de hojas y frutos, apareciendo en ocasiones anillos cloróticos (Figura 9) en estos últimos (Jordá y Font 2002; Melgarejo *et al.* 2010).

Este virus se transmite de forma no persistente por varias especies de pulgones entre ellos *Myzus persicae* Sulzer, *Aphis gossypii* Glover, *Aphis craccivora* Koch, *Aulacorthum solani* Kaltenbach y *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (Melgarejo *et al.* 2010). No se ha encontrado transmisión por semilla (Luís Arteaga 1994).



Figura 9 Síntomas de anillos cloróticos en sandía atribuidos a la infección por PRSV (Gonsalves *et al.* 2010)

1.2.2. *Watermelon mosaic virus (WMV) o Virus del mosaico 2 de la sandía*

Pertenece al género *Potyvirus* dentro de la Familia *Potyviridae*. Es un virus con una única molécula de ARN de cadena sencilla y de sentido positivo de 9.7 kb. Su partícula viral mide de 750 a 780 nm y es de forma filamentososa. Al igual que PRSV, induce inclusiones cilíndricas en forma de ruedas (“pinwheels”) en el citoplasma y en forma de tubo (“scrolls”). Algunos aislados producen agregados laminares (Melgarejo *et al.* 2010).

Las plantas huéspedes de WMV son el pepino, el melón, la calabaza, el calabacín y sandía de la familia *Cucurbitaceae*; y guisante (*Pisum sativum* L.), judía (*Phaseolus vulgaris* L.) de la familia *Fabaceae* y espinaca (*Spinacea oleracea* L.), familia *Chenopodiaceae*. Esta distribuido geográficamente por todo el mundo. Sus síntomas en pepino se manifiestan como un mosaico suave en hojas y moteado en frutos. En calabacín, produce un mosaico deformante con hojas filiformes y deformación de frutos (Figura 10). En melón, se observa mosaico en hojas, a veces deformante con reducción de la superficie foliar, y mosaico en frutos (Melgarejo *et al.* 2010). En sandía, la infección por WMV se manifiesta por mosaicos foliares suaves y manchas verde oscuro junto a los nervios de las hojas y deformación el limbo foliar, y anillos cloróticos en frutos (Jordá y Font 2002).

La transmisión del WMV es de forma no persistente por varias especies (aproximadamente 38) de pulgones, entre ellos *Aphis citricola* Van Der Goot, *A. craccivora*, *A. gossypii*, *A. solani*, *Myzus. euphorbiae*, *M. persicae*, *Toxoptera citricida* Kirkaldy y por el minador de hoja *Lyriomiza sativae* Blanchard. No se transmite por semilla (Luís Arteaga 1994).



Figura 10 Síntomas de deformación de frutos en calabacín WMV (Hausbeck 2011)

1.2.3. *Zucchini yellow fleck virus (ZYFV) o Virus del punteado Amarillo del calabacín*

Pertenece al género *Potyvirus* dentro de la familia *Potyviridae*. Es un virus de ARN monocatenario y sentido positivo. La partícula viral mide 750 nm y tiene una cápsida que es filamentosa. Induce cuerpos de inclusión en las células y se encuentra en el citoplasma. Las inclusiones pueden ser cristalizadas, como cuerpos membranosos y en forma de molinillo (“pinwheels”) o amorfas (ICTVdB 2006).

Este virus se ha descrito infectando distintas especies de cucurbitáceas (pepino, melón, calabacín, sandía y calabaza) y también de otras familias (*Chenopodium quinoa* Willd, *C. amaranticolor* Coste & Reyn, *Gomphrena globosa* L., *Vigna unguiculata* (L.) Walp, *Phaseolus vulgaris*). ZYFV se encuentra distribuido por los diferentes países de la cuenca mediterránea (ICTVdB 2006).

Los síntomas que induce la infección por ZYFV son mosaico, puntos amarillos en hojas adultas, lesiones locales amarillas y moteado. Concretamente, en pepino produce lesiones locales necróticas y moteado. En calabacín, lesiones locales y necrosis total; y en sandía, lesiones locales pequeñas y puntos amarillos. Es transmitido de manera no persistente por insectos de la familia *Aphididae* (pulgones) (ICTVdB Management 2006).

1.2.4. *Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) o Virus del mosaico amarillo del calabacín*

Pertenece al género *Potyvirus* dentro de la familia *Potyviridae*. El virus del mosaico amarillo del calabacín está constituido por una única molécula de ARN de cadena sencilla y sentido positivo de 9kb. Su partícula mide aproximadamente 750 nm de longitud y es una partícula filamentosa y flexuosa (Jordá y Font 2002). Induce inclusiones en el citoplasma en

forma de molinillo (“pinwheels”) y en forma de tubo (“scrolls”), pero no agregados laminares (Melgarejo *et al.* 2010).

Este virus infecta distintas especies de la familia de las cucurbitáceas, entre ellas el calabacín, el melón, el pepino y la sandía. La distribución del virus es mundial. Los síntomas que produce son muy severos en todas las cucurbitáceas cultivadas. Los calabacines infectados por ZYMV muestran mosaico, aclarado de nervios y amarilleo foliar con deformación y filiformismo; frutos con mosaico, bultos y deformaciones (Figura 11), alteración de la pulpa y deformación de semillas. Además se produce una importante reducción del crecimiento. En pepino, provoca un mosaico deformante con manchas verde oscuro situadas a lo largo de los nervios, asimetría del limbo y aspecto filiforme; en frutos, deformaciones, abolladuras y reducción del tamaño lo que dificulta su comercialización. En melón, reduce el crecimiento y desarrollo de las plantas, apareciendo un amarilleo generalizado con zonas necróticas en el limbo y peciolo, mosaico con ampollas color verde oscuro, asimetría y filiformismo en hojas; además se produce un retraso en la floración, aborto de flores y reduce el número y tamaño del fruto. Además se produce la alteración de la forma y calidad de los frutos que presentan grietas externas u manchas internas color marrón (Luís Arteaga 1994; Melgarejo *et al.* 2010). En sandía se observa un mosaico y amarilleo en las hojas y falta de desarrollo en las plantas; los frutos están deformes y abullonados. Según el asilado de ZYMV los síntomas son más o menos fuertes (Jordá y Font 2002).

La transmisión de este virus es por pulgones de manera no persistente específicamente por las especies *Aphis citricola*, *A. gossypii*, *M. periscae* y *M. euphorbiae* (Melgarejo *et al.* 2010).



Figura 11 Frutos de calabacín infectados por ZYMV que muestran bultos y deformaciones (Provvidenti 2014)

1.2.5. Moroccan watermelon mosaic virus (MWMV) o Virus marroquí del mosaico de la sandía

Pertenece al género *Potyvirus* dentro de la familia *Potyviridae*. Es un virus de ARN con una única partícula lineal de sentido positivo, es decir que su genoma es monopartito. Su rango de huéspedes se restringe a la familia *Cucurbitaceae*, infectando sandía, melón, pepino, calabaza y calabacín, y algunas especies de la familia *Malvaceae* tales como *Malva parviflora* L. (ICTVdB 2006). Se encuentra distribuido geográficamente en Marruecos, Sudáfrica, Zimbabue, Níger, Camerún, Sudán, el sur de España y suroeste de Francia (Yakoubi *et al.* 2008a).

Los principales síntomas que produce son una llamativa clorosis internervial en hojas con ampollas de color verde oscuro, deformaciones y filiformismo. Muestra además mosaico y necrosis en hojas. Los frutos aparecen deformes con la superficie ampollada. Las plantas afectadas muestran un severo enanismo y poco desarrollo (Yakoubi *et al.* 2008a).

Es transmitido por pulgones como *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* de manera no persistente (Yakoubi *et al.* 2008a).

1.2.6. Cucumber vein yellowing virus (CVYV) o Virus de las venas amarillas del pepino.

Pertenece al género *Ipomovirus* dentro de la Familia *Potyviridae*. Está compuesto por ARN monocatenario de sentido positivo. La partícula viral mide 740 – 780 nm de longitud y 15 – 18 nm de anchura. Al igual que en los virus del género *Potyvirus*, la infección por CVYV induce la formación en el citoplasma de las células afectadas de inclusiones en forma de molinillo (“pinwheels”) (Melgarejo *et al.* 2010).

CVYV es capaz de infectar especies tanto de la familia de las cucurbitáceas, cultivadas y no cultivadas, entre ellas: melón, pepino, calabacín, calabaza, sandía, etc. como a miembros de otras familias como *Solanaceae* (*Nicotiana tabacum* L. y *Datura stramonium* L.), *Asteraceae* (*Sonchus oleraceus* L., *Sonchus terrenimus* L.), *Malvaceae* (*Malva parviflora*) y *Convolvulaceae* (*Convolvulus arvensis* L.). Este virus ha sido descrito en diferentes países del Mediterráneo oriental (Melgarejo *et al.* 2010).

Los principales síntomas del virus en pepino son un amarilleo en las venas de las hojas del brote, pudiendo presentarse un amarilleo general de la planta, un menor desarrollo de la misma y frutos de tamaño pequeño. También produce moteado en hojas y mosaico en frutos. En el fruto de melón, produce un fuerte mosaico aunque en ocasiones se muestran asintomáticos. Los calabacines infectados manifiestan un amarilleo suave de los nervios de las

hojas. En sandía, los síntomas de clorosis suaves en hojas pueden incluso pasar desapercibidos. La sensibilidad de la enfermedad depende del cultivar, por ejemplo, los pepinos partenocárpicos son menos sensibles (Melgarejo *et al.* 2010).

La transmisión del CVYV es de forma semipersistente por la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius. Este vector adquiere el virus en 30 minutos, presentando un periodo de latencia de 75 minutos y periodo de retención de 6 horas (Melgarejo *et al.* 2010).

1.2.7. Beet yellows virus (BYV) o Virus del amarilleo de la remolacha

Pertenece al género *Closterovirus* dentro de la familia *Closteroviridae*. Es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo de 14.5 kb, donde el ácido nucleico supone un 5% del virión. La partícula viral mide 1250 nm y es filamentosa flexuosa. Este virus está asociado con la degeneración del floema (Melgarejo *et al.* 2010).

Como huéspedes de BYV se pueden citar a la remolacha (*Beta vulgaris* L.) y a la espinaca (*S. oleracea*) de la familia *Chenopodiaceae* y diferentes especies de la familia *Cucurbitaceae*. Este virus tiene una distribución mundial. Al principio, la infección por BYV se manifiesta con un aclarado de nervios en hojas jóvenes, que luego se engrosan, volviéndose coriáceas y quebradizas. En hojas maduras aparecen puntos traslucidos pequeños y en hojas más viejas muestra manchas pequeñas necróticas, rojizas o pardas junto al amarilleo. BYV es transmitido de forma semipersistente por varias especies de pulgones principalmente por *M. persicae* y *Aphis fabae* Scopoli, también por inoculación mecánica artificial pero con dificultad y por injerto (Melgarejo *et al.* 2010).

1.2.8. Beet pseudoyellows virus (BPYV) o Virus del falso amarilleo de la remolacha

Pertenece al género *Crinivirus* dentro de la familia *Closteroviridae*. BPYV es un virus de ARN de cadena simple y genoma bipartido con dos moléculas de ARN de 7889 nt y 7607 nt. La partícula viral mide aproximadamente entre 900 y 950 nm de longitud y 12 nm de diámetro y es una partícula flexuosa. Es un virus que se encuentra limitado al floema formando vesículas membranosas y agregados de partículas virales que se incorporan en el citoplasma de las células (Melgarejo *et al.* 2010).

Tiene un amplio rango de plantas huéspedes de diferentes familias tales como *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, etc., incluyendo varias cultivadas como melón, pepino, espinaca (*S. oleracea*), remolacha (*B. vulgaris*), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y fresones (*Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne). Se encuentra distribuido geográficamente en la Cuenca Mediterránea (Melgarejo *et al.* 2010).

Sus síntomas comienzan con un moteado amarillo internervial ligero que avanza hasta que la hoja queda amarilla por completo (Figura 12), manteniendo los nervios color verde. También se puede manifestar como una mancha amarilla con márgenes difusos alrededor del peciolo manteniendo los nervios verdes (Melgarejo *et al.* 2010).

Es transmitido por la mosca blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) de forma semipersistente. El virus no se multiplica en el vector y no se transmite a la progenie.. El período mínimo de adquisición y transmisión es de una hora, aunque su eficiencia de transmisión puede aumentar, siendo siete días su período máximo de persistencia. Este virus no se transmite por inoculación mecánica, ni por contacto entre plantas y tampoco por semilla (Melgarejo *et al.* 2010).



Figura 12 Clorosis internervial causado por BPYV en pepino (Texas A&M AgriLife extension 2014)

1.2.9. *Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) o Virus del amarilleo y del enanismo de las cucurbitáceas*

Pertenece al género *Crinivirus* dentro de la familia *Closteroviridae*. Es un virus que encapsida dos moléculas de ARN monocatenario de sentido positivo de 8 y 9 kb. Mide aproximadamente entre 825 y 900 nm y es una partícula filamentosa flexuosa. Se localiza en el floema de las plantas que infecta induciendo la vesiculación de membranas y formación de cuerpos de inclusión. Es un virus exclusivo de especies de cucurbitáceas, pero el melón y el pepino son los huéspedes que más se ven afectados. Se encuentra presente en el Mediterráneo y California, Estados Unidos (Melgarejo *et al.* 2010).

Su principal síntoma es el amarilleo de las hojas. Produce una clorosis internervial en hojas adultas con mayor intensidad, manteniendo los nervios verdes. observándose una reducción

del desarrollo. Puede comenzar con un moteado amarillo en áreas internerviales que luego avanza hasta que la hoja completa queda amarilla con excepción de los nervios. CYSDV es transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci* de forma semipersistente (Melgarejo *et al.* 2010).

1.2.10. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) o Virus del bronceado del tomate

Pertenece al género *Tospovirus* dentro de la familia *Bunyaviridae*. El virus contiene tres cadenas (L, M, S) de ARN monocatenario de sentido negativo. La cadena L presenta un tamaño de 8.9 kb y codifica en ambos sentidos de lectura, en cambio las cadenas M y S presentan tamaños de 5.4 y 2.9 kb, respectivamente. Mide entre 80 a 110 nm de diámetro y es una partícula isométrica esférica. Las partículas del virus contienen tres proteínas estructurales: una de la nucleocápsida interna N y dos proteínas en la envuelta que son glicosiladas. Contiene pequeñas cantidades de una proteína L asociada con la nucleocápsida interna codificada por la cadena de ARN L. Este virus presenta una alta variabilidad y se encuentra localizado en las células vegetales en paquetes dentro del retículo endoplasmático del citoplasma, además induce inclusiones amorfas o viroplasma (Melgarejo *et al.* 2010).

Presenta un gran rango de especies de plantas huéspedes de diferentes familias, entre ellas: *Solanaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Leguminosae*, *Ranunculaceae*, *Papaveraceae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, *Convolvulaceae*, etc. Se encuentra distribuido geográficamente por todo el mundo (Melgarejo *et al.* 2010).

Este virus induce gran variedad de síntomas en las plantas que infecta como lesiones cloróticas y necróticas, manchas anulares, manchas anulares en círculos concéntricos, mosaicos verdes, decoloración del tallos, patrones de líneas, marchitamiento, retraso del crecimiento, moteado, bronceado y distorsión (Melgarejo *et al.* 2010).

Se transmite por tisanóperos, entre ellos *Frankliniella occidentalis* Pergande, *Frankliniella schultzei* Trybom, *Frankliniella fusca* Hinds, *Thrips tabaci* Lindeman. La transmisión es de forma persistente circulativa propagativa, es decir lo adquieren las larvas y lo transmiten los adultos (Melgarejo *et al.* 2010).

1.2.11. *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) o Virus del mosaico verde jaspeado del pepino

Pertenece al género *Tobamovirus* dentro de la familia *Virgaviridae*. Es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo de 6.5 kb, su ácido nucleico supone el 5% del virión. Mide

300 nm de longitud y 18 nm de diámetro y es una partícula cilíndrica y rígida. Produce anomalías citológicas y vesiculaciones en las mitocondrias (Melgarejo *et al.* 2010)

Los huéspedes de CGMMV son el pepino, sandía y melón, principalmente. Es un virus que se encuentra en zonas templadas (Melgarejo *et al.* 2010). En hojas produce un moteado, abullonado y reducción del desarrollo (Figura 13). En frutos a veces no se producen síntomas, pero otras veces causa moteados y deformaciones severas (Figura 14; Luís Arteaga 1994). En ocasiones, además del mosaico más o menos intenso puede mostrar un bandeado de venas y reducción del crecimiento (Melgarejo *et al.* 2010). En sandía deteriora la pulpa del fruto (Jordá y Font 2002).

No se transmite por vectores animales sino que por semilla y de forma mecánica con facilidad durante las podas o recolección y con simple frotamiento entre hojas ya que es un virus muy estable (Melgarejo *et al.* 2010). Además las infecciones son producidas por las raíces con suelo o sustrato reciclado que contienen restos de plantas infectados o por el agua de riego (Blancard 1991).

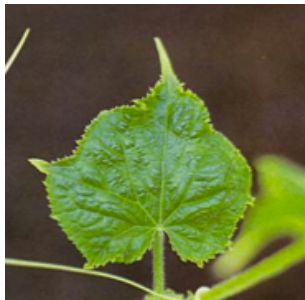


Figura 13 Abullonado en hojas de pepino infectado por CGMMV (Texas A&M AgriLife Extension 2009)



Figura 14 Deformación en frutos asociada a la infección por CGMMV en pepino (Vkm 2008)

1.2.12. *Cucumber mosaic virus (CMV) o Virus del mosaico del pepino*

Pertenece género *Cucumovirus* dentro de la familia *Bromoviridae*. Es un virus con genoma tripartido de ARN monocatenario de sentido positivo de 3,4, 3, 2,2 y 1 kb correspondientes al ARN 1, ARN 2, ARN 3 y ARN 4. En ocasiones presenta ARN – satélites. Es una partícula isométrica que mide 28 nm de diámetro aproximadamente, compuesta por un 18% de ácido nucleico. Las partículas del virus pueden verse en el citoplasma, núcleo y vacuolas de las células que se encuentran infectadas (Melgarejo *et al.* 2010).

Es uno de los virus más ampliamente distribuidos por todo el mundo, especialmente en zonas templadas. Es considerado el responsable de epidemias generalizadas que han provocado grandes pérdidas en muchas partes del mundo (Zitter *et al.* 2004). Los ataques son

más frecuentes en verano y otoño y las pérdidas son más importantes cuanto más precoz es la infección (Luís Arteaga 1994). Además de su amplia distribución, también se ha sido descrito en más de 1200 huéspedes de más de 100 familias monocotiledóneas y dicotiledóneas. Es muy importante en hortícolas, ornamentales y forrajeras entre los que se puede citar al pepino, melón, sandía, calabacín, tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), judía (*Phaseolus vulgaris*), espinaca (*S. oleracea*), platanera (*Musa balbisiana* Colla), etc. (Melgarejo *et al.* 2010).

Los síntomas son muy variables porque existen varios aislados diferentes del virus debido a la complejidad de la composición de la partícula. Uno de los principales síntomas es el enanismo de plantas y deformación de las hojas con mosaico amarillo y verde. En tomate puede presentar fuertes filiformismos en hojas y necrosis en tallo, peciolo y frutos asociados al denominado Carna – 5, infección por CMV y un satélite de ARN (Melgarejo *et al.* 2010). En sandía produce mosaico en hojas y frutos, abullonado y deformación de hojas, reducción del crecimiento de las plantas y de la producción de frutos. También presentan en fruto manchas circulares verdes o marrones como cicatrices, en forma de anillos concéntricos sobre la piel oscura. En otras cucurbitáceas se manifiesta como un mosaico fuerte en tonos diferentes de verde y amarillo, abullonado, falta de desarrollo de la planta, reducción del tamaño de la hoja, bandeado de venas, etc. (Jordá y Font 2002). En pepino, melón y calabaza produce un raquitismo grave y acorta los entrenudos del tallo. En las primeras fases hay un abundante rizado de las hojas hacia el envés, mosaico y reducción del tamaño de hojas (Figura 16). Las flores se ven afectadas, pueden ser anómalas y con pétalos verdosos. La intensidad de los síntomas depende de la especie y cultivar, la edad y las condiciones ambientales. Los síntomas más graves son en calabaza de verano y los menos graves en pepino, sandía y calabaza de invierno. Los frutos infectados se deforman y son descoloridos y pequeños, con una producción de semillas insignificante (Figura 15; Zitter *et al.* 2004).

La transmisión de CMV se produce por diferentes especies (más de 80) de pulgones de forma no persistente, es decir, el vector adquiere el virus de una planta infectada y lo trasmite a una planta sana durante picaduras muy breves (Blancard 1991). Los pulgones más eficientes son: *A. gossypii*, *A. fabae*, *A. craccivora*, *M. euphorbiae* y *M. persicae*. Está descrita su transmisión por semilla, pero no en cucurbitáceas (Jordá y Font 2002).



Figura 15 Pepinos deformes y descoloridos infectados por CMV (Zitter et al. 2009)



Figura 16 Mosaico amarillo verde en pepino causado por CMV (Texas A&M AgriLife Extension 2009)

1.2.13. *Cucumber leaf spot virus (CLSV) o Virus de la mancha de la hoja del pepino*

Pertenece género *Aureusvirus* dentro de la familia *Tombusviridae*. Es un virus con una cadena simple de ARN de sentido positivo de 4.4 kb. Tiene un diámetro de 28 nm y es una partícula isométrica. El virus se encuentra en las zonas sintomáticas, esparcidas en el citoplasma de las células infectadas o en pequeños grupos. Las mitocondrias se pueden encontrar deformadas. Está descrito solamente en pepino y se manifiesta en las hojas como manchas cloróticas con el centro marrón necrótico, enanismo y retraso en la floración. Los síntomas pueden disminuir o desaparecer con el tiempo. La transmisión de CLSV es por semilla o por el hongo vector *Olpidium bornovanus* (Sahtiyanci) Karling. (Melgarejo *et al.* 2010).

1.2.14. *Melon necrotic spot virus (MNSV) o Virus de las manchas necróticas del melón*

Pertenece al género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae*. El virus está compuesto por partículas isométricas de 30 nm de diámetro que tienen una sola cadena de ARN (Jordá y Font 2002) de sentido positivo de 4,26 kb. Las partículas se encuentran en forma de agregados o formaciones cristalinas en el citoplasma o en la vacuola central de las células de plantas infectadas (Melgarejo *et al.* 2010).

Sus huéspedes son exclusivos de la familia *Cucurbitaceae*, entre los que destacan el melón, pepino, sandía y calabacín. En un principio se consideraba una enfermedad grave para el melón pero en los últimos años también ha producido grandes pérdidas en sandía. Su distribución es mundial (Jordá y Font 2002).

Los síntomas causados por MNSV son lesiones cloróticas que acaban como manchas necróticas puntuales, donde el tejido muerto termina por desprenderse de la hoja y produciendo un cribado. Además presenta manchas necróticas internerviales que avanzan ampliándose en la hoja hasta secarla. Las plantas afectadas muestran estrías en peciolo y tallos, los nervios de la hoja se necrosan y forman un enrejado, luego se necrosa la zona internervial y finalmente toda la hoja. Otro síntoma asociado a la infección por MNSV es el colapso que consiste en el marchitamiento rápido que evoluciona hasta la muerte de la planta, sin presentar manchas necróticas. También muestra las estrías necróticas en la base del tallo en el momento de engorde del fruto. En campo los síntomas se muestran en rodales pues su transmisión está ligada al suelo, concretamente al hongo vector *Olpidium bornovanus* Sahtiyanci) Karling. Los frutos presentan manchas necróticas deprimidas en su superficie y en el caso de la sandía aparecen manchas necróticas en la pulpa (Jordá y Font 2002; Melgarejo *et al.* 2010).

Este virus se trasmite por las esporas de un hongo del suelo, *Olpidium bornovanus*, las cuales se infectan al parasitar las células de las raíces de plantas enfermas y transmiten el virus al colonizar las raíces de plantas vecinas sanas. Las esporas se enquistan en condiciones adversas y sobreviven varios años. Se transmite por semilla, pero su presencia y extensión está ligada a la presencia del hongo (Jordá y Font 2002).

1.2.15. *Squash mosaic virus* (SqMV) o Virus del mosaico de la calabaza

Pertenece al género *Comovirus* dentro de la familia *Comoviridae* sus partículas son isométricas con una silueta angular que sedimentan a 50S (T), 86S (M) y 120S (B). Los tres componentes tienen 30 nm de diámetro, conteniendo en dos de ellos moléculas de ARN monocatenario de sentido positivo. Es un virus de genoma dividido constituido por dos moléculas de ARN (Luís Arteaga 1994). La componente T no contiene ARN, la M tienen una molécula de ARN de 4.5 kb y la B una molécula de ARN de 6.0 kb. El ácido nucleico supone el 35% del virión (Melgarejo *et al.* 2010). Desde el punto serológico existen dos serotipos: el serotipo I es severo en melón, suave en calabacín y puede afectar sandía; en cambio el serotipo II es severo en calabacín, suave en melón y no infecta sandía (Luís Arteaga 1994).

Como rango de hospedantes naturales de este virus han sido citados el melón, pepino, sandía y calabacín, siendo éste último el más afectado. Los síntomas son diversos y varían en función a la cepa del virus y de las condiciones, aunque normalmente los síntomas son más severos en calabacín y más suaves en melón, sandía y pepino. Generalmente, la infección por

SqMV produce bandeado de venas, mosaico, manchas cloróticas, deformación y filiformismo grave en hojas. En frutos produce protuberancias que bajan su calidad comercial, además de un mosaico fuerte, deformación y una reducción en su desarrollo (Melgarejo *et al.* 2010).. En melón, aparecen manchas de color verde oscuro junto a los nervios, deformaciones y una recuperación aparente en la hoja. El virus, además, baja el rendimiento pues reduce el tamaño, peso y número de frutos, retrasando también la maduración. Las semillas también se ven afectadas ya que reduce el número, peso y porcentaje de germinación. Su distribución actual es mundial (Luís Arteaga 1994).

La transmisión del SqMV es por diferentes especies de coleópteros de la familia *Chrysomelidae*, entre ellos: *Acalymna trivittata* Mannerheim, *Epilachna chrysomelina* Fabricius y *Diabrotica undecimpunctata* Howardi y el ortóptero *Melanopus differentialis* Thomas. Los insectos adquieren el virus en pocos minutos comiendo hojas de plantas enfermas y luego lo transmiten, teniendo la capacidad de transmitir el virus entre 1 a 3 semanas después de la alimentación. La transmisión principal del virus es por semilla y posteriormente por vía mecánica durante las operaciones de poda y recolección o por rozamiento entre hojas, ya que se trata de un virus muy estable (Blancard 1991; Jordá y Font 2002).

1.2.16. *Cucumber aphid – borne yellows virus (CABYV) o Virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones*

Pertenece al género *Polerovirus* dentro de la familia *Luteoviridae*. CABYV es un virus que contiene una molécula de ARN monocatenario de 5 – 6 kb. Sus partículas son isométricas de 25 nm de diámetro. Está restringido al floema. Entre sus huéspedes se pueden citar el melón, la sandía, el pepino y el calabacín dentro de la familia Cucurbitaceae, aunque también se pueden encontrar huéspedes pertenecientes a otras familias como la remolacha y la lechuga; y en especies espontáneas que pueden funcionar como un reservorio de la enfermedad, entre ellas *Senecio vulgaris* L., *Capsella bursa-pastoris* L., *Papaver rhoeas* L. y *Bryonia dioica* Jacq. entre otras. Se encuentra distribuido geográficamente en Argelia, Brasil, California, China, España, Francia, Grecia, Honduras, Isla Reunión, Italia, Líbano, Nepal, Sudán, Swazilandia, Taiwan y Turquía (Melgarejo *et al.* 2010).

Los síntomas en melón producen un amarilleo e hinchamiento en las hojas más viejas y basales (Figura 17), provocan una curvatura de los bordes hacia el envés, y afecta al cuajado floral y sin pérdida apreciable de la calidad del fruto. La severidad de la enfermedad es

variable según la estación, afecta más durante el verano que en invierno pero todo depende del cultivar. Los síntomas en sandía son amarilleo en hojas basales con mosaicos ligeros y deformación de bordes de las hojas y manchas necróticas en hojas más viejas. También afecta el cuajado de frutos. Cuando las infecciones son tempranas a finales de la primavera se puede observar una clorosis generalizada y una falta de desarrollo. En pepino hay un amarilleo internervial en las hojas y al igual que el melón las hojas se curvan hacia el envés (Figura 18). Además produce un raquitismo acusado y al final de su ciclo se da un amarilleo generalizado de la planta. Por último, los calabacines afectados muestran un amarilleo en hojas basales y una clorosis generalizada (Melgarejo *et al.* 2010).

Se transmite por dos pulgones muy comunes en cultivos, el pulgón negro del algodónero o del melón *Aphis gossypii* y el pulgón verde del melocotonero *Myzus persicae*. Es transmitido de modo semipersistente. No se transmite mecánicamente (Melgarejo *et al.* 2010).



Figura 17 Amarilleo internervial de las hojas de melón causado por la infección con CABYV (Lecoq 2012)



Figura 18 Amarilleo internervial generalizado causado por CABYV en cucurbitáceas (Lecoq 2012)

1.2.17. *Tomato leaf curl Nueva Delhi virus (ToLCNDV)* o *Virus del rizado del tomate de Nueva Delhi*

El ToLCNDV pertenece al género *Begomovirus* dentro de la familia *Geminiviridae*. Es un virus de ADN con genoma bipartido. La gama de huéspedes no está limitada a cucurbitáceas (calabacín, pepino, calabaza, melón y alficoz), sino también afecta a solanáceas. Ha sido detectado en el sur de España en calabacín. Los síntomas en calabacín incluyen fuertes mosaicos, las hojas viejas amarillean y las jóvenes se enrollan hacia el envés a lo largo del nervio principal con una clorosis en los bordes. Hay una reducción del tamaño y deformación de las hojas nuevas con el haz fruncido. Si la infección es temprana las plantas se arpeollan y

no produce frutos. Los calabacines se deforman y tienen la piel rugosa. Puede presentarse más severamente con infecciones mixtas con CABYV, CVYV y Potyvirus. En pepino, calabaza, melón y alficóz produce mosaico amarillo muy fuerte, rizado de hojas por fruncimiento de nervios y parada de desarrollo dando a la planta aspecto achaparrado. ToLCNDV es transmitido por la mosca blanca *B. tabaci* de manera persistente (Alfaro y Font 2014).

1.3. Técnicas de detección, diagnóstico e identificación de virus vegetales

1.3.1. Técnicas moleculares

1.3.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase chain reaction”, PCR)

Es una técnica que consiste en la de amplificación *in vitro* de múltiples copias de un fragmento del genoma específico del virus que se quiere detectar y su posterior visualización. Para lograrlo se debe disponer de cuatro componentes importantes: el primero, el ADN molde, del cual se obtendrá la copia del fragmento deseado; el segundo, la enzima ADN polimerasa, capaz de generar las copias del ADN en presencia de un tampón con cationes divalentes como cloruro de magnesio (MgCl₂); el tercero, los iniciadores de la reacción, cebadores o primers que son moléculas cortas de ADN de cadena sencilla entre 10 y 30 bases que sirven como el punto de partida para la replicación y delimitan el fragmento a amplificar pudiendo ser específicos o degenerados (generales); el cuarto y último componente, son los nucleótidos libres (desoxirribonucleótidos trifosfato, dNTPS), que la ADN polimerasa incorpora al extremo 3' libre del cebador que ha unido a la cadena molde para crear la cadena complementaria (Walker y Rapley 2009).

El proceso de la reacción de PCR consiste en disponer de un ADN molde y a partir de él con la enzima polimerasa incorporar nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por los cebadores. La reacción se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación o anillamiento y elongación o extensión. La desnaturalización consiste en separar las dos cadenas de ADN y se lleva a cabo elevando la temperatura a 94° C durante un minuto o menos. El siguiente paso es la hibridación en la que los cebadores se unen por complementariedad al ADN molde al descender la temperatura entre 35° C y 60° C. Por último, se realiza la fase de elongación que consiste en la incorporación de nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región que han hibridado los cebadores gracias a la acción de la enzima ADN polimerasa a una de 72° C. Estas tres fases se repiten entre 25 y 35 ciclos, amplificando millones de copias del fragmento deseado. Al final del proceso se incluye un paso a 72° C durante 5-10 minutos para que finalicen las extensiones .

Los fragmentos amplificados pueden observarse un gel de agarosa del 0,8-2% en tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA a pH 8.0) tras la electroforesis, posterior tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz ultravioleta (UV) (Walker y Rapley 2009).

1.3.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (Reverse Transcription-PCR, RT PCR)

Es una variante de la PCR donde la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es precedida por una transcripción reversa (RT). En el paso de RT, previo a la PCR, se produce la síntesis del cDNA, es decir, a partir de una cadena de ARN por acción de una enzima transcriptasa reversa (ADN polimerasa, ARN-dependiente). Esta primera cadena de cDNA sirve como molde para la reacción de PCR. Es la más utilizada para detección de virus vegetales pues una gran parte de ellos son virus de ARN. Para el proceso se necesita ARN molde de la planta infectada y una enzima retrotranscriptasa o transcriptasa reversa (RT), además de los elementos necesarios indicados anteriormente para la realización de la PCR. En la RT-PCR por tanto se emplean los dos enzimas (RT y Taq polimerasa) en condiciones diferentes y puede realizarse en dos pasos o en un solo paso. En la RT-PCR de dos pasos, básicamente consiste, en obtener ADN complementario (cDNA) con ayuda de la retrotranscriptasa, y el segundo paso en una PCR normal, se lleva a cabo en dos reacciones diferentes. En cambio, la de un solo paso se lleva a cabo en una sola reacción, utilizando un mix con ADN polimerasa y retrotranscriptasa. En la reacción primero actúa la retrotranscriptasa a 50° C durante 30 minutos para la obtención de cDNA y luego aumentar la temperatura a 94° C para desnaturalizar la retrotranscriptasa y activar la Taq ADN polimerasa, continuando el proceso con una PCR normal (Walker y Rapley 2009).

1.3.1.3. Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs).

Se utiliza para diferenciar grupos de un mismo virus o para diferenciar los diferentes virus si se utilizaron cebadores degenerados en la PCR. Para que se lleve a cabo la reacción se hace una digestión con producto obtenido en la PCR con una enzima de restricción incubándolo a temperaturas variables en función del enzima empleado. Se emplean enzimas que reconocen secuencias de 4 a 8 pares de bases en una molécula de ADN de doble hebra y las cortan rompiendo uno de los puentes fosfodiésteres de la molécula. Los fragmentos generados se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% o geles de poliacrilamida (PAGE)

que se tiñen con bromuro de etidio para su visualización bajo luz UV. De esta manera es posible ver si hay diferencias entre patrones de banda obtenidos (Walker y Rapley 2009).

1.3.2. Técnicas serológicas: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

Se basan en la detección serológica de la proteína de la cápsida u otras proteínas codificadas por el virus. Su fundamento es la respuesta inmunológica que se produce como defensa de los organismos para rechazar las moléculas de alto peso molecular que entran en los mismos. Cuando una proteína de virus se inyecta en un mamífero o ave, induce la producción de anticuerpos que reaccionan con el antígeno (en este caso las proteínas del virus vegetal inyectado). La técnica serológica más utilizada es la denominada ELISA o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima. El ELISA es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo ligado a una enzima capaz de generar un producto detectable por absorbancia por el cambio de color. Tiene cuatro fases; en la primera se da la conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima; en la segunda se da la unión del antígeno o del anticuerpo a los pocillos; en la tercera se da la formación de una o más capas de inmunocomplejos; y en cuarto se hace el revelado de la reacción enzimática con un sustrato mediante espectrofotometría (Agrios 2005).

El ensayo tiene varias variantes y una de las más utilizada es el “Double antibody sandwich” ELISA o DAS-ELISA porque es muy específico y sensible en la cual se tienen varios pozos en una placa de poliestireno medio llenas y luego vacías en secuencia. En ella se recubre con un primer anticuerpo anti – CP cada pocillo y éste queda fijado, luego se lava el exceso de anticuerpo y se aplica la muestra con el antígeno, se forma el complejo antígeno – anticuerpo anti – CP. Se hace de nuevo un lavado y se aplica un segundo anticuerpo anti – CP conjugado y se forma el complejo antígeno – anticuerpo conjugado. Cada molécula esta unida a un anticuerpo en la base y a otro anticuerpo que lo marca. Por último se adiciona un sustrato específico que produce color si hay reacción enzima – sustrato (Agrios 2005).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las cucurbitáceas son una familia de plantas que han tomado gran importancia en Túnez en los últimos años, sobre todo los cultivos de pepino, sandía, melón y calabacín y la tendencia es que su superficie cultivada y producción vaya en aumento. Por el momento, se han detectado en cucurbitáceas más de 35 virus a nivel mundial que causan grandes pérdidas de rendimientos y afectan la calidad de las cosechas.

Concretamente en Túnez, se han detectado numerosos virus afectando a diferentes cultivos de cucurbitáceas. Prospecciones realizadas en diferentes zonas del país durante las campañas de los años 2000-01 y 2002-03 determinaron la presencia de ZYMV, WMV, PRSV, ZYFV, CMV y SqMV, donde la incidencia de ZYMV y WMV era de un 23%, seguida de la de CMV con un 16%, encontrándose el resto de virus estudiados en una menor proporción (Mnari-Hattab *et al.* 2008). En este mismo estudio, los autores determinaron la existencia de muestras sintomáticas que no estaban infectadas por ninguno de los virus estudiados. Estudios posteriores realizados durante los mismos años, así como en campañas sucesivas (2003-04) demostraron la presencia de CABYV en distintas especies de la familia *Cucurbitaceae*, tanto cultivadas (melón, pepino, calabacín y sandía) como silvestres (*Eccballium elaterium* (L.) T. Richard) (Mnari-Hattab *et al.* 2009). En las campañas de 2005-06 se detectó en la parte sur del país y del Sahel, la presencia de CVYV y CYSDV (Yakoubi *et al.*, 2007).

En la primavera de los años 2007, 2008 y 2010, gracias a la concesión de tres proyectos financiados por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) códigos A/5269/06, A8584/07 y A/0265/09, se detectaron en Túnez en las zonas noroeste (Monastir) y zona sureste (Kebili, Gabes, El Hamma y Matmata) los siguientes virus: CGMMV, CMV, CABYV, CYSDV, MNSV, PRSV, SqMV, ZYMV y WMV. Muchos de ellos ya habían sido descritos en el país en prospecciones realizadas en años anteriores en diversos trabajos, sin embargo la detección de CGMMV constituye la primera detección de este *Tobamovirus* en Túnez, así como la detección de MNSV en sandía cultivada al aire libre (Alfaro *et al.* 2011). CGMMV, como las diferentes especies del género *Tobamovirus* se transmite mecánicamente, mediante semillas procedentes de fruto infectado con altas tasas de transmisión y a través del polen (Liu *et al.* 2014). Este modo de transmisión supone un riesgo para los cultivos de cucurbitáceas ya que puede producirse una rápida dispersión del virus en campos afectados.

Por tanto, para continuar con el seguimiento realizado en campos de Túnez (2007-2010) de las virosis ampliamente distribuidas, verificar la incidencia de CGMMV, además de los virus

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) y *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) recientemente detectados en cultivos de sandía (Mnari-Hattab *et al.* 2014) de este país, se planteó realizar las prospecciones en diversos campos con diferentes especies de cucurbitáceas de la zona noreste, concretamente junto a las poblaciones de Zaghuan y El Fhas. En esta área las prácticas culturales, las condiciones ambientales y la falta de conciencia de los agricultores acerca de enfermedades virales son factores que pueden provocar una alta incidencia de enfermedades de etiología viral.

En las muestras recogidas durante estos muestreos realizados en 2013 se plantearon los siguientes objetivos en este trabajo fin de máster:

- Analizar las muestras prospectadas a los virus ampliamente distribuidos en Túnez como son: ZYMV, WMV, PRSV, ZYFV, CMV, SqMV, MNSV, CABYV, CYSDV, CVYV y MWMV mediante técnicas serológicas y moleculares.
- Analizar las muestras prospectadas a los virus recientemente descritos en el país como son: CGMMV, TYLCV y TYLCSV mediante técnicas serológicas y moleculares.
- Confirmar mediante el análisis de las muestras prospectadas, la presencia o ausencia de virus no detectados por el momento en Túnez como son: ToLCNDV, BSYV, BYV y CLSV mediante técnicas moleculares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2. Material vegetal

En 2013, se muestrearon 6 parcelas con diferentes cultivos de cucurbitáceas (sandía, melón, calabacín y pepino) en las zonas de Zaghouan y El Fahs, localizadas en el norte de Túnez (Figura 19) y que presentaban plantas con síntomas de enfermedades posiblemente de etiología viral. Se tomaron muestras de hojas de tres plantas de cada campo, 18 muestras en total, asignándoles a cada una un código de dos números para su posterior identificación, el primero de los cuales corresponde al campo muestreado y el segundo al número de muestra (Tabla 2). Una vez en el laboratorio, las 18 muestras fueron fotografiadas realizándose una breve descripción de los síntomas presentados (Figuras 20, 21, 22 y 23). Luego se deshidrataron con sílica gel y fueron enviadas desde Túnez al laboratorio del grupo de virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia.

Tabla 2 Identificación de las muestras de cucurbitáceas tomadas en Zaghouan y El Fahs, Túnez en 2013

No. Muestra	Área	Campo No.	Especie cultivada	Código
1	Zaghouan	1	Sandía	1 – 1
2	Zaghouan	1	Sandía	1 – 2
3	Zaghouan	1	Sandía	1 – 3
4	Zaghouan	2	Sandía	2 – 1
5	Zaghouan	2	Sandía	2 – 2
6	Zaghouan	2	Sandía	2 – 3
7	Zaghouan	3	Melón	3 – 1
8	Zaghouan	3	Melón	3 – 2
9	Zaghouan	3	Melón	3 – 3
10	El Fahs	4	Calabacín	4 – 1
11	El Fahs	4	Calabacín	4 – 2
12	El Fahs	4	Calabacín	4 – 3
13	El Fahs	5	Pepino	5 – 1
14	El Fahs	5	Pepino	5 – 2
15	El Fahs	5	Pepino	5 – 3
16	El Fahs	6	Pepino	6 – 1
17	El Fahs	6	Pepino	6 – 2
18	El Fahs	6	Pepino	6 – 3



Figura 20 Muestra de hojas recogidas en Zaghuan en el campo 1 mostrando abullonado y deformación (1-1) y necrosis en hojas (1-2 y -1-3) y en el campo 2 donde se observa ligera deformación y asimetría (2-2) aunque las otras muestras eran asintomáticas (2-1 y 2-3).



Figura 21 Muestra de hojas de melón recogidas en el campo 3 de Zaghuan donde se observa deformación de las hojas (3-1 y 3-2) y un fuerte amarilleo internervial en la muestra 3-3.



Figura 22 Muestras de hojas de calabacín recogidas en el campo 4 de El Fahs mostrando amarilleo internervial (4-1) acompañado en ocasiones de deformación de la hoja (4-3) y necrosis marginal (4-2)

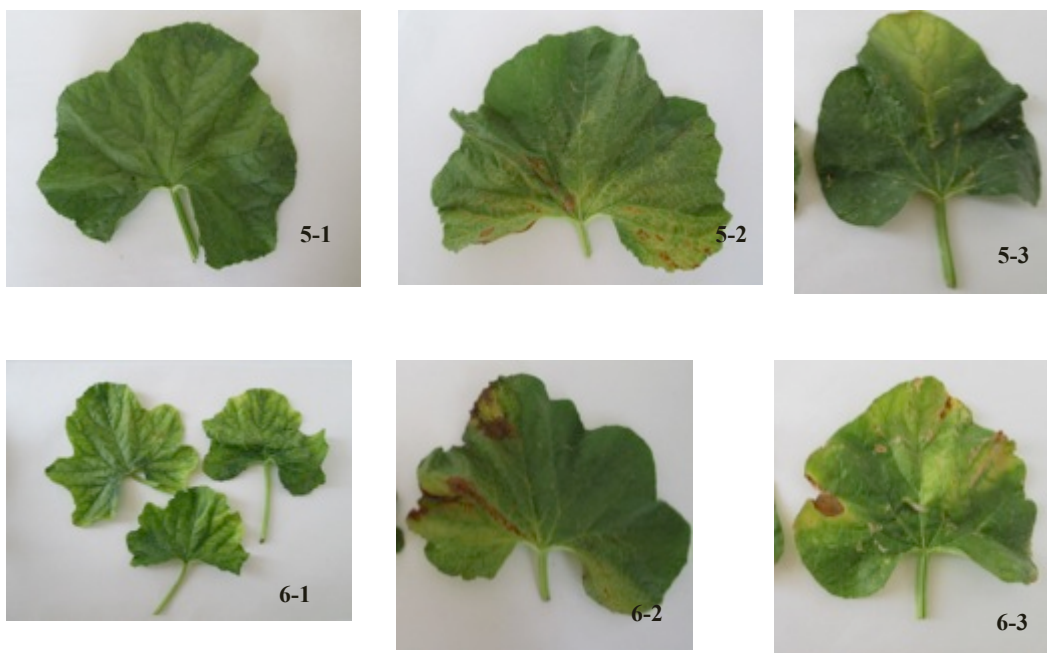


Figura 23 Muestras de hojas de Pepino recogidas en el campo 5 y campo 6 de en El Fahs mostrando un bandeado de venas incipiente con una coloración internervial en verde claro (5-1), aclarado de nervios y necrosis (5-2 y 6-2) y una clorosis internervial (6-3), acompañada en ocasiones por deformación de la hoja (6-1) o únicamente localizada en la zona apical de la hoja (5-3).

3.2 Detección de virus mediante la técnica serológica DAS - ELISA

Para la detección de los virus: SqMV, MNSV, TSWV, CGMMV y CMV se utilizó la técnica serológica DAS – ELISA (“Double Antibody Sandwich”). Todos los antisueros empleados fueron suministrados por la casa comercial Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach,

Alemania. Para el análisis se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos. En cada placa se dispusieron dos repeticiones de cada una de las muestras así como del control positivo (planta infectada con el virus a analizar), negativo (planta sana) y un blanco (tampón de extracción sin adicionarle ningún material vegetal). Se siguió la metodología recomendada por la casa comercial descrita en el Anexo 6. Las muestras se consideraron positivas a la infección por el virus si su valor de absorbancia era igual o superior al doble del valor de la absorbancia del negativo al realizar su lectura en un espectofotómetro Thermo Labsystems Original Multiskan Ex, de la casa comercial Thermo Fisher Scientific a una longitud de onda de 405 nm.

3.3 Detección e identificación de virus mediante técnicas moleculares: PCR y RT-PCR

3.3.1. Extracción de ácidos nucleicos

Se realizaron dos protocolos distintos para la extracción de los ácidos nucleicos de las muestras vegetales muestreadas en función de si el genoma del virus objeto de estudio era de ADN o ARN. Para la detección de virus cuyo genoma está constituido por ADN como es el caso de *Tomato yellow leaf curl Nueva Delhi virus* (TYLCNDV), se hizo previamente una extracción de ADN del material vegetal de las 18 muestras empleando el kit E.Z.N.A.® DNA Isolation Kit de la casa comercial Omega Bio – Tek (Georgia, Estados Unidos) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 1).

Para la detección de virus de ARN, como son CABYV, CVYV, BPYV, CYSDV, BYV y CLSV, se realizó la extracción de ARN del material vegetal de las 18 muestras empleando el kit RNAeasy Plant mini kit de la casa comercial Qiagen (California, Estados Unidos) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 3). Todos los extractos obtenidos se conservaron a -18° C para su posterior utilización.

3.3.2. Detección mediante PCR de distintas especies del género *Begomovirus*

Debido a la reciente detección en Europa del ToLCNDV (Juárez *et al.* 2014) y la presencia de TYLCV y TYLCSV en sandías en Túnez que presentan frutos endurecidos, con maduración precoz y la parte central de la pulpa de color blanco (Mnari-Hattab *et al.* 2014) se decidió analizar las muestras recogidas mediante PCR con cebadores degenerados que detectan diferentes especies del género *Begomovirus*, estas tres entre ellas, para determinar la presencia o no de estos agentes en las zonas muestreadas. Para ello la reacción de PCR se

llevó a cabo con la enzima DNA polimerase 1 U/ microlitro de la casa comercial Biotools B & M Labs (Madrid, España). Para la reacción se utilizaron los cebadores degenerados que detectan diferentes especies para el género Begomovirus AV (5' GCC (C/T)AT (G/A)TA (T/C)A G (A/G)A AGC C(A/C)A G 3') y AC (5' GG(A/G) TT(A/G/T) GA(G/A) GCA TG(T/A/G) GTA CAT G 3') que amplifican un fragmento de 550 pb descritos por Wyatt y Brown (1996). La PCR se llevó a cabo en un termociclador Primus de MWG Biotech siguiendo las siguientes condiciones: 94° C durante 5 minutos seguida por 35 ciclos de: desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, anillamiento a 56° C durante 1 minuto y extensión a 72° C durante 1 minuto. Por último se dejó 10 minutos a 72° C para terminar los procesos de extensión. Los productos y volúmenes empleados en la reacción se detallan en el Anexo 2. Los fragmentos una vez amplificados deben ser secuenciados o digeridos con enzimas de restricción para determinar la identidad de la especie concreta presente en la muestra positiva.

3.3.3. Detección mediante RT-PCR en un paso de CABYV, CVYV, BPYV, CYSDV, BYV, CLSV y CMV

La reacción de RT-PCR en un solo paso se llevó a cabo utilizando la enzima SuperScript™ II One – Step RT – PCR with Platinum® *Taq* de la casa comercial Invitrogen Life Technologies (Barcelona, España), partiendo de una dilución 1:50 en H₂O DEPC (dietilpirocarbonato 0,1% en agua destilada) del ARN extraído como se indicó anteriormente.

Para la detección de **CABYV**, se empleó ARN desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos en un termociclador modelo Eppendorf Mastercycler Personal. Se utilizaron los cebadores específicos del virus CABYV – D (5' GAA TAC GGT CGC GGC TAG AAA TC 3') y CABYV – R (5' CTA TTT CGG GTT CTG GAC CTG GC 3') descritos por Juárez *et al.* (2004) que amplifican un fragmento de 600 pb. La RT – PCR se realizó siguiendo las condiciones siguientes: 50 ° C durante 30 minutos para la síntesis de cDNA gracias a la enzima RT, 94° C durante 2 minutos, seguida por 34 ciclos de: desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, anillamiento a 55° C durante 30 segundos y extensión a 72° C por 30 segundos. Por último se sometió a una temperatura de 72° C por 5 minutos para terminar la extensión. Los productos y volúmenes empleados en la reacción se detallan en el Anexo 4.

Para la detección de **CVYV**, se empleó ARN desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos en un termociclador modelo Primus de MWG Biotech. Se utilizaron los cebadores específicos

del virus CVYV (+) (5' AGC TAG CGC GTA TGG GGT GAC 3') y CVYV (-) (5' GCG CCG CAA GTG CAA ATA AAT 3') descritos por Cuadrado *et al.* (2001) que amplifican un fragmento de 449 pb. La RT – PCR se realizó siguiendo las condiciones siguientes: 50 ° C durante 30 minutos para la síntesis de cDNA, 94° C durante 2 minutos, seguida por 34 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento a 55° C durante 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos. Por último se sometió a una temperatura de 72° C por 5 minutos para terminar la extensión. Los productos y volúmenes empleados en la reacción se detallan en el Anexo 4.

Para la detección de **BPYV**, se empleó ARN desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos en un termociclador modelo Eppendorf Mastercycler Personal. Se utilizaron los cebadores específicos del virus BH 1 (5' AAC TCA CCT TAC ATC CCA CTT GT 3') y BH 2 (5' AAT GGC TGC TGC AGA CGG TTC AAT 3') descritos por Rubio *et al.* (1999) que amplifican un fragmento de 450 pb. La RT – PCR se realizó siguiendo las condiciones siguientes: 50° C durante 30 minutos para la síntesis de cDNA, 94° C durante 2 minutos, seguida por 34 ciclos de: desnaturalización 94° C durante 30 segundos, anillamiento 55° C durante 45 segundos y extensión a 72° C durante 1 minuto. Por último se sometió a una temperatura de 72° C por 5 minutos para terminar la extensión . Los productos y volúmenes empleados en la reacción se detallan en el Anexo 4.

Para la detección de **CYSDV**, se empleó ARN desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos en un termociclador modelo Primus de MWG Biotech. Se utilizaron los cebadores específicos del virus 410 L (5' TTG GGC ATG TGA CAT 3') y 410 V (5' AGA GAC GGT AAG TAT 3') descritos por Celix *et al.* (1996) que amplifican a un fragmento de 557 pb. La RT – PCR se realizó siguiendo las condiciones siguientes: 50° C durante 30 minutos para la síntesis de cDNA 94° C durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturalización a 94° C durante 15 segundos, anillamiento a 45 ° C durante 30 segundos y extensión a 72° C durante 30 segundos. Al final se dejó 5 minutos a 72° C para finalizar los procesos de extensión. Los productos y volúmenes empleados en la reacción se detallan en el Anexo 4.

Para la detección de **BYV**, se empleó ARN desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos en un termociclador modelo Eppendorf Mastercycler Personal. Se utilizaron los cebadores específicos del virus BYV 2A (5' CTA TTC GGA CCA CCC TGC G 3') y BYV – 2B (5' AGG AGA ATA CGC TGA ACG AGT GAT 3') descritos por Kundu y Rysanek (2004) que

amplifican un fragmento de 625 pb. La RT – PCR se realizó siguiendo las condiciones siguientes: 50° C durante 30 minutos para la síntesis de cDNA, 94° C durante 2 minutos, seguida por 34 ciclos de: desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, anillamiento a 60° C durante 30 segundos y extensión a 72° C durante 1 minuto. Por último se sometió a una temperatura de 72° C por 10 minutos para terminar la extensión. Los productos y volúmenes empleados en la reacción se detallan en el Anexo 4.

Para la detección de CLSV, se empleó ARN desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos en un termociclador modelo Primus de MWG Biotech. Se utilizaron los cebadores específicos del virus CABYV – D (5' AAG GTA GGG GAG ATC TTG 3') y CABYV – R (5' GCT TCG GCT GAT TCT GA 3') descritos por Segundo *et al.* (2001) que amplifican un fragmento de 720 pb. La RT – PCR se realizó siguiendo las condiciones siguientes: 50° C durante 30 minutos para la síntesis de cDNA, 94° C durante 2 minutos, seguida por 40 ciclos de: desnaturalización a 94 ° C durante 15 segundos, anillamiento a 53° C durante 30 segundos y extensión a 68° C durante 1 minuto. Por último se sometió a una temperatura de 72° C por 5 minutos para terminar la extensión. Los productos y volúmenes empleados en la reacción se detallan en el Anexo 4.

Los productos amplificados en las diferentes reacción de RT – PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.2%, con tampón TAE 1x en una cámara de electroforesis, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estableció por comparación con un marcador molecular, Gene Ruler™ 100 pb ladder plus de la casa comercial Fermentas (Vilna, Lituania).

3.3.4. Detección e identificación del tipo de CMV mediante RT-PCR en un paso y análisis RFLP

Para la detección de CMV e identificación del tipo presente en las muestras que habían resultado positivas por DAS-ELISA se realizó una reacción RT PCR en un solo paso utilizando la enzima SuperScript™ III One – Step RT – PCR with Platinum® *Taq* de la casa comercial Invitrogen Life Technologies (Barcelona, España), utilizando dos parejas de cebadores distintas, la primera fue RW 8R (5' GGT TCG AA(A/G) (A/G)(A/T)A TAA CCG GG 3') y RW 11 D (5' GTT TAT TTA CAA GAG CGT ACG G 3') descritos por Finneti-Sialer *et al.* (1999) que amplifican un fragmento de 625 pb; La segunda pareja de cebadores fue CMV CP FOR (5' ATG GAC AAA TCT G(A/G)A TC(A/T) (A/C)CC 3') y CMV CP

REV (5' CTG GAT GGA CAA CCC GTT C 3') descritas por Deyong *et al.* (2005) que amplifican un fragmento de 773 – 788 pb. Las condiciones para la RT PCR fueron: 50° C durante 30 minutos para la síntesis de cDNA, 5 minutos a 94° C, seguido por 30 ciclos de: 94° C durante 30 segundos para desnaturalizar, 59° C durante 45 segundos para el anillamiento y 72° C durante 60 segundos para extensión. Por último se incluyó un paso de 72 °C durante 5 minutos para la extensión final. La reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo Sensoquest Labcycler.

Para la identificación del tipo de CMV presente en las muestras los productos de PCR obtenido se analizaron mediante RFLPs con las enzimas de restricción MLU I para los productos amplificados con los cebadores RW8R/11D y HPA II para los productos amplificados con los cebadores CMV CP FOR/R. Las dos enzimas de restricción empleadas pertenecían a la casa comercial Fermentas (Vilna, Lituania) y los productos se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Los productos obtenidos del análisis RFLPs con las dos enzimas de restricción fueron separados en un gel de agarosa al 3%, con tampón TAE 1x en una cámara de electroforesis. La tinción se realizó con bromuro de etidio para su posterior visualización bajo luz UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estableció por comparación con un marcador molecular, Gene Ruler™ 100 pb ladder plus de la casa comercial Fermentas (Vilna, Lituania).

Los patrones esperados para los diferentes tipos de CMV de los productos obtenidos con los cebadores RW8R/11D digeridos con la enzima de restricción MLU I son: si la enzima no corta el fragmento amplificado por tanto se observa el tamaño de banda del producto de PCR original (650 pb) es CMV de tipo IA. Si la enzima de restricción corta en un solo sitio y se observan dos fragmentos de 470 y 160 pb es CMV de tipo IB. Por último si la enzima hizo cortes en dos sitios es decir que se observan tres fragmentos de 320, 170 y 150 pb es CMV de tipo II.

En cambio, los patrones esperados para los productos amplificados con los cebadores CMV CP FOR/R y digeridos con la enzima de restricción HPA II: el CMV es de tipo I si la enzima corta en un solo sitio presentándose dos fragmentos de 449 y 324 pb, si la enzima corta en dos sitios se observan tres fragmentos de 449, 296, y 28 pb o si la enzima corta en cuatro sitios apareciendo cinco fragmentos a 422, 220, 76, 28 y 27 pb. El CMV es de tipo II cuando la enzima corta en cinco sitios distintos mostrando seis fragmentos diferentes de 248, 197, 161, 114, 40 y 28 pb.

3.3.5. Detección mediante RT-PCR en dos pasos de especies virales dentro del género *Potyvirus*

Para la detección de los virus del género *Potyvirus* que afectan a cucurbitáceas como son PRSV, WMV, ZYFV, ZYMV y MWMV, se utilizó la técnica RT – PCR en dos pasos. Para la reacción primero se desnaturalizó el ARN sin diluir en un termociclador modelo 2720 Thermalcycler de Applied biosystems a 65 ° durante 5 minutos. Luego para la síntesis cDNA se utilizó la enzima transcriptasa Cloned AMV Reverse Transcriptase, de la casa comercial Invitrogen (Barcelona, España). Las condiciones para la síntesis fueron 25° C durante 10 minutos, luego 45° C durante 50 minutos y por último 85° C durante 5 minutos.

Por último se llevó a cabo una PCR empleando el cDNA obtenido en el paso anterior como molde, para la cual se utilizó la enzima DNA polimerase 1 U/micro litro de la casa comercial Biotools B & M Labs (Madrid, España). Se emplearon cebadores degenerados para identificar diferentes especies del género *Potyvirus* NIB 2F (5' GTI TG(C/T) GTI GA(C/T) GA(C/T) TT(C/T) AA(C/T) AA 3') y NIB 3R (5' TCI ACI ACI GTI GAI GG(C/T) TG(A/C/G/T) CC 3') (I = deoxyinosine) descritos por Zheng *et al.* (2010) que amplifican un fragmento de 350 pb. La PCR se llevó a cabo en el mismo termociclador del paso anterior bajo las siguientes condiciones: 94° C durante 5 minutos, luego 35 ciclos de: 94° C durante 30 segundos para la desnaturalización, 45° C durante 30 segundos para anillamiento y 72° C durante 1 minuto para la extensión. Por último realizó un paso a 72° C durante 10 minutos para la extensión final. Los productos y volúmenes empleados en la reacción se detallan en el Anexo 5.

Los productos amplificados con la RT – PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.2%, con tampón TAE 1x en una cámara de electroforesis. La tinción de los fragmentos se realizó con bromuro de etidio y para su visualización se usó luz UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estableció por comparación con un marcador molecular, Gene Ruler™ 100 pb ladder plus de la casa comercial Fermentas (Vilna, Lituania).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de los análisis realizados mediante técnicas serológicas DAS-ELISA y moleculares (PCR y RT-PCR) a las muestras recogidas en 2013 en las zonas de Zaghouan y El Fahs se detallan en la tabla 3.

La detección de los virus CMV, MNSV, SqMV, CGMMV y TSWV se hizo por medio de la técnica DAS – ELISA. Los resultados indican que no se encontraron afectando cultivos de cucurbitáceas en la zona del Zaghouan y El Fahs los virus MNSV, SqMV, CGMMV y TSWV sin embargo, sí se encontró CMV afectando las plantas de pepino en la zona del El Fahs en dos campos diferentes (Tabla 3; Figura 24). Las hojas de pepino afectadas con el virus mostraban un fuerte mosaico, bandeado de nervios, un amarilleo internervial y necrosis (Figura 23), sin embargo otras muestras recogidas en el mismo campo que mostraban clorosis internervial generalizada o localizada solo en la parte apical de la hoja y en ocasiones con deformación de esta no resultaron positivas a CMV (Tabla 3; Figura 23).

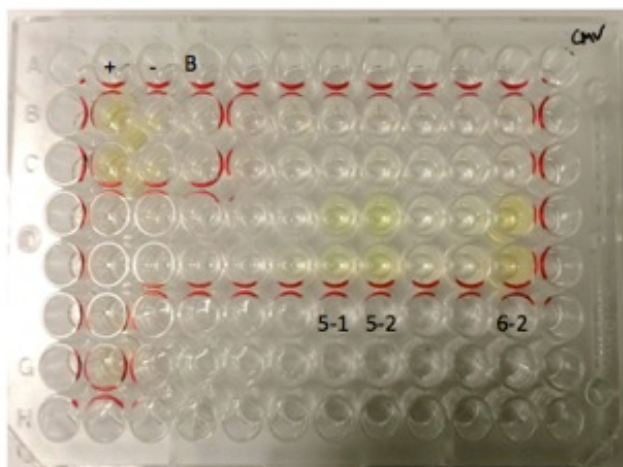


Figura 24 Placa para análisis de CMV por DAS - ELISA

De las 18 muestras recogidas en Zaghouan y El Fahs en 6 campos diferentes de cuatro especies de cucurbitáceas no se detectaron ninguna especie viral del género *Begomovirus* (Tabla 3), a pesar de que en otras zonas del país sí se había detectado TYLCV y TYLCSV (Mnari-Hattab *et al.* 2014) y recientemente se ha detectado en calabacín en el sur de España ToLCNDV (Juárez *et al.* 2014).

Tabla 3 Resultados de los cultivos de cucurbitáceas analizados en 6 parcelas de Zaghouan y El Fhas (Túnez)

Cultivo	Área	Muestra	Análisis realizado												
			DAS-ELISA					PCR	RT-PCR						
			CMV	MNSV	SqMV	CGMMV	TSWV	<i>Begomovirus</i>	CABYV	CVYV	BPYV	CLSV	CYSDV	BYV	<i>Potyvirus</i>
Sandía	Zaghouan	1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sandía	Zaghouan	2-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melón	Zaghouan	3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3-3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Calabacín	El Fhas	4-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pepino	El Fhas	5-1	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		5-2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		5-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pepino	El Fhas	6-1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		6-2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		6-3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

En cuanto a los análisis realizados a los virus de ARN únicamente se detectó CABYV en la zona de Zaghuan en cultivo de melón en una muestra y en la zona de El Fahs se encontró en cultivos de pepino en cinco muestras (Tabla 3). En las muestras positivas se obtuvieron los fragmentos del tamaño esperado (600 pb) (Figura 25). Los síntomas coinciden con un amarilleo internervial en hojas y en melón estas hojas se curvan hacia el envés. Esto indica que en la zona norte de Túnez los están presentes los áfidos vectores *A. gossypii* y/o *M. pericae* que transmiten la enfermedad de una manera semipersistente. Además tres de las muestras estaban coinfectadas con CMV (códigos 5-1, 5-2 y 6-3) también transmitido por pulgones de diversas especies, por tanto, es importante mantener las poblaciones de pulgones a niveles bajos para el control de estas virosis. Otros virus de ARN como CVYV, BPYV, BYV, CLSV, CYSDV y diferentes especies virales del género *Potyvirus* no fueron detectados en las muestras de hojas recolectadas en los seis campos de cultivos de cucurbitáceas. Las plantas, sin embargo, presentaban síntomas evidentes por lo que podría estar infectados por otros agentes fitopatológicos no analizados en el presente trabajo.

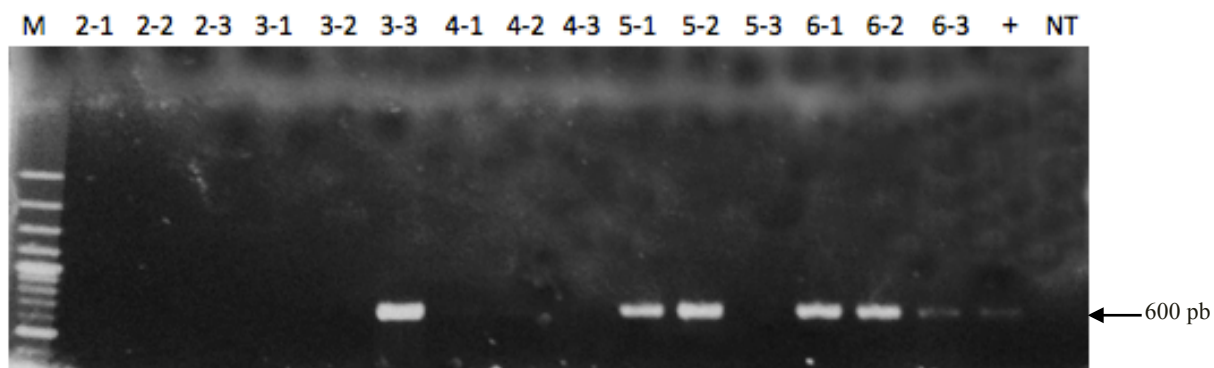


Figura 25 Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en TAE 1x de los productos de RT-PCR con cebadores específicos deCABYV. En los diferentes carriles se indican el código de las muestras analizadas, incluyéndose una muestra positiva (+), un blanco (NT) y un marcador GeneRuler 100bp ladder de Fermentas (M)

En las muestras positivas a CMV por DAS-ELISA se decidió realizar un análisis mediante RFLP utilizando dos reacciones de RT-PCR con dos parejas de primers específicos de CMV y posterior digestión de estos productos con dos enzimas de restricción diferentes. El resultado obtenido reveló que las tres muestras se encontraban infectadas por CMV del tipo 1A como se deduce de los patrones obtenidos en los geles de agarosa al 3% en TAE1x tras la restricción con cada uno de los enzimas (Figuras 26 y 27)

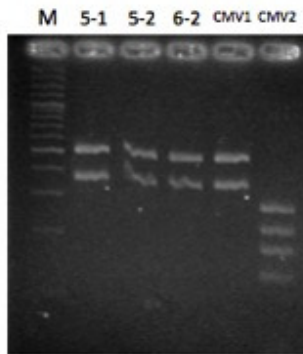


Figura 26 Electroforesis en gel de agarosa 3% en TAE 1x de los productos obtenidos tras el análisis RFLP con enzima HpaI de los productos de RT-PCR con los cebadores específicos CMV CP for/r. En los diferentes carriles se sitúan las muestras así como controles positivos de los distintos tipos de CMV en función del patrón observado. En el carril M se incluye el marcador GeneRuler 100bp ladder de Fermentas

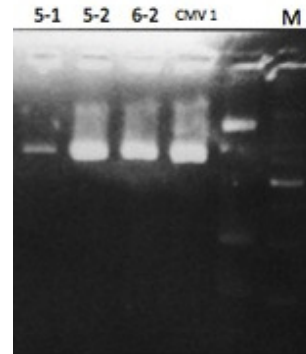


Figura 27 Electroforesis en gel de agarosa 3% en TAE 1x de los productos obtenidos tras el análisis RFLP con enzima MluI de los productos de RT-PCR con los cebadores específicos W8R/11. En los diferentes carriles se sitúan las muestras así como controles positivos de los distintos tipos de CMV en función del patrón observado. En el carril M se incluye el marcador GeneRuler 100bp ladder de Fermentas

Mnari – Hattab *et al.* (2009) encontraron en el año 2000 – 2001, 2003 y 2004 en cultivos de cucurbitáceas de las zonas de Sahel, norte, sur y centro de Túnez plantas con síntomas de amarilleos severos en hojas viejas y además una gran población de *A. gossypii* en estas mismas áreas, identificándose CABYV como agente causal de esta enfermedad. Según Mnari – Hattab *et al.* (2008), en el año 2000 – 2002 se encontraron ZYMV, WMV, PRSV, ZYFV, MNSV, CMV y SqMV en la región norte (Ariana, Beja, Bizerta y Seliana); región de Sahel (Sousse, Monastir y Mahdia); región centro (Kairouan); región sur (Gafsa, Gabes, Tozeur y Kebili). MWMV no se detectó en las muestras recogidas durante esos años en Túnez. Yakoubi *et al.* (2008a) detectaron por primera vez en la zona norte y en el Sahel de Túnez el virus MWMV en cucurbitáceas muestreadas en 2005. Yakoubi *et al.* (2008b), en el año 2005 y 2006, detectaron los virus CABYV, CYSDV y CVYV, estos dos últimos reportados por primera vez en Túnez pero estaban presentes solamente en la zona sur y en la zona de Sahel. Según Yakoubi *et al.* (2008b) en el año 2006 los cultivos de melón mostraban manchas necróticas en las hojas y luego las plantas morían en la zona de Kebili en el sur de Túnez, identificándose como agente causal al virus MSNV. Ésta fue la primera cita de MSNV en Túnez y África. Además según Alfaro *et al.* (2011) el CGMMV, CMV, CABYV, CYSDV, MNSV, PRSV, SqMV, ZYMV y WMV están presentes en la zona noroeste de Monastir y sureste de Kebili, Gabes, El Hamma and Matmata. La detección de CGMMV constituye la primera detección de este *Tobamovirus* en Túnez, así como la detección de MNSV en sandía cultivada al aire libre

(Alfaro *et al.* 2011). Por otro lado, recientemente se han detectado en el país *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) (Mnari-Hattab *et al.* 2014).

Por lo tanto se tiene conocimiento de la existencia de diversas virosis presentes en varias regiones de Túnez tales como ZYMV, WMV, PRSV, ZYFV, MNSV, CMV, SqMV, CGMMV, CABYV, CYSDV, CVYV y MWMV a lo largo de los años, sin embargo con excepción del CMV y CABYV, ninguna fue detectada en las muestras del año 2013 en Zaghouan y El Fahs en la zona noreste del país, por lo que se recomienda hacer un estudio con un número mayor de muestras y en un año con condiciones distintas para ver si hay diferencias entre los virus encontrados afectando cultivos cucurbitáceas en esa zona.

5. CONCLUSIONES

- En los muestreos realizados en el norte de Túnez en 2013, se detectó CABYV en la zona de Zaghouan y El Fahs en cultivos de melón y pepino respectivamente. Los síntomas observados en esas muestras fueron un fuerte amarilleo internervial, bandeado de venas incipiente con una coloración internervial en verde claro, aclarado de nervios y necrosis, una clorosis internervial acompañada en ocasiones por deformación de la hoja o únicamente localizada en la zona apical de la hoja.
- Concretamente, tres de las muestras de pepino de dos campos distintos muestreadas en El Fahs estaban co- infectadas con CABYV y CMV y presentaban un bandeado de venas incipiente con una coloración internervial en verde claro, aclarado de nervios y necrosis.
- El tipo de CMV detectado en las muestras de pepino positivas fue del tipo 1A en todos los casos.
- Ninguna de las 18 muestras recogidas de sandía, melón, calabacín y pepino estaba infectada con otros virus encontrados en trabajos anteriores en cucurbitáceas en Túnez como CVYV, BPYV, BYV, CLSV, CYSDV, MNSV, SqMV, CGMMV o TSWV.
- Asimismo tampoco se detectaron ninguna especie viral del género *Potyvirus* (como MWMV, PRSV, WMV, ZYFV, ZYMV) o *Begomovirus* (como ToLCNDV, TYLCV o TYLCSV).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, George. 2005. Plant Pathology. 5ta edición. Elsevier Academic Press. San Diego, California, EEUU. 922 p.p.
- Alfaro, A. O. y M. I. Font. 2014. Sintomatología del virus del rizado del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) en los cultivos españoles. *Phytoma España*, 257: 36 – 40.
- Alfaro, A., A. Boubaker, K. Saddredine, M. Córdoba, M. Cebrián. y M.I. Font 2011. .Occurrence of viral diseases of cultivated cucurbits in Tunisia. 4th Conference of the international working group on legume and vegetable viruses (IWGLVV). Antequera, Malaga, España. Mayo 17 -20, 2011
- Blancard, D. 1991. Enfermedades de las cucurbitáceas. Observar, identificar, luchar. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid. Pág. 238 – 252.
- Celix, A., A. López – Sesé, N. Almazara, M. L. Gómez – Guillamón y E. Rodriguez – Cerezo. 1996. Characterization of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* a *Bemisia tabaci* – Transmitted *Closterovirus*. *Phytopathology*, 86 (12): 1370 – 1376.
- Cuadrado, I. M., D. Janssen, L. Velasco, L. Ruiz, y E. Segunda. 2001. First report of *Cucumber vein yellow virus* in Spain. *Plant Disease*, 85 (3):336.
- Deyong, Z., P- Willingmann, C. Heinze, G. Adam, M. Pfunder, B. Frey y J. E. Frey. 2005. Differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates by hybridization to oligonucleotides in a microarray format. *Jornal of Virological Methods*, 123 (1): 101 – 108.
- FAOSTAT. 2014. Visualización datos: producción. FAO. Consultada el 01/0714. <http://faostat3.fao.org>

- Gonsalves, D., S. Tripathi, J. B. Carr y J. Y. Suzuki. 2010. *Papaya ring spot virus*. The plant health instructor. Consultada 27/06/14. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/PapayaRingspotvirus.aspx>
- Finetti-Sialer, M. M., F. Cillo, L. Barbarossa, y D. Gallitelli. 1999. Differentiation of *Cucumber mosaic virus* subgroups by RT – PCR RFLP. *Journal of Plant Pathology*, 81 (2): 145 – 148.
- Hausbeck, M. K. 2011. *Watermelon mosaic virus* detected in winter squash. Michigan State University. Consultado el 30/06/14. http://msue.anr.msu.edu/news/watermelon_mosaic_virus_detected_in_winter_squash
- ICTVdB. 2006. - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>.
- Jordá, C. y I. Font. 2002. Enfermedades virales de la sandía, en: El cultivo de la sandía. Ediciones Mundi-Prensa. España. Pág 232- 244.
- Juárez, M., R. Tovar, E. Fiallo-Olivé, M. A. Aranda, B. Gosálvez, P. Castillo E. Moriones y J. Navas-Castillo. 2014. First Detection of *Tomato leaf curl New Delhi virus* Infecting Zucchini in Spain. *Plant Disease*, 98 (6): 857.
- Juárez, M., V. Truniger y M. A. Aranda. 2004. First Report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Spain. *Plant disease*, 88 (8): 907.
- Kundu, R., P. Rysanek. 2004. Detection of *Beet yellows virus* by RT – PCR and immunocapture RT – PCR in *Tetragonia expansa* and *Beta vulgaris*. *Acta virológica*, 48 (3): 177 – 182.
- Lecoq, H. (INRA) 2012. *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV). Principaux symptômes. Consultado 30/06/14. http://147.100.108.242/melon/melon_utilisateur/index_appli.php?portail=LEGUMES&produit=melon&main=4&ssrub1=18&ssrub2=35&ssrub3=145&id_fiche=98&theme=367

- Luís Arteaga, M. 1994. Enfermedades causadas por virus, en: Enfermedades de las Cucurbitáceas en España. Monografías de la SEF 1. Phytoma, España. Pag 73 – 91.
- Maroto, J. V. 2002. Horticultura herbácea especial. 5ta edición. Mundi – Prensa. España. 611 p.p.
- Melgarejo, P., J., García-Jiménez, J., M.C., Jordá, M.M. López, M.F. Andrés, y N. Duran-Vila., 2010. Patógenos de plantas descritos en España. 2^a edición. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España. 884 p.p.
- Mnari-Hattab, M., H. Jebari y A. Zouba. 2008. Identification et distribution des virus responsables de mosaïques chez les cucurbitacées en Tunisie. Bulletin OEPP/EPPO, 38: 497 – 506.
- Mnari – Hattab, M., N. Gaunthier y A. Zouba. 2009. Biological and molecular characterization of the Cucurbit aphid - borne yellows virus affecting Cucurbits in Tunisia. Plant Disease, 93 (10): 1065 – 1072.
- Mnari-Hattab, M., S., Zammouri, y M.R. Hajlaoui. 2014. First report of hard watermelon syndrome in Tunisia associated with Tomato yellow leaf curl virus infection. New Disease Reports, 3: 7.
- Provvidenti, R. 2014. *Zucchini yellow mosaic*. Consultada 27/06/14. <https://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/ZucchiniYellowMosaic.aspx>
- Rubio, L., J. Soong, J. Kao y B.W. Falk. 1999. Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: *Lettuce infectious yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, and *Beet pseudo-yellows virus*. Phytopathology, 89 (8): 707 – 711.
- Segundo, E., D. Janssen, L. Velasco. L. Ruiz y I. M. Cuadrado. 2001. First report of *Cucumber leaf spot virus* in Spain. Plant Disease, 85(10): 1123.

- Texas A&M AgriLife extension. 2009. Cucurbit leaf disorders. Consultado el 27/06/14.
<http://aggie-horticulture.tamu.edu/vegetable/problem-solvers/cucurbit-problem-solver/leaf-disorders/>
- VKM, Norwegian Scientific committee for food safety. 2008. Pest risk assessment of cucumber green mottle mosaic virus in Norway. Consultado el 27/06/14.
http://www.english.vkm.no/eway/default.aspx?pid=278&trg=Content_6615&Main_6359=6582:0:31,2570&Content_6582=6615:0:31,2672&Content_6615=6393:1846220::0:6450:11::0:0
- Walker, J. M. y Ralph Rapley. 2009. Molecular biology and biotechnology. Royal society of chemistry. Reino Unido. 271 p.p.
- Wang, Yi-Hong. T. K. Behera y Chittaranjan Kole 2011. Genetics, genomics and breeding of cucurbits. CRC Press. Estados Unidos. 425 p.p.
- Wyatt, S. D. y J. K. Brown. 1996. Detetion of subgroup III Geminivirus Isolates in Leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86 (12): 1291.
- Yakoubi, S., C. Desbiez, H. Fakhfakh, C. Wipf-Scheibel, M. Marrakchi y H. Lecoq. 2008a. Biological characterization and complete nucleotide sequence of a Tunisian isolate of *Moroccan watermelon mosaic virus*. *Archives of Virology*, 153: 117 – 125.
- Yakoubi, S., C. Desbiez, H. Fakhfakh, C. Wipf-Scheibel, M. Marrakchi y H. Lecoq. 2008b. First report of *Melon necrotic spot virus* on melon in Tunisia. *Plant Pathology*, 57: 386.
- Yakoubi, S., C. Desbiez, H. Fakhfakh, C. Wipf-Scheibel, M. Marrakchi y H. Lecoq. 2007. Occurrence of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus* in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*, 89 (3): 417 – 420. (c)
- Zheng, L., B. C. Rodonil, M. J. Gibbs y A. J. Gibbs. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of Potyviruses. *Plant pathology*, 59 (2): 211 – 220.

Zitter, Thomas A.; Donald L. Hopkins y Claude E. Thomas. 2004. Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas. The American Phytopathological Society. Mundi Prensa. España. 88 p.p.

Zitter, T. A. and J. F. Murphy. 2009. *Cucumber mosaic virus*. The plant health instructor. <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/Cucumbermosaic.aspx>

7. ANEXOS

Anexo 1 Extracción de ADN con kit E.Z.N.A.® DNA Isolation Kit de la casa comercial Omega Bio – Tek, Georgia, Estados Unidos.

- Se trituran 10 mg de muestra seca con ayuda de un micropistilo.
- Se añaden 600 µl de tampón P1 y se vortea vigorosamente.
- Se incuba a 65° C durante 5 minutos. Se agitan los tubos una vez durante la incubación.
- Se agregan 140 µl de tampón P2 y se vortea.
- Se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos.
- Se transfieren 600 µl del sobrenadante a un tubo nuevo.
- Se añaden 300 µl de tampón P3 y 600 µl de etanol absoluto y se mezcla.
- Se pasan 800 µl a una columna HibindDNA acoplada a un tubo colector de 2 ml.
- Se centrifuga durante 1 minuto a 13000 rpm y se descarta el sobrenadante.
- Se pasa el resto del volumen por la columna.
- Se vuelve a centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y se descarta el sobrenadante en el tubo colector.
- Se pasa la columna a un nuevo tubo colector y se agregan 750 µl de wash buffer
- Se centrifuga 1 minuto a 13000 rpm para eliminar restos de alcohol de la columna.
- Se transfiere la columna a un tubo eppendorf estéril y se añaden 100 µl de agua PCR precalentado a 65° C y se incuba durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se centrifuga durante 1 minuto a 13000 rpm
- Se vuelve a añadir 100 µl de agua PCR precalentada, se incuba 1 minuto y se vuelve a centrifugar.
- Se obtienen de 2 a 10 µg de ADN

Anexo 2 Productos y volúmenes empleados para la PCR con cebadores degenerados para detectar diferentes especies del género *Begomovirus*

	1 (x) μ l
Buffer 10x	2.5
dNTPs 1 μ M	2.5
AV 10 μ M	1
AC 10 μ M	1
DNA Polimerasa 1 u/ μ l	0.7
Agua PCR	14.8
DNA	2.5

Anexo 3 Protocolo de extracción de ARN con RNAeasy plant mini kit, Qiagen.

- Se trituran 50 mg del material seco con ayuda de una maza en una bolsa de ELISA.
- Se homogenizan con 750 μ l de tampón de lisis RLT (pero añadiendo previamente β – mercaptoetanol 10 μ l/ml Rtl)
- Luego se incuba durante 3 minutos a 56° C
- Se transfieren 450 μ l del homogenizado a la columna Lila utilizando una punta recortada.
- Se centrifuga durante 5 minutos a 13000 rpm a 4° C.
- Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo.
- Se añaden 250 μ l de etanol frío, se mezcla con la punta y se transfiere a la columna rosa.
- Se centrifuga a 10000 rpm durante 1 minuto a 4° C.
- Se descarta el filtrado y volviendo a utilizar el tubo se añaden 700 μ l de tampón RW1.
- Se vuelve a centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto a 4° C.
- Se desecha el líquido y el tubo, se transfiere la columna a nuevo tubo colector. Se agregan 500 μ l de tampón RPE.
- Se centrifuga a 10000 rpm durante 1 minuto a 4° C.
- Se descarta el líquido y se vuelve a añadir 500 μ l de RPE, se vuelve a centrifugar durante 1 minuto.
- Se descarta el líquido y se centrifuga 1 minuto sin ningún tampón para eliminar los restos del alcohol de la columna.
- Por último, eluir el RNA de la columna agregando 50 μ l de “Rnase free wáter” o agua Dep y se centrifuga a 10000 rpm durante 1 minuto a 4° C.

Anexo 4 Productos y volúmenes empleados para la RT PCR en un paso con cebadores específicos de diferentes virus de ARN

CABYV

	1 (x) µl
2 mix buffer II	6.25
CABYV D 20 µM	0.25
CABYV R 20 µM	0.25
One Step Taq II	0.25
Agua dep	3
ARN 1:50 desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos	2.5

CVYV

	1 (x) µl
2 mix buffer II	6.25
CVYV (+) 20 µM	0.25
CVYV (-) 20 µM	0.25
One Step Taq II	0.25
Agua dep	3
ARN 1:50 desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos	2.5

BPYV

	1 (x) µl
2 mix buffer II	6.25
PVP 40 (10x)	1
BH – 1 (+) 20 µM	0.25
BH – 2 (-) 20 µM	0.25
One Step Taq II	0.25
RNase out 40 u/ µl	0.6
Agua dep	1.4
ARN 1:50 desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos	2.5

CLSV

	1 (x) μ l
2 mix buffer II	5
PVP 40 (10x)	1
CLSV Mix 5 μ M	1
One Step Taq II	0.4
RNAse out 40 u/ μ l	0.1
Agua MQ	1.9
ARN 1:50	0.6

CYSDV

	1 (x) μ l
2 mix buffer II	6.25
410 L	0.25
410 V	0.25
One Step Taq II	0.25
Agua dep	3
ARN desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos	2.5

BYV

	1 (x)
	μ l
2 mix buffer II	6.25
BYV 2A 20 μ M	0.25
BYV 2B 20 μ M	0.25
One Step Taq II	0.25
Agua dep	1.4
ARN desnaturalizado a 65° C durante 5 minutos	2.5

Anexo 5 Productos y volúmenes empleados para la RT PCR en dos paso con cebadores generales para detectar diferentes especies del género *Potyvirus*

Para desnaturalizar ARN

	1 (x) µl
Agua PCR	6.25
dNTPs	1
RP (Random Primers)	0.25
ARN	0.25

Para hacer cDNA

	1 (x) µl
5x cDNA Synthesis Buffer	6.25
DTT 0.1 M	1
AMV – RT (cloned)	0.25
RNAse out	0.25
One Step Taq II	0.25
RNAse out 40 u/ µl	0.6

PCR Potyvirus

	1 (x) µl
B 10x Buffer	5
dNTPs	1
BSA	1
Nbmix 5 µM	5
Taq	2
H ₂ O PCR	34
cDNA	2

Anexo 6 Protocolo de la técnica serológica DAS ELISA para antisueros suministrados por la casa comercial Loewe Biochemica GmbH (Sauerlach, Alemania)

- Se diluye el antisuero IG en tampón de recubrimiento (“Coating buffer”) a una dilución 1:200
- Se tapiza la placa con 100 µl/pocillo de la dilución anterior. En los bordes se agrega el mismo volumen pero con agua, evitando así los efectos de borde.
- Se deja incubar la placa con el tampón de recubrimiento durante 4 horas a 37° C.
- Después de la incubación, se vacía la placa con un golpe seco y se realizan 4 lavados con tampón de lavado (“Wash buffer”). Los primeros dos se hacen sin tiempo de espera y los dos últimos se espera 3 minutos para lavar. Luego se seca la placa.
- Se trituran las muestras con tampón de extracción a una proporción 1:20 (peso/volumen) en una bolsa ELISA.
- Se agregan 100 µl del extracto en cada pocillo, haciendo dos repeticiones por muestra. También se agregan la muestra positiva, la negativa y el blanco. En los bordes se agrega el mismo volumen pero con agua.
- Se dejar incubar la placa durante 12 horas en nevera a 4° C.
- Al terminar la incubación se vacía la placa con un golpe seco y se realizan 5 lavados con tampón de lavado. Los dos primero sin tiempo de espera y los últimos tres esperando 3 minutos. Si la placa aún queda con extractos vegetales se deben hacer más lavados. Se seca la placa.
- Se diluye el antisuero conjugado (Ig – AP) en tampón conjugado (“conjugate buffer”) a 1:200.
- Se tapiza la placa con 100 µl/pocillo de la dilución anterior. En los bordes se agrega el mismo volumen pero con agua, evitando así los efectos de borde.
- Se deja incubar 4 horas en estufa a 37° C.
- Después de la incubación se vacía la placa con un golpe seco y se realizan 5 lavados con tampón de lavado. Los dos primeros sin tiempo de espera y los últimos tres, esperando 3 minutos. Se seca la placa.
- Se prepara una solución de p- nitrofenil fosfato a una concentración de 1 mg/ml de tampón substrato (substrate). Se tapiza la placa.

- Luego de tapizada la placa con la solución se tapa con una bandeja para protegerla de la luz y se mantiene a temperatura ambiente.
- Se deja durante 1 y/o 2 horas y se realiza la lectura de los resultados con un espectrofotómetro Thermo Labsystems Original Multiskan Ex, de la casa comercial Thermo Fisher Scientific, a una longitud de onda de 405 nm. Las muestras positivas serán aquellas cuyo valor de absorbancia sea igual o mayor al doble del valor de la muestra negativa. El espectrofotómetro está conectado a un software Ascent Software for Multiskan.

Tampones

Tampón de recubrimiento (“coating buffer”) pH 9,6

Na ₂ CO ₃ H ₂ O	0,186 g
NaHCO ₃	0,293 g
H ₂ O destilada	100 ml

Tampón de lavado (“wash buffer”) pH 7,2 – 7,4

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
H ₂ O destilada	11 ml

Tampón de extracción (simple extraction buffer) pH 7,4

PVP	5 g
BSA	0,5 g
NaN ₃	0,025 g
Tampón de lavado	250 ml

Tampón conjugado (conjugate buffer) pH 7,4

PVP	2 g
BSA	0,2 g
NaN ₃	0.01 g

Tampón de lavado 100 ml

Tampón substrato (Substrate buffer) pH 9,8

Dietanolamina 9,7 ml

MgCl₂·6H₂O 0,02 g

H₂O destilada 90,3 ml

Anexo 7 Productos y volúmenes empleados para la RT PCR en un paso con dos parejas diferentes de cebadores específicos de CMV y posterior análisis de los productos obtenidos mediante RFLPs con dos enzimas de restricción diferentes

RT PCR CMV con cebadores RW

	1 (x) μ l
2 mix buffer III	10
CMV RW	2
PVP 40 10X	2
One Step Taq III	0.8
RNAse out	0.2
Agua MQ	3.8
ARN 1:50	1.2

RFLP CMV MLUI

	1 (x) μ l
Buffer R 10x	2
MLU I	1
Agua MQ	10
Producto PCR	7

RT PCR CMV con cebadores CP

	1 (x) μ l
2 mix buffer III	10
CMV CP	2
PVP 40 10X	2
One Step Taq III	0.8
RNAse out	0.2
Agua MQ	3.8
ARN 1:50	1.2

RFLP CMV HAP II

	1 (x) μ l
B10 x (tango)	2
Hpa II	1
Agua MQ	10
Producto PCR	7