

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**ivia**

instituto valenciano  
de investigaciones agrarias

### ***Detección por hibridación molecular de virus en cultivos de tomate con manejo convencional, integrado y ecológico***

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: Ferran Salavert Pamblanco

DIRECTORES: Dr. Luis Rubio Miguélez y Dr. Luis Galipienso Torregrosa

TUTOR: Carmelo López del Rincón

*Curso Académico 2015-2016*

VALENCIA, Julio de 2016



**ALUMNO:** Ferran Salavert Pamblanco

**DIRECTORES:** Luis Rubio Miguélez y Luis Galipienso Torregrosa

**TUTOR:** Carmelo López del Rincón

**FECHA:** Valencia, Julio de 2016

**TÍTULO:** Detección por hibridación molecular de virus en cultivos de tomate con manejo convencional, integrado y ecológico

## **RESUMEN**

El creciente interés por llevar a cabo prácticas sostenibles con el medio ambiente, también ha llegado a la agricultura, produciéndose un incremento de las prácticas ecológicas u orgánicas en las últimas décadas. Las enfermedades virales causan graves daños y pérdidas económicas en cultivos de tomate de todo el mundo, lo que supone una reducción en la producción. Entre los virus más importantes están los virus del mosaico del tomate (ToMV), del mosaico del pepino (CMV), del bronceado del tomate (TSWV), del mosaico del pepino dulce (PepMV), del moteado de la parietaria (PMoV) y del rizado amarillo del tomate (TYLCV). Resulta crucial disponer de un método de detección preciso y rápido, para evaluar la incidencia de estos virus y poder aplicar los correspondientes métodos de control de la enfermedad.

En este trabajo se puso a punto la hibridación molecular para detectar estos virus, y se aplicó para estimar cómo varía la incidencia de los mismos durante el cultivo de tomate en campos con un manejo convencional, integrado y ecológico.

**PALABRAS CLAVE:** diagnóstico, hibridación, virus, tomate, cultivo ecológico.

**AUTHOR:** Ferran Salavert Pamblanco

**DIRECTORS:** Luis Rubio Miguélez y Luis Galipienso Torregrosa

**TUTOR:** Carmelo López del Rincón

**DATE:** Valencia, July 2016

**TITLE:** Detection by molecular hybridization of viruses in tomato crops under conventional, integrated and organic management

**ABSTRACT**

The growing interest in carrying out sustainable practices with the environment has also come to agriculture, resulting in an increase on the ecological or organic practices in the last decades. The viral diseases cause serious damage and economical loses in tomato crops all over the world, which is translated into a reduction of the production. Among the most important viruses is it possible to find the Tomato Mosaic Virus (ToMV), the Cucumber Mosaic Virus (CMV), the Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV), the Pepino Mosaic Virus (PepMV), the Parietaria Mottle Virus (PMoV) or the Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV). It is crucial to have a precise and fast detection method, in order to evaluate the incidence of these viruses and to apply the most suitable control methods for the disease.

In this project, the molecular hybridization has been set-up for detecting these viruses, and has been applied to analyze the variations on the viral incidence during the tomato crop in fields under conventional, integrated and organic managements.

**KEYWORDS:** diagnosis, hybridization, virus, tomato, organic culture.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar me gustaría dedicarles este trabajo a mis padres, hermanas y tía; que me han impedido salirme del camino y me han animado para seguir y poder estar ahora mismo escribiendo estas palabras. También agradecer todo el apoyo que he tenido por parte de amigos y amigas más cercanos, que me han dado el último empujón que necesitaba.

Para poder llevar a cabo los ensayos de campo, se han establecido distintas colaboraciones con particulares e instituciones. Mención especial me gustaría hacer a una persona que generosamente cedió su parcela particular de Vinalesa y se encargó del manejo del cultivo siguiendo las directrices de este estudio: Vicente Lloris, muchas gracias. También agradecer a la Fundación Cajamar Valencia, y más en particular a Carlos Baixauli, director del Centro de Experiencias de la fundación, por adjudicar una parcela en Paiporta para este estudio y llevar a cabo los manejos estipulados del cultivo de tomate. Finalmente, agradecer a José Serra y Josep Roselló, de la Estación Experimental de Carcaixent del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, por realizar el diseño y seguimiento de los ensayos de Vinalesa, Paiporta y Carcaixent y encargarse del cultivo y manejo de la parcela de Carcaixent. Destacar también al Dr. Alberto Urbaneja y a su equipo, por su participación y asesoramiento en el control biológico

Por último, aunque no menos importante, agradecer al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y a todas aquellas personas del laboratorio que me han ayudado en la realización del proyecto. Gracias a Andrés Puchades, que me ha aconsejado durante todo el desarrollo experimental. Finalmente, agradecer a mis dos directores, Luis Rubio y Luis Galipienso, gracias a los cuales ha sido posible la realización de este proyecto.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. El modelo de cultivo ecológico .....	1
1.2. Cultivo de tomate en la Comunidad Valenciana y la importancia de los virus .....	3
1.3. Información básica acerca de los virus del estudio.....	4
1.3.1. CMV.....	4
1.3.2. PepMV.....	5
1.3.3. PMoV.....	6
1.3.4. ToMV.....	7
1.3.5. TSWV.....	8
1.3.6. TYLCV .....	9
1.4. Detección y diagnóstico de virus .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
3.1. Diseño experimental y muestreo.....	13
3.2. Purificación de ácidos nucleicos .....	14
3.3. Detección de los virus por hibridación molecular.....	15
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	19
4.1. Incidencia viral tras la hibridación molecular.....	19
4.2. Particularidades de la infección viral.....	20
4.2.1. Ensayo 1: Paiporta.....	20
4.2.2. Ensayo 2: Carcaixent.....	22
4.2.3. Ensayo 3: Vinalesa .....	22
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	23
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	24

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las diferentes soluciones utilizadas.....	18
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del consumo anual de fertilizante en España .....	2
Figura 2. Evolución de la superficie destinada a agricultura ecológica en España.....	2
Figura 3. Producción de hortalizas en España media de 2008 a 2012 .....	3
Figura 4. Representación de la partícula viral o virión de CMV .....	5
Figura 5. Representación de la estructura del genoma de los virus del género Cucumovirus.....	5
Figura 6. Representación del virión de PepMV .....	6
Figura 7. Representación de la estructura del genoma de PepMV.....	6
Figura 8. Representación de la partícula viral de PMoV.....	7
Figura 9. Representación de la estructura del genoma de los virus del género Ilarvirus .....	7
Figura 10. Representación del virión de ToMV.....	8
Figura 11. Representación de la estructura del genoma de ToMV.....	8
Figura 12. Representación del virión de TSWV.....	9
Figura 13. Representación de la estructura del genoma de TSWV .....	9
Figura 14. Representación del virión de TYLCV .....	10
Figura 15. Representación de la la estructura del genoma de TYLCV .....	10
Figura 16. Esquema del proceso de la hibridación molecular de ácidos nucleicos.....	11
Figura 17. Esquema de las plantaciones de tomate usado en los tres ensayos localizados en Paiporta, Carcaixent y Vinalesa.....	14
Figura 18. Representación de la membrana de hibridación.....	16
Figura 19. Resultados de las pruebas de reacción cruzada entre las diferentes sondas .....	16
Figura 20. Resultados de incidencia tras llevar a cabo la hibridación molecular de los seis virus de estudio .....	20
Figura 21. Evolución de la incidencia de ToMV a lo largo del tiempo en la parcela bajo manejo intensivo y ecológico en las variedades de tomate Valenciano y Óptima.....	21

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AMV</b>	Alfalfa Mosaic Virus
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>CMV</b>	Cucumber Mosaic Virus
<b>CP</b>	Proteína de cápside
<b>CSPD</b>	Quimioluminiscente
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>F:Cl:AI</b>	Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico
<b>h</b>	hora(s)
<b>M</b>	Molar
<b>mJ</b>	miliJulio(s)
<b>MP</b>	Proteína de movimiento
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b><i>N. tenuis</i></b>	<i>Nesidiocoris tenuis</i>
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PepMV</b>	Pepino Mosaic Virus
<b>PMoV</b>	Parietaria Mottle Virus
<b>PTGS</b>	Silenciamiento Génico Post-Transcripcional
<b>PVY</b>	Potato Virus Y
<b>RdRp</b>	ARN polimerasa dependiente de ARN
<b>rpm</b>	Revoluciones/minuto
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SSC</b>	Tampón SSC
<b>TCES</b>	<u>T</u> ris, <u>N</u> aCl, <u>E</u> DTA, <u>S</u> DS (Tampón extracción ARN)
<b>TMV</b>	Tobacco Mosaic Virus
<b>ToMV</b>	Tomato Mosaic Virus
<b>TSWV</b>	Tomato Spotted Wilt Virus
<b>TYLCD</b>	Tomato Yellow Leaf Curl Disease
<b>TYLCV</b>	Tomato Yellow Leaf Curl Virus
<b>μl</b>	Microlitro(s)

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El modelo de cultivo ecológico

La agricultura es vital para nuestra sociedad ya que, de la misma, depende en gran medida la alimentación de la población mundial, la cual está en constante crecimiento. Debido a la creciente demanda de alimentos, han emergido múltiples innovaciones y avances tecnológicos, con el fin de aumentar la productividad (Pretty et al., 2010).

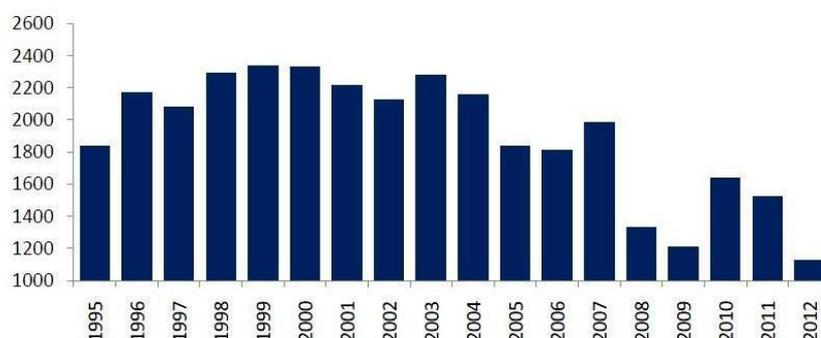
El modelo agrícola establecido, conocido como convencional, está basado en el monocultivo de variedades vegetales de alto rendimiento, y depende de un uso elevado de productos agroquímicos. Pese a que los resultados a nivel de producción que se obtienen de su utilización son muy altos, también lo son los efectos negativos que derivan de su puesta en práctica: contaminación del medio ambiente por la utilización de los agroquímicos, aumento de la resistencia de las plagas y las enfermedades, erosión y disminución progresiva de la fertilidad del suelo, riesgos para la salud humana y animal, etc. Es en este marco, es cuando empieza a tomar importancia la agricultura ecológica, también conocida como orgánica. La agricultura ecológica se puede definir como la puesta en práctica de un conjunto de técnicas de conservación y mejora de la calidad del suelo, que favorecen al ecosistema, y que permiten la obtención de productos de máxima calidad nutritiva, sin la utilización de productos químicos de síntesis, lo que permite mantener la sostenibilidad del medio ambiente. En los últimos veinte años se ha producido un incremento de su popularidad en todo el mundo (De Ponti et al., 2012). La demanda, por parte de los consumidores, de productos “amigables” con el medio ambiente, que estuvieran producidos siguiendo unas pautas determinadas y estuvieran libres de productos químicos, ha permitido la expansión de este modelo de cultivo (Rigby y Cáceres, 2001).

Pese a este incremento en su popularidad, todavía sigue siendo bajo el porcentaje de terreno de cultivo destinado al cultivo ecológico. Se vislumbran razones, tanto por parte de la perspectiva del consumidor, como de la del productor, que condicionan la puesta en práctica de estas técnicas. Por una parte, aquellos productos generados utilizando estas técnicas, suelen ir acompañados de precios más elevados y, por otra parte, se suelen obtener menores y más variables rendimientos, a la vez que la demanda de estos tipos de productos suele ser más limitada (De Ponti et al., 2012).

Como beneficio de la utilización de este tipo de manejo, se encuentra el enriquecimiento del suelo. Las prácticas llevadas a cabo, como son la rotación de cultivos, el cultivo mixto, la utilización de cultivos de cubierta, etc; benefician a la fauna y flora del suelo, al mismo tiempo que a la formación y estructuración del mismo, propiciando sistemas más estables. A su vez, se produce una mejora de la capacidad de retención de nutrientes y agua, incrementándose también la circulación de los mismos y de energía, lo que confluje en una independencia de la utilización de fertilizantes minerales. Gracias a esta mejor capacidad de retención de nutrientes se reduce el peligro de contaminación de aguas subterráneas, un problema muy acusado en el manejo convencional, debido a la utilización de fertilizantes y plaguicidas sintéticos. Otro aspecto destacable es la mayor fijación de carbono en el suelo, fruto de las prácticas llevadas a cabo en este manejo, lo cual aumenta la productividad y también contribuye a mitigar el efecto invernadero. Por último, se genera un aumento de la biodiversidad, ya que se proporcionan estructuras que ofrecen sustento y no se emplean plaguicidas. Se favorece el establecimiento de diversas especies de insectos y artrópodos y de organismos beneficiosos para el sistema orgánico, como pueden ser polinizadores o depredadores de plagas, generándose un control biológico natural (Altieri, 1995).

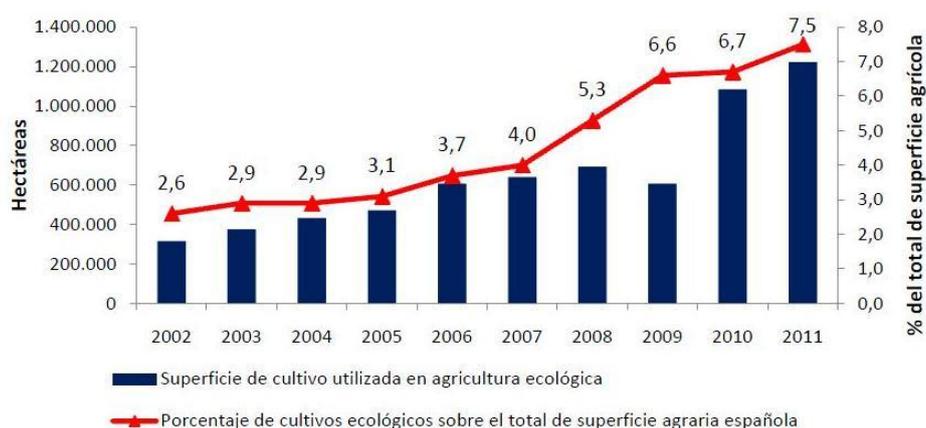
En el caso de España, la introducción de este manejo está siendo progresiva, quedando patente en la evolución en el consumo anual de fertilizantes (Figura 1) y, por otra parte, la evolución de la superficie destinada a la agricultura orgánica (Figura 2):

Evolución del consumo anual de fertilizantes (en miles de toneladas) en España



**Figura 1.** Evolución del consumo anual de fertilizante en España (Martínez et al., 2013)

Evolución de la superficie destinada a agricultura ecológica en España



**Figura 2.** Evolución de la superficie destinada a agricultura ecológica en España (Martínez et al., 2013)

Un sistema de producción agraria a medio camino entre la agricultura convencional y la ecológica es la producción integrada. Este tipo de agricultura permite el uso de productos agroquímicos de síntesis (abonos, pesticidas, etc.), aunque restringiéndolos todo lo posible y combinándolos con otros más respetuosos con el medio ambiente, como los métodos biológicos.

## 1.2. Cultivo de tomate en la Comunidad Valenciana y la importancia de los virus

El cultivo hortícola convencional, también conocido como horticultura, se trata de un sistema de explotación intensiva caracterizado por una serie de particularidades (Maroto, 2008):

1. Necesidad de un importante desembolso de capital de explotación, para poder: preparar el terreno, llevar a cabo la fertilización, costear los fertilizantes y pesticidas, etc.
2. En general, no se precisa de una gran superficie de cultivo, aunque esta puede ser mayor en los casos de la horticultura extensiva.
3. Gran absorción de mano de obra, la cual suele precisar de cierta especialización.
4. La reiteración de los tratamientos fitosanitarios es bastante intensa, al mismo tiempo que se lleva a cabo una excesiva utilización de fertilizantes minerales, lo que puede llegar a conllevar problemas de contaminación y presencia de residuos en la producción. Este tipo de práctica se está viendo controlada en los últimos años, optándose por tecnologías como la producción integrada y por prácticas agrícolas más sostenibles con el medio ambiente.

Bajo el término horticultura, quedan englobadas tres disciplinas distintas:

1. Olericultura u Holericultura: disciplina destinada al estudio, manejo y producción de hortalizas
2. Fruticultura: disciplina cuya finalidad es el estudio, manejo y producción de árboles frutales.
3. Floricultura u Ornamenticultura: disciplina cuyo objetivo es el estudio, manejo y producción de flores y plantas ornamentales.

Este proyecto se centra en la olericultura, puesto que la investigación se llevó a cabo en un cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Esta disciplina tiene mucha importancia en nuestro país, tal y como queda reflejado en la superficie dedicada al cultivo de hortalizas, que se sitúa en un 22,23% (349.980 hectáreas) de la superficie total (MAGRAMA, 2008-2010). A su vez, analizando los datos de la producción total, se observa la importancia del cultivo de hortalizas, ya que un 54% corresponde al cultivo de las mismas (MAGRAMA, 2008-2012). Analizando más en profundidad, se puede entender la importancia del cultivo de tomate, dentro del cultivo de hortalizas (Figura 3), suponiendo este un 19% del total (MAGRAMA, 2008-2012).

### Producción de hortalizas en España.

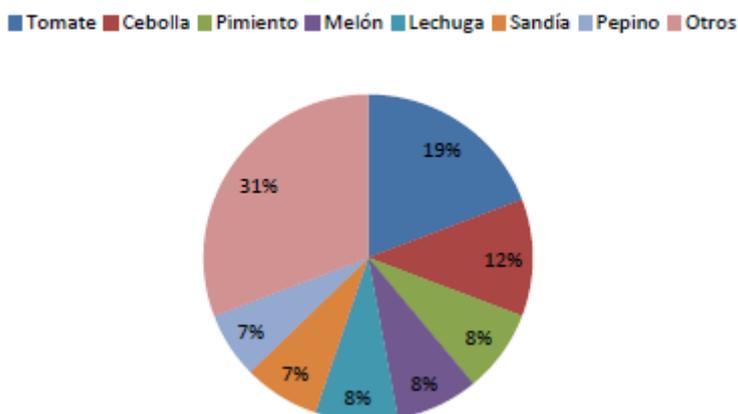


Figura 3. Producción de hortalizas en España media de 2008 a 2012 (MAGRAMA, 2008-2012)

En la Comunidad Valenciana, el tomate ha sido el cultivo hortícola más importante en cuanto a términos de producción total durante décadas. Sin embargo, la producción del mismo se ha visto disminuida considerablemente en los últimos años, pasando de una producción total de 202.284 toneladas en 2001, a 110.156 toneladas en 2007, ocupando la segunda posición en cuanto a producción total, por detrás del cultivo de sandía (Soler et al., 2010). La razón más importante de esta disminución se debe a la propagación de las enfermedades virales, las cuales han ido creciendo en número a lo largo del tiempo. Los virus que afectan a los cultivos de tomate son muchos, desde virus que llevan presentes muchas décadas como el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) o el virus Y de la patata (Potato virus Y, PVY); pasando por otros, que fueron detectados por primera vez en los noventa, como el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) o el virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV); hasta los más recientemente detectados como podrían ser el virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) o el virus del moteado de la parietaria (*Parietaria mottle virus*, PMoV). A su vez, se conoce la existencia de otros virus, como el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) o el virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), los cuales no suponen un riesgo real en los cultivos de tomate en España (Soler et al., 2010).

Las infecciones virales suelen producir una reducción en la productividad y la calidad de la fruta, y en ocasiones supone la pérdida total de la cosecha. La incidencia de las enfermedades virales depende de multitud de factores, como son: el aislado o cepa viral, la genética de la planta cultivada, el estado de desarrollo en el que se encuentra la planta cuando se produce la infección, las condiciones climáticas, si se produce infección mixta con distintos aislados o especies virales, etc. Todo esto se ve exacerbado en los cultivos en campo abierto durante el verano, temporada en la que se cultiva alrededor de un 26% de la producción total, ya que se producen las condiciones favorables para la proliferación de insectos vectores y la dispersión de los virus (Soler et al., 2010).

### **1.3. Información básica acerca de los virus del estudio**

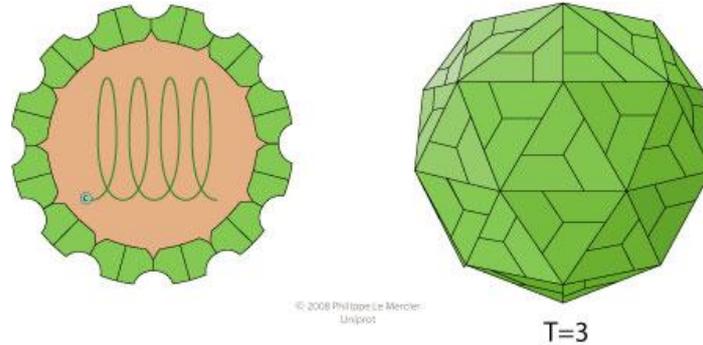
Los virus seleccionados para llevar a cabo el análisis en este proyecto fueron: CMV, PepMV, PMoV, ToMV, TSWV y TYLCV.

#### **1.3.1. CMV**

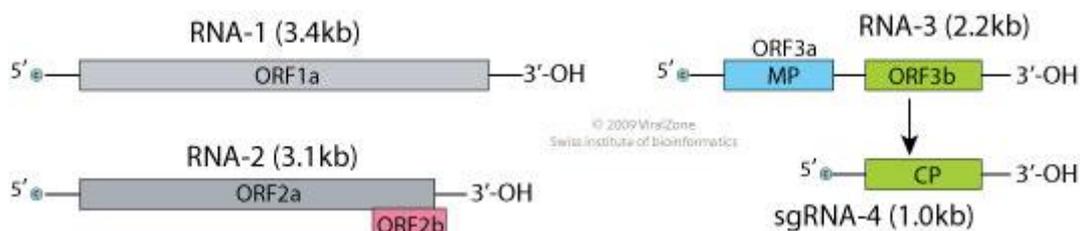
El virus del mosaico del pepino pertenece al género *Cucumovirus*. Se descubrió en 1916 en Estados Unidos, como el agente causante de enfermedad tanto en pepino como en melón. Es el virus de plantas con mayor rango de hospedadores, el cual abarca alrededor de 1300 especies de plantas (Loebenstein y Lecoq, 2012). La cifra de especies de áfidos capaces de transmitir este virus asciende a 80 y, la distribución de los aislados de este virus abarca todo el mundo, desde zonas tropicales a templadas, tanto en producciones en campo abierto como en invernadero (Loebenstein y Lecoq, 2012).

Las partículas del virión son isométricas (Figura 4) y están formadas por una cubierta protéica formada por el ensamblaje de varias copias de la proteína de la cápside (*Coat protein*, CP), quedando el genoma viral en el interior. El genoma es tripartido (Figura 5), formado por tres moléculas de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva que codifica cinco pautas de lectura abiertas (*Open reading frames*, ORFs):

1. El ARN1 codifica la proteína 1a que es una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) implicada en la replicación del genoma viral.
2. El ARN2 codifica para la proteína 2a que es otra RdRp, y la proteína 2b, que participa en el movimiento viral y en la supresión de la ruta de silenciamiento génico post-transcripcional (*Post transcriptional gene silencing*, PTGS), que es un mecanismo de defensa de la planta que consiste en la degradación del ARN viral.
3. El ARN3 codifica la proteína de membrana 3a, que es una proteína que permite el movimiento del virus dentro de la planta (*movement protein*, MP) y la proteína 3b, que es la proteína de cápside (*coat protein*, CP), ésta última se expresa mediante un ARN subgenómico (sgARN4).



**Figura 4.** Representación de la partícula viral o virión de CMV (<http://viralzone.expasy.org>)



**Figura 5.** Representación de la estructura del genoma de los virus del género Cucumovirus (<http://viralzone.expasy.org>)

### 1.3.2. PepMV

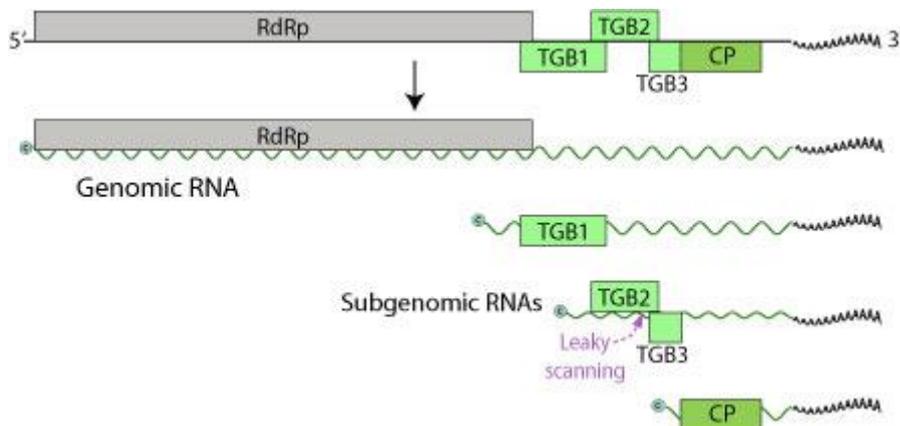
Este virus, perteneciente al género *Poxtevirus*, fue aislado en 1974 en Perú infectando pepino. Más tarde, en 1999, fue reportada su presencia en Holanda, infectando tomate, para terminar extendiéndose por todo el mundo, pasando a convertirse en uno de los causantes de enfermedad más importante en los cultivos de tomate. También se ha detectado su presencia en cultivos de berenjena, patata o tabaco. Este virus se transmite mecánicamente (por contacto) y a través de la semilla y en menor medida por el hongo *Oplidium virulentus*. (Loebenstein y Lecoq, 2012).

Los viriones de PepMV tienen forma de varilla y tienen una longitud de unos 500 nm (Figura 6). El genoma (Figura 7) está formado por una única molécula de ARN de simple cadena de polaridad positiva que posee en su extremo 3' una cadena poli-A y contiene 5 ORFs (Aguilar et al., 2002) (Loebenstein y Lecoq, 2012):

1. La ORF1 codifica para la RdRp aparente, la cual posee tres dominios conservados presentes en las replicasas de otros virus del mismo género.
2. Las ORF 2, 3 y 4 codifican para tres proteínas de movimiento viral: TGBp1, TGBp2 y TGBp3.
3. Por último, la ORF5 codifica para la CP que, además de su función estructural, también posee un papel importante en los movimientos célula-célula y de larga distancia.



**Figura 6.** Representación del virión de PepMV (<http://viralzone.expasy.org>)



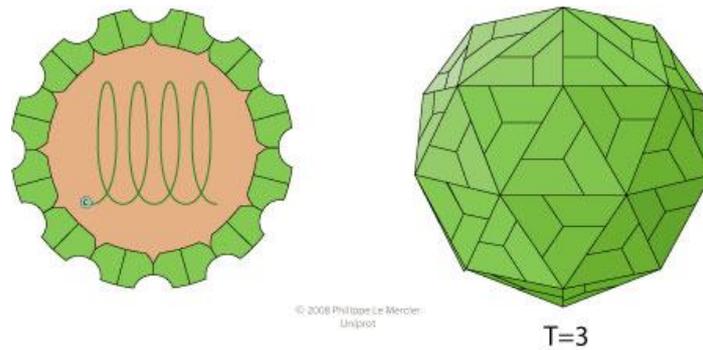
**Figura 7.** Representación de la estructura del genoma de PepMV (<http://viralzone.expasy.org>)

### 1.3.3. PMoV

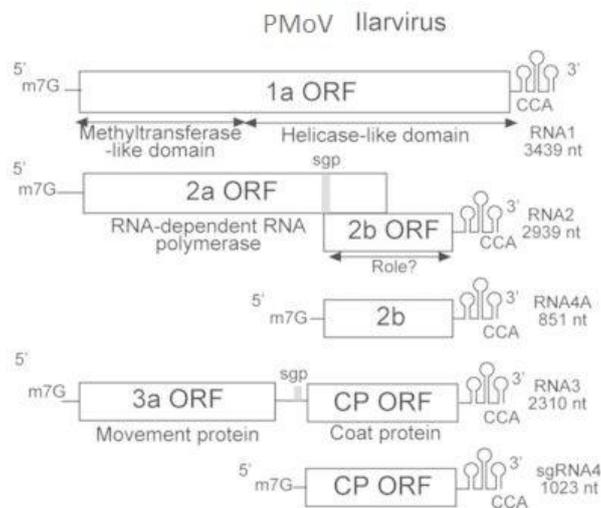
Este virus, perteneciente al género *Ilarvirus*, fue detectado por primera vez en 1971 infectando plantas de parietaria en Italia (Galipienso et al., 2005), y posteriormente se encontró en diferentes países de la zona Mediterránea como España, Italia, Francia y Grecia (Galipienso et al., 2009) (Galipienso et al., 2015). Este virus es transmitido de manera inespecífica por polen, semillas y por insectos como trips o míridos (Galipienso et al., 2015).

Los viriones consisten en partículas casi isométricas, compuestos por una sola CP (Galipienso et al., 2005) y un genoma (Figura 8) de tres ARNs de simple cadena con polaridad positiva (Galipienso et al., 2015)

1. El ARN1 codifica la proteína p1, que parece ser una RdRp.
2. El ARN2 presenta dos genes solapantes: p2 parece codificar para otra RdRp y una proteína de función desconocida (2b), que posiblemente participa en el movimiento viral y en la supresión del PTGS. La proteína 2b se expresa a través de un sgRNA4A.
3. El ARN3 presenta dos genes solapantes, que codifican la MP y la CP, expresándose esta última a través de un sgRNA4.



**Figura 8.** Representación de la partícula viral de PMoV (<http://viralzone.expasy.org>)

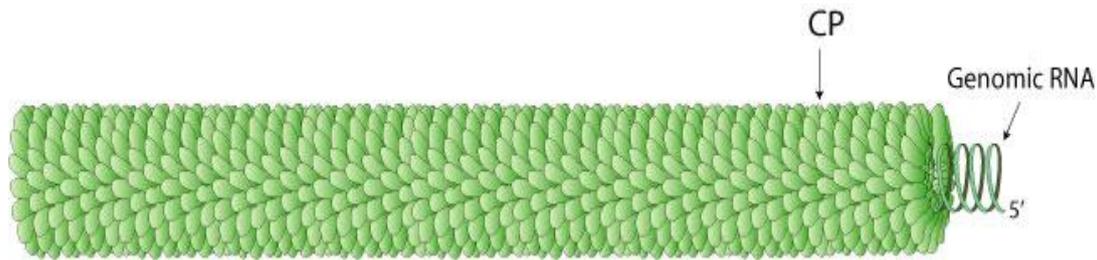


**Figura 9.** Representación de la estructura del genoma de los virus del género Iarvirus (<https://www.researchgate.net>)

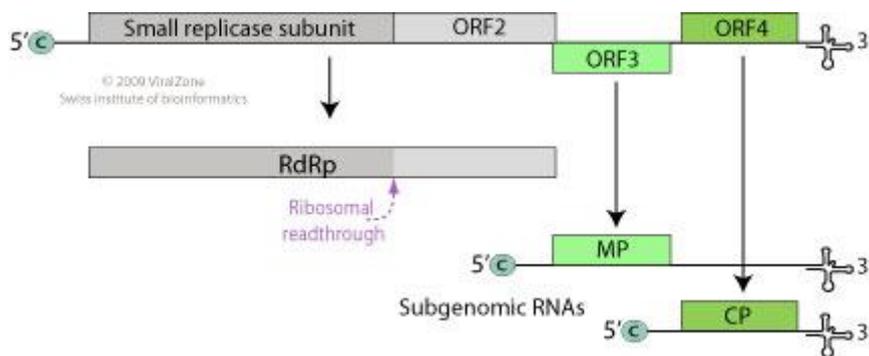
#### 1.3.4. ToMV

El virus del mosaico del tomate pertenece al género *Tobamovirus*, y fue por primera vez detectado en Estados Unidos y en Holanda a principios de 1900, pero ahora se ha extendido a todos los cultivos de tomate de todo el mundo. Pese a que su principal hospedador es el tomate, este virus también se ha detectado en cultivos de pimiento, y ocasionalmente en patata, cereza, pera, manzana y uva (Van Regenmortel y Fraenkel-Conrat, 2013). La reacción de la planta de tomate a la infección por este virus depende de ciertos aspectos, como son el tiempo de infección, los nutrientes presentes en el suelo, las condiciones del agua, temperatura, etc. Se han encontrado cepas que infectan variedades de tomate que poseen genes de resistencia (Van Regenmortel y Fraenkel-Conrat, 2013). Puede permanecer infectivo en el material vegetal recogido de plantas infectadas y en las estructuras del invernadero, durante varios meses. Además ha sido detectado ocasionalmente en agua utilizada para la irrigación. Este virus puede ser transmitido mecánicamente a través de insectos, pequeños mamíferos, pájaros y sobre todo, por la actividad y herramientas de los horticultores (Van Regenmortel y Fraenkel-Conrat, 2013).

La estructura de los viriones (Figura 10) es helicoidal y el genoma está formado por una molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva que codifica cuatro proteínas (Figura 11): dos RdRPs, una MP y una CP (Van Regenmortel y Fraenkel-Conrat, 2013).



**Figura 10.** Representación del virión de ToMV (<http://viralzone.expasy.org>)



**Figura 11.** Representación de la estructura del genoma de ToMV (<http://viralzone.expasy.org>)

### 1.3.5. TSWV

El virus del bronceado del tomate es la especie tipo del género *Tospovirus*, que es el único género que pertenece a la familia *Bunyaviridae* que contiene virus que infectan a plantas, puesto que los virus de otros géneros de esta familia infectan animales vertebrados e invertebrados (Sherwood et al., 2009). Fue descrito por primera vez en Australia en 1915 (Sherwood et al., 2009) y actualmente afecta a un gran número de cultivos como tomate, pimiento, lechuga y pepino, causando importantes pérdidas en todo el mundo (Loebenstein y Lecoq, 2012). Los virus de este género, dentro del cual se encuentra TSWV junto con más de una docena de otros, son transmitidos por trips, y se replican tanto en ellos como en la planta a la que infectan (Loebenstein y Lecoq, 2012).

Los viriones de este género son esféricos o pleomórficos (Figuras 12) con cubierta formada por una membrana plasmática procedente del hospedador que tiene unas glicoproteínas incrustadas. Dentro se encuentra el genoma cubierto por unidades de la nucleoproteína (equivalente a la CP de otros virus) y algunas copias de la RdRp. El genoma está formado por tres moléculas de ARN de simple cadena. La molécula de ARN más grande, ARN L, presenta sentido negativo, mientras que las otras dos, ARN S y ARN M, presentan sus dos regiones codificantes en una disposición ambisentido. En total, el genoma viral (Figura 13) codifica cinco proteínas (Loebenstein y Lecoq, 2012):

1. El ARN L codifica para la RdRP.
2. El ARN M codifica para dos proteínas: la NSm, que es una MP y un precursor para las glicoproteínas Gn y Gc, implicados en la transmisión por trips.
3. El ARN S codifica para dos proteínas: la N que forman parte de la nucleocápside y la NSs, que es un supresor del silenciamiento génico.

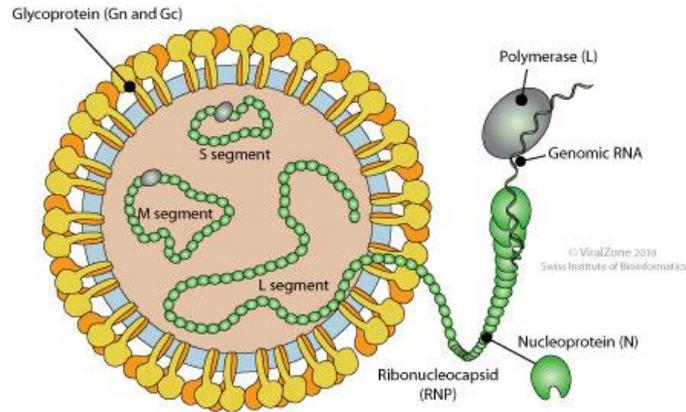


Figura 12. Representación del virión de TSWV (<http://viralzone.expasy.org>)

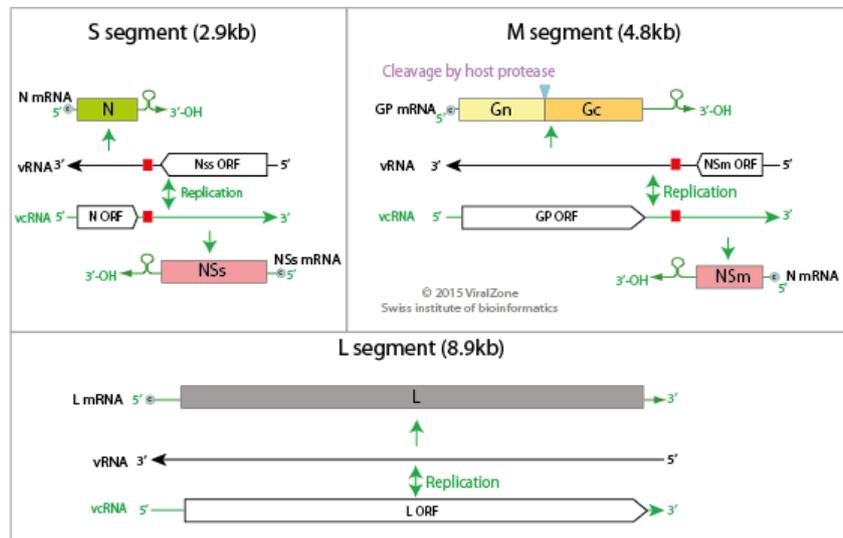


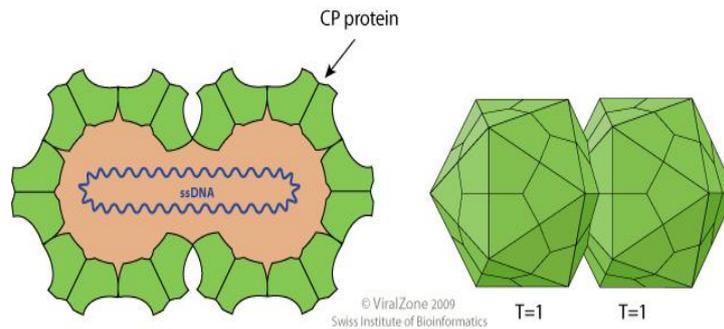
Figura 13. Representación de la estructura del genoma de TSWV (<http://viralzone.expasy.org>)

### 1.3.6. TYLCV

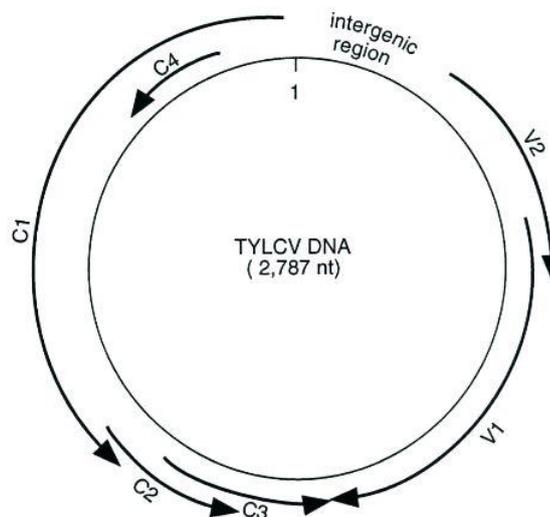
El virus del rizado amarillo del tomate, también conocido como “virus de la cuchara”, pertenece al género *Begomovirus*. Fue detectado por primera vez en Israel en 1959 y es el causante de una de las enfermedades de plantas más devastadoras en todo el mundo, la enfermedad del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl disease*, TYLCD) (Glick et al., 2009). El virus provoca pérdidas en la productividad muy altas, dependiendo del estado fenológico de la planta en el momento de la infección, pudiendo llegar hasta un 100%. En el área del Mediterráneo, este virus se ha convertido en un factor limitante tanto para la producción en campo abierto como para los cultivos bajo cubierta. Aunque se trata de un patógeno mayoritariamente de tomate, se ha reportado que induce enfermedades en otros cultivos, como las judías (Loebenstein y Lecoq, 2012). Este virus es transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Loebenstein y Lecoq, 2012).

Los viriones están formado por dos icosaédros incompletos (Figura 14) y encapsida el genoma formado por una única molécula de ADN circular de simple cadena (Figura 15) (Glick et al., 2009) que contienen los siguientes genes:

1. C1 codifica la proteína Rep, involucrada en la regulación de replicación y transcripción.
2. C2 codifica TrAP que induce un incremento de la expresión de la CP, a la vez que participa tanto en la supresión de defensas del huésped como en la infección viral sistémica.
3. C3 codifica REn, que interactúa con Rep y también aumenta la acumulación del ADN viral en la planta infectada.
4. C4 codifica productos implicados en el movimiento del virus y en la patogenicidad.
5. V1 codifica la CP.
6. V2 codifica productos implicados en el movimiento viral.



**Figura 14.** Representación del virión de TYLCV (<http://viralzone.expasy.org>)



**Figura 15.** Representación de la estructura del genoma de TYLCV. Los ORFs están designados como V (orientación viral) o C (orientación sentido complementario) (Glick et al., 2009)

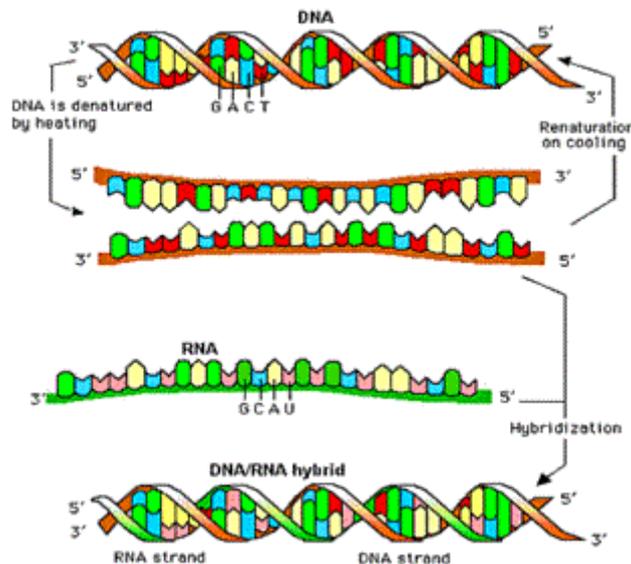
#### 1.4. Detección y diagnóstico de virus

Resulta vital poder disponer de un método que sea eficaz y preciso para la detección e identificación de los virus, ya que una pronta detección de la presencia de los mismos en una planta constituye una de las mejores herramientas para frenar su avance (Pallás et al., 1998). Por otra parte, el control de la calidad fitosanitaria de la semilla, también es un aspecto muy a tener en cuenta para el control de las enfermedades virales, puesto que una certificación de que el material de propagación vegetativo está exento de virus, permite una producción de plantas libres de los mismos y de las enfermedades que

estos producen (Rangel et al., 2006). También resulta muy importante tener una herramienta para detectar la presencia viral, para evaluar la capacidad de resistencia y tolerancia al virus de variedades de distintos cultivos obtenidas por mejora genética.

Los principales métodos de diagnóstico o detección son: la caracterización biológica, la observación al microscopio, el análisis serológico, el análisis de ARN bicatenario, la hibridación molecular, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación isotérmica, la diferenciación de variantes genéticas y la secuenciación nucleotídica (Rangel, 2015).

La hibridación de ácidos nucleicos (Figura 16) es la técnica seleccionada para este estudio, tratándose de una de las más fiables y sensitivas a la hora de llevar a cabo un diagnóstico de virus en plantas, y tiene la ventaja añadida de que permite analizar simultáneamente un gran número de muestras. Esta técnica molecular se basa en la capacidad de apareamiento específico entre dos cadenas sencillas de ARN, ADN o ARN – ADN que tengan secuencias complementarias formando una estructura de doble cadena más estable. La síntesis de una molécula de ARN o ADN monocatenario complementaria al genoma del virus (sonda) marcada con isótopos radioactivos (como el  $^{32}\text{P}$ ) o con marcajes no-radioactivos (como la molécula digoxigenina o diferentes fluoróforos) y su posterior hibridación con ácidos nucleicos (dot-blot) de la planta fijados en un soporte sólido (generalmente una membrana) permite detectar la presencia del virus (Ferriol et al., 2015)



**Figura 16.** Esquema del proceso de la hibridación molecular de ácidos nucleicos (<http://andrus-dna-tech-project-2012.wikispaces.com>)

## 2. OBJETIVOS

El aumento de la concienciación por la sostenibilidad del medio ambiente es una realidad en nuestra sociedad. Esto se refleja en la horticultura, en la que se está produciendo un cambio de mentalidad en los últimos tiempos, lo que ha hecho emerger a la agricultura orgánica. Sin embargo, esta no queda exenta de las enfermedades virales, las cuales suponen un gran impedimento para la producción. Por ello, resulta muy importante el estudio de la incidencia viral en las plantas cultivadas bajo este tipo de manejo, para poder adoptar medidas, siempre bajo la regulación de este tipo de cultivos; o para tratar de seguir determinadas directrices durante el proceso de cultivo, que permitan tener bajo control la gran cantidad de enfermedades virales que afectan a los cultivos de tomate.

El principal objetivo de este trabajo es comprobar si existen diferencias en la incidencia viral en plantas cultivadas bajo los manejos convencional, integrado y ecológico, al mismo tiempo que analizar las razones que han llevado a esa posible diferencia en la tasa de infección. Para ello, se establecen unos objetivos concretos:

1. Llevar a cabo el diseño experimental de los diferentes ensayos
2. Llevar a cabo la detección de los diferentes virus mediante hibridación molecular
3. Analizar los resultados de incidencia viral obtenidos

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Diseño experimental y muestreo

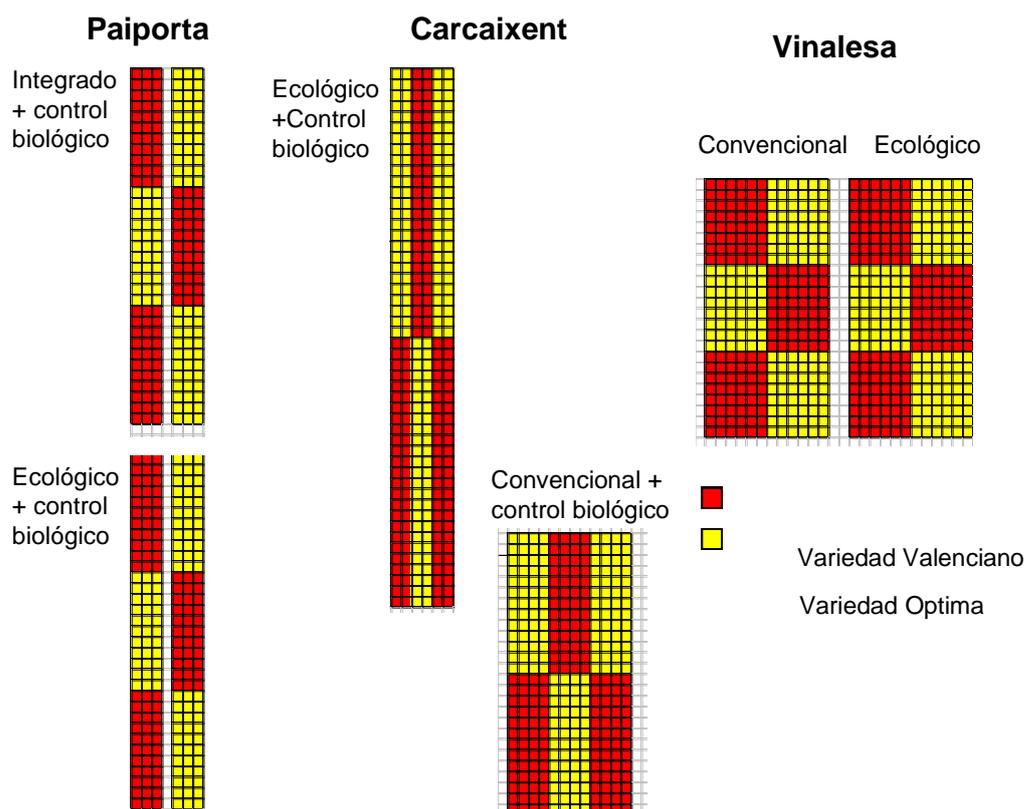
Para llevar a cabo el estudio, en el verano de 2015 se llevaron a cabo tres ensayos independientes en las localidades valencianas de Paiporta, Carcaixent y Vinalesa (Figura 17). En cada uno de ellos, se demarcaron dos parcelas contiguas, cada una de ellas siendo destinada a un tipo de manejo agrícola, pero intentando que fueran lo más similares posibles para que fueran más comparables. Cada parcela se dividió en seis subparcelas, en tres se cultivaron plantas de tomate de la variedad Optima y en las otras tres la variedad Tomate Valenciano. Optima es un híbrido comercial al que se ha incorporado uno o más de un genes de resistencia a ToMV y el tomate Valenciano es una variedad local sin ningún tipo de resistencias.

Ensayo 1. En Paiporta se comparó un sistema de producción integrada con uno ecológico a los que se les dio un tratamiento de control biológico basado en la suelta de ejemplares de *Nesidiocoris tenuis*. Se trata de un chinche de la familia de los míridos, que es un depredador generalista que se alimenta de mosca blanca, lepidópteros (incluida la *Tuta absoluta* que es una plaga para tomate), trips y araña roja. Cuando no dispone de presas se puede alimentar del cultivo. Tanto en el cultivo integrado como en el ecológico se utilizó un sistema de semiforzado que consistió en acolchado negro y microtúnel de polipropileno térmico de baja densidad (17g/m<sup>2</sup>). El objetivo era mejorar las condiciones ambientales en las primeras fases de desarrollo del cultivo y actuar de barrera física impidiendo la llegada de insectos transmisores de virus.

Ensayo 2. En Carcaixent se comparó un cultivo de tomate convencional con uno ecológico, llevándose también a cabo un tratamiento de control biológico basado en la suelta de ejemplares de *N. tenuis*. No se utilizó ningún sistema de semiforzado.

Ensayo 3. En Vinalesa, se comparó un cultivo de tomate convencional con uno ecológico. No se realizó ningún tratamiento de control biológico, ni se empleó ningún sistema de semiforzado.

El manejo integrado se realizó siguiendo las directrices del Real Decreto 1201/2002, de 20 de noviembre (BOE núm. 287 de sábado 30 noviembre 2002), y el manejo ecológico según una normativa europea, el Reglamento CE 834/2007 sobre producción y etiquetaje de los productos ecológicos, cuyas disposiciones de aplicación (incluyendo el sistema de control) están establecidas por el Reglamento CE 889/2008.



**Figura 17.** Esquema de las plantaciones de tomate usado en los tres ensayos localizados en Paiporta, Carcaixent y Vinalesa. Cada cuadrado representa una planta de tomate.

Se realizaron seis tomas de muestra cada dos semanas, excepto para el último muestreo, el cual se llevó a cabo tres semanas después. En el primer muestreo (27 mayo de 2015) se seleccionaron aleatoriamente dos plantas por cada subparcela, llegando a un total de 72 plantas entre las tres localidades. Estas mismas plantas se utilizaron en los siguientes muestreos para llevar a cabo un análisis longitudinal. De cada una de las plantas seleccionadas se recogieron 0,2 g de hojas del meristemo apical, que fueron almacenadas en tubos eppendorf de 1,5 ml. Estos tubos eppendorf, con el fin de preservar la integridad del posible material genético viral presente en el material vegetal, fueron guardados en un recipiente que contenía nitrógeno líquido. Posteriormente, todas las muestras obtenidas tras cada muestreo se almacenaron en un congelador a -80 °C.

### 3.2. Purificación de ácidos nucleicos

Para poder obtener el material genético del virus, se llevó a cabo la purificación de ácidos nucleicos. Para los virus de genoma de ARN (CMV, PepMV, PMoV, ToMV y TSWV) se siguió el método de Fenol/Clorofomo (Ferriol et al., 2011). Este consiste en:

1. Triturado de la muestra en nitrógeno líquido en un aparato "tissuelyser", hasta que el material quede completamente homogéneo.
2. Adición de 500 µl de tampón TCES, 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (F:Cl:AI) y 2.5 µl de 2-mercaptoetanol. Homogeneización, empleando un agitador vórtex, durante 1 minuto aproximadamente. Centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos.
3. Recogida de la fase acuosa superior, evitando la fase orgánica. Adición de 450 µl de F:Cl:AI. Homogeneización, empleando el vórtex, durante 1 minuto. Centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos.

4. Recogida de la fase acuosa y posterior adición de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M a pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol al 95%.
5. Incubación a -20 °C, durante un día, para conseguir una buena precipitación del material genético.
6. Centrifugación de las muestras precipitadas a una temperatura de 4°C y a una velocidad de 13000 rpm, durante 30 minutos.
7. Eliminación del sobrenadante y lavado del sedimento con 400 µl de etanol al 70%. Centrifugación a una temperatura de 4 °C y a una velocidad de 13000 rpm, durante 10 minutos.
8. Finalmente, secado del sedimento, mediante tiras de papel Whatman 3MM, y posterior resuspensión del mismo en 20 µl de H<sub>2</sub>O estéril.

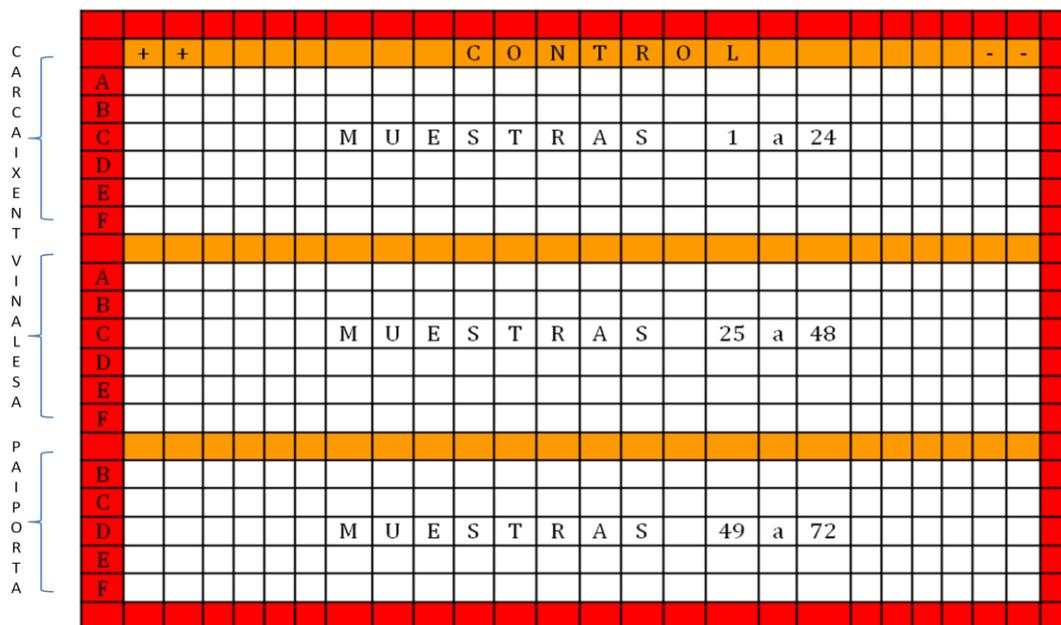
Para obtener el material genético de TYLCV, el cual se trata de un virus de ADN, se llevó a cabo el método de CTAB:

1. Triturado de la muestra en nitrógeno líquido en un aparato "tissuelyser", hasta que el material quede completamente homogéneo.
2. Añadir 400 µl de CTAB y 5 ml de 2-mercaptoetanol. Agitar y vórtex.
3. Calentar 1 hora a 60 °C agitando cada 10 min.
4. Añadir 400 µl cloroformo: isoamílico (24:1). Agitar en vórtex.
5. Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente.
6. Recoger fase acuosa superior.
7. Añadir el mismo volumen de isopropanol. Agitar volteando la gradilla.
8. Dejar a -20 °C durante 15 minutos.
9. Centrifugar 10 min. a 12.000 rpm a una temperatura de 4 °C.
10. Lavar el pellet con etanol 70%.
11. Centrifugar 5 minutos a una velocidad de 10000 rpm a una temperatura de 4 °C.
12. Secar el sedimento al aire y resuspender con 50 µl de H<sub>2</sub>O estéril.

Tras llevar a cabo todos estos pasos, se almacenan las muestras en un congelador a una temperatura de -80 °C.

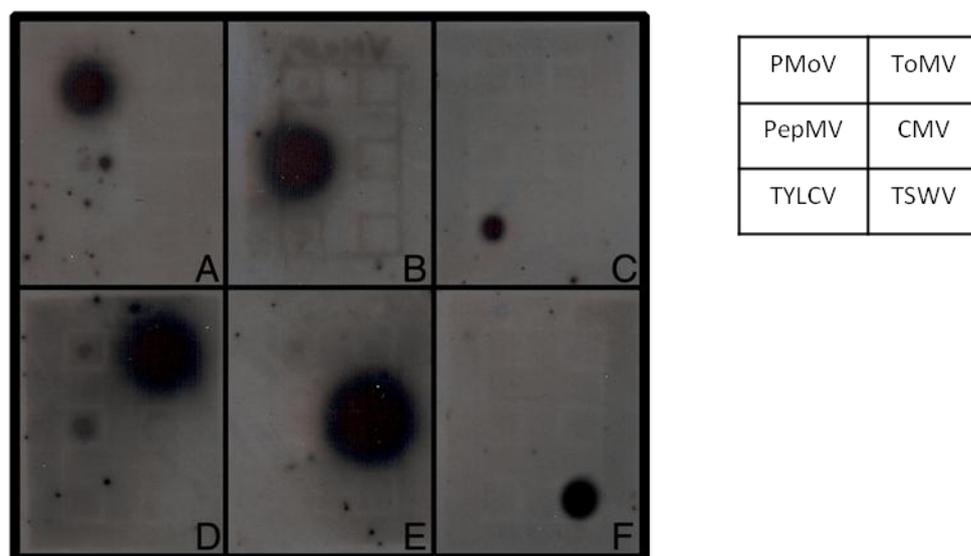
### **3.3. Detección de los virus por hibridación molecular**

Por cada virus analizado se preparó una membrana de hibridación. Para la elaboración de la misma se empleó membrana de nylon cargada positivamente (Roche), dejando alrededor de 0,5 cm<sup>2</sup> para cada muestra, de la cual se puso de 1µl de extracto de material genético. Al finalizar la colocación de muestras en la membrana, esta se fija mediante radiación ultravioleta a 120 mJ/cm<sup>2</sup>, para la preservación de la integridad del material genético de cada una de las muestras. La disposición de las muestras en cada membrana se muestra en la Figura 18, donde cada columna hace referencia a cada una de las 24 muestras, y cada fila a un muestreo, quedando separados los diferentes ensayos por una fila sin muestras. La disposición de los controles positivo y negativo, quedan representados en la membrana por los signos "+" y "-", respectivamente.



**Figura 18.** Representación de la membrana de hibridación. En la membrana quedan separadas las diferentes muestras de los diferentes ensayos, perteneciendo las 24 primeras al ensayo de Carcaixent, de la 25-48 al de Vinales y, por último, de la 49-72 al ensayo de Paiporta. Las letras A, B, C, D, E y F corresponden a los muestreos del 1 al 6, respectivamente.

Las sondas empleadas para llevar a cabo la hibridación, las cuales estaban disponibles en el laboratorio, fueron diseñadas a partir de la secuencia de la CP de cada virus y se sintetizaron a partir de RT-PCR o PCR. Se llevó a cabo un ensayo de reactividad cruzada (Figura 19), para comprobar que las sondas hibridaban únicamente con controles positivos del virus para el que habían sido diseñadas. Los resultados del ensayo de reactividad cruzada indicaron que las diferentes sondas eran específicas únicamente para el virus para el que habían sido diseñadas.



**Figura 19.** Resultados de las pruebas de reacción cruzada entre las diferentes sondas, junto con el esquema, en la parte derecha, de la disposición de los diferentes controles positivos para cada virus en la membrana. En las subfiguras A, B, C, D E y F; se muestran los resultados de la hibridación con las sondas de PMoV, PepMV, TYLCV, ToMV, CMV y TSWV, respectivamente, las cuales reaccionaron únicamente con el control positivo del virus para el que habían sido diseñadas.

El protocolo seguido para llevar a cabo la hibridación molecular, consta de tres partes:

1. Prehibridación: Se lleva a cabo (con solución de hibridación ) durante un mínimo de 1 h y un máximo de 3 h, a la temperatura de hibridación, la cual es de 50 °C para sondas de ADN (TYLCV) y 68 °C para sondas de ARN (CMV, PepMV, PMoV, ToMV y TSWV).
2. Hibridación: Si la sonda no ha sido previamente utilizada, se debe desnaturalizar a una temperatura de 95 °C, durante 10 minutos. Sin embargo, si esta ya ha sido utilizada previamente, solo es necesaria una desnaturalización previa a 68 °C, también durante 10 minutos. Finalmente, se añade la sonda al tubo de hibridación, junto con solución de hibridación, y el proceso se extiende durante un periodo de tiempo entre 12 y 14 h (*overnight*).
3. Lavados. Consta de los siguientes pasos:
  - a) Lavado 1: Dos lavados de 15 minutos a temperatura de hibridación con solución de lavado 1.
  - b) Lavado 2: Dos lavados de 15 minutos a temperatura de de hibridación con solución de lavado 2.
  - c) Maleato-Tween: Dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con tampón maleato-tween.
  - d) Maleato: Dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con tampón maleato.
  - e) Bloqueo: Un lavado de 60 minutos a temperatura ambiente con solución bloqueante al 2%.
  - f) Bloqueo-Anticuerpo: Un lavado de 30 minutos a temperatura ambiente con una dilución 1:10.000 del anticuerpo en solución bloqueante al 2 %.
  - g) Maleato-Tween: Dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con tampón maleato-tween.
  - h) Maleato: Dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con tampón maleato.
  - i) Incubación en tampón de detección: Se extrae la membrana del tubo de hibridación y se mantiene durante 2-3 minutos en un recipiente con tampón de detección.

En la Tabla 1 quedan resumidas las composiciones de las diferentes soluciones utilizadas durante todo el proceso.

Por último, queda el proceso de revelado de la membrana. Para ello, se toma la membrana, se deposita en el interior de una funda de plástico, y se elimina el exceso de tampón de detección. El siguiente paso consiste en añadir un volumen suficiente de la dilución de CSPD (dilución 1:100 en tampón de detección), y se incuba en oscuridad durante 5 minutos. Seguidamente, se elimina el exceso de CSPD, para evitar una reacción excesiva, que favorecería la presencia de ruido de fondo. Se ella la funda y se introduce en un cassette, junto con papel fotográfico. Este se incuba a 37 °C en la estufa, para aumentar la cinética de la reacción, durante 20 minutos si se trata de sondas de ADN, y 40 minutos para las de ARN. Finalmente, se revelan en un cuarto oscuro mediante la utilización de revelador, agua y fijador, en este orden.

**Tabla 1.** Composición de las diferentes soluciones utilizadas

<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
TCES	0.2M Tris-HCl 1M pH 8 0,1M EDTA 0,5M pH 8 0.2 M NaCl 0,2 M SDS 10%
F:Cl:IA	50 % fenol saturado 48% cloroformo 2% alcohol isoamílico
Solución de prehibridación	25 % SSC x 20 0,02 % SDS 10% 0,1 % sal sódica N-laryl 10% 2% reactivo bloqueante 50 % formamida
Lavado 1	10 % SSC x 20 1 % SDS 10%
Lavado 2	0,5 % SSC x 20 1 % SDS 10%
Tampón Maleato	100 mM Ácido Maleico 150 mM NaCl pH 7,5
Tampón Maleato-Tween	100 mM Ácido Maleico 150 mM NaCl pH 7,5 0,3 % Tween 20
Solución de reactivo bloqueante 10%	Disolución del reactivo bloqueante en tampón maleato a una concentración 10g/100mL
Tampón de detección	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Incidencia viral tras la hibridación molecular

En la Figura 20 se muestra el análisis de hibridación. Cada membrana tiene fijada todas las muestras y fue analizada con una sonda correspondiente a un virus. Se produjo una fuerte señal de hibridación en los controles positivos, obtenidos a partir de extractos de plantas infectadas por cada virus, mientras que no hubo señal en los controles negativos (plantas no infectadas). Únicamente 85 muestras de las 408 analizadas fueron positivas con al menos uno de los virus analizados; tres muestras fueron positivas para el virus PMoV, otras tres para el virus TSWV y 79 muestras para el virus ToMV. Además, dos de las muestras analizadas en el trabajo mostraron una infección mixta del virus TSWV y ToMV. Puesto que se tomaron 6 muestras de cada planta cada 15 días, en total resultaron infectados 26 plantas de las 72 analizadas, que corresponde a una incidencia del 36 %. Veinticuatro plantas resultaron infectadas con el virus ToMV, dos plantas con el virus TSWV y una planta con el virus PMoV, habiendo una planta con infección mixta de ToMV y TSWV. No se detectaron los virus CMV, PepMV y TYLCV en ninguna de las plantas analizadas.

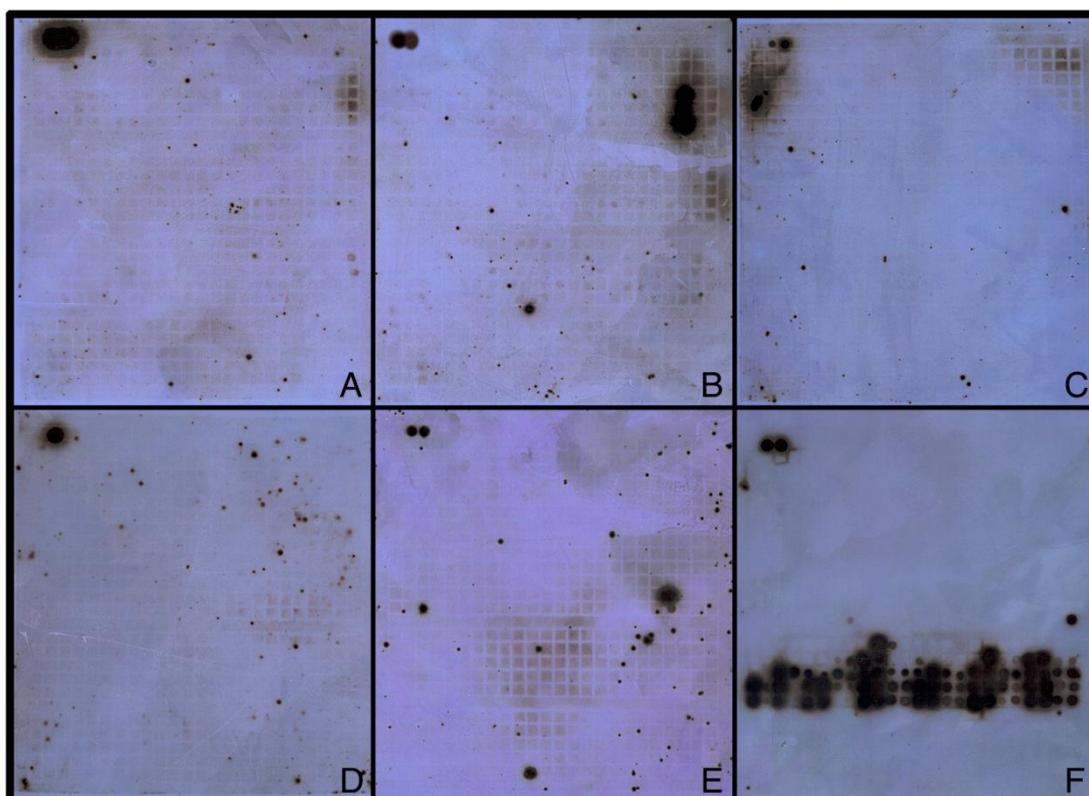
En este trabajo se observó solamente una planta con infección mixta de ToMV y TSWV. Las infecciones mixtas son frecuentes en cultivos de tomate (Panno et al., 2012), aunque en el presente trabajo la baja tasa de infección de los virus analizados ha afectado a la frecuencia de las mismas (solo una planta). En las plantas es frecuente la infección mixta de distintos virus ya que pueden sufrir distintos procesos de inoculación por insectos o mecánicamente. En ocasiones, las infecciones mixtas se ven favorecidas ya que se produce una interacción sinérgica entre los virus, puesto que cada virus “ataca” distintos aspectos de los mecanismos de defensa de la planta. Por ejemplo, pueden interferir en distintas etapas del proceso de silenciamiento génico (Palukaitis, 2011). En tomate se han descrito interacciones sinérgicas entre distintos virus (García-Cano et al., 2006) (Wintermantel et al., 2008)

En todas las plantas en las que en un determinado momento del muestreo se detectó la infección de un virus, éste fue detectado en todos los sucesivos muestreos, lo que indica que la hibridación es una técnica consistente y que el sistema defensivo de las plantas no es suficiente para eliminar el virus una vez que se haya producido la infección.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que en los campos muestreados en desde mayo a agosto del 2015, hubo una incidencia muy baja o inexistente de virus que se transmiten por insectos. El periodo de toma de muestras coincidió con una de las épocas estivales más calurosas en las últimas décadas, siendo el mes de julio el más caluroso de la historia (AEMET, 2015). Estas altas temperaturas podrían haber influido en gran medida en la incidencia viral, por dos razones:

1. Podrían haber servido como un proceso de termoterapia para la planta. Este consiste en mantener las plantas, o más frecuentemente una parte de las mismas, a una temperatura entre 35 °C y 54 °C, dependiendo de la tolerancia fisiológica de éstas, durante un periodo de tiempo determinado. La elección de la temperatura es aquella que represente el mejor compromiso entre la degradación del virus y la supervivencia de la planta, aquella que permita alcanzar un ambiente celular que resulte, progresivamente, menos adecuado para el desarrollo y supervivencia virales (Panattoni et al., 2013).
2. Otro aspecto destacable es cómo afecta la temperatura a la dinámica de población de insectos vectores. El efecto que la temperatura tiene sobre estos es muy variable,

dependiendo de la especie. Se ha observado que determinadas especies de áfidos, como por ejemplo *Aphis gossypii*, el cual afecta a pepino, melón, pimiento, etc. ve aumentada su mortalidad en fases de desarrollo inmaduras y reducidas su fecundidad y longevidad en fase adulta a elevadas temperaturas (Kersting et al., 1999).



**Figura 20.** Resultados de incidencia tras llevar a cabo la hibridación molecular de los seis virus de estudio: A) CMV, B) PMoV, C) TYLCV, D) PepMV, E) TSWV y F) ToMV.

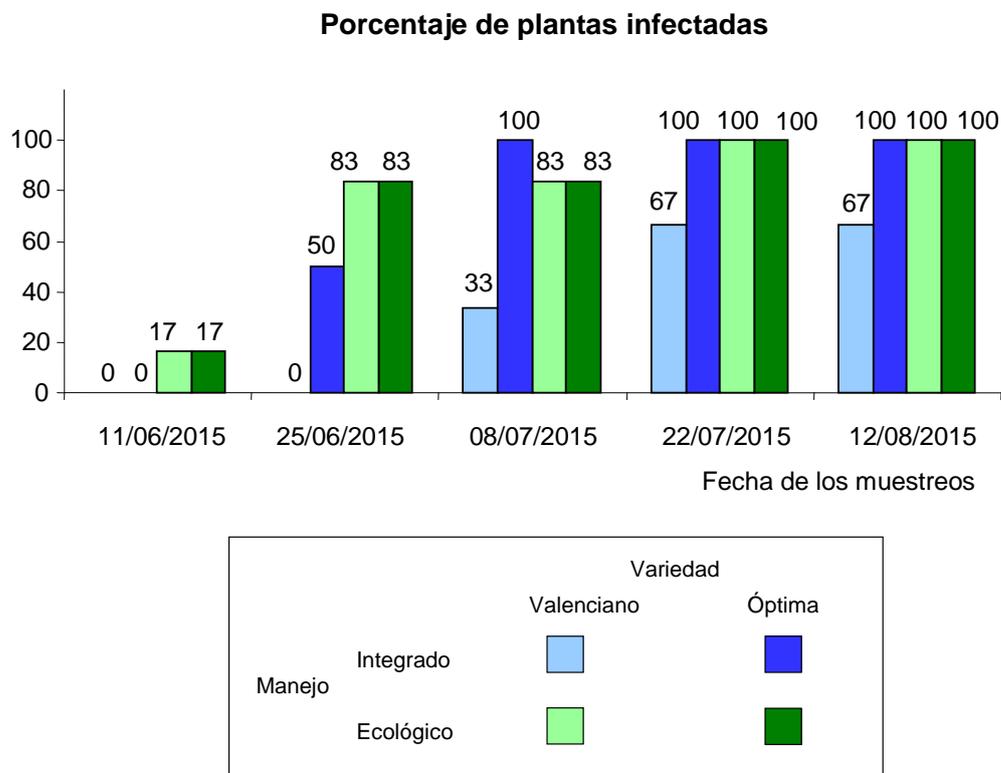
## 4.2. Particularidades de la incidencia viral

### 4.2.1. Ensayo 1: Paiporta

Se han analizado un total de 24 plantas de dos variedades de tomate (Valenciano y Óptima) en condiciones de agricultura integrada y ecológica en Paiporta. Casi todas las plantas analizadas en esta localidad resultaron infectadas por el virus ToMV, siendo una de ellas infectada también por el virus TSWV. Solamente dos plantas estaban libres del virus ToMV al final del muestreo, ambas de la variedad de tomate Valenciano y cultivadas bajo condiciones de cultivo integrado. Al analizar la incidencia de ToMV a lo largo de tiempo mediante un test Chi-cuadrado con la corrección de Yates, se ha observado que ésta fue incrementándose con el tiempo, de manera que en el primer muestreo se detectó ToMV en el 8 % de las plantas, pero dos semanas después la mitad de las plantas estaban infectadas, y dos semanas después  $\frac{3}{4}$  de las plantas tenían el virus, hasta que el 92 % resultaron infectadas en el penúltimo y último muestreo ( $P < 0.05$ ).

Se ha comparado la incidencia del virus ToMV en la parcela con manejo intensivo con la parcela contigua bajo manejo ecológico en los seis muestreos realizados mediante el análisis Chi-cuadrado con la corrección de Yates y no se observaron diferencias significativas en ninguno de los muestreos ( $P > 0.05$ ). Este mismo resultado se obtuvo al

analizar la incidencia del virus en las diferentes variedades de tomate analizadas (Valenciano y Óptima;  $P>0.05$ ).



**Figura 21.** Evolución de la incidencia de ToMV a lo largo del tiempo en la parcela bajo manejo intensivo y ecológico en las variedades de tomate Valenciano y Óptima.

En este trabajo se han evaluado dos variedades de tomate, Valenciano y Óptima. Destacar que la infección de ToMV en las plantas de la variedad Óptima ha sido mayor a la esperada dado que esta descrita (y la casa comercial así la publicita) como variedad que presenta una resistencia para este virus. Para este virus se conocen tres genes de resistencia: *Tm-1*, *Tm-2* y *Tm-2<sup>2</sup>*. El primero produce una ausencia de síntomas asociados a la enfermedad y una limitación de la acumulación viral, siendo más efectivo en homocigosis que en heterocigosis. Los otros dos son alélicos y desencadenan una respuesta hipersensible. Estos genes de resistencia, son incorporados por gran parte de las variedades comerciales de tomate en la actualidad, principalmente el gen *Tm-2<sup>2</sup>*, lo que permite tener controlada la enfermedad que este virus produce (Soler-Aleixandre y Nuez, 2016 ). El tipo de resistencia que proporcionan tanto *Tm-2* como *Tm-2<sup>2</sup>*, conocida como dominante, es activada cuando el hospedante reconoce un determinante viral, que es codificado por el gen *avr*. Esto suele inducir un fenotipo de respuesta hipersensible localizada y una resistencia adquirida sistémica (SAR), que confina el virus en el foco de infección inicial. Esta resistencia tiene dependencia de la temperatura, pudiendo quedar inhibida o muy debilitada si sobrepasa un determinado umbral. La resistencia proporcionada por el gen *Tm-2* presenta esta dependencia a la temperatura (Canto et al., 2009).

Teniendo en cuenta esta información y que los valores de temperatura fueron muy altos durante el periodo de toma de muestras es posible asumir que las plantas de la variedad Óptima hayan podido quedar expuestas a la infección del virus, ya que la defensa que los genes de resistencia al virus le proporcionaban quedó deshabilitada. Por otra

parte, otra posibilidad sería que la infección haya sido producida por un aislado de ToMV capaz de superar la resistencia (Meshi et al., 1988) (Meshi et al., 1989).

A la baja infección de virus transmitidos por insectos (PMoV y TSWV) podría haber contribuido, además de las elevadas temperaturas, el que se empleó *N. tenuis* como control biológico, y también se dispuso un microtúnel de propileno térmico de baja densidad, con el objetivo de proteger físicamente a las plantas recién cultivadas de posibles colonizaciones por parte de vectores virales. No obstante, la baja incidencia general de estos virus hace imposible que se puedan obtener conclusiones a este respecto.

La elevada incidencia de ToMV, que se transmite por contacto, puede haber sido favorecido por el tratamiento con *N. tenuis*, ya que este insecto podría transmitir ToMV de manera inespecífica.

#### 4.2.2. Ensayo 2: Carcaixent

En este ensayo solamente una planta resultó infectada por el virus PoMV que correspondía a la parcela de cultivo ecológico y la variedad de tomate Valenciano. Esta planta resultó infectada en el cuarto muestreo (8 de julio de 2015) y se mantuvo infectada en los sucesivos muestreos (22 de julio y 12 de agosto de 2015). Esto corresponde a una incidencia de tan solo el 4 %. Esta baja incidencia general ha impedido que se pueda comparar la evolución de la infección viral entre cultivo convencional y ecológico.

#### 4.2.3. Ensayo 3: Vinalesa

En este ensayo se infectaron dos plantas con el virus TSWV, una de la variedad tomate Valenciano de la parcela bajo manejo convencional y la otra de la variedad Óptima en la parcela bajo manejo ecológico. El virus se detectó tardíamente, en el quinto y sexto muestreo. También se detectaron dos plantas infectadas con ToMV, ambas de la variedad de tomate Valenciano, una planta estaba en el cultivo convencional y la otra en el ecológico. Este virus también se detectó tardíamente, en el sexto muestreo. La baja incidencia viral total, del 17%, resulta insuficiente para realizar un análisis estadístico y comparar la incidencia en cultivo convencional y ecológico. Tampoco se puede comparar con el ensayo de Carcaixent, en el que se empleó *N. tenuis* como control biológico, por lo que cabría esperar a priori una mayor incidencia viral de aquellos virus transportados por los vectores de los que este mío se alimenta. Aunque hay que tener en cuenta que el efecto geográfico es importante, ya que la epidemiología de un virus puede variar según los cultivos locales, microclima (temperatura y vientos), etc.

ToMV es transmitido mecánicamente por la acción de insectos o por el propio horticultor, en dos plantas de las seleccionadas, una perteneciente al cultivo con manejo convencional y la otra al ecológico. La característica que estas dos plantas comparten entre sí es que se trata de plantas de tomate de la variedad Valenciano. Esta variedad es muy utilizada en agricultura ecológica, ya que se trata de una variedad muy adaptada a las condiciones locales y es resistente a plagas y enfermedades, lo que permite su cultivo sin precisar de la utilización de plaguicidas sintéticos. Esta carece de genes de resistencia para este virus, a diferencia de la otra variedad de tomate cultivada en el ensayo, la variedad Óptima, para la cual no se ha detectado infección por este virus en estas condiciones ambientales.

## 5. CONCLUSIONES

1. La hibridación molecular es una herramienta útil para la detección e identificación de los virus. Funcionó de manera consistente, ya que una vez que se detectaba un virus en una planta se volvía a detectar en los sucesivos muestreos.
2. La incidencia de cinco de los seis virus analizados fue muy baja. No se detectó ninguna planta infectada con CMV, PepMV y TYLCV, y la incidencia de PoMV fue del 1% y la de TSWV del 4%.
3. La incidencia de ToMV en una de las localidades, Paiporta, fue elevada 92%, mientras que las otras dos localidades presentaron una incidencia viral casi inexistente.
4. Los datos obtenidos no permitieron encontrar diferencias en la infección viral entre los distintos tipos de manejo agrícola: convencional, integrado y ecológico; ni entre las dos variedades de tomate utilizadas: Valenciano y Óptima.
5. La infección de la variedad Óptima por ToMV, pese a que contiene resistencia a este virus sugiere que bien se ha producido una desactivación de la resistencia por las temperaturas inusualmente elevadas de esa fecha o bien por la aparición de aislados capaces de superar la resistencia.

## 6. REFERENCIAS

- Aguilar J, Hernandez-Gallardo M, Cenis J, Lacasa A, Aranda M (2002) Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome. *Archives of Virology*, 147, 2009-2015.
- Altieri M (1995) *Agroecology: the science of sustainable agriculture*. Westview Press. Boulder: 145-190.
- Martínez JA, García D, Miquel AB, Callejo S (2013) Características del sector agrario español en el marco de la Unión Europea. *Papeles de trabajo del Instituto de Estudios Fiscales. Serie economía*, 3-39.
- Canto T, Aranda MA, Fereres A (2009) Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Global Change Biology*, 15, 1884-1894.
- De Ponti T, Rijk B, Van Ittersum MK (2012) The crop yield gap between organic and conventional agriculture. *Agricultural Systems*, 108, 1-9.
- Ferriol I, Rangel E, Panno S, Davino S, Han C, Olmos A, Rubio L (2015) Rapid detection and discrimination of fabaviruses by flow-through hybridisation with genus- and species-specific riboprobes. *Annals of Applied Biology*, 167, 26-35.
- Ferriol I, Ruiz-Ruiz S, Rubio L (2011) Detection and absolute quantitation of Broad bean wilt virus 1 (BBWV-1) and BBWV-2 by real time RT-PCR. *Journal of virological methods*, 177, 202-205.
- Galipienso L, Herranz M, Pallás V, Aramburu J (2005) Detection of a tomato strain of Parietaria mottle virus (PMoV-T) by molecular hybridization and RT-PCR in field samples from north-eastern Spain. *Plant Pathology*, 54, 29-35.
- Galipienso L, Martínez C, Willemsen A, Alfaro-Fernández A, Font-San Ambrosio I, Davino S, Rubio L (2015) Genetic variability and evolutionary analysis of Parietaria mottle virus: role of selection and genetic exchange. *Archives of Virology*, 160, 2611-2616.
- Galipienso L, Rubio L, López C, Soler S, Aramburu J (2009) Complete nucleotide sequence of a spanish isolate of Parietaria mottle virus infecting tomato. *Virus genes*, 39, 256-260.
- García-Cano E, Resende RO, Fernández-Munoz R, Moriones E (2006) Synergistic interaction between Tomato chlorosis virus and Tomato spotted wilt virus results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology*, 96, 1263-1269.
- Glick E, Levy Y, Gafni Y (2009) The viral etiology of tomato yellow leaf curl disease-a review. *Plant Protection Science*, 45, 81-97.
- Kersting U, Satar S, Uygun N (1999) Effect of temperature on development rate and fecundity of apterous *Aphis gossypii* glover (Hom., Aphididae) reared on *Gossypium hirsutum* L. *Journal of Applied Entomology*, 123, 23-27.
- Loebenstein G, Lecoq H (2012) *Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin*. Academic Press. Oxford: 31-53.
- Maroto JV (2008) *Elementos de horticultura general*. Mundi-Prensa Libros. Madrid: 15-39.
- Meshi T, Motoyoshi F, Maeda T, Yoshiwoka S, Watanabe H, Okada Y (1989) Mutations in the Tobacco mosaic virus 30-kD protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. *The Plant Cell*, 1, 515-522.

- Meshi T, Motoyoshi F, Adachi A, Watanabe Y, Takamatsu N, Okada Y (1988) Two concomitant base substitutions in the putative replicase genes of tobacco mosaic virus confer the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene, Tm-1. *The EMBO journal*, 7, 1575-1581.
- Pallás V, Más P, Sánchez-Navarro JA (1998) Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. *Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance*, 461-468.
- Palukaitis P (2011) The Road to RNA Silencing is Paved with Plant-Virus Interactions. *Plant Pathology Journal*, 27, 197-206.
- Panattoni A, Luvisi A, Triolo E (2013) Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11, 173-188.
- Panno S, Davino S, Rubio L, Rangel E, Davino M, García-Hernández J, Olmos A (2012) Simultaneous detection of the seven main tomato-infecting RNA viruses by two multiplex reverse transcription polymerase chain reactions. *Journal of virological methods*, 186, 152-156.
- Pretty J, Sutherland WJ, Ashby J, Auburn J, Baulcombe D, Bell M, Bentley J, Bickersteth S, Brown K, Burke J (2010) The top 100 questions of importance to the future of global agriculture. *International journal of agricultural sustainability*, 8, 219-236.
- Aranguren E (2015) Desarrollo de métodos moleculares de detección de virus de RNA de cultivos hortícolas. Tesis Doctoral en Virología. Universidad Politècnica de València.
- Rangel E, Schmidt A, Centeno F (2006) Implementación de la técnica de ELISA para la detección de virus y otros Patógenos en plantas de Venezuela. *Revista Digital del CENIAP (Venezuela)*.
- Rigby D, Cáceres D (2001) Organic farming and the sustainability of agricultural systems. *Agricultural systems*, 68, 21-40.
- Sherwood J, German T, Moyer J, Ullman D (2009) Tomato spotted wilt. *The Plant Health Instructor* DOI: 101094, visto el 20 de junio de 2016  
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/TomatoSpottedWilt.aspx>
- Soler S, Prohens J, López C, Aramburu J, Galipienso L, Nuez F (2010) Viruses Infecting Tomato in València, Spain: Occurrence, Distribution and Effect of Seed Origin. *Journal of Phytopathology*, 158, 797-805.
- Soler-Aleixandre S, Nuez F (2016) Control genético de la tolerancia a los aislados del ToMV que superan la resistencia del gen Tm-2<sup>2</sup> en tomate, visto el 22 de junio de 2016  
<http://www.sech.info/ACTAS/index.php?d=../Acta%20n%C2%BA%2054.%20VI%20Congreso%20Ib%C3%A9rico%20de%20Ciencias%20Hort%C3%ADcolas.%20XII%20Congreso%20Nacional%20de%20Ciencias%20Hort%C3%ADcolas/Comunicaciones/>
- Van Regenmortel MH, Fraenkel-Conrat H (2013) *The Plant Viruses: The Rod-shaped Plant Viruses*. Springer Science & Business Media. Plenum Press. New York: 181-197.
- Wintermantel WM, Cortez AA, Anchieta AG, Gulati-Sakhuja A, Hladky LL (2008) Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. *Phytopathology*, 98, 1340-1345.