

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL



**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BEGOMOVIRUS EN ESPAÑA.
VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE ToLCNDV DE LA
COMUNIDAD VALENCIANA**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Alumna:

Micaela Landeira González

Directora:

María Isabel Font San Ambrosio

Codirectora:

Ana Alfaro Fernandez

CURSO ACADÉMICO 2015-2016

Valencia, 29 de julio de 2016

TÍTULO DEL TFG

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BEGOMOVIRUS EN ESPAÑA. VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE ToLCNDV DE LA COMUNIDAD VALENCIANA.

RESUMEN

El virus del rizado de tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) pertenece al género *Begomovirus*, englobado en la familia *Geminiviridae*. ToLCNDV fue detectado en 2013 en España en cultivos de cucurbitáceas, principalmente en calabacín, y en 2014 en tomate. Hasta entonces, otros begomovirus como el virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) y el virus del rizado amarillo del tomate especie Cerdeña (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, TYLCSV), se detectaban frecuentemente en los cultivos españoles de tomate. La infección de cultivos de cucurbitáceas y tomates por estos virus provoca grandes pérdidas en todo el mundo. Para controlar y tener la posibilidad de reducir los daños causados por estos virus, es importante disponer de técnicas de diagnóstico que permitan detectarlos de manera sensible, rápida y con costes asumibles.

Los objetivos del presente trabajo fueron la comparación de las técnicas de detección mediante PCR e hibridación molecular no radiactiva (NASH), la comparación de métodos de extracción de ácidos nucleicos (el kit comercial EZNA Plant DNA de Omega Biotech y el método de captura con silica) y el estudio de la variabilidad de aislados de ToLCNDV muestreados en la Comunidad Valenciana.

Los resultados reflejaron que la PCR es la técnica que presenta mejores límites de detección, concretamente 100 veces mayores que NASH, siempre que el protocolo de extracción sea el kit comercial EZNA. En el caso de la extracción mediante el método silica, el límite de detección es similar. Por tanto, existe buena correlación entre ellas, detectándose incluso algunas muestras positivas únicamente con NASH por la presencia de inhibidores de la PCR, lo que pone de manifiesto que la hibridación molecular es una buena alternativa para el diagnóstico rutinario de ToLCNDV. Asimismo, se comprobó que el mejor método de extracción del DNA en el análisis por PCR es el kit comercial EZNA, mientras que para aplicar NASH se obtienen mejores resultados con extracción de ácidos nucleicos totales con silica.

Para llevar a cabo la caracterización molecular de aislados virales valencianos de ToLCNDV, se seleccionaron tres aislados de distintos hospedantes, dos de diferentes especies de calabaza (*Cucurbita maxima* y *C. moschata*) y otro de calabacín (*C. pepo*) de diferentes zonas de Alicante. Se realizó la secuenciación del genoma completo de ToLCNDV diseñando cebadores degenerados dirigidos hacia zonas conservadas, realizando la amplificación por círculo rodante combinada con reacciones de PCR que permitiesen la amplificación completa de cada componente del genoma (DNA-A y DNA-B). Una vez determinada la secuencia nucleotídica, se realizó un análisis Blast que reveló una alta identidad nucleotídica de los tres aislados de la Comunidad Valenciana con los aislados de ToLCNDV españoles recopilados de la base de datos del GenBank, y una identidad menor con los aislados indios y paquistaníes. El análisis filogenético de la secuencia nucleotídica del DNA-B agrupa los aislados secuenciados con el resto de aislados españoles, mientras que en el análisis filogenético de la secuencia nucleotídica del DNA-A, el único aislado que se agrupó junto al resto de aislados españoles fue el del procedente de *C. maxima*, los otros dos aislados se agruparon junto a otros procedentes de India y Pakistán. El análisis filogenético de las proteínas codificadas por las diferentes pautas de lectura abierta (ORF), determinó que los tres aislados se agruparan con el resto de aislados españoles, confirmando los resultados del análisis Blast.

PALABRAS CLAVE: DNA, PCR, hibridación molecular NASH, tomate, cucurbitáceas.

ABSTRACT

Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) belongs to the genus *Begomovirus*, in the family *Geminiviridae*. ToLCNDV was detected recently in 2013 in Spain in cucurbits, mainly in zucchini, and in 2014 it was detected in tomatoes. Until then, other begomovirus such as yellow leaf curl virus tomato (Tomato yellow leaf curl virus TYLCV) and yellow leaf curl virus tomato species Sardinia (Tomato yellow leaf curl Sardinia virus, TYLCSV), were frequently detected in Spanish tomato crops. Infection of tomatoes and cucurbits by these viruses produces considerable economic losses worldwide. In order to control and reduce the damage caused by these viruses, it is important to have diagnostic techniques which allow for sensitive, fast and affordable detection.

The objectives of this study were the comparison of detection techniques using PCR and nucleic acid spot hybridization (NASH), the comparison between different methods for extracting nucleic acids (EZNA Plant DNA commercial kit, from Omega Biotech, and silica capture method), and the study of variability of the ToLCNDV isolates of the Valencian Community.

Results showed that the PCR is the technique obtained better detection limits, namely 100 times greater than NASH with the EZNA extraction protocol. In the case of extraction by the silica method, the detection limit is similar. Therefore, there is a good correlation between them, detecting even some positive samples only with NASH due to the presence of PCR inhibitors, which shows that the molecular hybridization is a good alternative for routine diagnosis of ToLCNDV. It was also shown that the best method of extraction of DNA for PCR analysis is the EZNA commercial kit, in contrast to the NASH method, where the best results are obtained with silica capture method.

In order to perform the molecular characterization of valencian virus isolates of ToLCNDV, three isolates from different hosts, two pertaining to different species of pumpkin (*Cucurbita maxima* and *C. moschata*) and one to zucchini (*C. pepo*) from different areas of Alicante were selected. Whole genome sequencing of ToLCNDV was performed by designing degenerate primers directed to conserved areas, and then performing rolling circle amplification combined with PCR reactions, which allowed the complete amplification of each component of the genome (DNA-A and DNA-B). Once the nucleotide sequence was determined, a Blast analysis was carried out, which revealed a high nucleotide identity between the three isolates from the Valencian Community and the ToLCNDV Spanish isolates from the GenBank database, and a lower level of identity to the Indian and Pakistani isolates. A phylogenetic analysis of the nucleotide sequence of DNA-B grouped together the sequenced isolates with the rest of the Spanish isolates, in contrast to the phylogenetic analysis of the nucleotide sequence of DNA-A, where the only isolate that was grouped together with the Spanish isolates was the *C. maxima* isolate, and the other two isolates were grouped together with the Indian and Pakistani isolates. Finally, the phylogenetic analysis of the proteins coded by the different open reading frames (ORF), showed the three isolates are to be grouped with the rest of the Spanish isolates, thus confirming the results of the Blast analysis.

KEYWORDS: DNA, PCR, NASH molecular hybridization, tomato, cucurbits.

ALUMNA: Micaela Landeira González

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, 29 de julio de 2016

DIRECTORA:

Prof. Dña. María Isabel Font San Ambrosio

CODIRECTORA:

Dña. Ana Alfaro Fernandez

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. FAMILIA GEMINIVIRIDAE: TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES	1
1.2. EL GÉNERO BEGOMOVIRUS.....	3
1.3. ESPECIES DE BEGOMOVIRUS QUE AFECTAN AL TOMATE DETECTADAS EN ESPAÑA (TYLCV, TYLCSV Y ToLCNDV)	5
1.3.1 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y FUNCIONAL.....	7
1.3.2 TRANSMISIÓN	9
1.3.3 PROCESO DE INFECCION, REPLICACION Y MOVIMIENTO DE GEMINIVIRUS.....	9
1.3.4 GAMA DE HOSPEDANTES	10
1.3.5 SINTOMATOLOGÍA.....	11
1.3.6 DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN.....	12
1.3.6.1. TÉCNICAS MOLECULARES	12
1.3.6.2. TÉCNICAS SEROLÓGICAS	14
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DETECCIÓN MOLECULAR DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE BEGOMOVIRUS PRESENTES EN CULTIVOS ESPAÑOLES	16
3.1.1. MATERIAL VEGETAL	16
3.1.2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	16
3.1.3. ANÁLISIS MEDIANTE PCR Y RFLPS.....	17
3.1.4. ANÁLISIS MEDIANTE NASH	18
3.2. ESTUDIO DE VARIABILIDAD MOLECULAR DE AISLADOS DE ToLCNDV RECOGIDOS EN LA COMUNIDAD VALENCIANA.....	18
3.2.1. MATERIAL VEGETAL Y EXTRACCIÓN DE DNA.....	18
3.2.2. AMPLIFICACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS Y PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN	21
4.1.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE PCR	21
4.1.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE NASH.....	24
4.1.3. COMPARACIÓN RESULTADOS DE PCR Y NASH	27
4.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE CAMPO.....	28
4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE ToLCNDV.	30
5. CONCLUSIONES	31
6. BIBLIOGRAFÍA	32
7. ANEXOS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de las partículas virales de los miembros de la familia *Geminiviridae*. Imagen de microscopía electrónica (A). Simulación de la partícula geminada del *Maize streak virus*, MSV (B). (Fuente: (a) Zhang *et al.*, 2001. (b) Stanley *et al.*, 2005).

Figura 2. Organización genómica de los diferentes géneros de la familia *Geminiviridae* (Fuente: Varsani *et al.*, 2014).

Figura 3. Diagrama de 57 especies del género *Begomovirus* del “Nuevo Mundo” y del “Viejo Mundo”. Se indica el nombre y número de accesión de todos los aislados. El árbol filogenético se realizó utilizando la secuencia completa del DNA-A. A cada virus le corresponde la situación geográfica marcada con una estrella del mismo color. Se indica si son monopartitos con un punto rojo y si son bipartitos con un punto verde. Los puntos azules indican aquellos virus en los que se ha detectado asociación con betasatélites. La distribución geográfica de las 4 secuencias en blanco corresponde con las estrellas del mismo color situadas en el mapa, localizadas en Indochina, Indonesia, Filipinas y Australia (Fuente: Czosnek, 2007).

Figura 4. Distribución de los virus causantes de la enfermedad del rizado del tomate (TYLCD) a nivel mundial: TYLCV (A) y TYLCSV (B). (Fuente: <https://gd.eppo.int/taxon/TYLCV0/distribution>; <https://gd.eppo.int/taxon/TYLCSV/distribution>).

Figura 5. Distribución de ToLCNDV en el mundo. (Fuente: <https://gd.eppo.int/taxon/TOLCND/distribution>).

Figura 6. Distribución del virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi en España en 2013 (A) y en 2015 (B).

Figura 7. Dibujo representativo del proceso de replicación de geminivirus. (Fuente: Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

Figura 8. Síntomas característicos de TYLCV y TYLCSV en tomates: acucharado de las hojas con folíolos reducidos, clorosis y proliferación de brotes laterales con acortamiento de entrenudos en plantas infectadas (A y B); Frutos infectados con coloración anaranjada y falta de maduración (C).

Figura 9. Síntomas característicos de infección por ToLCNDV en hojas (A) y frutos (B) de calabacín.

Figura 10. Resultados de la detección de ToLCNDV (Muestra 1), TYLCSV (Muestra 2) y TYLCSV (Muestra 3) utilizando los cebadores degenerados para begomovirus AV494/AC1048. NT y M corresponden con el control (no template) y el marcador de pesos moleculares de 100 pb, respectivamente.

Figura 11. Resultados de la detección de ToLCNDV (Muestra 1), TYLCSV (Muestra 2) y TYLCSV (Muestra 3) utilizando los cebadores degenerados para begomovirus PGI/PGII. NT y M corresponden con el control (no template) y el marcador de pesos moleculares de 100 pb, respectivamente.

Figura 12. Resultados de la detección de ToLCNDV (Muestra 1) con los cebadores específicos ToLCNDV up/down, y la detección de TYLCSV (Muestra 2) y TYLCSV (Muestra 3) utilizando los cebadores degenerados TY1/TY2. NT y M corresponden con el control (no template) y el marcador de pesos moleculares de 100 pb, respectivamente.

Figura 13. Detección de ToLCNDV, TYLCV y TYLCSV en tejidos infectados mediante hibridación molecular con sondas específicas (NASH).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros de la familia *Geminiviridae* y sus principales características.

Tabla 2. Localización y funciones de los genes de especies de *Begomovirus* monopartitos.

Tabla 3. Localización y funciones de los genes de especies de *Begomovirus* bipartitos.

Tabla 4. Cebadores utilizados en los ensayos de PCR para detectar ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV.

Tabla 5. Cebadores empleados para la secuenciación del genoma completo de los tres aislados de ToLCNDV.

Tabla 6. Relación de los límites de detección obtenidos mediante las técnicas de detección PCR y NASH.

Tabla 7. Análisis comparativo de detección de ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV en muestras de campo, realizado mediante PCR con cebadores específicos para ToLCNDV, PCR-RFLPs con cebadores degenerados para begomovirus y para TYLCSV y TYLCV, y mediante NASH utilizando la sonda de la replicasa de ToLCNDV y de CP de TYLCSV y TYLCV. Todas las muestras fueron extraídas con el protocolo EZNA. En el caso de NASH también se utilizó el protocolo de tampón citrato.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los factores limitantes más importantes en los sistemas de producción agrícola es la destrucción de cosechas por la acción de virus. En particular, desde los años 90, distintas cepas virales pertenecientes a la familia *Geminiviridae* han sido responsables de daños millonarios por todo el mundo (Picó et. al., 1996; Rybicki y Pietersen, 1999; Harrison y Robinson, 1999).

La inexistencia de tratamientos antivirales efectivos una vez la planta ha sido infectada, motivan la aplicación de técnicas preventivas que sean eficaces y económicas. La aplicación de medidas higiénicas antes y durante el cultivo, la erradicación de las plantas enfermas y la utilización de variedades resistentes (mediante selección artificial o modificación genética) son algunas de las estrategias de control utilizadas en la actualidad. A pesar de ello, en el caso de los geminivirus, su rápida capacidad de adaptación dificulta la producción de cepas resistentes, y el aumento en el comercio internacional, facilita la dispersión de los nuevos virus a escala mundial. Estos dos hechos motivan la necesidad de introducir, junto a las medidas preventivas, medidas rápidas y fiables de detección y diagnóstico de las enfermedades virales (Moffat, 1999).

1.1. FAMILIA GEMINIVIRIDAE: TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

La familia *Geminiviridae* engloba a un grupo de virus fitopatógenos de la clase II según la clasificación de Baltimore. Poseen DNA monocatenario (ssDNA) encapsidado en viriones icosaédricos (18x30nm) unidos por una de sus caras, otorgándole una morfología geminada (King *et al.*, 2011) (Figura 1). Estos organismos son transmitidos por diferentes vectores, entre los que se encuentra la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) e infectan tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (King *et al.*, 2011; Varsani *et al.*, 2014).

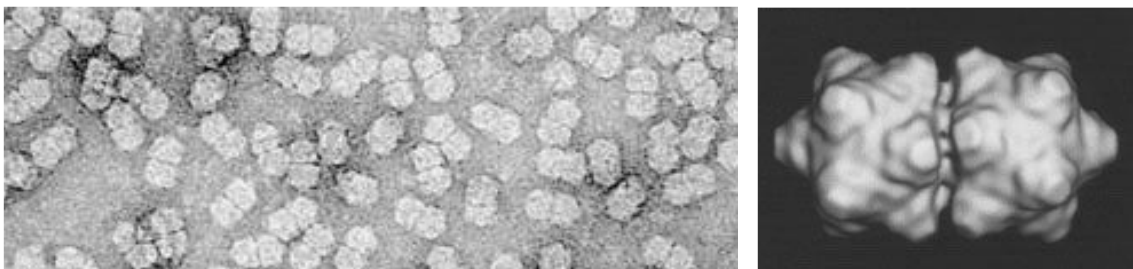


Figura 1. Morfología de las partículas virales de los miembros de la familia *Geminiviridae*. Imagen de microscopía electrónica (A). Simulación de la partícula geminada del *Maize streak virus*, MSV (B). (Fuente: (a) Zhang *et al.*, 2001. (b) Stanley *et al.*, 2005).

Diferencias en la organización genética, el rango de hospedantes y sus vectores son criterios para reconocer los diferentes géneros dentro de la familia *Geminiviridae* (Gutierrez *et al.*, 2004). Además, los avances en las tecnologías de secuenciación y en las herramientas moleculares han facilitado la caracterización molecular de nuevos miembros de esta familia. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, *International Committee on Virus Taxonomy*) aprobó la creación de 3 géneros nuevos (Varsani *et al.*, 2014), y en consecuencia, el número de

miembros de la familia *Geminiviridae* se ha ampliado respecto al informe generado en el 9º congreso del ICTV, y actualmente consta de siete géneros (Tabla 1).

Tabla 1. Géneros de la familia *Geminiviridae* y sus principales características.

Familia <i>Geminiviridae</i>			
Género	Genoma	Transmisión	Hospedantes
<i>Mastrevirus</i>	Monopartito (excepto TYDV y BeYDV)	Cicáduas	Monocotiledóneas
<i>Curtovirus</i>	Monopartito	Cicáduas	Dicotiledóneas
<i>Topocuvirus</i>	Monopartito	Membrácidos	Dicotiledóneas
<i>Begomovirus</i>	Monopartito y bipartito	Mosca blanca	Dicotiledóneas
<i>Becurtovirus</i>	Monopartito	Cicadélidos	Dicotiledóneas
<i>Eragrovirus</i>	Monopartito	Desconocido	Monocotiledóneas
<i>Turncurtovirus</i>	Monopartito	Cicadélidos	Dicotiledóneas

En cuanto a la organización genómica, los géneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus* y *Turncurtovirus* tienen genomas monopartitos que constan de un único segmento llamado DNA-A. En cambio, el género *Begomovirus* está compuesto por virus con genoma monopartito de 2700 a 2800 nucleótidos, y otros con genoma bipartito en los que el genoma se encuentra repartido en dos componentes de tamaño similar de 2500 a 2700 nucleótidos, denominados DNA-A y DNA-B (King, *et al.*, 2011) (Figura 2). Este género es el más grande de la familia y consta actualmente de 288 especies, siendo *Bean golden yellow mosaic virus* (BGMV) el miembro tipo. (King *et al.*, 2011; ICTV, 2016).

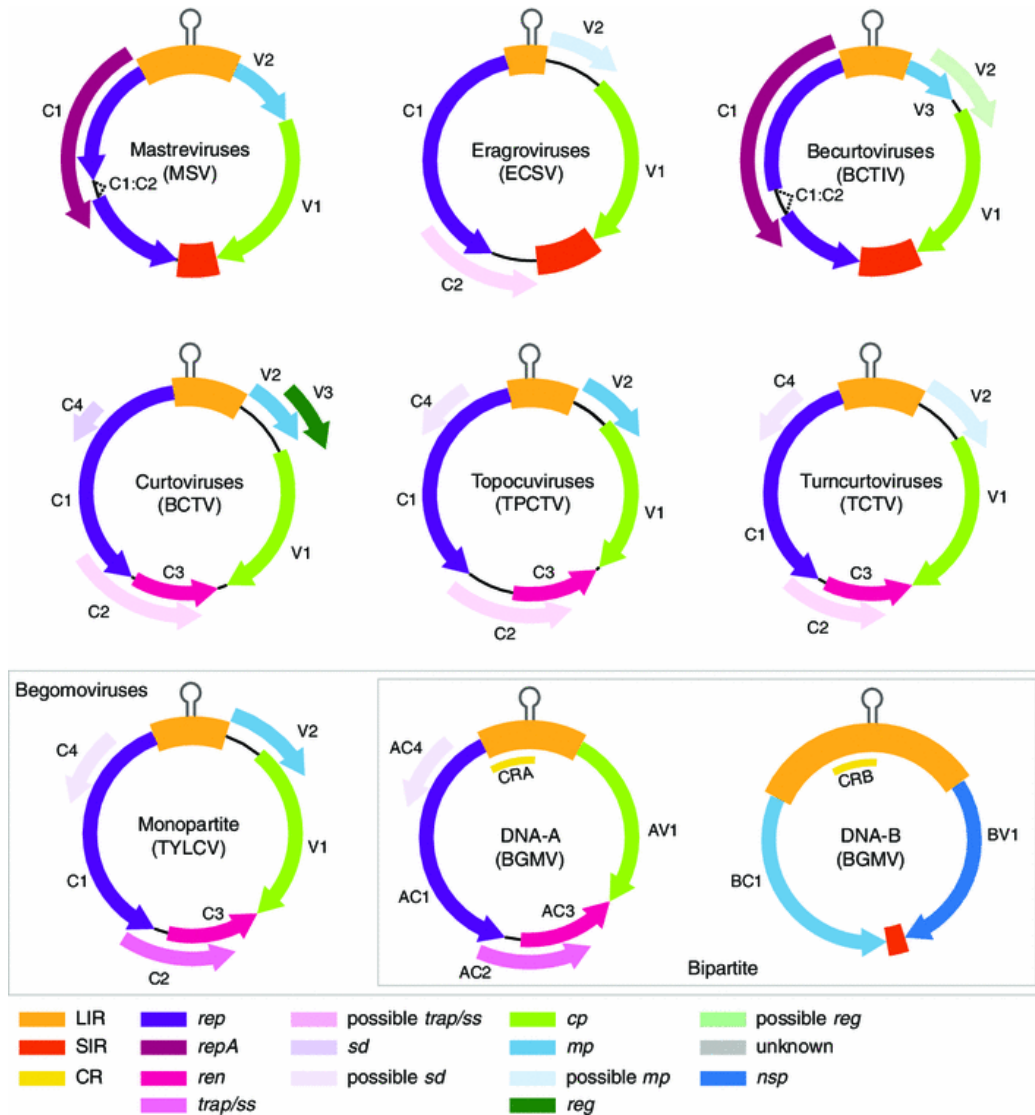


Figura 2. Organización genómica de los diferentes géneros de la familia *Geminiviridae* (Fuente: Varsani *et al.*, 2014).

1.2. EL GÉNERO BEGOMOVIRUS

Los virus pertenecientes al género *Begomovirus* infectan dicotiledóneas, principalmente solanáceas, y son transmitidos de forma natural por la mosca blanca *B. tabaci* de forma persistente y circulativa (Navas-Castillo *et al.*, 2011).

Estudios filogenéticos agrupan al género *Begomovirus* en dos grandes grupos basándose en diferencias en la secuencia que codifica para la proteína de cubierta (CP): *Begomovirus* del “Viejo Mundo” que incluye las especies procedentes del Mediterráneo, África, Oriente Medio, Asia y Australia; y los del “Nuevo Mundo” procedentes del continente americano y el Caribe (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1995) (Figura 3).

Los satélites (alfa y betasatélites) asociados a especies del género begomovirus son moléculas de DNA de cadena simple (ssDNA) circular de aproximadamente 1,3 Kb que dependen del virus “helper” para su replicación, encapsidación y movimiento en la planta, y en algunos casos son necesarios para la inducción de síntomas en el hospedante (Briddon *et al.* 2001; Saunders *et al.* 2004). La mayoría de los begomovirus monopartitos del “Viejo Mundo” están asociados a los betasatélites (Briddon *et al.*, 2001; Briddon y Stanley, 2006).

Los betasatélites codifican para una proteína conocida como β C1, contienen también una región rica en adenina y una secuencia satélite de 150 nucleótidos conservada en todos los betasatélites (Briddon *et al.*, 2002). La proteína β C1 actúa como determinante patogénico (Saunders *et al.*, 2004; Briddon y Stanley, 2006), supresor del silenciamiento de RNA (Gopal *et al.*, 2007) y elevador de los niveles de DNA viral en las plantas (Mansoor *et al.*, 2003; Saunders *et al.*, 2004).

Aunque la mayoría de betasatélites están asociados con begomovirus monopartitos del “Viejo Mundo” como TYLCV y TYLCSV (Kheyr-Pour *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 2009), también se han detectado asociaciones con otros bipartitos, entre los que se encuentra ToLCNDV (Sivalingam *et al.*, 2010; Jyothsna *et al.*, 2013).

Otro grupo de satélites asociados a especies del género *Begomovirus* son los alfasatélites. Éstos codifican para una proteína asociada a la replicación, y son capaces de replicarse autónomamente en las células de las plantas (Saunders y Stanley, 1999), pero necesitan al virus helper para el movimiento, encapsidación y transmisión.

Una diferencia esencial entre alfa y betasatélites es que los alfasatélites no contribuyen al desarrollo de la enfermedad y no se les ha atribuido una función clara (Briddon y Stanley, 2006; Nawaz-ul-Rehman y Fauquet, 2009).

1.3. ESPECIES DE BEGOMOVIRUS QUE AFECTAN AL TOMATE DETECTADAS EN ESPAÑA (TYLCV, TYLCSV Y ToLCNDV)

Hasta el momento, en España se han detectado tres begomovirus que afectan, entre otros hospedantes, a tomate: TYLCV, TYLCSV y ToLCNDV. Desde su introducción, la enfermedad del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) se ha convertido en una enfermedad prevalente y un factor limitante en la producción de tomate en las costas mediterráneas españolas y las Islas Canarias (Jordá *et al.*, 2001). En España se considera que sus agentes causales son mayoritariamente las especies *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV o virus del rizado amarillo del tomate) y *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV o virus del rizado amarillo del tomate especie Cerdeña). Ambas son especies pertenecientes al género *Begomovirus* de tipo monopartito transmitidos por mosca blanca. Actualmente, TYLCV se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, sin embargo, TYLCSV se ha detectado únicamente en diferentes países de la cuenca mediterránea y en las Islas Canarias (Figura 4A; 4B). TYLCSV fue detectado por primera vez en España en 1992, concretamente en Murcia (Moriones *et al.*, 1993); mientras que TYLCV fue detectado en 1997 en Almería (Navas-Castillo *et al.*, 1997). En 1999 fueron detectados ambos en Gran Canaria (Font *et al.*, 2000).

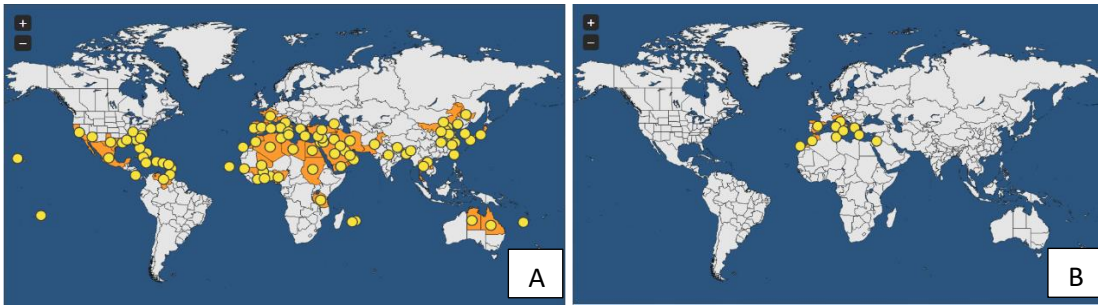


Figura 4. Distribución de los virus causantes de la enfermedad del rizado del tomate (TYLCD) a nivel mundial: TYLCV (A) y TYLCSV (B). (Fuente: <https://gd.eppo.int/taxon/TYLCV0/distribution>; <https://gd.eppo.int/taxon/TYLCSV/distribution>).

Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) o virus del rizado del tomate de Nueva Delhi es una especie del género *Begomovirus* bipartito y transmitido por mosca blanca, descrito por primera vez en India en 1995, como una variante del complejo de virus causantes del rizado amarillo del tomate (TYLCD). Al principio se detectó en solanáceas como tomate, berenjena, pimiento y patata, pero pronto fue detectado en algodón y cucurbitáceas como calabacín, calabaza, melón, pepino y sandía, en la India y otros países asiáticos. Actualmente se encuentra distribuido geográficamente en diferentes países de Asia. En 2015, fue detectado por primera vez en Túnez, causando enfermedad en melones, pepinos y calabacines (Mnari-Hattab *et al.*, 2015) (Figura 5).

En 2012 y 2013 fue detectado por primera vez en España, en cultivos de calabacín y otras cucurbitáceas de las regiones de Murcia y Almería (Figura 6A) (Juárez *et al.*, 2014), pero se ha extendido a otras provincias como Badajoz, Cáceres, Ciudad Real, Granada, Mallorca, Tarragona y Comunidad Valenciana, y no se descarta que esté presente en otros cultivos de cucurbitáceas de la península e islas (Figura 6B). En 2013 también fue detectado por primera vez en tomate en Almería (Ruiz *et al.*, 2015).

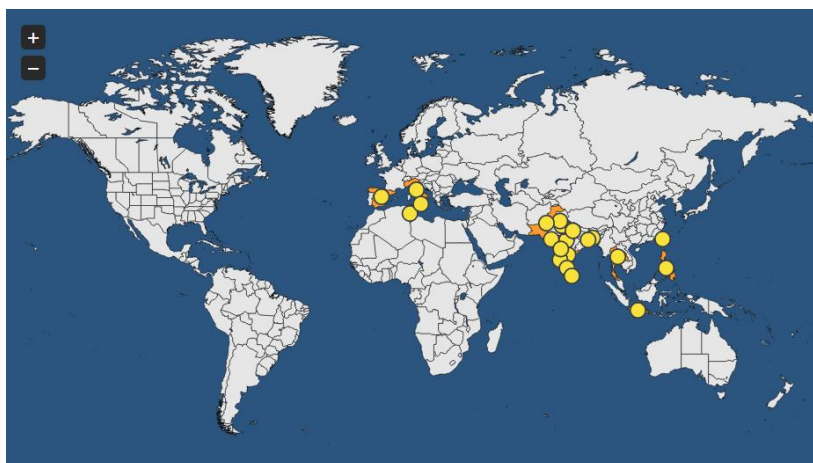


Figura 5. Distribución de ToLCNDV en el mundo. (Fuente: <https://gd.eppo.int/taxon/TOLCND/distribution>).

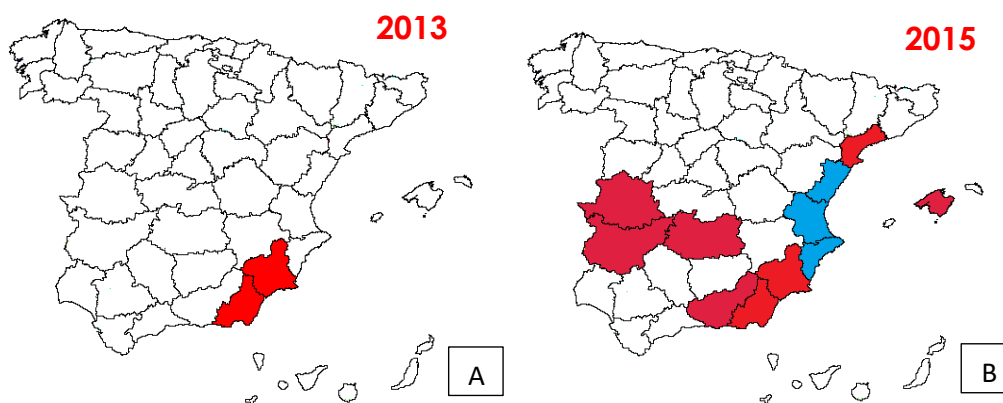


Figura 6. Distribución del virus de la hoja rizada del tomate de Nueva Delhi en España en 2013 (A) y en 2015 (B).

Los aislados de ToLCNDV detectados en España son una variante diferente a la asiática, presentando un 97% de identidad nucleotídica con ésta. Se piensa que la gama de hospedantes puede haberse visto ampliada por la flexibilidad de interacción con los componentes de otros *Begomovirus* y su transmisión por *B. tabaci*. La rápida difusión de este virus y su amplia gama de hospedantes incrementan su peligrosidad (CSIC, 2016).

1.3.1 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y FUNCIONAL

Los begomovirus monopartitos TYLCV y TYLCSV presentan un genoma circular de DNA de cadena simple (ssDNA) de 2700 a 2800 nucleótidos que codifica para 6 proteínas, 2 en sentido viral (V1 y V2) y 4 en sentido complementario (C1, C2, C3 y C4). Los ORFs solapan entre sí y se organizan en forma bidireccional en dos unidades de transcripción separadas por una región intergénica no codificante de aproximadamente 300 nucleótidos (IR) (Picó et al., 1996; Moriones y Navas-Castillo, 2000). V1 codifica para las proteínas de cubierta y solapa con V2, que codifica para una proteína relacionada con el movimiento sistémico. C1, C2, C3 y C4 dan lugar a las proteínas Rep, TrAP, REn y C4, respectivamente. Rep está implicada en la iniciación de la replicación, TrAP en la activación de la transcripción de V1 y V2, REn en la potenciación de la replicación del DNA viral y C4 en el movimiento del virus y la expresión de síntomas (Lazarowitz y Sheperd, 1992). En la tabla 2 se resumen los principales aspectos de la organización genómica y funcional de los *Begomovirus* monopartitos, incluidos TYLCV y TYLCSV.

El genoma de ToLCNDV consta de dos componentes, DNA-A y DNA-B. El DNA-A incluye los genes V1/AV1, C1/AC1, C2/AC2, C3/AC3 y C4/AC4, que codifican para proteínas implicadas en la encapsidación del virus (CP), en la replicación (Rep), en la activación de la transcripción (TrAP), en la potenciación de la replicación (REn) y en la expresión de síntomas y movimiento del virus (C4). El DNA-B contiene los genes BC1 y BV1, ambos involucrados en el movimiento del virus en el hospedante y que actúan de manera cooperativa (Sanderfoot y Lazarowitz, 1996). BC1 codifica para la proteína de movimiento (MP) y controla el movimiento célula-célula. BV1 codifica para la proteína NSP (“nuclear shuttle protein”) y media el transporte de DNA viral entre el núcleo y el citoplasma (Noueiry et al., 1994).

Tabla 2. Localización y funciones de los genes de especies de *Begomovirus* monopartitos.

Región	Proteína	Localización en accesión Z25751.1	Función
IR	-	2620-148	Secuencias de inicio de replicación y transcripción del genoma viral.
V1	CP	309-1082	Encapsidación del DNA viral, movimiento del DNA viral y reconocimiento del vector.
V2	V2	149-496	Expresión de síntomas y movimiento viral.
C1	Rep	2619-1540	Iniciación de la replicación del genoma viral.
C2	TrAP	1631-1224	Activación de la transcripción de V1 y V2.
C3	REn	1483-1079	Potenciación de la replicación del DNA viral.
C4	C4	2462-2172	Expresión de síntomas, movimiento del virus y rango de hospedantes.

Los componentes DNA-A y DNA-B tienen en común una región compartida (CR) incluida dentro de la región intergénica (IR), que además de formar parte del origen de replicación, contiene unos motivos repetidos conservados y una estructura de loop que contiene la secuencia TAATATTAC. A esta secuencia se le une específicamente la proteína asociada a la replicación (Rep), codificada por el DNA-A, para iniciar la replicación del DNA-B mediante círculo rodante (Mansoor *et al.*, 2003). En la tabla 3 se resumen los principales aspectos de la organización genómica y funcional de los begomovirus bipartitos, incluido ToLCNDV.

Tabla 3. Localización y funciones de los genes de especies de *Begomovirus* bipartitos.

Región	Proteína	Localización en accesión KF891467.1	Función
IR - CR	-	-	Secuencias de inicio de replicación y transcripción del genoma viral.
AV1	CP	279-1049	Encapsidación del DNA viral, movimiento del DNA viral y reconocimiento del vector.
AV2	Pre-CP	119-457	Expresión de síntomas y movimiento viral
AC1	Rep	1498-2583	Iniciación de la replicación del genoma viral.
AC2	TrAP	1191-1595	Activación de la transcripción de V1 y V2
AC3	REn	1046-1456	Potenciación de la replicación del DNA viral.
AC4	C4	2250-2426	Expresión de síntomas, movimiento del virus y rango de hospedantes.
BV1	NSP	430-1236	Transporte del DNA viral del núcleo al citoplasma.
BC1	MP	1290-2135	Expresión de síntomas y transporte de DNA viral a través de los plasmodesmos.

1.3.2 TRANSMISIÓN

La transmisión de los tres begomovirus descritos anteriormente ocurre en la naturaleza a través del vector *B. tabaci* de manera persistente y circulativa (Navas-Castillo *et al.*, 2011), es decir, cuando *B. tabaci* se alimenta de plantas enfermas, puede adquirir el virus de una planta infectada, de manera que éste avanza a través del aparato digestivo del artrópodo y cuando alcanza el intestino, penetra en sus tejidos. Tras un periodo de la latencia, se da una circulación efectiva del virus hasta acumularse en grandes cantidades en las glándulas salivales y el conducto salival. *B. tabaci* emplea su estilete para alimentarse del floema de otra planta, con el cual atraviesa las células de la epidermis y el parénquima, inyectando los viriones directamente en el tejido vascular (Czosnek, 2007). TYLCV se puede transmitir también por injerto, agroinoculación y transmisión mecánica (Picó *et al.*, 1996; Picó *et al.*, 2001). También se ha comprobado la transmisión mecánica artificial de ToLCNDV en *Nicotiana benthamiana* Domin, patata y algunas cucurbitáceas (Usharani *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2010).

El vector de estos begomovirus, *B. tabaci*, es un insecto de la familia *Aleyrodidae* del orden Hemiptera, que se caracteriza por alimentarse de las hojas de las plantas, generalmente del envés. Fue descrita por primera vez en el año 1889 en Grecia, sobre plantas de tabaco. Hasta la década de los 80, *B. tabaci* era conocida como una plaga de cultivos en zonas tropicales y subtropicales, pero con la propagación del Biotipo B (Bedford *et al.*, 1994), altamente polífago, se ha convertido en una plaga en cultivos de todo el mundo y se estima que tiene una gama de hospedantes de alrededor de 600 especies, entre las que destacan numerosas plantas hortícolas y otras especies silvestres (Sattar, 2012).

1.3.3 PROCESO DE INFECCION, REPLICACION Y MOVIMIENTO DE GEMINIVIRUS

El proceso de infección y replicación de los geminivirus, entre ellos también los begomovirus, comienza con la inoculación de las partículas virales en el citoplasma. Una vez dentro, mediante un mecanismo de momento desconocido, el virión se desensambla y el genoma viral es transportado al núcleo celular. Para introducir el material genético viral en el núcleo no es necesaria la ruptura de la envoltura nuclear como la que tiene lugar en la mitosis, por lo que pueden infectar células que no están en división (Nagar *et al.*, 1995). Una vez alcanzado el núcleo, el virus se replica realizando una conversión de ssDNA a dsDNA. En una segunda fase, a partir del dsDNA se produce la síntesis de factores virales (Rep y REn) y factores celulares propios de la planta que intervienen en la síntesis de nuevo ssDNA a partir del dsDNA. Posteriormente, Rep reprime su propia transcripción, posibilitando la expresión de la proteína TrAP, que a su vez activa a la proteína CP y a la NSP.

El nuevo ssDNA puede entrar de nuevo al ciclo de replicación o ser encapsidado en partículas virales por la proteína de cubierta (CP), estando ya disponibles para ser adquiridas por *B. tabaci*. Por otra vía, el DNA viral es transportado por la proteína NSP fuera de la envoltura nuclear, y por la proteína de movimiento (MP) a través de los plasmodesmos (Figura 7) (Rojas *et al.*, 2001; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

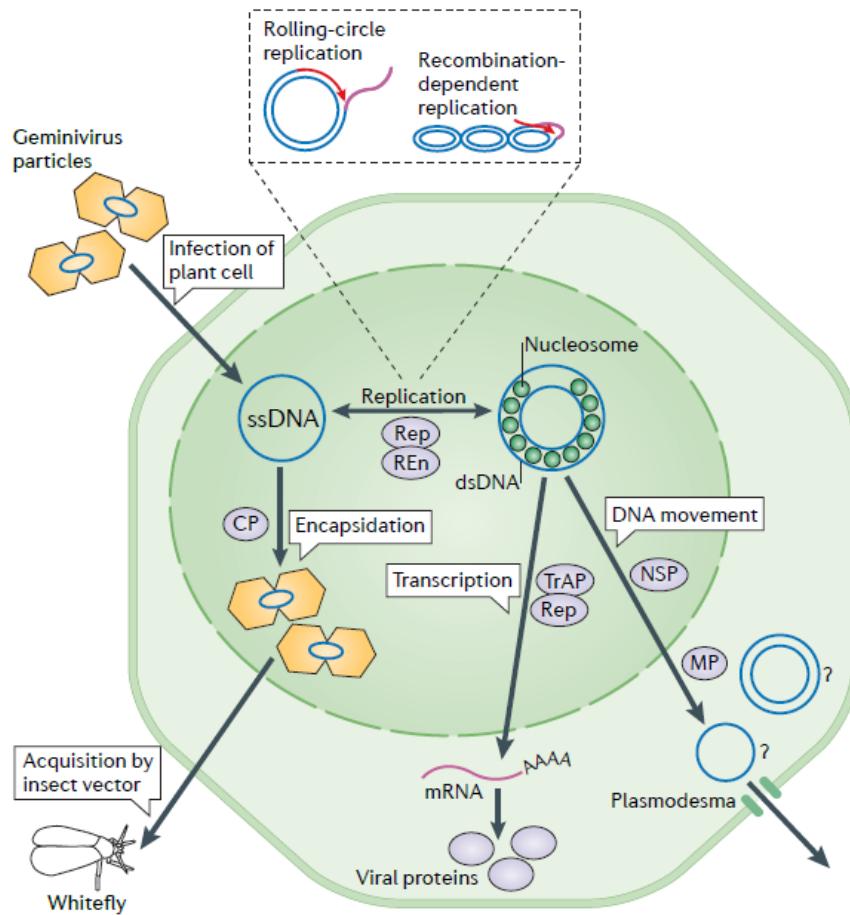


Figura 7. Dibujo representativo del proceso de replicación de geminivirus. (Fuente: Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

1.3.4 GAMA DE HOSPEDANTES

La gama de hospedantes varía entre especies de virus e incluso entre aislados de la misma especie. En el caso de TYLCV, se han descrito diversas especies botánicas pertenecientes a 5 familias diferentes como hospedantes de este virus. Entre ellas están: *Acalypha australis* L. (acalifa sureña), *Capsicum annuum* L. (pimiento), *Capsicum frutescens* L. (chile), *Citrullus lanatus* var. *lanatus* (sandía), *Datura stramonium* L. (estramonio), *Eustoma grandiflorum* f. *grandiflorum* (Lisianthus), *Nicotiana tabacum* L. (tabaco), *Phaseolus vulgaris* L. (judía), *Physalis philadelphica* Lam. (tomatillo), *Solanum elaeagnifolium* Cav. (tomatito amarillo), *Solanum lycopersicum* L. (tomate), *Vigna* sp., *Viola prionantha* var. *prionantha* (violeta) (EPPO Global Database, 2016).

ToLCNDV se detectó en primer lugar en *S. lycopersicum* (tomate), y después en otras solanáceas como *Solanum melongena* L. (berenjena), *Capsicum* spp. (chile) y *Solanum tuberosum* L. (patata). ToLCNDV se ha detectado también en cucurbitáceas: *Benincasa hispida* (Thumb.) Cogn. var. *hispida* (calabaza blanca), *C. lanatus* (sandía), *Cucumis melo* L. (melón), *Cucumis melo* var. *flexuosus* (alficoz), *Cucumis sativus* L. (pepino), *Cucurbita moschata* Duchesne (calabaza), *Cucurbita maxima* Duchesne (calabaza), *Cucurbita pepo* L. (calabacín), *Cucurbita pepo* var. *giromontiina* (calabacín), *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.

(calabaza de peregrino), *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem. (estropajo), *Momordica charantia* L. (melón amargo) (EPPO Global Database, 2016). En España, se ha detectado en cultivos de melón (*C. melo*, *C. melo* var. *flexuosus*), calabacín (*C. pepo*), calabaza (*C. moschata* y *C. maxima*), pepino (*C. sativus*) y tomate (*S. lycopersicum*) (Font y Alfaro-Fernández, 2015).

1.3.5 SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas pueden variar dependiendo de factores como las condiciones ambientales, especie y variedad del hospedante, aislado del virus y la precocidad e intensidad de la infección.

Entre los síntomas más comunes causados por TYLCV y TYLCSV en tomate (Figura 8) se encuentra el enrollamiento de los folíolos hacia el haz a lo largo del nervio principal en la forma de cuchara, que es el síntoma más característico (Figura 8A); clorosis en los bordes, y en ocasiones, matices violáceos en el envés. Los folíolos nuevos ven reducido su tamaño y presentan deformaciones como engrosamiento y fruncimiento del haz. La planta detiene su crecimiento, reduciendo la distancia entre sus nudos y la proliferación de brotes laterales (Figura 8B). Además, la producción se ve reducida al producirse una caída de flores importante y una reducción del cuajado. Los frutos cuajados no suelen alcanzar el calibre comercial, presentan un color rojo anaranjado y no maduran adecuadamente (Figura 8C) (Picó et al., 1998).



Figura 8. Síntomas característicos de TYLCV y TYLCSV en tomates: acucharado de las hojas con folíolos reducidos, clorosis y proliferación de brotes laterales con acortamiento de entrenudos en plantas infectadas (A y B); Frutos infectados con coloración anaranjada y falta de maduración (C).

Los síntomas causados por ToLCNDV en varias especies de cucurbitáceas como pepino, calabaza, melón y alficóz incluyen un fuerte mosaico amarillo, rizado de las hojas debido al fruncimiento de sus nervios y una parada del desarrollo, dándole un aspecto achaparrado.

Entre los síntomas más característicos en calabacines (Figura 9) se encuentra la parada del desarrollo, que le da un aspecto de arbusto. Las hojas viejas amarillean, mientras que las jóvenes se enrollan hacia el envés a lo largo del nervio principal, presentando además clorosis en los bordes, reducción de tamaño y deformaciones de las nuevas hojas apareciendo con el haz fruncido (Figura 9A). Los frutos salen deformados y con la piel rugosa (Figura 9B). Si la infección es temprana, la planta queda completamente arrechada y no llega a producir frutos. Si la planta tiene además una infección mixta con otro virus como, por ejemplo, *Cucurbit aphid-borne virus* (CABYV), los síntomas descritos son aún más severos (Font y Alfaro-Fernández, 2015).

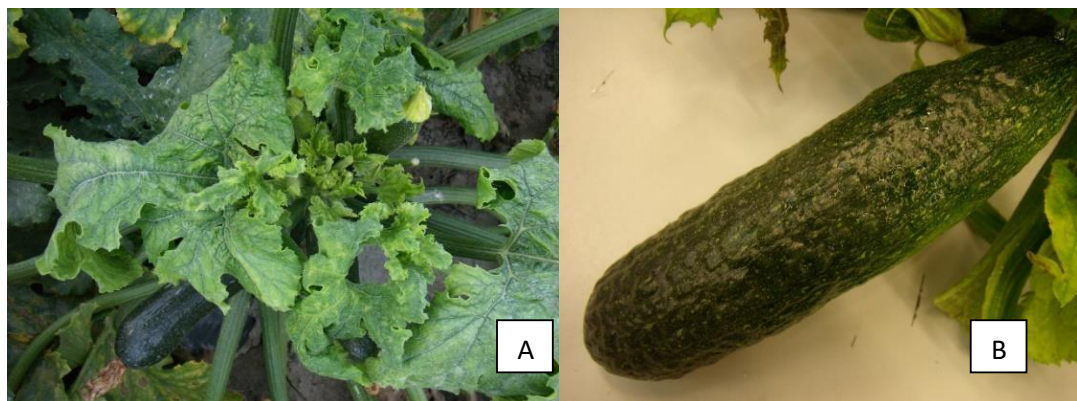


Figura 9. Síntomas característicos de infección por ToLCNDV en hojas (A) y frutos (B) de calabacín.

1.3.6 DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

1.3.6.1. TÉCNICAS MOLECULARES

- **PCR CONVENCIONAL**

La reacción en cadena de la polimerasa o “polymerase chain reaction” (PCR), es una técnica de amplificación *in vitro* de fragmentos de ácidos nucleicos a partir de una secuencia de DNA o RNA. El proceso consiste en ciclos sucesivos de desnaturalización térmica del DNA, anillado de los cebadores a las secuencias complementarias y extensión de los cebadores anillados mediante una DNA polimerasa termoestable, de manera que tras cada ciclo el número de fragmentos se ve duplicado (Mullis *et al.*, 1987).

La alta sensibilidad de esta técnica la convierte en una buena herramienta de diagnóstico de patógenos. Además, la posibilidad de amplificar parte del genoma viral de manera sencilla, permite abordar estudios de variabilidad mediante la secuenciación de los fragmentos obtenidos o análisis con enzimas de restricción.

Sin embargo, la alta sensibilidad de esta técnica junto con el requerimiento de cebadores específicos y/o el carácter enzimático de la técnica de PCR, son factores que pueden alterar el resultado del análisis debido a la presencia de contaminaciones, anillamientos inespecíficos o la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación. En este sentido, el análisis de muestras vegetales mediante PCR implica un procesamiento riguroso del tejido para evitar posibles contaminaciones durante su manipulación así como la utilización de material estéril y desechable (LLácer *et al.*, 1996).

La PCR permite la detección de begomovirus de manera rápida, sensible y precisa con una preparación mínima de las muestras. Todas las especies del género *Begomovirus* comparten regiones de alta homología en sus genomas. Por tanto, para la detección de estos organismos está generalizado el uso de cebadores degenerados (mezclas de cebadores similares con cambios de bases en una o más posiciones) complementarios a zonas altamente conservadas del genoma, que permiten la detección de las distintas especies virales de este género contenidas en una muestra (Rojas *et al.*, 1993; Briddon y Markham, 1994; Deng *et al.*, 1994; Wyatt y Brown, 1996).

El diagnóstico de begomovirus mediante la técnica de PCR con oligos degenerados y el posterior análisis de los fragmentos obtenidos al digerir los amplicones con diferentes enzimas de restricción o RFLPs (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) permite identificar la especie viral presente en la muestra (Accotto *et al.*, 2000). La técnica de RFLPs se utiliza para identificar grupos de virus basándose en diferencias de secuencia que afectan a los diferentes dianas utilizadas por las enzimas de restricción (Czosnek, 2007). Durante el análisis, los amplicones son digeridos con enzimas que reconocen secuencias de 4 a 8 pares de bases de la molécula de DNA, generando diferentes fragmentos que se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% o geles de poliacrilamida (PAGE) (Walker y Rapley, 2009).

- **PCR A TIEMPO REAL**

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) ofrece mayor sensibilidad que la PCR convencional, hibridación molecular y las técnicas serológicas, permitiendo además cuantificar la carga viral presente en la muestra (Hu *et al.*, 1995; Schaad y Frederick, 2002).

Para la cuantificación en la qPCR se requiere la presencia de al menos un fluorocromo en la mezcla de reacción, el uso de una polimerasa termoestable que sólo inicie la polimerización cuando comience la reacción (polimerasas de tipo “Hot-Start”) y que la reacción se lleve a cabo en un termociclador que incorpore en su estructura un lector de fluorescencia. El fluorocromo puede estar libre y unirse inespecíficamente a la doble cadena de DNA formada como el SYBR® Green, o puede estar unido a una sonda que hibrida en el fragmento entre los 2 cebadores (sondas tipo TaqMan). En detección y diagnóstico de virus fitopatógenos es más habitual el empleo de sondas TaqMan por su mayor especificidad. Cuando se utiliza la tecnología TaqMan para cuantificar los ácidos nucleicos se mide la intensidad de fluorescencia durante la fase amplificación del DNA. La fluorescencia se genera por la escisión de una sonda TaqMan por la actividad 5' exonucleasa de la Taq DNA polimerasa (Higuchi *et al.*, 1992, 1993). La fluorescencia medida puede relacionarse directamente, en reacciones paralelas, con la cantidad de DNA mediante el análisis de muestras que contienen cantidades conocidas de DNA de referencia. Además de la sensibilidad, la PCR a tiempo real tiene la ventaja de que no se requiere un procesamiento posterior para detectar los productos de reacción, evitando así una posible contaminación con éstos (Schaad y Frederick, 2002).

- **AMPLIFICACIÓN MEDIANTE CÍRCULO RODANTE (RCA)**

La amplificación por círculo rodante (“Rolling circle amplification”, RCA) es un proceso enzimático en el cual una secuencia nucleotídica corta de DNA o RNA es amplificada para formar concatámeros con decenas o centenares de repeticiones en tándem complementarias al molde circular. La reacción se lleva a cabo usando un molde circular y la polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (Blanco *et al.*, 1989).

Es una técnica que ha demostrado ser eficiente en la caracterización de los componentes de DNA de especies de *Begomovirus*. Presenta ventajas respecto a otras técnicas como la PCR o ELISA porque no es necesario tener información de la secuencia, así como por el bajo coste por reacción, la facilidad de manejo o la posibilidad de caracterizar el DNA amplificado mediante RFLPs o su secuenciación, tras clonar y purificar el plásmido correspondiente. Esta técnica puede

ser utilizada para begomovirus tanto como método de diagnóstico como para la caracterización molecular de genomas completos (Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Haible *et al.*, 2006).

- **TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN MOLECULAR**

Estas técnicas se basan en el fenómeno de apareamiento entre cadenas complementarias de ácidos nucleicos (Maule *et al.*, 1983). Se utilizan sondas o fragmentos de DNA o RNA sintetizadas *in vitro* y marcadas para su posterior detección e identificación. Es una técnica de alta sensibilidad, sencilla y de bajo coste, especialmente útil cuando se requiere el diagnóstico y detección de un virus en un gran número de muestras. La capacidad de detección depende tanto del diseño de la sonda como de las condiciones más o menos restrictivas de la hibridación. Es posible diferenciar entre especies de virus, diseñando sondas sobre zonas altamente variables del genoma y bajo unas condiciones de hibridación muy restrictivas.

En concreto, la hibridación molecular NASH (“Nucleic acid spot hybridization”) consiste en la hibridación de DNA procedente de un extracto crudo de tejido vegetal con sondas marcadas con moléculas radiactivas o fluorescentes sobre una membrana de nylon. Es un método de detección muy sensible ampliamente utilizado para la detección de especies de la familia *Geminiviridae* (Kheyr-Pour *et al.*, 1991; Accotto *et al.*, 2000).

- 1.3.6.2. **TÉCNICAS SEROLÓGICAS**

Se basan en la detección serológica de la proteína de la cápside u otras proteínas codificadas por el virus. Su fundamento es la respuesta inmunológica que se produce como defensa de los organismos a la presencia de moléculas de alto peso molecular. Cuando una proteína viral 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 (Voller y col. 1976; Clark y Adams, 1977).

- **ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (“ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY”, ELISA)**

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 al leer su absorbancia en un espectrómetro debido al cambio de color. Consta de cuatro fases: en la primera se da la conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima; en la segunda, la unión del antígeno o del anticuerpo a los pocillos; en la tercera, la formación de una o más capas de inmunocomplejos; y en la cuarta se hace el revelado de la reacción enzimática con un sustrato mediante espectrofotometría (LLácer *et al.*, 1996). Esta técnica permite detectar virus en un gran número de muestras, de forma sencilla, sensible, económica y en poco tiempo.

Las técnicas serológicas no han tenido mucho éxito para la detección de begomovirus debido a dificultades en la obtención de los sueros por la dificultad en la purificación del virus y la baja inmunogenicidad de los mismos. Actualmente existen reactivos comerciales para detectar TYLCV, TYLCSV y ToLCNDV (Dalmon *et al.*, 2000; Crescenzi *et al.*, 2003; Yazdani-Khameneh *et al.*, 2013).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los virus pertenecientes al género *Begomovirus* infectan diferentes especies de dicotiledóneas causando una gran variedad de enfermedades en los cultivos de las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Hasta 2013 las únicas especies virales de este género detectadas en España eran TYLCSV y TYLCV, de genoma monopartito, causantes de la enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD), generando importantes pérdidas económicas en dicho cultivo. La detección de ToLCNDV en 2013 en cultivos de calabacín y en tomate en 2014 constituye la primera cita de un begomovirus con genoma bipartito en España y Europa (Juárez *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2015).

ToLCNDV tiene una gama de hospedadores muy amplia, incluyendo cultivos de gran importancia económica en Europa como el tomate, el pimiento, la berenjena, la patata y diferentes especies de cucurbitáceas. Es un patógeno que afecta severamente a la producción en diferentes regiones de la India, pero en Europa y en particular en España se trata de un virus emergente, por lo que la información y estudios realizados para los aislados españoles son escasos pero necesarios para implementar las medidas de control adecuadas. ToLCNDV presenta variabilidad genética entre aislados de diferentes regiones y afecta a diferentes cultivos dependiendo de la región. Hasta la fecha, aunque en España también se ha detectado en tomate, aparentemente causa mayores problemas tanto por su dispersión como por la gravedad de los síntomas en cucurbitáceas, sobre todo en calabacín y pepino (Font y Alfaro-Fernández, 2015). Las medidas de control son limitadas y son necesarios más estudios para obtener información de tipo biológico y epidemiológico que permitan diseñar estrategias de control eficaces contra la dispersión del virus. La reciente aparición de ToLCNDV en España y Túnez ha activado las alarmas de la Unión Europea, y como consecuencia, la EPPO decidió incluirlo en su Lista de Alerta “EPPO Alert List” en Junio de 2015 con el propósito de lograr una alerta temprana en otros países miembros (EPPO, 2016).

Por todo ello, los objetivos del presente trabajo son:

- Evaluación y comparación de diferentes técnicas de diagnóstico moleculares para disponer de una herramienta fiable, específica, sensible y rápida para la detección de los virus del género *Begomovirus* detectados hasta el momento en España.
- Estudio de la variabilidad genética de ToLCNDV de aislados recogidos en la Comunidad Valenciana comparándolos con otros aislados españoles y del resto del mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DETECCIÓN MOLECULAR DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE BEGOMOVIRUS PRESENTES EN CULTIVOS ESPAÑOLES

En este trabajo se compararon dos técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación molecular no radiativa (NASH, “Nucleic acid spot hybridization”) con sondas específicas de las tres especies objeto de estudio (ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV). En el caso de la PCR, se probaron cuatro parejas de cebadores diferentes: tres parejas de cebadores degenerados para la detección de diferentes especies del género *Begomovirus*, con un posterior análisis de restricción mediante RFLPs para identificar la especie concreta presente en cada muestra; y una cuarta pareja de cebadores específicos para la detección de ToLCNDV. Además se evaluaron dos protocolos de extracción de ácidos nucleicos.

3.1.1. MATERIAL VEGETAL

Para la comparación entre diferentes técnicas moleculares de diagnóstico, se seleccionaron 3 aislados virales de las tres especies de begomovirus presentes en los cultivos españoles: ToLCNDV procedente de calabacín (muestra número 1), TYLCSV de tomate (muestra número 2) y TYLCV de tomate (muestra número 3) recogidos en Murcia, Granada y Almería en 2013, respectivamente.

En el análisis de muestras de campo, realizado para validar las técnicas moleculares comparadas en este estudio, se emplearon 41 muestras con síntomas de TYLCD y/o ToLCNDV recogidas a lo largo del año 2013 y parte del 2014 en zonas donde se había detectado síntomas de TYLCSV, TYLCV y/o ToLCNDV en las provincias de Almería, Cantabria, Granada, Murcia y Valencia. Los cultivos analizados fueron de tomate y diferentes cucurbitáceas (calabacín, melón, sandía, pepino y calabaza).

La toma de muestras vegetales para este estudio se realizó separando fragmentos de tejido vascular de plantas sintomáticas, que se almacenaron a 4 °C hasta su procesado (menos de 7 días).

3.1.2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos de los tres aislados de ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV utilizados en el estudio comparativo (muestras 1, 2 y 3) de técnicas de diagnóstico, se extrajeron mediante dos protocolos diferentes a partir de 0,1 g de tejido vascular, el protocolo de extracción de ácidos nucleicos totales mediante el método de captura con sílica (MacKenzie *et al.*, 1997) (Anexo 1) y el protocolo de extracción de DNA mediante el kit comercial E.Z.N.A Plant DNA (OMEGA Biotech, Doraville, USA) (Anexo 2). Los extractos fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis por las técnicas moleculares ensayadas.

En el análisis de las 41 muestras de campo se empleó el protocolo EZNA para la extracción del DNA de las muestras ensayadas y posteriormente fue almacenado a -20 °C hasta su empleo.

3.1.3. ANÁLISIS MEDIANTE PCR Y RFLPS

Para la detección de las especies de begomovirus ensayadas (ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV) se emplearon la DNA polimerasa (Biotools DNA Polymerase, B&M Labs S.A. Madrid, España) con cada una de las cuatro parejas de cebadores diferentes (Tabla 4) en un volumen final de 20 µl por reacción. Las parejas de cebadores AV494/AC1048 (Wyatt y Brown, 1996) y PGI/PGII (Font, 2003) son cebadores degenerados que amplifican un fragmento de 578 pares de bases (pb) de la proteína de la cápside (CP) de diferentes especies del género *Begomovirus*. La identificación de diferentes especies se realiza mediante un paso adicional de digestión con el enzima de restricción *Eco471* (*Avall*) de Thermo Scientific (Spain). TY1/TY2 fueron diseñados para detectar TYLCSV y TYLCV, amplificando un fragmento de la CP de 578 pb y, al igual que los anteriores, para identificar la especie concreta presente en la muestra, los productos obtenidos deben digerirse con el enzima de restricción *Eco471* (*Avall*) (Accotto *et al.*, 2000). La pareja de cebadores ToLCNDV up/down permite la detección específica de ToLCNDV, amplificando un fragmento de la CP de 914 pb en calabacín, melón, calabaza y pepino (Gawande *et al.*, 2007).

Las condiciones establecidas en el programa de PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C y 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C de desnaturalización, 1 minuto con temperatura de anillamiento apropiada para cada primer específico (Tabla 4) y 1 minuto a 72 °C de elongación, seguidos de una incubación final de 10 minutos a 72 °C para completar los fragmentos incompletos. Para la detección de ToLCNDV, las temperaturas de anillamiento y elongación se mantuvieron durante 2 y 3 minutos, respectivamente.

Tabla 4. Cebadores utilizados en los ensayos de PCR para detectar ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV.

Nombre del cebador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Especies virales diana	Fragmento esperado (bp)	Nº de acceso del GenBank y localización en el genoma	Temperatura de anillamiento (°C)	Referencia
AV494	GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG	Especies de Begomovirus	578 (CP)	AF068644 494-1048	60	Wyatt y Brown, 1996
AC1048	GGRTTDGARGCATGHGTACATG					
PGI	GCCYATGWAYMGRAAGCC	Especies de Begomovirus	578 (CP)	X61153 447-1022	48	Font, 2003.
PGII	GTTWGAVGCATGHGTRCAWGCCAT					
ToLCNDV-up	GAACATGGTGAAGCGACCAGCAGA	ToLCNDV	914 (CP)	KP640677 275-1190	52	Gawande <i>et al.</i> , 2007
ToLCNDV-do	ACACAGGTCCTTAGGTACCTG					
TY-1	GCCCATGTAYCGRAAGCC	TYLCV, TYLCSV	578 (CP)	X61153 447-1024	55	Accotto <i>et al.</i> , 2000
TY-2	GGRTTAGARGCATGMGTAC					

Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1,2% en tampón TAE 1x (Tris, Ácido acético y EDTA), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador con luz UV.

Los productos de PCR obtenidos a partir de los cebadores degenerados para detectar especies de begomovirus (AV1048/AC494 y PGI/PGII) y de los cebadores que permiten detectar TYLCV y TYLCSV (TY1/TY2) fueron digeridos con el enzima de restricción *Eco471* (*AvaII*). La reacción se realizó con 10 µl de producto de PCR en un volumen final de 20 µl, siguiendo las indicaciones del fabricante e incubando a 37 °C durante 24 horas. La digestión fue analizada en geles de agarosa al 3% en TAE 1x, se tiñó con bromuro de etidio y fue visualizado en un transiluminador con luz UV.

Para estimar y comparar los límites de detección de las técnicas ensayadas, se realizaron diluciones seriadas en agua estéril de los ácidos nucleicos extraídos con ambos protocolos de extracción en una relación 1:10. Las diluciones resultantes se analizaron mediante PCR utilizando los cebadores de la tabla 4, y posterior análisis RFLPs en caso de tener que identificar la especie de begomovirus presente en la muestra, así como mediante NASH como se indica a continuación.

3.1.4. ANÁLISIS MEDIANTE NASH

Las sondas específicas de los begomovirus presentes en España (ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV) fueron sintetizadas y los análisis NASH realizados en el grupo del Dr. Jesús Sánchez Navarro del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). Las sondas sintetizadas en el caso de ToLCNDV hibridan con parte del gen de la replicasa o de la CP, mientras que en el caso de TYLCSV y TYLCV corresponden a parte del gen de la CP. Los resultados obtenidos se compararon con los análisis de PCR realizados como se ha descrito anteriormente.

Para el análisis NASH se emplearon los mismos extractos de ácidos nucleicos y las mismas diluciones, obtenidos como se ha detallado anteriormente, que se emplearon en las reacciones de PCR. Por esta técnica se analizaron tanto las muestras 1, 2 y 3 empleadas en la comparación de métodos de diagnóstico y protocolos de extracción (correspondientes a los aislados de ToLCNSV, TYLCSV y TYLCV) como las otras 38 muestras de campo.

3.2. ESTUDIO DE VARIABILIDAD MOLECULAR DE AISLADOS DE ToLCNDV RECOGIDOS EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

3.2.1. MATERIAL VEGETAL Y EXTRACCIÓN DE DNA

Para realizar el estudio de variabilidad de ToLCNDV, se seleccionaron tres aislados procedentes de muestreos realizados en 2015 en diferentes zonas de Alicante, concretamente en Orihuela y Pilar de la Horadada, en distintas especies hospedantes de cucurbitáceas: *C. máxima* (aislado 453/16), *C. moschata* (aislado 450/16) y *C. pepo* (aislado 546/16). El protocolo empleado para la extracción del DNA de estas muestras fue mediante el kit comercial E.Z.N.A Plant DNA (OMEGA Biotech, Doraville, USA) como se indica en el apartado 3.1.2 de este trabajo.

3.2.2. AMPLIFICACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

La determinación de la secuencia nucleotídica de los componentes A y B de los tres aislados de ToLCNDV se abordó mediante la amplificación del genoma completo mediante círculo rodante (CR) seguida de PCR.

Se diseñaron cebadores degenerados dirigidos a zonas conservadas del genoma de ToLCNDV que permitiesen la amplificación completa de los componentes A y B del virus, a excepción de las regiones utilizadas para el diseño de dichos cebadores, las cuales fueron amplificadas con cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias previamente obtenidas a partir de los cebadores degenerados (Tabla 5). Para diseñar los cebadores, se realizó un alineamiento con todas las secuencias de la base de datos mediante el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando el algoritmo CLUSTALW (Koichiro *et al.*, 2013).

Las muestras fueron sometidas a reacciones de amplificación del genoma completo mediante CR durante toda la noche a 28 °C. Los cebadores utilizados (Tabla 5) son 2807s y 2809As para amplificar el DNA-A y 2810s y 2811As para amplificar el DNA-B.

Seguidamente se realizaron amplificaciones por PCR a partir de los productos de CR. Para amplificar y secuenciar el DNA-A se utilizaron 3 parejas de cebadores: 2807s/2809As (2807/2808 en el caso de la muestra 453/16), 2824s/2825As y 2827s/2826As. Para amplificar y secuenciar el DNA-B 2810s/2811As (2810/2812 en el caso de la muestra 450/16), 2828s/2829As y 2831s/2830As. Las condiciones establecidas en el programa de PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 minutos a 98 °C y 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C de desnaturalización, 5 segundos a 50 °C de temperatura de anillamiento y 3 minutos a 72 °C de elongación, seguidos de una incubación final de 5 minutos a 72 °C para completar los fragmentos incompletos.

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en TAE 1X como se ha indicado anteriormente para verificar que el tamaño del amplicón era el correcto. Posteriormente, los productos de PCR obtenidos fueron purificados con el kit comercial GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) (Anexo 3) siguiendo las especificaciones del fabricante. La secuenciación fue realizada por el servicio de secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP).

El análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos obtenidas de los tres aislados secuenciados fue realizado con el software de alineamiento CLUSTALW, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas (Pallás, 2008), con el programa Mega versión 6 (Tamura *et al.*, 2013). Se incluyeron en los análisis las secuencias del DNA-A y DNA-B de diferentes aislados recogidos de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) procedentes de varios países. En estos análisis se incluyó la secuencia de TYLCSV (número de acceso JN859137) como outgroup o grupo externo.

El análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de las proteínas para las que codifican los tres aislados secuenciados fue realizado con el software de alineamiento MUSCLE,

y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Se incluyeron en los análisis las secuencias aminoácidas de las proteínas AC1, AC2, AC3, AC4, AV1, AV2, BC1 y BV1 de diferentes aislados recogidos de la base de datos del GenBank procedentes de varios países. En estos análisis se incluyeron como outgroups o grupos externos las secuencias de TYLCSV de AC1, AC2, AC3, AC4, AV1 y AV2 (números de accesión AFQ60624.1, AFQ60623.1, AFQ60622.1, AFQ60625.1, AFQ60621.1 y AFQ60620.1, respectivamente). Los outgroups utilizados para BC1 y BV1 fueron de CoMoV (*Corchorus mottle virus*) (números de accession AJG36439.1 y AJG36438.1, respectivamente).

Tabla 5. Cebadores empleados para la secuenciación del genoma completo de los tres aislados de ToLCNDV.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Componente Viral	Localización en el genoma
2807sToLCNDV DNA-A 1482	TCCCCTGTGCGTGAATCC	A	1431-1448
2808AsToLCNDV DNA-A 1499	GGATTCACGCACAGGGGA	A	1448-1431
2809AsToLCNDV DNA-A 1481	RYHCATCACYGYRGMTCRWRHAG	A	1430-1408
2810sToLCNDV DNA-B 1751	CCATGAYTCRTTMGGACMTAT	B	1497-1517
2811AsToLCNDV DNA-B 1751	ATAKGTCCKAAYGARTCATGG	B	1517-1497
2812AsToLCNDV DNA-B 1730	GCWAGYAGRTCRGAGRTMGG	B	1496-1477
2824sToLCNDV DNA-A 2280	CCTTGACGTCCGACGCTG	A	2280-2297
2825AsToLCNDV DNA-A 657	TGATATTTTCATCCATCC	A	657-640
2826AsToLCNDV DNA-A 1684	CTTCCTGTGCAATGAAGG	A	1684-1667
2827sToLCNDV DNA-A 1290	TGGTTGAACTGTACTTGG	A	1290-1307
2828sToLCNDV DNA-B 2300	TACTAAATGAACGGC	B	2300-2317
2829AsToLCNDV DNA-B 681	ATAACGATTGTTGTGGAGG	B	681-663
2830AsToLCNDV DNA-B 1684	CTGACGTCAATTACAGACC	B	1684-1666
2831sToLCNDV DNA-B 1358	TATCCGTAATATCTTCCC	B	1358-1375

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS Y PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN

Para establecer una rutina de análisis de ToLCNDV y su discriminación respecto a TYLCSV y TYLCSV, en este apartado se presentan los resultados obtenidos al evaluar los dos métodos de detección molecular, NASH y PCR; así como la evaluación de la influencia de los dos procedimientos de extracción de ácidos nucleicos, silica y EZNA, sobre ambas técnicas de detección. También se presentan los resultados obtenidos al analizar las 41 muestras de campo con síntomas de rizado empleados para validar los resultados de la puesta a punto de las técnicas de detección.

4.1.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE PCR

En primer lugar, se analizó la capacidad de detección de los cebadores AV494/AC1048 (Wyatt y Brown, 1996) para los tres begomovirus estudiados ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV (Figura 10). Como se observa en la figura 10B, no hubo amplificación en el caso de la muestra 2 infectada con TYLCSV, lo cual indica que esta pareja de cebadores no consigue detectar TYLCSV, como ya habían demostrado trabajos anteriores (Accotto *et al.*, 2000). Se observaron los amplicones de 578pb esperados para los extractos infectados con ToLCNDV (muestra 1, Figura 10A), hasta diluciones de 10^{-2} con el protocolo de extracción silica, y de 10^{-4} con EZNA. Para los extractos infectados con TYLCV (muestra 3, Figura 10C), se observaron los amplicones de 578 pb hasta diluciones de 10^{-1} con silica y 10^{-3} con EZNA. Sin embargo, el hecho de que las muestras sin dilución de ToLCNDV presenten niveles reducidos del amplicón esperado, y se obtuviera un resultado negativo en la muestra de TYLCV extraída con el protocolo EZNA, indica la presencia de inhibidores en la reacción de PCR. En cuanto al paso de digestión con la endonucleasa *Eco471* (Avall), se obtuvieron los correspondientes fragmentos de ToLCNDV, 578pb (Figura 10A); y TYLCV, 293pb y 257pb (Figura 10C).

En el análisis de capacidad de detección de la pareja de cebadores para diferentes especies del género *Begmovirus* PGI/PGII (Font, 2003), se obtuvieron los amplicones esperados de 578pb en los 3 extractos infectados con ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV, respectivamente, utilizando ambos protocolos de extracción (Figura 11).

Los límites de detección de los extractos infectados con ToLCNDV (Figura 11A) y TYLCSV (Figura 11B) corresponden a 10^{-3} y 10^{-2} respectivamente, independientemente del protocolo de extracción utilizado. En los extractos infectados con TYLCV (Figura 11C), los amplicones esperados se obtuvieron en diluciones de hasta 10^{-2} con silica y 10^{-3} con EZNA. De manera similar a los resultados obtenidos en la amplificación con los cebadores AV494/AC1048 (Wyatt y Brown, 1996), la mayoría de muestras sin dilución dan resultados negativos tanto con silica como con EZNA.

La digestión con *Eco471* (Avall) de los productos de PCR confirmó la identidad de los 3 virus generando fragmentos de 293pb y 267pb para TYLCV; 360pb, 130pb y 70pb para TYLCSV; y la no digestión del fragmento amplificado (578pb) para ToLCNDV.

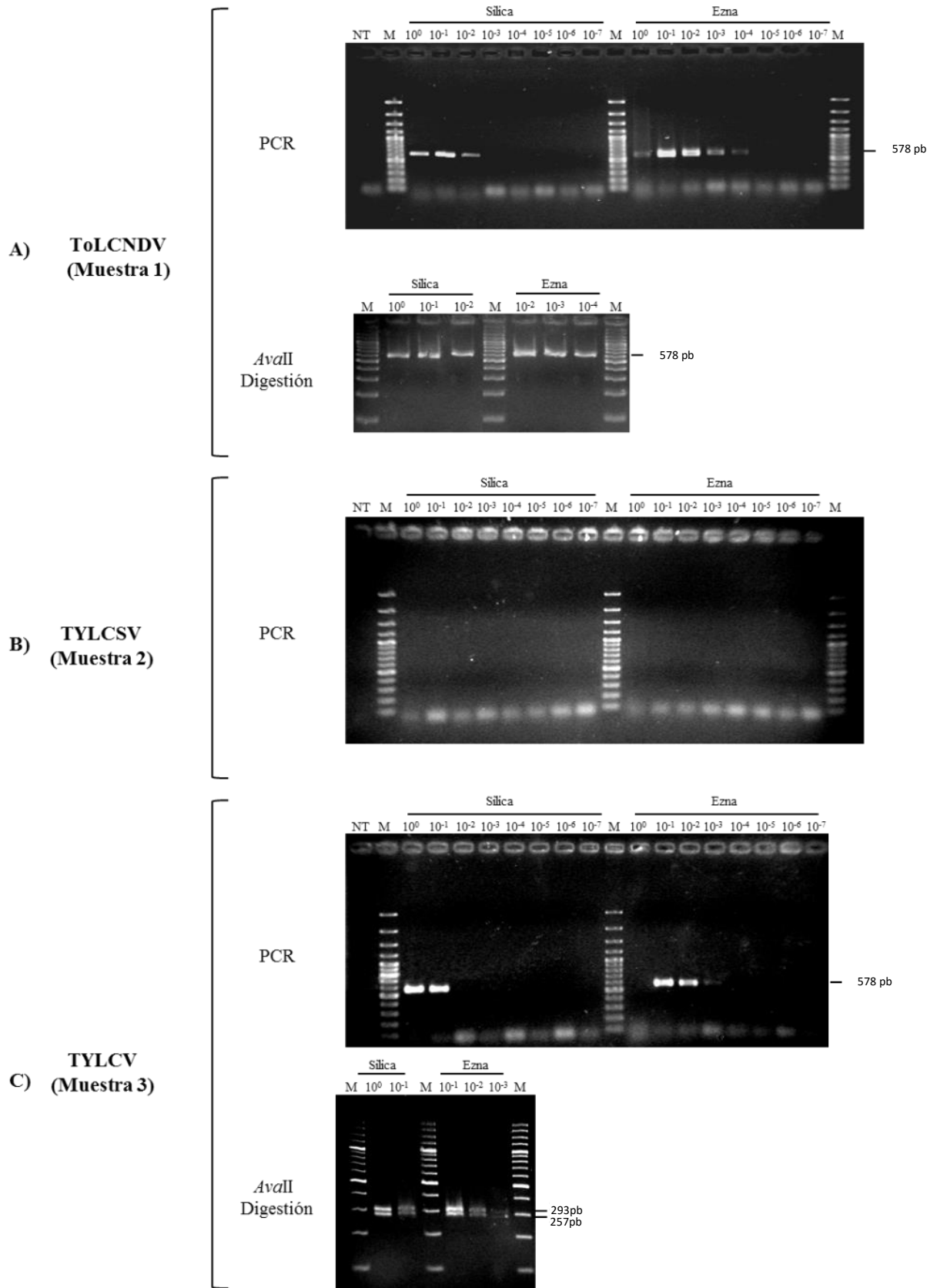


Figura 10. Resultados de la detección de ToLCNDV (Muestra 1), TYLCSV (Muestra 2) y TYLCSV (Muestra 3) utilizando los cebadores degenerados para begomovirus AV494/AC1048. NT y M corresponden con el control (no template) y el marcador de pesos moleculares de 100 pb, respectivamente.

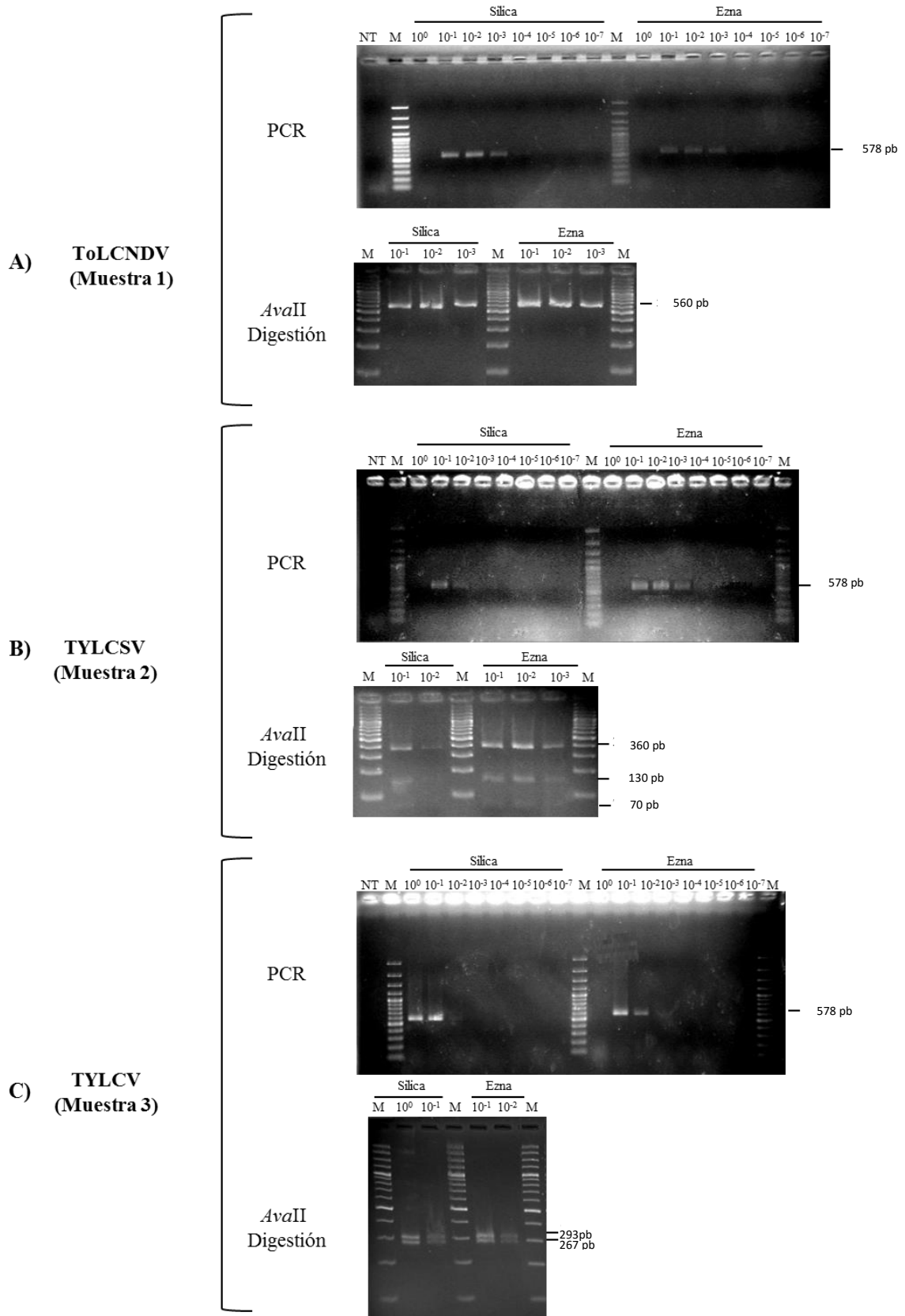


Figura 11. Resultados de la detección de ToLCNDV (Muestra 1), TYLCSV (Muestra 2) y TYLCSV (Muestra 3) utilizando los cebadores degenerados para begomovirus PGI/PGII. NT y M corresponden con el control (no template) y el marcador de pesos moleculares de 100 pb, respectivamente.

Finalmente, empleando las parejas de cebadores ToLCNDV Up/Down, específicos para ToLCNDV (Figura 12A) y los cebadores degenerados TY1/TY2 para detectar TYLCSV y TYLCV (Figura 12B y C) se observó que ambas parejas amplificaron los fragmentos esperados. Utilizando la pareja ToLCNDV Up/Down, se detectaron los extractos positivos para ToLCNDV hasta la dilución 10^{-3} , independientemente del protocolo de extracción y obteniendo los amplicones esperados de 914pb. Con la pareja de cebadores TY1/TY2 se obtuvieron amplicones de 578 pb. Los productos de PCR se digirieron con la endonuceasa *Eco471* (*Avall*) para identificar la especie, obteniendo los patrones de restricción para TYLCSV (302pb, 150pb y 68pb) y TYLCV (302pb y 277pb).

Al contrario que con ToLCNDV Up/Down, con los cebadores TY1/TY2 se obtienen mejores límites de detección cuando se utiliza el protocolo de extracción EZNA, de manera que el límite de detección para los extractos infectados con TYLCSV es de 10^{-4} con silica y 10^{-5} con EZNA. De manera similar, los límites de detección en los extractos infectados con TYLCV son de 10^{-3} con silica y 10^{-4} con EZNA.

El límite de detección obtenido empleando el protocolo de extracción EZNA es 10 veces mayor comparado con el resultante del empleo del método de captura con silica, tanto para los extractos infectados con TYLCV como con TYLCSV. También se observa una reducción de la intensidad de los amplicones generados con los extractos sin dilución o incluso resultados negativos con todas las parejas de cebadores, lo que indica que este efecto se debe a la presencia de inhibidores en los extractos y no por los cebadores utilizados.

4.1.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE NASH

En la detección de los extractos infectados con ToLCNDV se observaron mejores resultados usando la sonda de la replicasa, obteniendo límites de detección entre 5 y 10 veces mayores (5^{-5} y 10^{-4}) comparado con la sonda de la CP (5^{-4} y 10^{-3}). Ambas son muy específicas, dando señal negativa para las muestras infectadas con TYLCV y TYLCSV (Figura 13).

Con la sonda de la CP de TYLCSV se obtuvieron resultados similares, se detectó la presencia de TYLCSV hasta diluciones de 5^{-5} y 10^{-4} . La especificidad de esta sonda es similar a las sondas de ToLCNDV, a pesar de encontrar hibridación cruzada con la muestra de TYLCV extraída con silica donde se observa una señal muy débil.

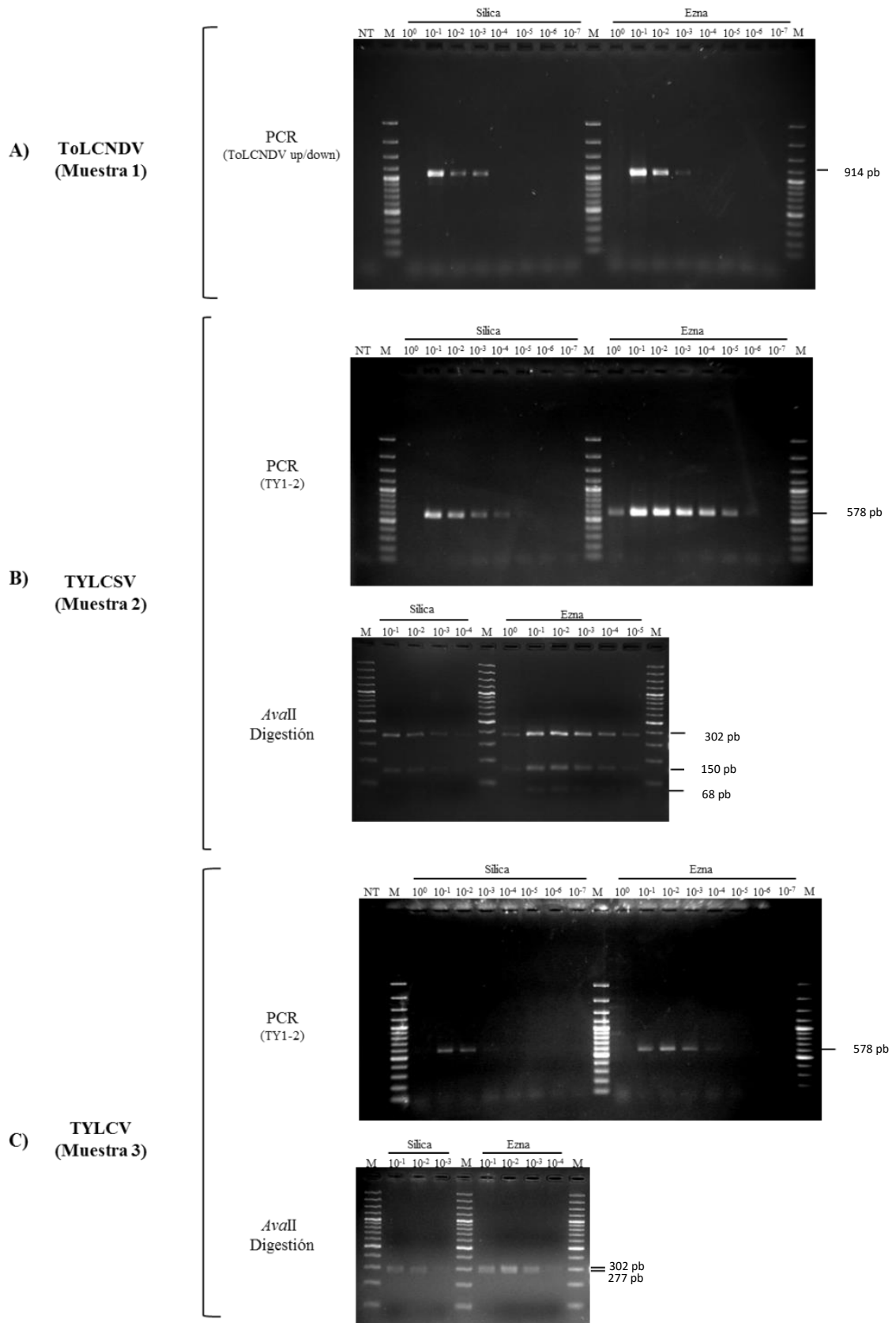


Figura 12. Resultados de la detección de ToLCNDV (Muestra 1) con los cebadores específicos ToLCNDV up/down, y la detección de TYLCSV (Muestra 2) y TYLCSV (Muestra 3) utilizando los cebadores degenerados TY1/TY2. NT y M corresponden con el control (no template) y el marcador de pesos moleculares de 100 pb, respectivamente.

En el caso de la sonda de la CP de TYLCV, los límites de detección son 5^{-5} y 10^{-2} . Al contrario que con las sondas de ToLCNDV y TYLCSV, la sonda de TYLCV generó señales de hibridación cruzada con los extractos infectados con TYLCSV. Los análisis Blast con las tres sondas ensayadas revelan que la sonda de TYLCV es hasta un 81% idéntica a aislados de TYLCSV, y la sonda de TYLCSV hasta un 82% idéntica a los de TYLCV encontrados en dicha base de datos; mientras que las dos sondas de ToLCNDV son hasta un 74% idénticas a los aislados de TYLCV y TYLCSV disponibles en la base de datos. En el caso de la sonda de TYLCSV, se observaron en las bases de datos 3 secuencias con un 99-100% de identidad (números de accesión del GenBank: Z86067, Z86068 y EF423644) que corresponden con un aislado recombinante (García-Andrés *et al.*, 2007) o a aislados putativos, clasificados inicialmente como TYLCV. Estas reacciones cruzadas entre sondas de estas dos especies de begomovirus causantes de la enfermedad del rizado amarillo del tomate en España, ya se habían observado en estudios anteriores (Accotto *et al.*, 2000).

Se estimó que la concentración viral de los aislados de ToLCNDV y TYLCSV empleados fue de nanogramos por microlitro de extracto, mientras que la concentración de TYLCV es unas 100 veces menor. El hecho de que la sonda de TYLCV presente hibridaciones cruzadas con los extractos infectados con TYLCSV que se encuentra en altas concentraciones (nanogramos de DNA viral) sugiere que el empleo de esta sonda en NASH da como resultado hibridación cruzada con muestras con alta concentración de secuencias con identidades de entre 74-81% con la secuencia de la correspondiente sonda, al menos en las condiciones de hibridación establecidas. De acuerdo con estas observaciones, era de esperar hibridación cruzada entre la sonda de TYLCSV y los extractos infectados con TYLCV, sin embargo se observa una señal muy débil, debida probablemente a una baja concentración de TYLCV en el extracto analizado.

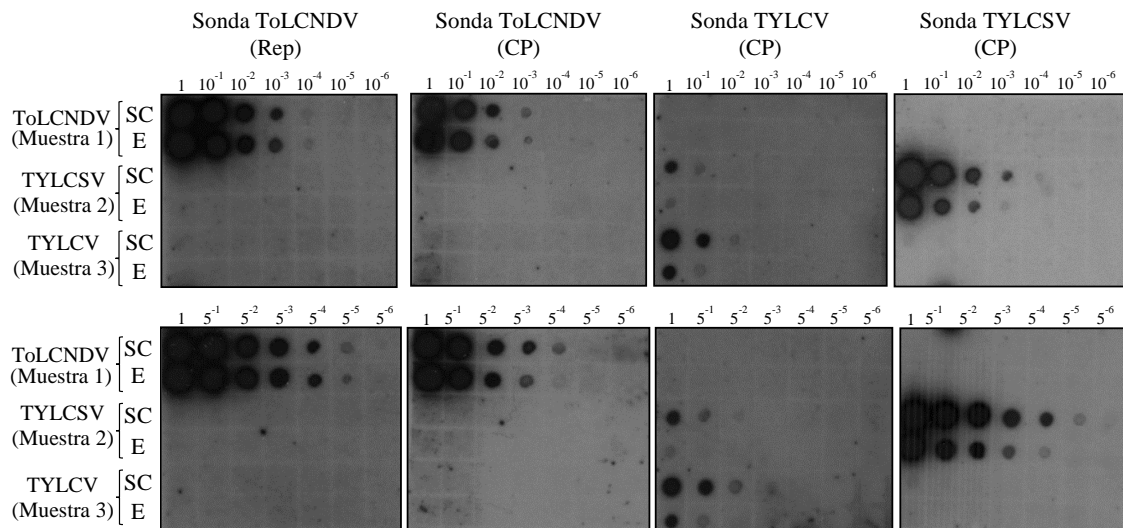


Figura 13. Detección de ToLCNDV, TYLCV y TYLCSV en tejidos infectados mediante hibridación molecular con sondas específicas (NASH).

4.1.3. COMPARACIÓN RESULTADOS DE PCR Y NASH

Al comparar los resultados obtenidos con PCR y NASH (Tabla 6), se observó que con PCR se obtuvieron mejores resultados utilizando el procedimiento EZNA, mientras que para la técnica NASH, los mejores resultados se obtuvieron con el protocolo silica. La PCR presenta límites de detección similares a NASH utilizando el protocolo de extracción de silica, o hasta 100 veces mayores utilizando el protocolo de extracción de EZNA. Estas diferencias de dos órdenes de magnitud en los límites de detección entre PCR y NASH se han comprobado también para otros virus (Sánchez-Navarro *et al.*, 1996; 1998). La diferencia observada en cuanto al protocolo de extracción empleado se debe probablemente al tipo de ácidos nucleicos que se purifican con cada uno: mientras que EZNA solo purifica el DNA, la extracción por silica también purifica el RNA (incluido el RNA mensajero) que se detecta por NASH.

Se utilizaron cebadores específicos para la detección de ToLCNDV, pero los cebadores degenerados AV494/AC1048 (Wyatt y Brown, 1996) fueron los que obtuvieron mayor sensibilidad. Como desventaja, con estos cebadores degenerados no se puede detectar TYLCSV. Considerando la concentración vírica estimada por NASH, el límite de detección para los tres virus obtenidos con los diferentes cebadores se encuentra entre 1 y 0,01 picogramos de DNA viral, similares a los descritos previamente (Gawande *et al.*, 2007; Lefeuvre *et al.*, 2007).

Mediante PCR se obtienen buenos límites de detección, pero se observan algunos falsos negativos en los extractos sin dilución, probablemente por la presencia de inhibidores. Este hecho junto con la necesidad de protocolos de extracción comerciales, y en caso de algunos cebadores, la utilización de un paso extra de digestión con *Eco471* (*Avall*), limitaría el uso de la PCR para análisis a gran escala.

Tabla 6. Relación de los límites de detección obtenidos mediante las técnicas de detección PCR y NASH.

	ToLCNDV (muestra 1)		TYLCSV (muestra 2)		TYLCV (muestra 3)		
	silica	EZNA	silica	EZNA	silica	EZNA	
PCR	AV494/AC1048	10 ⁻²	10 ⁻⁴	-	-	10 ⁻¹	10 ⁻³
	PGI/PGII	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²
	TY1/TY2	-	-	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁴
	ToLCNDV up/down	10 ⁻³	10 ⁻³	-	-	-	-
NASH	Sonda replicasa	10 ⁻⁴ (5 ⁻⁵)	10 ⁻⁴ (5 ⁻⁵)	-	-	-	-
	Sonda CP	10 ⁻³ (5 ⁻⁴)	10 ⁻³ (5 ⁻⁴)	10 ⁻⁴ (5 ⁻⁵)	10 ⁻³ (5 ⁻⁴)	10 ⁻² (5 ⁻³)	10 ⁻¹ (5 ⁻¹)

4.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE CAMPO

Los resultados de los análisis de las 41 muestras recogidas en campo se muestran en la tabla 7. El análisis mediante PCR con los cebadores degenerados PGI/PGII (Font, 2003) permitió detectar específicamente los tres virus (ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV) por lo que esta pareja de cebadores parece conveniente para diagnósticos rutinarios. Asimismo, se comprobó que la pareja de cebadores degenerados AV494/AC1048 (Wyatt y Brown, 1996) es capaz de detectar ToLCNDV y TYLCV, pero no la presencia de TYLCSV, como se comentó anteriormente.

Por otro lado, se aprecia una buena correlación entre los resultados obtenidos por PCR y NASH, ya que el 89,6% de los positivos de PCR (26 de 29) fueron detectados e identificados correctamente con NASH a pesar de haber utilizado el protocolo de extracción EZNA, que es menos sensible para NASH como se demostró en la puesta a punto de la técnica. Ese porcentaje probablemente se podría haber incrementado utilizando el protocolo de extracción silica. En este sentido, resulta llamativo que algunas muestras positivas (6, 7 y 39) solo fueran detectadas con NASH, indicando la presencia de inhibidores de PCR en los extractos. Para confirmar esa idea, las 3 muestras fueron analizadas por PCR en diluciones 1:10 del extracto original. En todas ellas se observaron los amplicones esperados, confirmando la presencia de inhibidores de PCR. Además, en los análisis mediante NASH, solo se observó reacción cruzada entre las sondas de TYLCV y TYLCSV en la muestra 2.

También se observó que el 82,7% de los positivos de PCR (24 de 29) fueron correctamente detectados e identificados con NASH usando el protocolo rápido con tampón citrato. Este hecho hace que NASH se sitúe como una técnica adecuada para análisis a gran escala. Además, la posibilidad de detectar diferentes virus mediante la mezcla de las sondas (Saldarelli *et al.*, 1996; Sánchez-Navarro *et al.*, 1999) o mediante el uso de polisondas (Cohen *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011; Peiró *et al.*, 2012) podría hacer que NASH fuera una técnica muy interesante para la detección rutinaria de estos tres patógenos. Adicionalmente, las 29 muestras positivas para TYLCV y las 37 para TYLCSV detectadas con PCR, también fueron positivas con NASH. Sin embargo, las muestras 16, 22 y 41 resultaron positivas con PCR para ToLCNDV, TYLCV y TYLCSV respectivamente, pero negativas con NASH. Esto sugiere concentraciones virales por debajo del límite de detección de NASH inferior al de la PCR como se ha visto en el apartado anterior.

Tabla 7. Análisis comparativo de detección de ToLCNDV, TYLCSV y TYLCV en muestras de campo, realizado mediante PCR con cebadores específicos para ToLCNDV, PCR-RFLPs con cebadores degenerados para begomovirus y para TYLCSV y TYLCV, y mediante NASH utilizando la sonda de la replicasa de ToLCNDV y de CP de TYLCSV y TYLCV. Todas las muestras fueron extraídas con el protocolo EZNA. En el caso de NASH también se utilizó el protocolo de tampón citrato.

Código de muestra	Fecha de recolección	Área	Hospedante	PCR-RFLPs (Begomovirus)		PCR-RFLP (TYLCV/ TYLCSV)	PCR ToLCNDV	NASH (EZNA/Tampón citrato)		
				AV494/AC1048	PGI/PGII			ToLCNDV	TYLCV	TYLCSV
1	Sep-2013	Murcia	Calabacín	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na ^a	+	+ / +	- / -	- / -
2	Oct-2013	Granada	Tomate	-	+ TYLCSV	+ TYLCSV	-	- / -	(+) / -	+ / +
3	Sep-2013	Almería	Tomate	+ TYLCV	+ TYLCV	+ TYLCV	-	- / -	+ / +	- / -
4	Sep-2013	Murcia	Calabacín	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
5	Sep-2013	Murcia	Calabacín	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
6	Sep-2013	Murcia	Melón	-	-	na	-	+ / +	- / -	- / -
7	Sep-2013	Murcia	Calabaza	-	-	na	-	+ / +	- / -	- / -
8	Sep-2013	Murcia	Calabacín	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
9	Sep-2013	Granada	Calabacín	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
10	Sep-2013	Granada	Calabacín	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
11	Oct-2013	Almería	Melón	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
12	Sep-2013	Almería	Pepino	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
13	Sep-2013	Murcia	Calabaza	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
14	Oct-2013	Granada	Pepino	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
15	Oct-2013	Granada	Pepino	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
16	Oct-2013	Granada	Pepino	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	- / -	- / -	- / -
17	Oct-2013	Granada	Pepino	-	-	na	-	- / -	- / -	- / -
18	Mar-2014	Granada	Pepino	-	-	na	-	- / -	- / -	- / -
19	Apr-2014	Granada	Sandía	-	-	na	-	- / -	- / -	- / -
20	May-2014	Granada	Pepino	+ ToLCNDV	+ ToLCNDV	na	+	+ / +	- / -	- / -
21	May-2014	Valencia	Calabacín	-	-	-	-	- / -	- / -	- / -
22	Sep-2013	Murcia	Tomate	+ TYLCV	+ TYLCV	+ TYLCV	-	- / -	- / -	- / -
23	Sep-2013	Murcia	Tomate	-	-	-	-	- / -	- / -	- / -
24	Sep-2013	Granada	Tomate	+TYLCV	+TYLCV	+TYLCV	-	- / -	+ / +	- / -
25	Sep-2013	Granada	Tomate	+TYLCV	+TYLCV	+TYLCV	-	- / -	+ / +	- / -
26	Sep-2013	Granada	Tomate	+TYLCV	+TYLCV	+TYLCV	-	- / -	+ / +	+ / +
27	Sep-2013	Granada	Tomate	-	-	-	-	- / -	- / -	- / -
28	Sep-2013	Granada	Tomate	-	+ TYLCV	+ TYLCV	-	- / -	+ / -	- / -
29	Oct-2013	Granada	Tomate	+TYLCV	+TYLCV	+TYLCV	-	- / -	+ / +	-
30	Oct-2013	Granada	Tomate	-	-	-	-	- / -	- / -	- / -
31	Oct-2013	Granada	Tomate	-	-	-	-	- / -	- / -	- / -
32	Oct-2013	Granada	Tomate	-	-	-	-	- / -	- / -	- / -
33	Oct-2013	Granada	Tomate	-	-	-	-	- / -	- / -	- / -
34	Oct-2013	Granada	Tomate	+TYLCV	+TYLCV	+TYLCV	-	- / -	+ / +	- / -
35	Oct-2013	Granada	Tomate	+TYLCV	+TYLCV	+TYLCV	-	- / -	+ / +	- / -
36	Dec-2013	Murcia	Tomate	+TYLCV	+TYLCV	+TYLCV	-	- / -	+ / -	- / -
37	Jan-2014	Granada	Tomate	-	+ TYLCSV	+ TYLCSV	-	- / -	- / -	+ / +
38	Jan-2014	Granada	Tomate	-	+ TYLCSV	+ TYLCSV	-	- / -	- / -	+ / +
39	May-2014	Valencia	Tomate	-	-	-	-	- / -	+ / +	- / -
40	May-2014	Valencia	Tomate	+TYLCV	+TYLCV	+TYLCV	-	- / -	+ / +	- / -
41	May-2014	Cantabria	Tomate	-	+ TYLCSV	+ TYLCSV	-	- / -	- / -	- / -

^ana: no analizado

4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE ToLCNDV.

En la caracterización molecular de los tres aislados estudiados: aislado 453/16 (procedente de calabaza *C. maxima*), aislado 450/16 (procedente de calabaza *C. moschata*) y aislado 546/16 (procedente de *C. pepo*), se obtuvieron las secuencias completas del DNA-A y el DNA-B. Al realizar el análisis Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) de las secuencias del DNA-A (2738 nt) y DNA-B (2684 nt) de los tres aislados secuenciados, se observa que muestran una alta identidad nucleotídica (99%) con los aislados de ToLCNDV españoles recopilados de la base de datos del GenBank, independientemente del hospedante, y presentan una identidad menor con los aislados procedentes de India y Pakistán (91-92% en el DNA-A y 82-84% en el DNA-B). El aislado 450/16, procedente de *C. moschata*, presenta una duplicación en el DNA-B que también aparece en otros aislados del GenBank, aunque por el momento no se conoce su función.

Al realizar el análisis filogenético de los aislados secuenciados (Anexo 4), se observó que el DNA-B de los aislados estudiados recogidos en la Comunidad Valenciana se agrupa con el resto de aislados españoles (Anexo 4.1), mientras que para el DNA-A únicamente el aislado procedente de *C. maxima* (aislado 453/16) se encuentra en el clado de los aislados españoles y los otros dos aislados (450/16 y 546/16) en clusters indios y pakistaníes (Anexo 4.2).

En cambio, el análisis filogenético de las proteínas de los aislados secuenciados de la Comunidad Valenciana (Anexo 5) reveló que todas ellas se agrupan con el resto de aislados españoles disponibles en la base de datos del GenBank. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el análisis Blast, al agrupar los aislados de la Comunidad Valenciana con el resto de aislados españoles. El hecho de que todas las proteínas de los aislados españoles se agrupen juntas sugiere que puedan provenir de un mismo aislado común.

Las diferencias encontradas en el análisis filogenético de las proteínas y los nucleótidos del DNA-A de los aislados 450/16 y 546/16 pueden ser debidas a la naturaleza degenerada del código genético, por tanto que no se traduzcan en cambios en la secuencia aminoacídica de las proteínas para las que codifican.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- Para la detección de ToLCNDV, los cebadores degenerados AV494/AC1048 (Wyatt y Brown, 1996) fueron los que obtuvieron mayor sensibilidad. Como desventaja, con estos cebadores no se puede detectar TYLCSV.
- El método de extracción comercial de DNA EZNA Plant DNA Kit fue el que mejores resultados dio en el análisis mediante la técnica PCR, sin embargo para la aplicación de NASH fue el método de captura con sílica con el que se obtuvieron mejores resultados.
- La comparación de las técnicas de PCR y NASH con muestras de campo, reveló una buena correlación entre ellas, detectándose incluso algunas muestras positivas únicamente con NASH debido a la posible presencia de inhibidores de la PCR.
- La técnica NASH permite la aplicación directa en la membrana de las muestras homogeneizadas en tampón citrato, lo que reduce el tiempo de análisis y permite el diagnóstico de un gran número de muestras.
- El análisis Blast reveló una alta identidad nucleotídica de los tres aislados de la Comunidad Valenciana con los aislados de ToLCNDV españoles, recopilados de la base de datos del GenBank; y una identidad menor con los aislados indios y paquistaníes.
- El análisis filogenético de los nucleótidos del DNA-B agrupó los aislados de ToLCNDV de la Comunidad Valenciana con el resto de aislados españoles, coincidiendo con los resultados del análisis Blast.
- Aunque el análisis filogenético de los nucleótidos del DNA-A reveló diferencias genéticas entre los aislados secuenciados, agrupando únicamente el aislado procedente de *C. maxima* con el resto de los aislados españoles, el análisis filogenético de todas las proteínas apoya los resultados del análisis Blast, al agrupar los aislados de la Comunidad Valenciana con el resto de aislados españoles.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Accotto, G., Navas-Castillo, J., Noris, E., Moriones, E. & Louro, D. (2000). Typing of Tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 179-186.
- Bedford, I. D., Briddon, R. W., Brown, J. K., Rosell, R. C. & Markham, P. G. (1994). Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology*, 125(2), 311-325.
- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J. M., Martín, G., Garmendia, C. & Salas, M. (1989). Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *Journal of Biological Chemistry*, 264(15), 8935-8940.
- Briddon, R. W. & Markham, P. G. (1994). Universal primers for the PCR amplification of dicot-infecting geminiviruses. *Molecular Biotechnology*, 1(2), 202-205.
- Briddon, R. W., Mansoor, S., Bedford, I. D., Pinner, M. S., Saunders, K. & Stanley, J. (2001). Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology*, 285, 234-243.
- Briddon, R. W., Bull, S. E., Mansoor, S., Amin, I. & Markham, P. G. (2002). Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA β . *Molecular biotechnology*, 20(3), 315-318.
- Briddon, R. W. & Stanley, J. (2006). Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*, 344(1), 198-210.
- Chang, H. H., Ku, H. M., Tsai, W. S., Chien, R. C. & Jan, F. J. (2010). Identification and characterization of a mechanical transmissible begomovirus causing leaf curl on oriental melon. *European Journal of Plant Pathology*, 127(2), 219-228.
- Clark, M.F. & Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34, 475-483.
- Cohen, O., Batuman, O., Stanbekova, G., Sano, T., Mawassi, M. & Bar-Joseph, M. (2006). Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. *Virus Genes*, 33(3), 287-292.
- Credi, R., Betti, L., & Canova, A. (1989). Association of a geminivirus with a severe disease of Tomato in Sicily/Un geminivirus associato a una grave malattia del Pomodoro in Sicilia. *Phytopathologia Mediterranea*, 28(3), 223-226.
- Crescenzi, A., Comes, S., Napoli, C., Fanigliulo, A., Pacella, R. & Accotto, G. P. (2003). Severe outbreaks of tomato yellow leaf curl Sardinia virus in Calabria, Southern Italy. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 69(4), 575-580.
- CSIC. (2016). *Red de Agroalimentación del CSIC*. Visto el 19 de Julio de 2016. Disponible en: <http://agrotransfer.csic.es/wp-content/uploads/2014/02/articulo-ToLCNDV.pdf>.
- Czosnek, H. (2007). *Tomato yellow leaf curl virus disease: management, molecular biology, breeding for resistance*. Editorial Springer Science & Business Media. 448 pp.

- Dalmon, A., Cailly, M. & David, C. (2000). Comparison of serological and molecular techniques for detection of tomato yellow leaf curl begomovirus. *EPPO Bulletin*, 30(3-4), 457-462.
- Deng, D., McGrath, P. F., Robinson, D. J. & Harrison, B. D. (1994). Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of Applied Biology*, 125(2), 327-336.
- EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*). (2016). *Archives.eppo.int*. Visto el 19 de Julio de 2016. Disponible en: <http://archives.eppo.int/EPPOreporting/2015/Rse-1506.pdf>
- EPPO Global Database. (2016). *Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV0) [Host plants]*. Visto el 19 de julio de 2016. Disponible en: <https://gd.eppo.int/taxon/TYLCV0/hosts>
- Font I. (2003). *Tomato yellow leaf curl virus en los cultivos españoles: variabilidad y caracterización de aislados*. Universidad Politécnica de Valencia. Tesis Doctoral.
- Font, I., Martínez-Culebras, P. & Jorda, C. (2000). First report of *Tomato yellow leaf curl virus-Is* (TYLCV-Is) in the Canary Islands. *Plant Disease*, 84(9), 1046-1046.
- Font, I. & Alfaro-Fernandez, A. (2015). "El virus de Nueva Delhi" (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) amplia su gama de hospedantes en los cultivos españoles. *Phytoma*, 272, 25- 30.
- García-Andrés, S., Accotto, G. P., Navas-Castillo, J. & Moriones, E. (2007). Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. *Virology*, 359(2), 302-312.
- Gawande S.J., Kaundal P., Kaushal N. & Garg I.D. (2007). Print capture PCR - A simple technique for the detection of *Tomato leaf curl New Delhi virus* - Causal agent of potato apical leaf curl disease in India. *Potato Journal*, 34, 87-88
- Gopal, P., Kumar, P. P., Sinilal, B., Jose, J., Yadunandam, A. K. & Usha, R. (2007). Differential roles of C4 and β C1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: evidence for transactivation by the C2 of *Bhendi yellow vein mosaic virus*, a monopartite begomovirus. *Virus Research*, 123(1), 9-18.
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M. M., Sanz-Burgos, A. P., Luque, A. & Missich, R. (2004). Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology*, 98(2), 111-119.
- Haible, D., Kober, S. & Jeske, H. (2006). Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, 135, 9–16.
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D. & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 777-788.

- Harrison, B. D. & Robinson, D. J. (1999). Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (*Begomoviruses*). *Annual Review of Phytopathology*, 37(1), 369-398.
- Herranz M.C., Sánchez-Navarro J.A., Aparicio F. & Pallás V. (2005). Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *Journal of Virological Methods*, 124, 49-55.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4), 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026-1030.
- Hu, J. S., Li, H. P., Barry, K., Wang, M. & Jordan, R. (1995). Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Disease*, 79(9), 902-906.
- ICTV (2016). *ICTV Virus Taxonomy*. Visto el 18 de Julio de 2016. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Ito, T., Kimbara, J., Sharma, P. & Ikegami, M. (2009). Interaction of *Tomato yellow leaf curl virus* with diverse betasatellites enhances symptom severity. *Archives of virology*, 154(8), 1233-1239.
- Jordá, C., Font, I., Martínez, P., Juárez, M., Ortega, A. & Lacasa, A. (2001). Current status and new natural hosts of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Spain. *Plant Disease*, 85(4), 445-445.
- Juárez, M., Legua, P., Mengual, C. M., Kassem, M. A., Sempere, R. N., Gómez, P., Truniger, V. & Aranda, M. A. (2013). Relative incidence, spatial distribution and genetic diversity of cucurbit viruses in eastern Spain. *Annals of Applied Biology*, 162(3), 362-370.
- Juárez, M., Tovar, R., Fiallo-Olivé, E., Aranda, M.A., Gosálvez, B., Castillo, P., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2014) First detection of *Tomato leaf curl New Delhi virus* infecting zucchini in Spain. *Plant Disease*, 98(6), 857.
- Jyothsna, P., Haq, Q. M. I., Singh, P., Sumiya, K. V., Praveen, S., Rawat, R., Briddon, R. W. & Malathi, V. G. (2013). Infection of tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), a bipartite *Begomovirus* with betasatellites, results in enhanced level of helper virus components and antagonistic interaction between DNA B and betasatellites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 5457-5471.
- Kheyr-Pour, A., Bendahmane, M., Matzeit, V., Accotto, G.P., Crespi, S. & Gronenborn, B. (1991). Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. *Nucleic Acids Res.*, 19.

- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J. & Carstens, E. B. (Eds.). (2011). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, 6763 – 6769
- Koichiro, T., Glen, S., Daniel, P., Alan, F. & Sudhir, K. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 28(28), 2731-2739.
- Inoue-Nagata, A. K., Albuquerque, L. C., Rocha, W. B. & Nagata, T. (2004). A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*, 116(2), 209-211.
- Lazarowitz, S. G. & Shepherd, R. J. (1992). Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11(4), 327-349.
- Lefeuvre, P., Martin, D. P., Hoareau, M., Naze, F., Delatte, H., Thierry, M., Varsani, A., Becker, N., Reynaud, B. & Lett, J. M. (2007). Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *Journal of General Virology*, 88(12), 3458-3468.
- Lin L., Li R., Mock R. & Kinard G. (2011). Development of a polyprobe to detect six viroids of pome and stone fruit trees. *Journal of Virological Methods*, 171, 91-97.
- Llácer, G., López, M. M., Trapero, A. & Bello, A. (1996). Patología vegetal. Tomo I. Sociedad Española de Fitopatología. *Phytoma-España*, 263-274.
- Mackenzie D.J., McLean M.A., Mukerji S. & Green M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81, 222-226.
- Mansoor, S., Briddon, R. W., Bull, S. E., Bedford, I. D., Bashir, A., Hussain, M., Saeed, M., Zafar, Y., Malik, K. A., Fauquet, C. & Markham, P. G. (2003). Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite *Begomoviruses* supported by single DNA β . *Archives of Virology*, 148(10), 1969-1986.
- Maule, A. J., Hull, R. & Donson, J. (1983). The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. *Journal of Virological Methods*, 6(4), 215-224.
- Mnari Hattab, M., Kummert, J., Roussel, S., Ezzaier, K., Zouba, A. & Jijakli, M. H. (2005). First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Tunisia causing yellows on five cucurbitaceous species. *Plant Disease*, 89(7), 776-776.
- Moffat, A. S. (1999). Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science*, 286 (5446), 1835-1835.
- Moriones, E., Arno, J., Accotto, G. P., Noris, E. & Cavallarin, L. (1993). First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Spain. *Plant Disease*, 77(9), 1461- 1461.
- Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2000). *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*, 71(1), 123-134.

- Monci, F., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. & Moriones, E. (2002). A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, 303(2), 317-326.
- Mullis, K. B., Erlich, H. A., Arnheim, N., Horn, G. T., Saiki, R. K. & Scharf, S. J. (1987). *U.S. Patent No. 4,683,195*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Nagar, S., Pedersen, T. J., Carrick, K. M., Hanley-Bowdoin, L. & Robertson, D. (1995). A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *The Plant Cell*, 7(6), 705-719.
- Navas-Castillo, J., Sánchez-Campos, S., Díaz, J. A., Saez-Alonso, E. & Moriones, E. (1997). First report of *Tomato yellow leaf curl virus*-ls in Spain: coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. *Plant Disease*, 81(12), 1461-1461.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E. & Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 219-248.
- Nawaz-ul-Rehman, M. S. & Fauquet, C. M. (2009). Evolution of geminiviruses and their satellites. *Febs Letters*, 583(12), 1825-1832.
- Noeiry, A. O., Lucas, W. J. & Gilbertson, R. L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, 76(5), 925-932.
- Padidam, M., Beachy, R. N. & Fauquet, C. M. (1995). Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology*, 76(2), 249-263.
- Pallás, V. (Ed.). (2008). *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 464 pp.
- Peiró A., Pallás V. & Sánchez-Navarro J.A. (2012). Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 469-475.
- Picó, B., Díez, M. J. & Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus—a review. *Scientia Horticulturae*, 67(3), 151-196.
- Picó, B., Díez, M. J. & Nuez, F. (1998). Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Euphytica*, 101(3), 259-271.
- Picó, B., Ferriol, M., Díez, M. J. & Vinals, F. N. (2001). Agroinoculation methods to screen wild *Lycopersicon* for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. *Journal of Plant Pathology*, 215-220.

- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L. & Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant disease*, 77(4), 340-347.
- Rojas, M. R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cázares, B., Sudarshana, M. R., Lucas, W. J. & Gilbertson, R. L. (2001). Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite *Begomovirus*, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 291(1), 110-125.
- Ruiz, M.L., Simón, A., Velasco, L., García, M.C. & Janssen, D. (2015). First report of *Tomato leaf curl New Delhi virus* infecting tomato in Spain. *Plant Disease*, 99, 894.
- Rybicki, E. P. (1994). A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology*, 139(1-2), 49-77.
- Rybicki, E. P. & Pietersen, G. (1999). Plant virus disease problems in the developing world. *Advances in virus research*, 53, 127-175.
- Saldarelli P., Barbarossa L., Grieco F. & Gallitelli D. (1996). Digoxigenin-labeled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Disease*, 80, 1343-1346
- Sánchez-Navarro J.A., Cano E.A. & Pallás V. (1996). Non-radioactive molecular hybridization detection of carnation mottle virus in infected carnations and its comparison to serological and biological techniques. *Plant Pathology*, 45, 375-382.
- Sánchez-Navarro J.A., Aparicio F., Rowhani A. & Pallás V. (1998). Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus in herbaceous and Prunus hosts. *Plant Pathology*, 47, 780-786.
- Sánchez-Navarro J.A., Canizares M.C., Cano E.A. & Pallás V. (1999). Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *Journal of Virological Methods*, 82, 167-175.
- Sanderfoot, A. A. & Lazarowitz, S. G. (1996). Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends in Cell Biology*, 6(9), 353-358.
- Sattar, M. N. (2012). Diversity and interactions of Begomoviruses and their associated DNA-satellites. *Department of Plant Biology and Forest Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences*. Tesis Doctoral.
- Saunders, K. & Stanley, J. (1999). A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology*, 264(1), 142-152.
- Saunders, K., Norman, A., Gucciardo, S. & Stanley, J. (2004). The DNA β satellite component associated with ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein (β C1). *Virology*, 324(1), 37-47.

- Schaad, N. W. & Frederick, R. D. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(3), 250-258.
- Sivalingam, P.N, Malathi, V.G. & Varma, A. (2010) Molecular diversity of the DNA- β satellites associated with tomato leaf curl disease in India. *Archives of Virology*, 155, 757–764
- Stanley, J., Boulton, M. I. & Davies, J. W. (2005). *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & sons. 18348 pp.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Usharani, K. S., Surendranath, B., Paul-Khurana, S. M., Garg, I. D. & Malathi, V. G. (2004). Potato leaf curl—a new disease of potato in northern India caused by a strain of *Tomato leaf curl New Delhi virus*. *Plant Pathology*, 53(2), 235-235.
- Varsani, A., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Brown, J. K., Zerbini, F.M. & Martin, D. P. (2014). Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. *Archives of Virology*, 159(8), 2193-2203.
- Voller, A. Bartlett, A., Bidwell, D.E., Clark, M.F. & Adams, A.N. (1976). The detection of plant viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.*, 33, 165.
- Walker, J. M. & Rapley, R. (2009). *Molecular biology and biotechnology*. Royal society of chemistry. Reino Unido. 271 pp.
- Wyatt, S. D. & Brown, J. K. (1996). Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86(12), 1288-1293.
- Yazdani-Khameneh, S., Golnaraghi, A. R. & Rakhshandehroo, F. (2013). Report of a new begomovirus on melon in Iran. *New Disease Reports*, 28.
- Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J.W. & McKenna, R. (2001). Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology*, 279(2), 471-477.

ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de extracción de RNA con silica

- Triturar 100 mg de tejido vegetal (fresco o congelado) en una bolsa de plástico o 25 mg (deshidratado) con 1,5 ml de tampón de extracción al que previamente se le haya añadido β - mercaptoetanol en proporción 1%.
- Transferir 500 μ l del homogeneizado a un tubo eppendorf de 1,5 ml con punta recortada.
- Añadir 100 μ l de n-lauronyl sarcosina 10% e incubar 10 minutos a 70°C (agitando los tubos de vez en cuando).
- Incubar en hielo durante 5 minutos.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Transferir 300 μ l a un nuevo tubo y añadir 150 μ l de etanol, 300 μ l de NaI 6M y 50 μ l de silica resuspendido, e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Centrifugar 1 minuto a 6000 rpm a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con 1 ml de tampón de lavado.
- Centrifugar 1 minuto a 6000 rpm a temperatura ambiente
- Repetir 3 veces el paso de lavado.
- Tras el último lavado eliminar el máximo posible de tampón.
- Resuspender el pellet en 100 μ l de agua MQ estéril.
- Incubar 4 minutos a 70 °C.
- Centrifugar 3 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y guardar a -20 °C hasta su próximo uso.

ANEXO 2. Protocolo de extracción del DNA total de plantas con EZNA

- Triturar 10 mg de muestra seca o 40 mg de muestra fresca o congelada en un eppendorf con ayuda de un micropistilo estéril.
- Añadir 600 μ l de tampón P1 y vortear vigorosamente. (Opcional: añadir 10 μ l de β -mercaptoetanol).
- Incubar a 65 °C al menos 5 minutos. Agitar los tubos una vez durante la incubación.
- Añadir 140 μ l de tampón P2 y vortear.
- Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm.
- Cuidadosamente pipetear 600 μ l de sobrenadante a un nuevo tubo, sin transferir restos vegetales.
- Añadir ½ volumen de tampón P3 (300 μ l) y 1 volumen de etanol absoluto (600 μ l), mezclar.
- Pasar 800 μ l a una columna HiBindDNA acoplada a un tubo colector de 2 ml.
- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
- Pasar el resto del volumen por la columna.
- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y descartar el sobrenadante y el tubo colector.
- Pasar la columna a un nuevo tubo colector y añadir 750 μ l de Wash Buffer.
- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y descartar sobrenadante.
- Volver a centrifugar 2 minutos a 13000 rpm para eliminar restos de alcohol de la columna.

- Transferir la columna a un nuevo tubo Eppendorf estéril y añadir 100 µl de agua PCR precalentada a 65 °C e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm.
- Volver a añadir 100 µl de agua PCR precalentada, incubar 1 minuto y centrifugar.
- Se obtienen de 2 a 10 µg.

ANEXO 3. GeneJET Gel Extraction Kit de Thermo Scientific

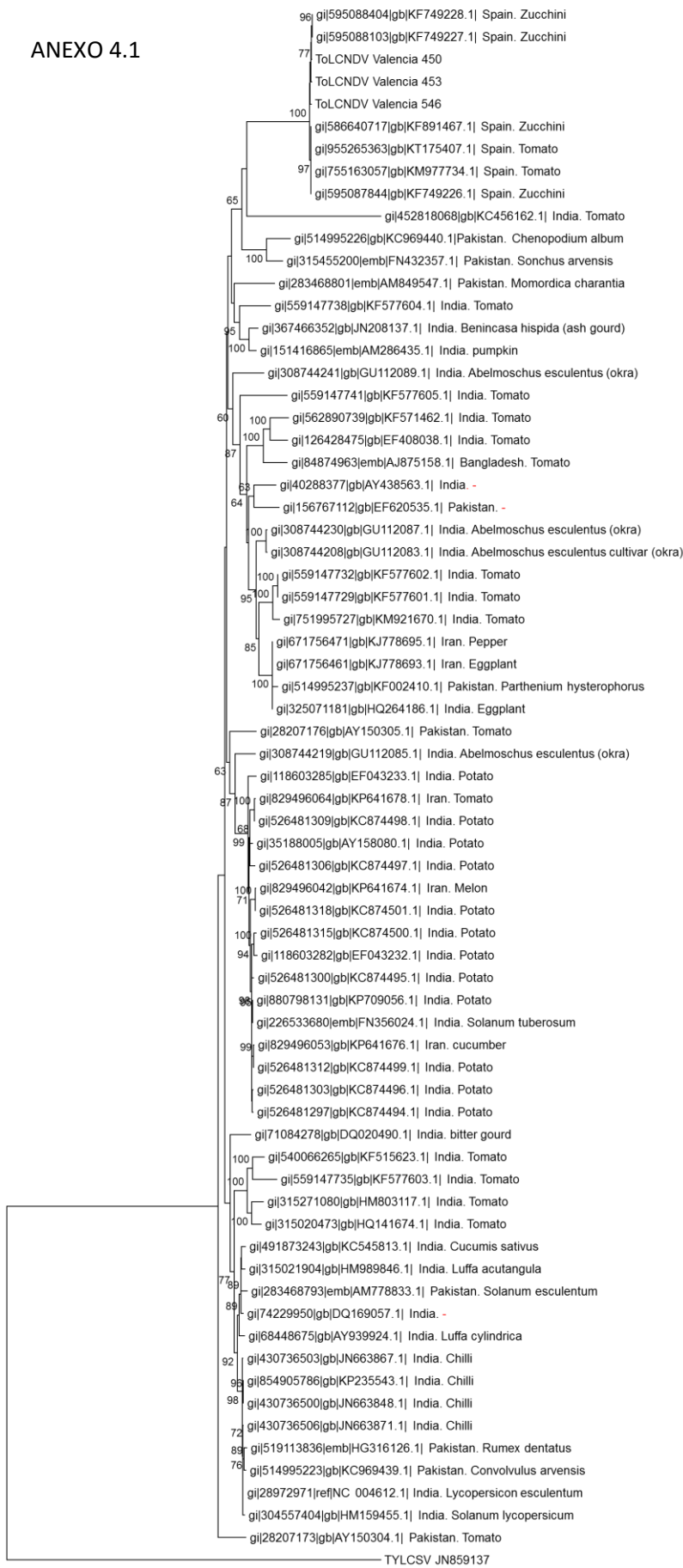
- Extraer la banda de interés del gel de agarosa con ayuda de un bisturí estéril.
- Transferir la banda a un tubo de 1,5 ml.
- Agregar 1 volumen de binding buffer (según el tamaño de la banda extraída) e incubar a 65 °C durante 15 minutos o hasta la disolución total de la agarosa.
- Transferir toda la muestra disuelta a una columna de purificación y centrifugar 30 segundos a 13000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y volver a colocar la columna en el tubo.
- Añadir 700 µl de tampón de lavado a la columna purificación GeneJET y centrifugar durante 1 minuto. Desechar el sobrenadante y volver a colocar la columna de nuevo en el mismo tubo de recogida.
- Centrifugar de nuevo la columna de purificación durante 1 minuto para eliminar por completo el tampón de lavado residual.
- Transferir la columna de purificación a un nuevo tubo de microcentrífuga estéril 1,5 ml y añadir 50 µl de tampón de elución al centro de la membrana de la columna.
- Centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm. Guardar a -20°C.

ANEXO 4. Árboles filogenéticos de las secuencias de nucleótidos del DNA-A y DNA-B de ToLCNDV.

ANEXO 4.1. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas del DNA-B de ToLCNDV basado en los alineamientos de secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) calculados según el algoritmo neighbor-Joining y el modelo Tamura-Nei implementados con 1000 pseudo-réplicas a través del programa informático Mega 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de acceso, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de acceso JN859137) como outgroup o grupo externo.

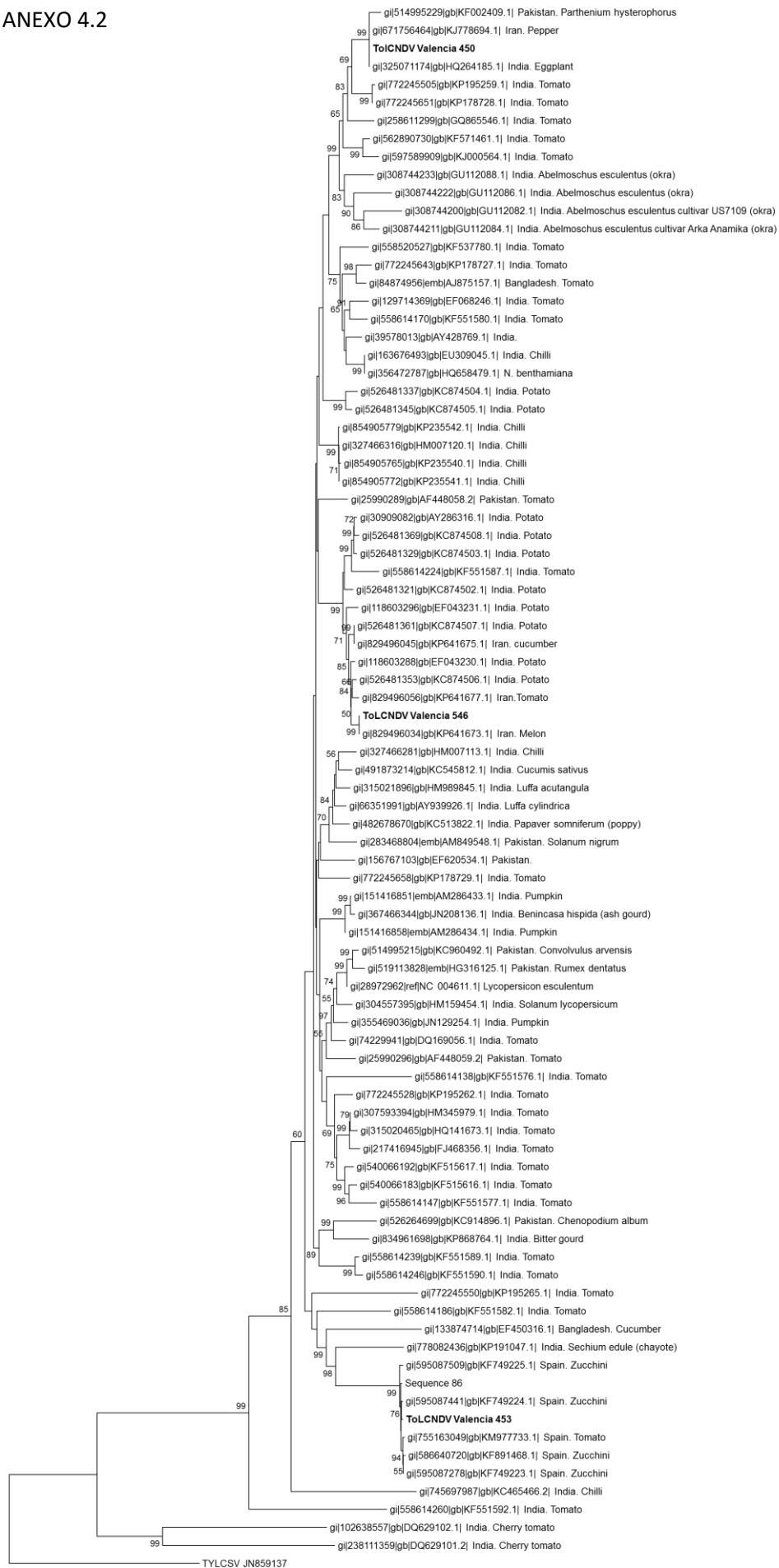
ANEXO 4.2 Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas del DNA-A de ToLCNDV basado en los alineamientos de secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) calculados según el algoritmo neighbor-Joining y el modelo Tamura-Nei implementados con 1000 pseudo-réplicas a través del programa informático Mega 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de acceso, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de acceso JN859137) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 4.1



0.05

ANEXO 4.2



ANEXO 5. Árboles filogenéticos de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de ToLCNDV codificadas por AC1, AC2, AC3, AC4, AV1, AV2, BC1 y BV1.

ANEXO 5.1. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína AC1 basado en los alineamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60624.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.2. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína AC2 basado en los alineamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60623.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.3. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína AC3 basado en los alineamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60622.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína AC4 basado en los alineamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60625.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.5. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína AV1 basado en los alineamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron

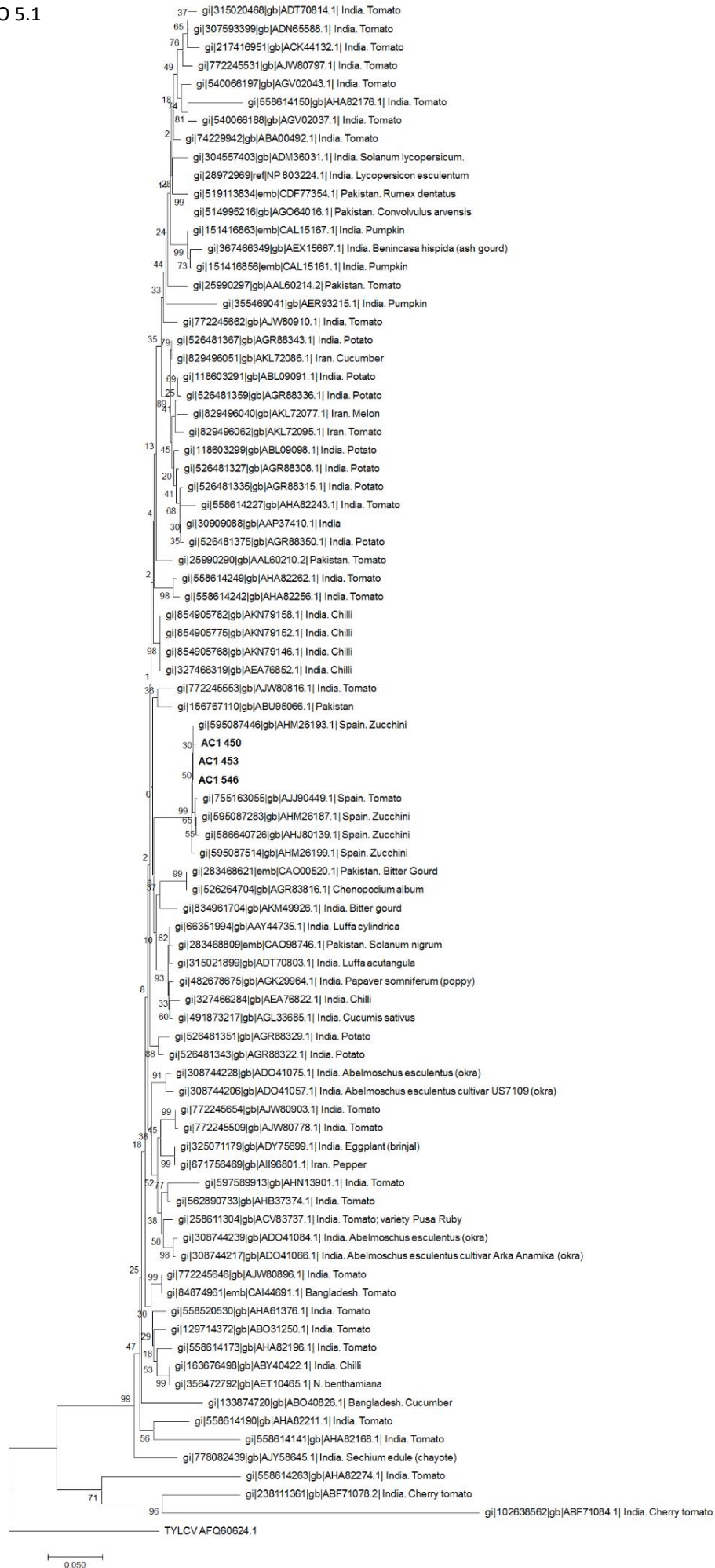
extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60621.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.6. Análisis filogenético de las secuencia aminoacídica de la proteína AV2 basado en los alinamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Boostrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60620.1) como outgroup o grupo externo.

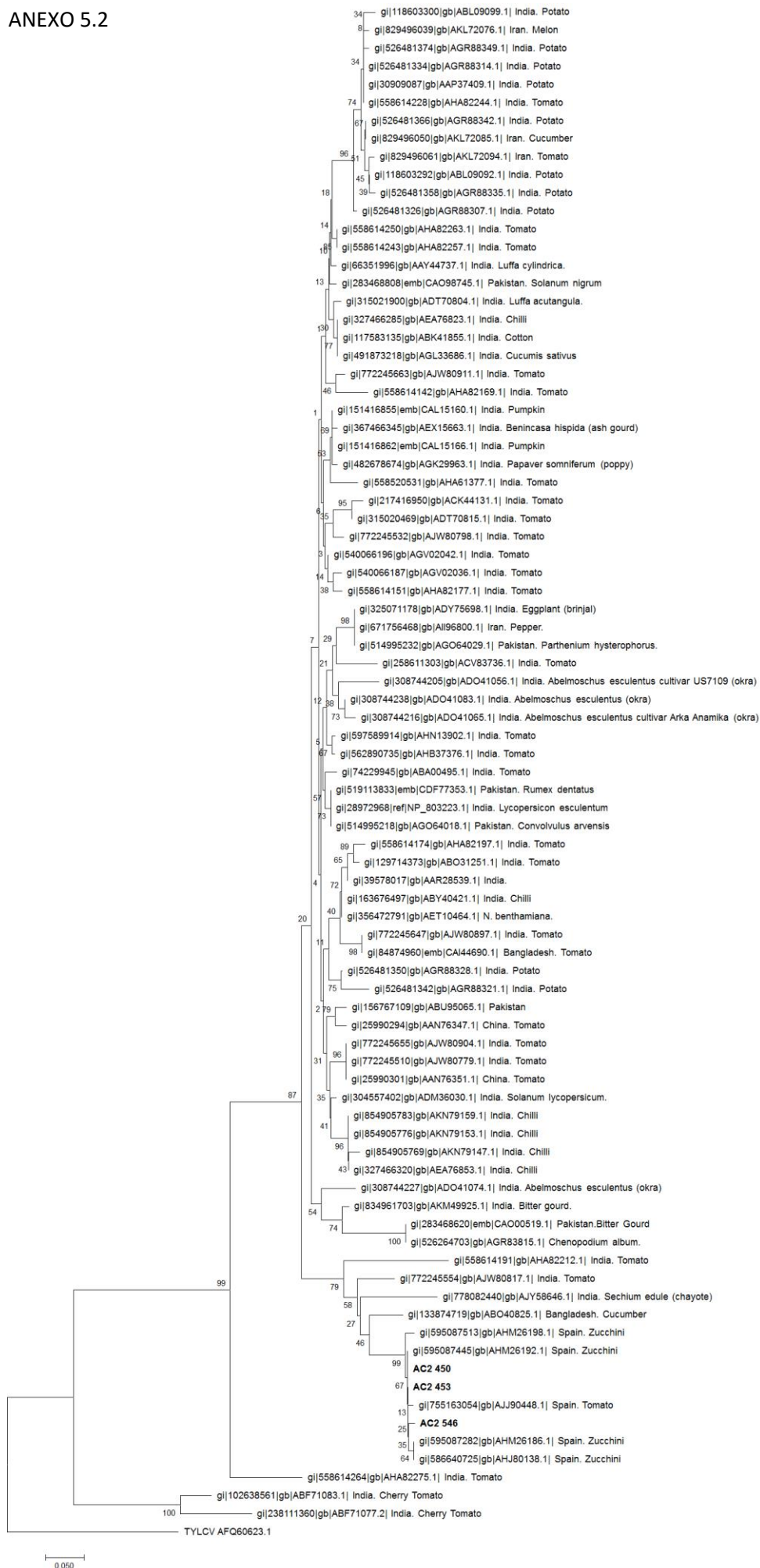
ANEXO 5.7. Análisis filogenético de las secuencia aminoacídica de la proteína BC1 basado en los alinamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Boostrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de CoMoV (Número de accesoión AJG36439.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.8. Análisis filogenético de las secuencia aminoacídica de la proteína BV1 basado en los alinamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Boostrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de CoMoV (Número de accesoión AJG36438.1) como outgroup o grupo externo.

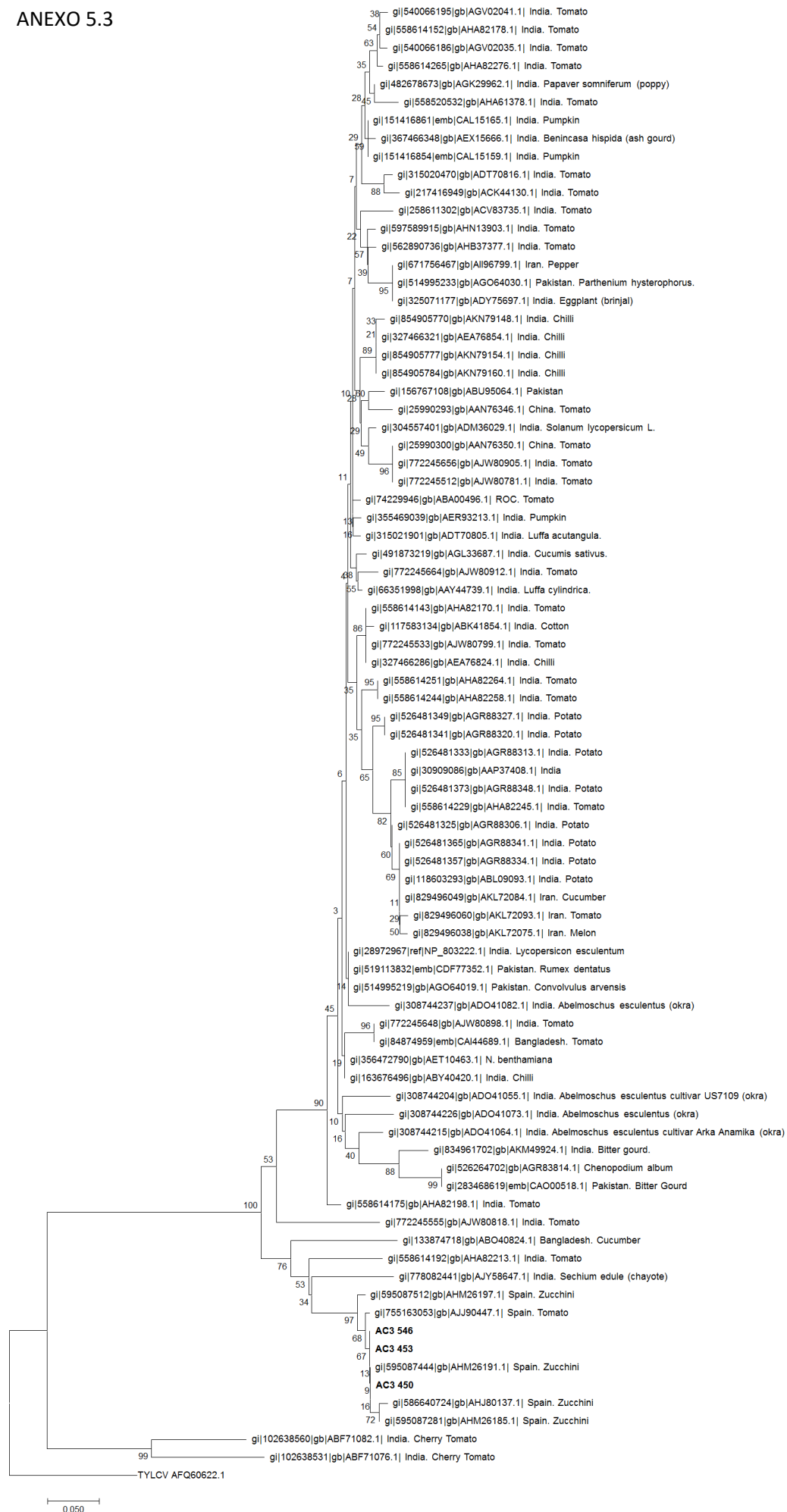
ANEXO 5.1



ANEXO 5.2



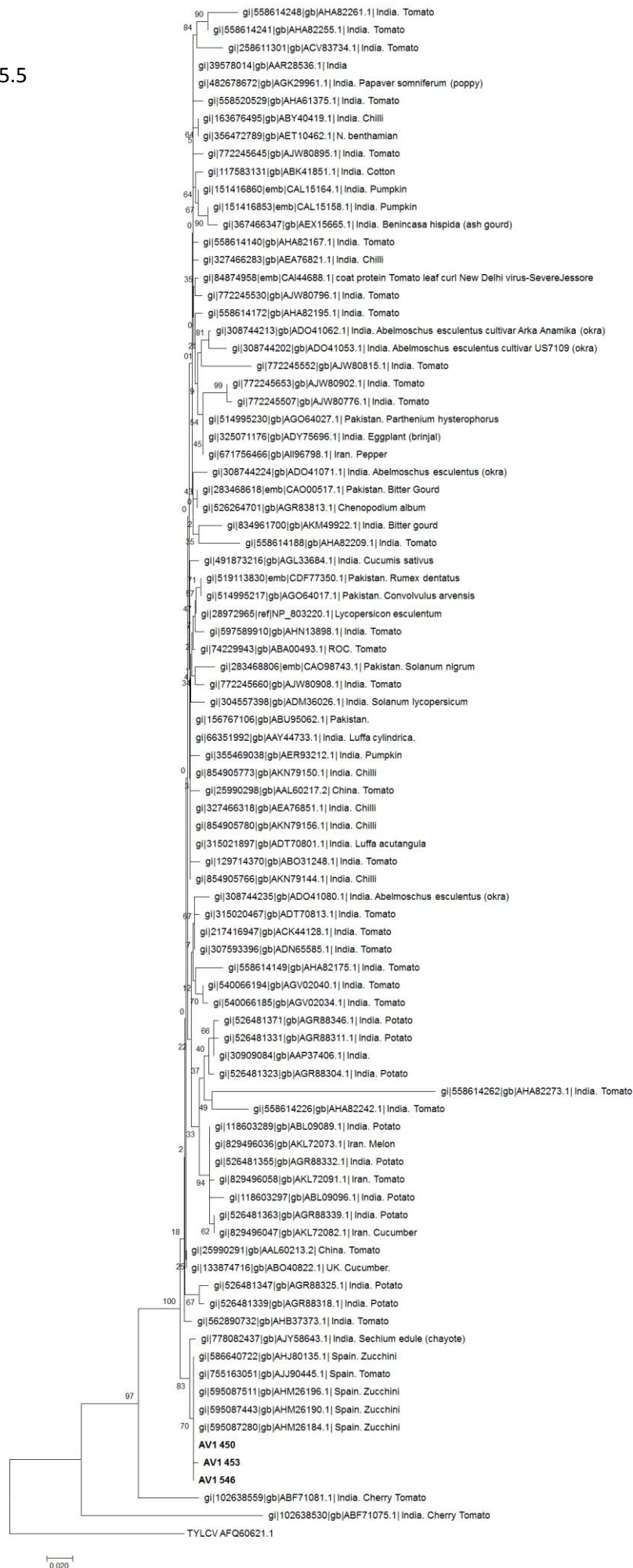
ANEXO 5.3



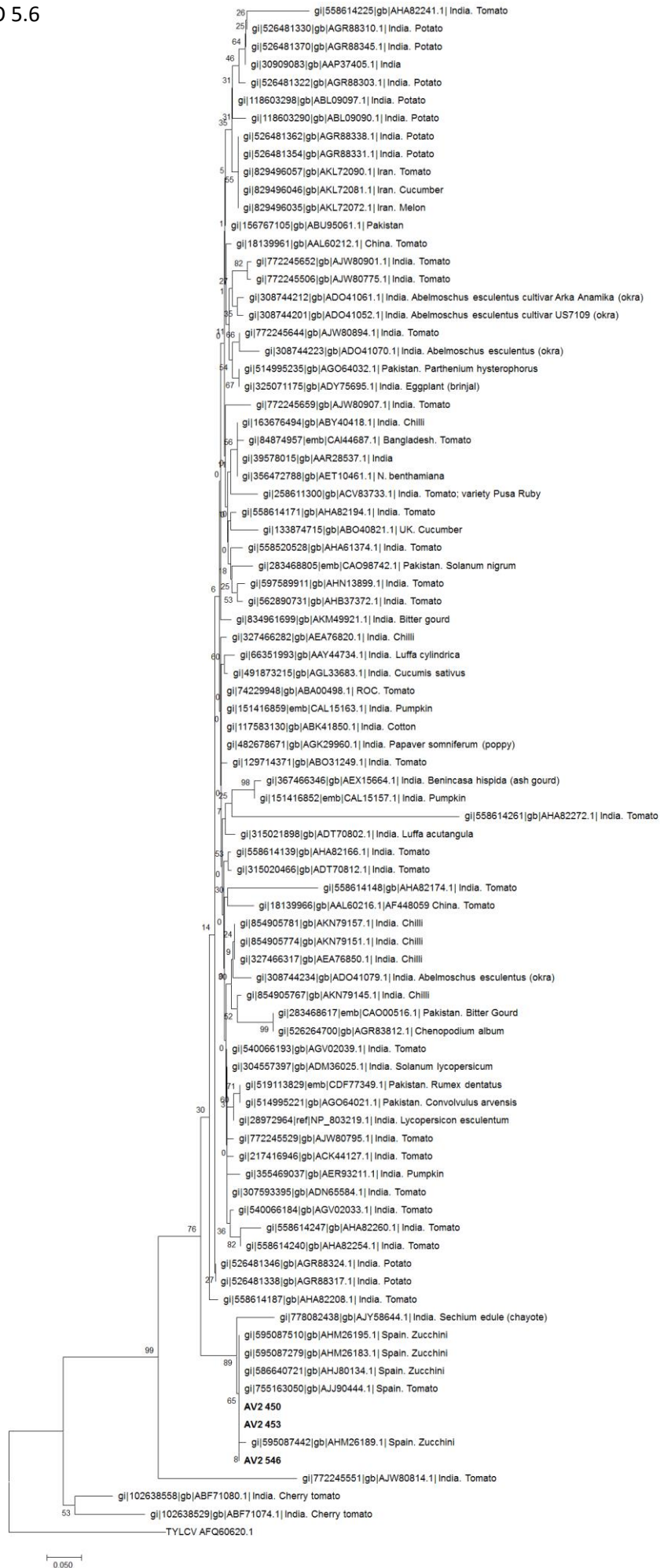
ANEXO 5.4



ANEXO 5.5



ANEXO 5.6



ANEXO 5.7

