

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS
AGROFORESTALES



CONTROL DE VIROSIS EN CULTIVOS DE TOMATE CHERRY: EVALUACIÓN DE LA SANIDAD DE LOS SEMILLEROS Y EFICACIA DE AGROTEXTILES

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN PRODUCCIÓN VEGETAL Y ECOSISTEMAS
AGROFORESTALES

ALUMNO: ROBERTO PEIRÓ GARCÍA
TUTORA ACADÉMICA: MARÍA ISABEL FONT SAN AMBROSIO
COTUTORA ACADÉMICA: ANA OLVIDO ALFARO FERNÁNDEZ

Curso Académico: 2014/2015
VALENCIA, JULIO 2015

RESUMEN

La continuada presencia del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) desde 2007, en las zonas productoras de la Cooperativa Granada-La Palma del sureste y noreste de la provincia de Granada (Fornes y Zújar) y la detección de otras virosis de forma puntual, viene provocando graves pérdidas económicas en la producción de tomate cherry de verano y una gran preocupación entre los agricultores. CMV es transmitido por áfidos de forma no persistente, por lo tanto, impedir la entrada del vector en el cultivo resulta el mejor método de control. En el presente trabajo se han ensayado distintos agrotexiles con distintas densidades de hilos (6x6, 8x10 y 8x16 hilos/cm²) y se ha podido comprobar que el empleo de malla de 6x6 hilos/cm² no impide la entrada de áfidos vectores de CMV en los cultivos de tomate. En cambio, el empleo de la malla 8x10 hilos/cm² en techo y 8x16 hilos/cm² en perímetro resulta muy eficaz en impedir la entrada de áfidos vectores de CMV, y por tanto el mejor método de control de la enfermedad al retrasar la aparición de la misma, obtener las mayores producciones y menores destríos y conseguir unas condiciones climáticas en el invernadero óptimas para la producción.

El estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción realizado en el presente trabajo a siete aislados de CMV recogidos en el campo de ensayos de la Cooperativa Granada-La Palma ubicado en Fornes nos indican que pertenecen al grupo I.B.

También se ha podido comprobar que las plántulas adquiridas por los socios de la Cooperativa de la Granada-La Palma provenientes de semilleros comerciales presenta un buen estado fitosanitario, descartando que la enfermedad sea introducida con el material vegetal de plantación.

Palabras clave: Virus del mosaico del pepino, *Cucumber mosaic virus*, CMV, áfidos, mallas, hibridación molecular.

ABSTRACT

The continued presence of *Cucumber mosaic virus* (CMV) since 2007, in the production areas of the Cooperative Granada-La Palma located in the southeast and northeast of the province of Granada (Fornes and Zújar; Spain) and the detection of other viruses in a timely manner, has been causing serious economic losses in the production of cherry tomatoes in summer and a great concern among farmers. CMV is transmitted by aphids in a non-persistent manner, therefore, prevent the entry of the vector into the culture is the best method of control. In this TFM we have been tested nets with different densities of threads (6x6, 8x10 and 8x16 threads/cm²). It has been found that the use of mesh 6x6 threads/cm² not preclude the entry of aphid vectors of CMV in tomato crops. Instead, the use of mesh 8x10 threads/cm² in ceiling and 8x16 threads/cm² in perimeter is very effective in preventing the entry of aphids, CMV vectors, and therefore the best method of controlling the disease to delay the onset of the same and get the biggest productions to control the disease, obtaining minimum wastes and get climatic conditions in the greenhouse for optimal production.

Restriction Fragment Length Polymorphisms has been realized to seven CMV Isolates from the first essay. The analysis of isolates shows that all belong to group I.B.

Also it has been found that the seedlings purchased by members of the Cooperative of Granada-La Palma from commercial nurseries present a good plant health, ruling that the disease is introduced with the planting material.

Keyword: *Cucumber mosaic virus*, CMV, aphids, net, molecular hybridization.

ÍNDICE

RESUMEN.....	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El cultivo del tomate	1
1.2 El tomate cherry.....	4
1.3. La Cooperativa Granada-La Palma y su producción de tomate de verano	6
1.4. Principales virosis en tomate	11
1.4.1. Virus del mosaico del pepino (<i>Cucumber mosaic virus</i> , CMV).....	12
1.4.2. Virus del bronceado del tomate (<i>Tomato spotted wilt virus</i> , TSWV)	14
1.4.3. Virus del rizado amarillo del tomate (<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> , TYLCV) 16	
1.4.4. Virus de la clorosis del tomate (<i>Tomato chlorosis virus</i> , ToCV).....	18
1.4.5. Virus del enanismo moteado de la berenjena (<i>Eggplant mottled dwarf virus</i> , EMDV).....	18
1.5. Técnicas de detección, diagnóstico e identificación de virus vegetales.....	19
1.5.1. Hibridación Molecular no radiactiva	19
1.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase chain reaction”, PCR) .	20
1.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (“Reverse Transcription-PCR”, RTPCR).	22
1.5.4. Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> , RFLPs).....	22
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
3.1. Ensayo de agrotexiles para el control de enfermedades virales transmitidas por vectores.....	26
3.1.1. Ubicación del ensayo	26
3.1.2. Agrotexiles y sectores	26
3.1.3. Material vegetal	29
3.1.4. Ciclo de cultivo y manejo	30

3.1.5. Diseño del ensayo	31
3.1.6. Análisis de las muestras mediante hibridación molecular no radiactiva.....	33
3.1.7. Análisis de muestras con síntomas de virosis distintas a CMV mediante PCR y RT-PCR.	34
3.2. Caracterización molecular del tipo de CMV que afecta a los cultivos de tomate del ensayo de agrotexiles.	37
3.3. Estudio del estado sanitario de las plántulas de tomate empleadas por los socios de la cooperativa Granada-La Palma de la zona norte y de la costa adquiridas de semilleros.....	39
3.3.1. Material vegetal	39
3.3.2. Diseño experimental tras la recepción	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. Ensayo de agrotexiles para el control de enfermedades virales transmitidas por vectores.....	42
4.1.1. Resultados de la hibridación molecular, RT-PCR y PCR de las plantas seleccionadas para el ensayo.	42
4.1.2. Resultados de la hibridación molecular de las plantas marcadas por el agricultor por mostrar síntomas de virosis.	47
4.1.3. Evolución y distribución de la enfermedad por sector y muestreo durante el ciclo de cultivo.....	48
4.2. Caracterización molecular del tipo de CMV que afecta a los cultivos de tomate del ensayo de agrotexiles.	57
4.3. Estudio del estado sanitario de las plántulas de tomate empleadas por los socios de la empresa de la zona norte y de la costa adquiridas de semilleros.....	59
5. CONCLUSIONES.....	61
6. BIBLIOGRAFÍA	62
7. ANEXO.....	65
ANEXO 1. PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS VEGETALES MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR NO RADIOACTIVA (DIGOXIGENINA)	65
ANEXO 2. PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS CON SILICA..	67
ANEXO 3. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA RT-PCR ToCV EN UN PASO.....	69
ANEXO 4. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA RT-PCR TSWV EN UN PASO.....	70

ANEXO 5. EXTRACCIÓN DE ADN CON KIT E.Z.N.A.® DNA ISOLATION KIT DE LA CASA COMERCIAL OMEGA BIO – TEK, GEORGIA, ESTADOS UNIDOS.....	71
ANEXO 6. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA PCR TYLCV-TYLCSV...	72
ANEXO 7. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA RT-PCR EN UN PASO CON DOS PAREJAS DIFERENTES DE CEBADORES ESPECÍFICOS DE CMV Y POSTERIOR ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS MEDIANTE RFLPS CON DOS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DIFERENTES.	73
ANEXO 8. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE VIRUS POR HIBRIDACIÓN MOLECULAR.	74
ANEXO 9. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA RT-PCR PARA ToCV.....	82
ANEXO 10. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA RT-PCR PARA TSWV.....	83
ANEXO 11. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR PARA TYLCV Y TYLCSV.	84
ANEXO 12. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA RT-PCR PARA CMV.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de plantas positivas a EMDV y CMV en los diferentes ensayos en 2013	10
Tabla 2. Producción y destrío en Kg/planta en los diferentes ensayos en 2013.	10
Tabla 3. Virosis de mayor relevancia en cultivo de tomate.....	11
Tabla 4. Densidad de malla ensayada, superficie aproximada y número de plantas a ensayar en los cuatro sectores de los dos invernaderos.	30
Tabla 5. Zona de trasplante. fecha de recepción y número de las plántulas analizadas para determinar su estado fitosanitario antes del trasplante.....	40
Tabla 6. Resultados de la hibridación molecular con poli 15 y sonda CMV a las plantas marcadas, por sector y muestreo.....	42
Tabla 7. Resultados de la hibridación molecular con sondas específicas a TSWV, EMDV, TYLCV y TYLCSV a las plantas marcadas, por sector y muestreo.	43
Tabla 8. Plantas positivas a CMV, producción bruta, destrío y producción neta para cada sector.....	47
Tabla 9. Resultados de la hibridación molecular con Poli 15 y sondas específicas a CMV, TSWV, EMDV y TYLCV a las plantas marcadas por los agricultores; por sector y muestreo.	47
Tabla 10. Resultados de la hibridación molecular con poli15 a las plantas injertadas procedentes de semilleros a los 0 días y a los 45 días del trasplante.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la superficie del cultivo de tomate a nivel mundial. Datos: FAO 2009. (Estévez, 2013).....	2
Figura 2. Evolución de la producción de tomate a nivel mundial. Datos: FAO 2009. (Estévez, 2013).....	2
Figura 3. Evolución de la superficie del cultivo de tomate en España según época de recolección (MAGRAMA, 2012).	3
Figura 4. Evolución de la producción de tomate en España según época de recolección (MAGRAMA, 2012).....	4
Figura 5. Frutos de tomate cherry pera de las variedades Ministar, Luciplús y Santa. (Estévez, 2007).....	5
Figura 6. Evolución de la superficie del cultivo de tomate cherry en Granada (Estévez, 2013).	5
Figura 7. Sintomatología observada en frutos de tomate cherry de la Cooperativa Granada-La Palma en verano.....	7
Figura 8. Síntomas asociados a CMV en tomate.....	14
Figura 9. Síntomas asociados a TSWV en tomate.	16
Figura 10. Síntomas asociados a rizado amarillo en tomate.	17
Figura 11. Síntomas asociados a ToCV	18
Figura 12. Síntomas asociados a EMDV en tomate.....	19
Figura 13. Situación geográfica de la finca EcoA en Fornes (Granada) donde ha tenido lugar el ensayo de agrotexiles	26
Figura 14. Distribución de los sectores 1, 2, 3 y 4 en los invernaderos de la finca EcoA, densidad de hilos de las mallas ensayadas en cada sector y distribución de las trampas pegajosas y rafia.	28
Figura 15. Malla de 8x16 perimetral empleada en el Sector 3 (izquierda) y malla 8x10 en el techo.	29
Figura 16. Marco de plantación y emparrillado en uno de los sectores del ensayo.	31
Figura 17. Plántulas procedentes de semillero para su análisis.	40
Figura 18. Plántulas de tomate en fitotrón a los 45 días post-trasplante.	41
Figura 19. Síntomas de CMV en plantas de tomate de los sectores 1 y 2 de los invernaderos EcoA.....	44
Figura 20. Distribución esquemática de las plantas en los invernaderos. Sectores 1 y 2. 1º Muestreo de 12 de mayo de 2014.	49
Figura 21. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus, seleccionadas y sintomáticas marcadas por el agricultor. Sectores 1 y 2. 2º Muestreo de 23 de junio de 2014.	50
Figura 22. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus, seleccionadas y sintomáticas marcadas por el agricultor. Sectores 1 y 2. 3º Muestreo de 30 de julio de 2014.	51
Figura 23. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus, seleccionadas y sintomáticas marcadas por el agricultor. Sectores 1 y 2. 4º Muestreo de 5 de septiembre de 2014.....	52
Figura 24. Distribución esquemática de las plantas en los invernaderos. Sectores 3 y 4. 1º Muestreo de 12 de mayo de 2014.	53

Figura 25. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus. Sectores 3 y 4. 2º Muestreo de 23 de junio de 2014.	54
Figura 26. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus, seleccionadas y sintomáticas marcadas por el agricultor. Sectores 3 y 4. 3º Muestreo de 30 de julio de 2014.	55
Figura 27. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus, seleccionadas y sintomáticas marcadas por el agricultor. Sectores 3 y 4. 4º Muestreo de 5 de septiembre de 2014.....	56
Figura 28. Visualización de los productos obtenidos de la digestión con <i>Mlu</i> I de los productos de la RT-PCR realizada con los cebadores descritos por Finneti-Sialer <i>et al.</i> (1999).....	58
Figura 29. Visualización de los productos obtenidos de la digestión con <i>Hpa</i> I de los productos de la RT-PCR realizada con los cebadores descritos por Deyong <i>et al.</i> (2005).....	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cultivo del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L. =*Lycopersicon esculentum* Mill.=*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Fawell) es una planta originaria del continente americano y pertenece a la familia *Solanaceae*. Es una planta cultivada normalmente como anual, pero cuya duración vegetativa en condiciones climáticas favorables puede prolongarse varios años (Maroto, 2002).

Su alto contenido en vitaminas hace que el tomate sea una de las hortalizas de gran uso en la alimentación humana tanto a través de su consumo en fresco como tras su industrialización, en forma de conservas de frutos pelados, zumos concentrados, salsas, etc.

En el tomate se distinguen las siguientes variedades botánicas (Maroto, 2002):

- Var. *commune*: de hojas pequeñas y frutos con numerosos lóculos lisos.
- Var. *cerasiforme*: de hojas pequeñas y frutos globulares de pequeño tamaño. A esta variedad pertenecen los cultivares englobados bajo el nombre de Cherry.
- Var. *pyriforme*: frutos aperados.
- Var. *validum*: de porte erecto, y desarrollo bajo.
- Var. *grandifolium*: hojas anchas y planas.

A nivel mundial, según datos estadísticos de 2009 de la FAO, tanto la superficie cultivada como la producción de tomate, en el decenio 1999-2009, han ido incrementándose año tras año. En cuanto a la superficie cultivada, se observan máximos históricos en el trienio 2004-2006, en el año 2006 aparece un total de 4.639.810 ha. En el último año de datos, 2009, se alcanzan 4.393.045 ha (Figura 1). En cuanto a la producción, sin embargo, el 2009 es el año en que se alcanza el máximo de producción mundial de tomate con 152.956.115 t (Figura 2) (Estévez, 2013).

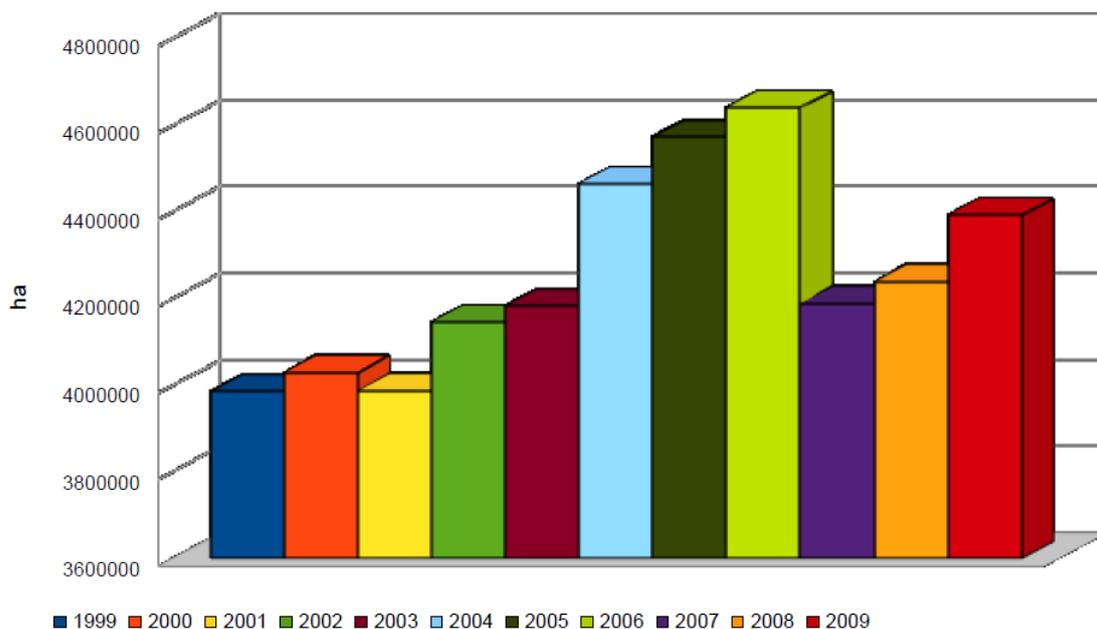


Figura 1. Evolución de la superficie del cultivo de tomate a nivel mundial. Datos: FAO 2009. (Estévez, 2013).

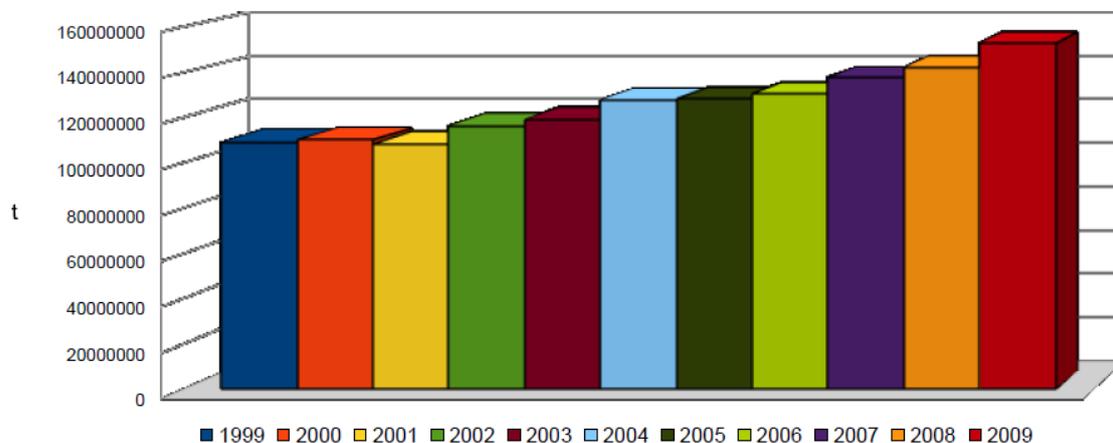


Figura 2. Evolución de la producción de tomate a nivel mundial. Datos: FAO 2009. (Estévez, 2013).

En el anuario de Estadística Agraria 2013 del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, la superficie y producción española de tomates del 2012 se distribuye en función de la época en que se recolecta, en los siguientes grupos:

- *Tomates recolectados entre el 1 de enero y el 31 de mayo:* 7.086 ha y 652.744 toneladas; siendo Almería, Murcia y Granada las provincias con mayor tonelaje.
- *Tomates recolectados entre el 1 de junio y el 30 de septiembre:* 29.889 ha y 2.292.602 toneladas; siendo Badajoz, Granada y Sevilla las provincias con mayor producción.
- *Tomates recolectados entre el 1 de octubre y el 31 de diciembre:* 11.641 ha y 1.101.607 toneladas; siendo Almería, Murcia y Navarra las provincias con mayor producción.

Las figuras 3 y 4 muestran la evolución de la superficie del cultivo de tomate y la producción en España en el decenio 2002-2012 según época de recolección.

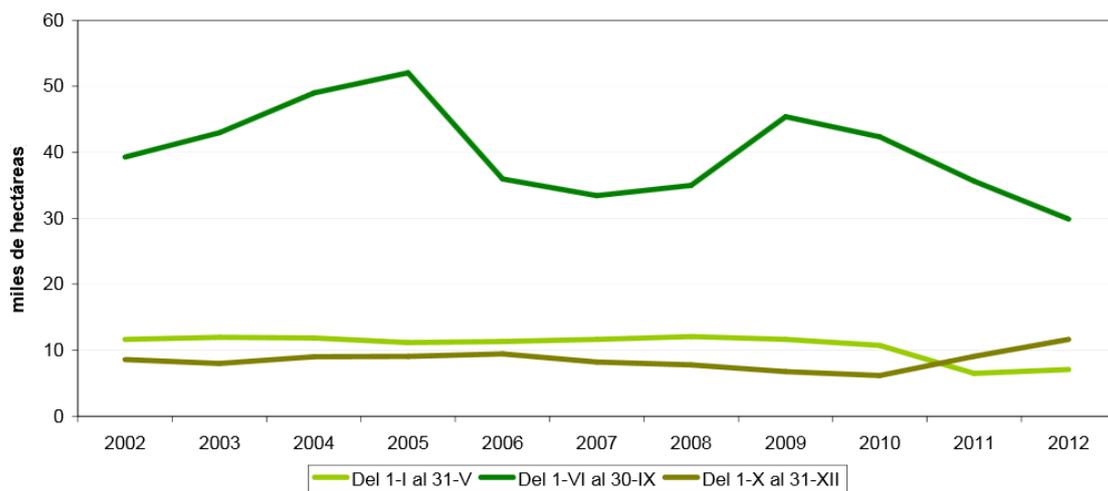


Figura 3. Evolución de la superficie del cultivo de tomate en España según época de recolección (MAGRAMA, 2012).

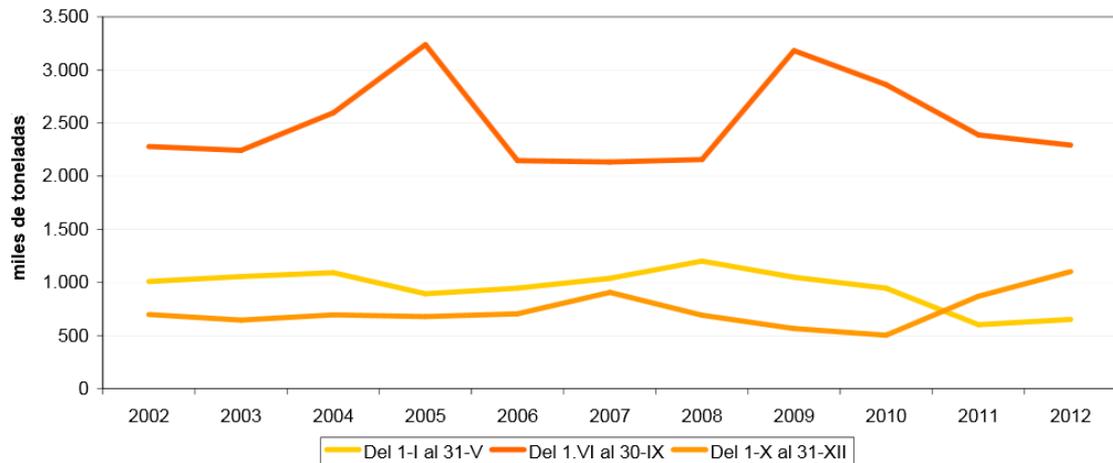


Figura 4. Evolución de la producción de tomate en España según época de recolección (MAGRAMA, 2012).

Siendo el total de superficie dedicada al cultivo del tomate en España en 2012 de 48.617 ha, de las cuales 18.501 fueron en regadío protegido, habiéndose obtenido una producción de 4.046.413 toneladas. Las provincias con mayor producción total de tomates fueron Almería, Badajoz y Granada.

1.2 El tomate cherry

El tomate cherry o tomate cereza *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Peralta *et al.*, 2005), presenta una gran diversidad de formas y colores. Comercialmente, el concepto “cherry” hace referencia a aquellos frutos de tomate con un calibre siempre inferior a 35 mm. De ésta manera y en primer lugar podemos establecer una clasificación por formas, forma redondeada (conocido como cherry suelto) y forma aperada (conocido como cherry pera). Por otro lado, existen diversas formas de recolección de los frutos, una recolección en suelto (sin cáliz) y otra recolección en ramo (frutos en la rama, cogidos por su cáliz).

Entre las variedades de tomate cherry cultivadas en España podemos citar: Josefina, Lupita, Katalina, Natasha, Salomé como variedades de forma redonda; Santa, Lucinda, Ministar y Luciplús como variedades de pera (Figura 5).



Figura 5. Frutos de tomate cherry pera de las variedades Ministar, Luciplus y Santa (Estévez, 2013).

La superficie de tomate cherry en la provincia de Granada ha ido aumentando desde 1999 con 16 ha, hasta 755 ha en 2008 (Figura 6).

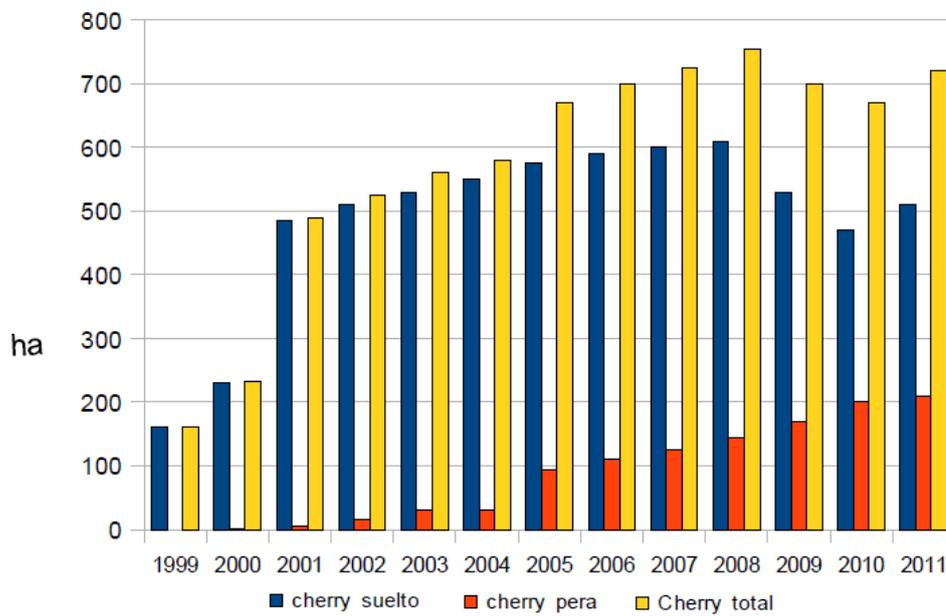


Figura 6. Evolución de la superficie del cultivo de tomate cherry en Granada (Estévez, 2013).

1.3. La Cooperativa Granada-La Palma y su producción de tomate de verano.

La Cooperativa Granada La Palma es una cooperativa de agricultores fundada en 1973 que agrupa a 641 agricultores de diversas zonas de la provincia de Granada como Albuñol, Vélez Benaudalla, Cúllar, Zújar, Los Ríos, Málaga, Motril y el llano de Carchuna. La superficie de cultivo en 2014 alcanza las 854 ha, lo que representa el 25% de la superficie productiva de Granada, con una producción de 75.774 toneladas. El 93% de su producción lo destina a la exportación, mayoritariamente, a los mercados europeos, lo que representa el 8,90% del valor de las exportaciones de tomate en España. Estos datos sitúan a la Cooperativa Granada La Palma como la decimoquinta mayor empresa hortofrutícola de España. Su principal producción son distintos cultivares de tomate cherry, que comercializa bajo el nombre de *Tomate Cherry Clásico*, *Tomate Cherry Rama*, *Tomate Cherry Amarillo*, *Tomate Cherry Pera Clásico*, *Tomate Cherry Pera Amarillo*, *Tomate Cherry Pera Naranja*, *Tomate Cherry Fresa*, *Mini Chocmato Pera* y *Tomate Cherry Selección Premium*.

Durante los años 2007 y 2008 se observaron en cultivos de calabacín y tomate cherry en zonas productoras próximas al pantano de los Bermejales en Fornes (Granada) puntualmente síntomas de posible etiología viral, detectándose el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV). En 2009 y 2010 este problema fitosanitario se fue extendiendo entre las zonas productoras de la Cooperativa Granada-La Palma del sureste y noreste de Granada (Fornes y Zújar) convirtiéndose en un problema para el cultivo de tomate cherry de verano. El resultado era una merma importante de la producción. Los propios agricultores clasificaron la sintomatología observada en los frutos con tres denominaciones:

- Fruto con tripilla dura: el fruto presenta una reducción del mesocarpio, textura dura y maduración irregular (Figura 7A).
- Fruto con tripilla blanda: el fruto presenta una reducción del mesocarpio acompañada de una pérdida de dureza total o parcial y con maduración irregular (Figura 7B).
- Fruto manchado duro (Figura 7C)

Al cortar los frutos con tripilla se observaba una reducción del mesocarpio (Figura 7D).



Figura 7. Sintomatología observada en frutos de tomate cherry de la Cooperativa Granada-La Palma en verano. A. Frutos con tripilla dura. B. Frutos con tripilla blanda. C. Frutos manchado y duro. D. Fruto con reducción del mesocarpio.

En septiembre de 2011, el Grupo de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM) de la Universitat Politècnica de València (UPV) recibió muestras de tomate sintomáticas de la Cooperativa Granada-La Palma. En una primera aproximación al diagnóstico se detectó CMV en infección mixta con el virus del enanismo moteado de la berenjena (*Eggplant mottled dwarf virus*, EMDV), detectado por primera vez en Almería ese mismo verano. EMDV es un virus que en los últimos años ha aumentado su dispersión en España y el rango de hospedantes naturales. Sin embargo, poco se sabe sobre su transmisión por semilla o de los vectores implicados en su dispersión en España. En 2011, el 64,7% de las plantas analizadas resultaron positivas a EMDV, el 58,8% resultó positivo a CMV, y el 29% de las plantas sintomáticas presentaban infección mixta de EMDV y CMV.

En 2012, el grupo de Virología del IAM-UPV firmó un contrato de colaboración con la Cooperativa Granada-La Palma para el estudio de las virosis implicadas en el problema fitosanitario que afectaban a los cultivos de tomate cherry de verano. Este contrato fue renovado en 2013 ampliándose a los cultivos de tomate de invierno, en los que se detectó la presencia de PepMV (*Pepino mosaic virus*), ToCV (*Tomato chlorosis virus*), EMDV, ToMV (*Tomato mosaic virus*), TSWV (*Tomato potted wilt virus*), TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) y TYLCSV (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*)

Entre los estudios llevados a cabo en 2013, se realizó un ensayo en un invernadero 1000 m² de tomate cherry de la Coop. Granada-La Palma en Fornes con mallas de distintas densidades para evaluar la posible protección del cultivo frente a los vectores virales detectados años anteriores y comparar su eficacia con el control de áfidos con un insecticida. La variedad de tomate empleada en este estudio fue Guindo injertada sobre Beaufort. El invernadero se dividió en cuatro subparcelas de 250 m² y en cada una de ellas se realizó los siguientes ensayos:

- **Ensayo 1:** malla de 6x6 hilos/cm² en perímetro y techo y sin tratamientos adicionales (subparcela control)
- **Ensayo 2:** malla de 10x20 hilos/cm² en el perímetro y de 6x6 hilos/cm² en techo durante todo el cultivo.
- **Ensayo 3:** malla de 10x20 hilos/cm² instalada en perímetro y en el techo durante todo el cultivo.
- **Ensayo 4:** malla de 6x6 hilos/cm² en perímetro y techo y aplicación de Confidor desde el inicio de cultivo y durante el todo el ciclo. Las aplicaciones se realizaron de forma localizada con el riego.

La malla de 6x6 hilos/cm² es la usada habitualmente por los productores de tomate bajo protección de la zona de Fornes (Granada) para resguardar las plantas del viento.

En este estudio se realizaron 3 muestreos al azar en julio, agosto y septiembre de 2013. Las muestras se analizaron para detectar la presencia de CMV y EMDV. Los resultados en porcentajes de plantas infectadas detectadas se recogen en la Tabla 1.

En 2013, las infecciones por EMDV se redujeron bastante en comparación con años anteriores, en cambio la infección por CMV fue la mayoritaria. La subparcela donde se empleó la malla de 10x20 hilos/cm², instalada en perímetro y en el techo durante todo el cultivo (ensayo 3), fue la que presentó menor porcentaje de plantas infectadas. La subparcela donde se empleó la malla de 6x6 hilos/cm², aislamiento tradicionalmente usado por la cooperativa, fue la que mostró un mayor porcentaje de plantas infectadas; por lo tanto el empleo de este tipo de malla no es aconsejable para reducir la incidencia de EMDV y CMV ya que no impide la entrada de sus vectores.

En los resultados obtenidos en el ensayo de aislamiento se observó una mayor producción en el aislamiento tradicional combinado con tratamientos químicos y la menor producción en el aislamiento con 10x20 hilos/cm² instalada en perímetro y en el techo durante todo el cultivo. Sin embargo el destrío fue menor en el aislamiento con 10x20 hilos/cm² instalada en perímetro y en el techo durante todo el cultivo que en el resto de ensayos (Tabla 2).

El aislamiento con 10x20 hilos/cm² instalada en perímetro y en el techo durante todo el cultivo, por tanto, resultó eficaz en el control de las virosis por ofrecer menor porcentaje de plantas infectadas, y presentar menor destrío; sin embargo, la producción fue menor porque el empleo de mallas con mayor cantidad de hilos por cm² empeora las condiciones climáticas del invernadero al reducir la insolación y la aireación, por lo que las plantas son más débiles que en subparcelas donde se usa la malla tradicional.

El presente trabajo de investigación parte de la necesidad de ensayar nuevos agrotexiles, que además de controlar la entrada de los vectores virales del CMV y EMDV, mejoren las condiciones climáticas dentro de los invernaderos para poder obtener rendimientos aceptables.

Tabla 1. Porcentaje de plantas positivas a EMDV y CMV en los diferentes ensayos en 2013

Ensayo	Aislamiento y tratamiento	% de plantas positivas a EMDV			% de plantas positivas a CMV		
		Julio	Agosto	Septiembre	Julio	Agosto	Septiembre
1	6x6 hilos/cm ²	0	14,3	0	86,7	71,6	85
2	10x20 hilos/cm ² perimetral y 6x6 hilos/cm ² en techo	0	5,6	0	20	31,2	78,9
3	10x20 hilos/cm ² perimetral y techo	0	0	0	0	0	71,4
4	6x6 hilos/cm ² y Confidor	0	6,7	0	33,3	86,6	72,3

10

Tabla 2. Producción y destrío en Kg/planta en los diferentes ensayos en 2013.

Ensayo	Aislamiento y tratamiento	Kg producción/planta y sector			Kg destrío/planta y sector		
		Julio	Agosto	Julio	Agosto	Julio	Agosto
1	6x6 hilos/cm ²	2,35	1,97	2,35	1,97	2,35	1,97
2	10x20 hilos/cm ² perimetral y 6x6 hilos/cm ² en techo	1,6	2,6	1,6	2,6	1,6	2,6
3	10x20 hilos/cm ² perimetral y techo	1,6	2,38	1,6	2,38	1,6	2,38
4	6x6 hilos/cm ² y Confidor	2,63	2,12	2,63	2,12	2,63	2,12

1.4. Principales virosis en tomate.

Las enfermedades causadas por virus son muy difíciles de controlar y pueden resultar en pérdidas sustanciales del cultivo. Su incidencia y severidad variarán entre estaciones de cultivo debido a la interacción que existe entre el patógeno, la planta y el ambiente (Jones *et al*, 2001). La incidencia de enfermedades ocasionadas por virus es muy alta en España, sobre todo en cultivos sin protección en la región Mediterránea, siendo el origen de la semilla uno de los principales factores de la incidencia (Soler *et al.*, 2010). Las virosis de mayor relevancia en el cultivo del tomate se recogen en la tabla 3.

Tabla 3. Virosis de mayor relevancia en cultivo de tomate (Blancard, 2011; Alfaro-Fernández *et al*, 2013).

Virus	Acrónimo	Familia (género)	Método de transmisión
Virus del mosaico de la alfalfa (<i>Alfalfa mosaic virus</i>)	AMV	<i>Bromoviridae</i> (<i>Alfamovirus</i>)	Áfidos.
Virus del mosaico del pepino (<i>Cucumber mosaic virus</i>)	CMV	<i>Bromoviridae</i> (<i>Cucumovirus</i>)	Semilla. Áfidos.
Virus del enanismo moteado de la berenjena (<i>Eggplant mottled dwarf virus</i>)	EMDV	<i>Rhabdoviridae</i> (<i>Nucleorhabdovirus</i>)	Cicadélidos.
Virus del mosaico del pepino dulce (<i>Pepino mosaic virus</i>)	PepMV	<i>Flexiviridae</i> (<i>Potexvirus</i>)	Mecánica, abejorros en la polinización y semilla (escasa proporción).
Virus del jaspeado de la parietaria (<i>Paretaria mottle virus</i>)	PMoV	<i>Bromoviridae</i> (<i>Ilarvirus</i>)	Trips
Virus Y de la patata (<i>Potato virus Y</i>)	PVY	<i>Potyviridae</i> (<i>Potyvirus</i>)	Áfidos.
Virus de las manchas zonales del Pelargonium (<i>Pelargonium zonate spot virus</i>)	PZSV	<i>Bromoviridae</i> (<i>Anulavirus</i>)	Semilla
Virus de la clorosis infecciosa del tomate (<i>Tomato infactious chlorosis virus</i>)	TICV	<i>Closteroviridae</i> (<i>Crinivirus</i>)	Aleuródidos.
Virus del mosaico del tabaco (<i>Tobacco mosaic virus</i>)	TMV	<i>Virgaviridae</i> (<i>Tobamovirus</i>)	Mecánica.
Virus de la clorosis el tomate (<i>Tomato chlorosis virus</i>)	ToCV	<i>Closteroviridae</i> (<i>Crinivirus</i>)	Por aleuródidos
Virus del mosaico del tomate (<i>Tomato mosaic virus</i>)	ToMV	<i>Virgaviridae</i> (<i>Tobamovirus</i>)	Mecánica y semilla.
Virus del "torrao" del tomate (<i>Tomato torrado virus</i>)	ToTV	<i>Secoviridae</i> (<i>Torradovirus</i>)	Aleuródidos
Virus del bronceado del tomate (<i>Tomato spotted wilt virus</i>)	TSWV	<i>Bunyaviridae</i> (<i>Tospovirus</i>)	Trips y semilla.
Virus del rizado amarillo del tomate (<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>)	TYLCV	<i>Geminiviridae</i> (<i>Begomovirus</i>)	Aleuródidos

A continuación se detallan las virosis de mayor relevancia para el presente ensayo.

1.4.1. Virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

El virus del mosaico del pepino se citó por primera vez en 1916 causando una enfermedad que afectaba a melón y pepino en Michigan (Estados Unidos). Desde esa fecha se ha extendido por zonas templadas, tropicales y subtropicales de todo el mundo. En España fue citado causando necrosis en 1992 (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

Pertenece a la familia *Bromoviridae*, género *Cucumovirus*. El CMV es un virus formado por tres tipos de partículas isométricas de aproximadamente 28 nm de diámetro compuestas por un 18% de ácido nucleico. Genoma tripartito de ARN monocatenario de sentido positivo correspondiente a cuatro ARNs. En ocasiones presenta ARNs satélites (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

Hay descritos más de 1200 huéspedes en más de 100 familias mono y dicotiledóneas. En España está descrito en numerosas especies de las familias *Solanaceae* y *Cucurbitaceae* como pepino, tomate, pimiento, berenjena, melón, sandía, calabacín; y también en otros cultivos como garbanzo, judía, remolacha o en plantas ornamentales como geranio, crisantemo y tulipán (Melgarejo *et al.*, 2010).

Los síntomas (Figura 8) son extraordinariamente variables debido al gran número de aislados diferentes de la entidad viral, dada la complejidad de la composición de la partícula. A ello se añade la posible presencia de ARNs satélites que modifican la expresión del virus. En tomate produce enanismo de la planta, acortamiento de entrenudos, distorsión de hojas, jaspeado en hojas jóvenes, reducción del limbo foliar hasta llegar al filiformismo o aspecto de hoja de helecho, lesiones y manchas necróticas en limbo foliar y frutos. Cuando el CMV presenta ARNs satélites necrogénicos (CARNA-5) causa estrías necróticas en el tallo y peciolo y necrosis en fruto, llegando a la muerte de la planta (Melgarejo *et al.*, 2010; Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

Se transmite por áfidos de forma no persistente y por semilla con un porcentaje de transmisión del 0,2% en tomate (Van Koot, 1949). Hay citadas más de noventa especies de áfidos vectoras, pero las más eficientes son *Aphis gossypii* y *Myzus persicae* (Blancard, 2011).

Existen distintas cepas de CMV que se agrupan en dos grupos (I y II) basándose en sus propiedades serológicas, hibridación de sus ácidos nucleicos, composición de secuencias nucleotídicas o proteicas y análisis RFLPs. Asimismo, el grupo I ha sido subdividido en dos subgrupos IA y IB en base a datos de sus secuencias. El grupo II domina en las zonas templadas y el grupo I en las zonas tropicales y subtropicales. Los síntomas son extraordinariamente variables debido al gran número de aislados diferentes y la complejidad de la composición de la partícula. A ello se añade la posible presencia de ARN satélites que modifiquen la expresión del virus (como el CARNA-5).

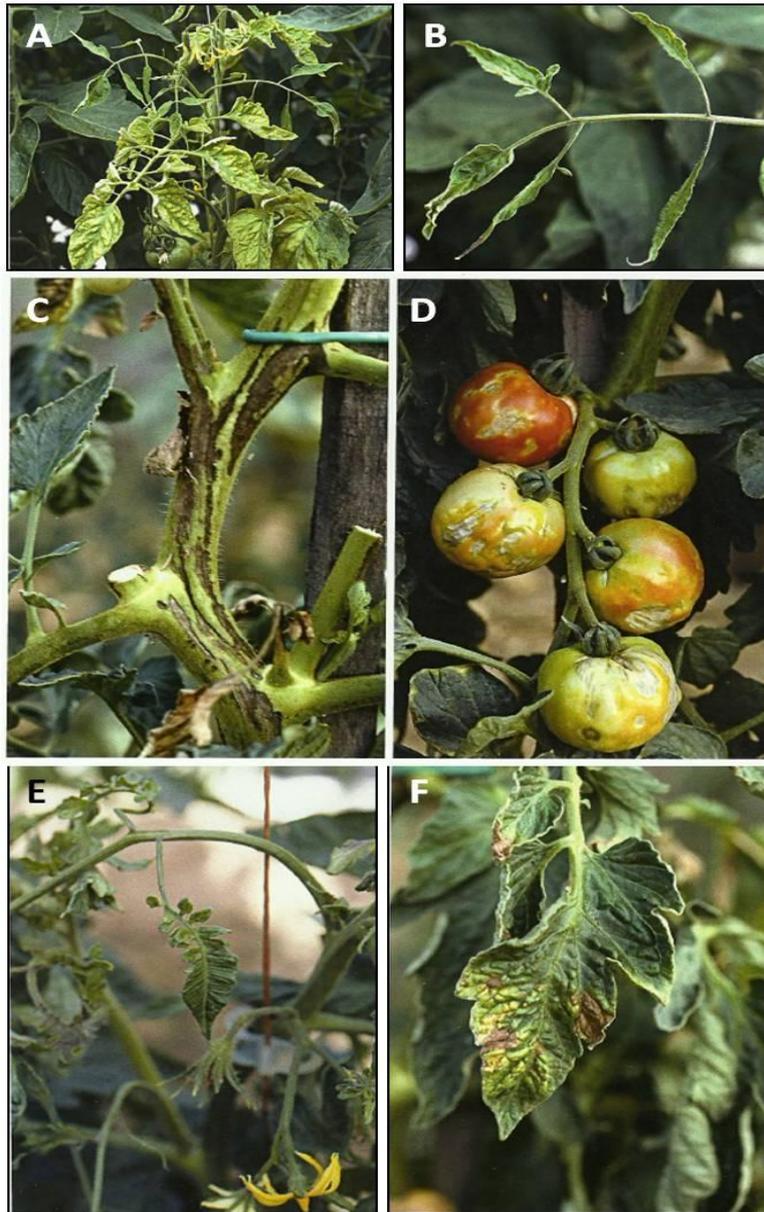


Figura 8. Síntomas asociados a CMV en tomate. A. Jaspeado y filiformismo en foliolos. B. Filiformismo. C. Estrías necróticas en el tallo por CARNA-5. D. Lesiones necróticas irregulares de tinte blanquecino en frutos. E. Foliolo de aspecto de hoja de helecho. F. Lesiones necróticas y cloróticas en el limbo de este foliolo (Blancard, 2011).

1.4.2. Virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*)

La enfermedad causada por el virus del bronceado del tomate se considera una de las más destructivas que afectan a hortalizas y ornamentales, al ser transmitida por trips, que son insectos polenófagos. Presenta un amplio rango de huéspedes con más de 500 especies (Melgarejo *et al.*, 2010).

Pertenece a la familia *Bunyaviridae* y género *Tospovirus*. Su partícula viral es isométrica y su tamaño de 80 y 110 nm de diámetro. Contiene tres cadenas de ARN monocatenario de sentido negativo (L, M, S). Las cadenas L, M y S presentan tamaños de 8,9; 5,4 y 2,9 kb, respectivamente. Las partículas del virus contienen tres proteínas estructurales: una de la nucleocápsida interna N y dos proteínas en la envuelta que son glicosiladas. Contiene pequeñas cantidades de una proteína L asociada con la nucleocápsida interna codificada por la cadena de ARN L. Este virus presenta una alta variabilidad y se encuentra localizado en las células vegetales, en paquetes dentro del retículo endoplasmático, además induce inclusiones amorfas o viroplasmos (Melgarejo *et al.*, 2010).

El TSWV es un virus muy complejo, presentando una gran variedad de cepas diferentes y con gran facilidad de aparición de cepas resistentes y más virulentas. Los síntomas pueden ser muy variables (Figura 9). En tomate, el síntoma más típico y que da nombre a la enfermedad es la aparición de amarilleo con tonos violáceos y manchas bronceadas sobre las hojas jóvenes, seguida de una parada del crecimiento y necrosis. En las plantas jóvenes puede provocar la muerte de las mismas. También puede observarse asimetría en los folíolos pudiéndose observar un plegamiento de los mismos hacia el haz. En fruto aparecen manchas circulares de colores rojo-anaranjado o rojo-verde, y en ocasiones manchas circulares necróticas y arabescos (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

Se transmite por tisanóperos, entre ellos *Frankliniella occidentalis* Pergande, *Frankliniella schultzei* Trybom, *Frankliniella fusca* Hinds, *Thrips tabaci* Lindeman. La transmisión es de forma persistente circulativa propagativa, es decir lo adquieren las larvas y lo transmiten los adultos (Melgarejo *et al.*, 2010). No tiene transmisión mecánica natural y no se ha demostrado la transmisión del virus por semilla de tomate (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

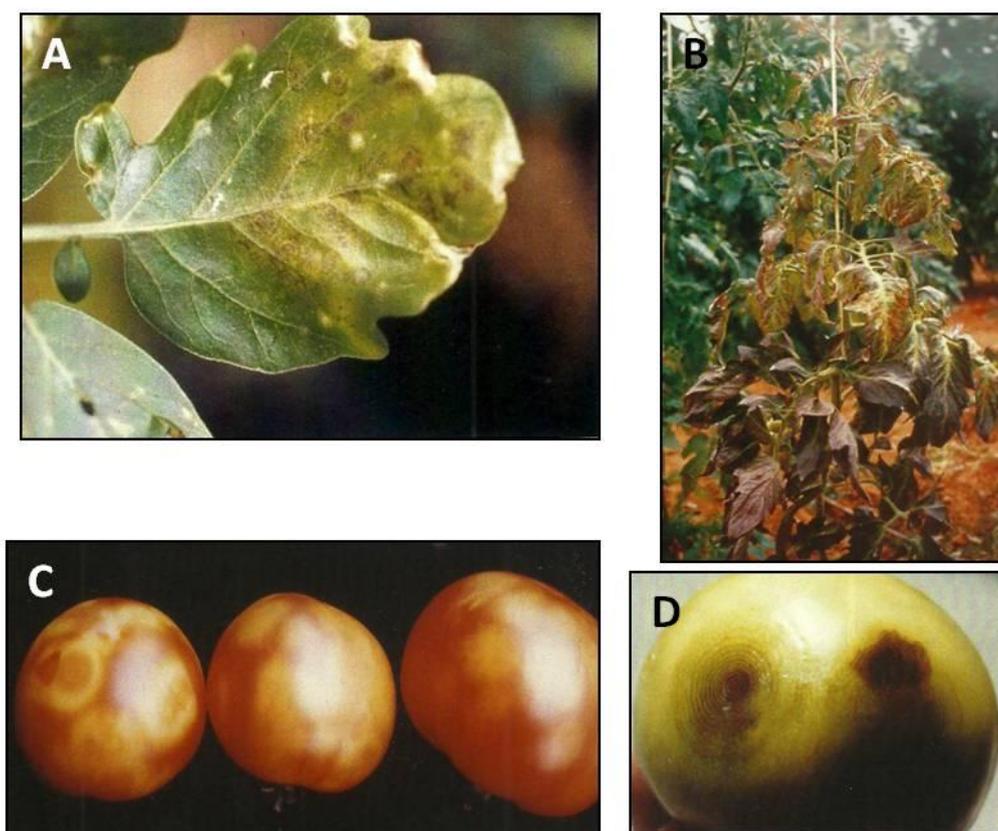


Figura 9. Síntomas asociados a TSWV en tomate. A. Amarilleo y manchas de color bronce anilladas. B. Amarilleo, tonos violáceos y bronce de las hojas. C. Manchas circulares en fruto de tomate. D. Manchas circulares necróticas y arabescos en fruto de tomate (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

1.4.3. Virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl disease*, TYLCD) puede estar causada por un complejo de virus del género *Begomovirus* de la familia *Geminiviridae*, que pueden llegar a reducir severamente la producción de los cultivos de todo el mundo y que reciben todos el nombre de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Entre las especies virales de este complejo encontramos: *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV), *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV), *Tomato yellow leaf curl Kanchanabur virus* (TYLCKaV), *Tomato yellow leaf curl Guangdong virus* (TYLCGuV), *Tomato yellow leaf curl Málaga virus* (TYLCMaIV), *Tomato yellow leaf curl Mali virus* (TYLCMLV), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) y *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

Como en otros virus sucede, los síntomas desarrollados en las plantas infectadas están influenciados por las condiciones ambientales, la precocidad e intensidad de la infección, la variedad del cultivo y el aislado del virus. En tomate se observa una parada del desarrollo; los folíolos se enrollan hacia el haz a lo largo del nervio (acucharado del folíolo); clorosis en los bordes, reducción del tamaño y deformación de los folíolos; pueden observarse, en ocasiones, matices violáceos en el envés de las hojas (Figura 10). Abscisión de flores y frutos cuajados más pequeños y de color más pálido (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

Los geminivirus poseen partículas virales geminadas de 18x30 nm formadas por 22 capsómeros pentaméricos, que se organizan constituyendo 2 icosaedros incompletos unidos por una de sus caras. Afecta principalmente a tomate, aunque también ha sido citado en pimiento, tabaco y judía principalmente. El virus se transmite por la mosca blanca del algodón *Bemisia tabaci* (Gennadius) de forma persistente, circulativa, propagativa y capaz de pasar a la progenie (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).



Figura 10. Síntomas asociados a rizado amarillo en tomate. A. Achaparramiento y amarilleo. Foliolos con reducción del limbo, amarilleo y enrollados hacia el haz. B. Acucharado de folíolos (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

1.4.4. Virus de la clorosis del tomate (*Tomato chlorosis virus, ToCV*)

Virus originario de Estados Unidos, perteneciente a la familia *Closteroviridae* y al género *Crinivirus*; con partículas virales que miden 800-850 x 12 nm.

Las plantas de tomate infectadas presentan los primeros síntomas en las hojas bajas e intermedias, con un amarilleo internervial, las hojas viejas se enrollan y se vuelven quebradizas (Figura 11). Los frutos no presentan síntomas pero ven retardado su crecimiento y maduración. La transmisión es por aleuródidos de modo semipersistente: *Trialeurodes vaporariorum* (Weswood), *Trialeurodes abutilonea* (Haldeman), y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Blancard, 2011).



Figura 11. Síntomas asociados a ToCV en tomate. Amarilleo y enrollado de hojas (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).

1.4.5. Virus del enanismo moteado de la berenjena (*Eggplant mottled dwarf virus, EMDV*)

El EMDV es miembro de la familia *Rhabdoviridae* y del género *Nucleorhabdovirus*. Afecta a miembros de las familias *Solanaceae* y *Cucurbitaceae*, además de a *Pittosporum tobira*, *Pelargonium peltatum* y *Capparis spinosa*. Los cicadélidos parecen ser los vectores de la enfermedad, aunque no se descarta que los pulgones también puedan serlo (comunicación personal de Dra. M. I. Font).

Las plantas de tomate infectadas presentan enanismo, deformación de hojas y amarilleo de venas. Las hojas adultas pueden presentar rizado, amarilleo y clorosis y finalmente necrosis. Los frutos son pequeños con manchas cloróticas y necróticas (Figura 12) (Alfaro-Fernández *et al.*, 2013).



Figura 12. Síntomas asociados a EMDV en tomate. Hojas con amarilleo y deformación de las hojas. Frutos con maduración irregular (Blancard, 2011).

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

1.5.1. Hibridación molecular no radiactiva

La hibridación molecular se basa en la unión complementaria de ácidos nucleicos (ADN o ARN). Las técnicas de hibridación se utilizan a menudo para detectar una molécula diana partiendo de una sonda complementaria a ella. Su uso extendido en diagnóstico molecular abarca el diagnóstico de enfermedades, la identificación de microorganismos patógenos, el análisis de perfiles de expresión génica, la localización de genes en cromosomas, la detección de ARNm en tejidos *in situ* o la comparación de

especies de patógenos. La sonda y la secuencia diana forman un híbrido que será detectado gracias a que la sonda está marcada ya sea radiactivamente o no. La muestra con el ácido nucleico diana se macera en solución alcalina y se fija a un soporte sólido que puede ser una membrana de nitrocelulosa o de nylon. En la hibridación *dot blot* una pequeña parte (5-10 µl) de un extracto bruto o purificado de la muestra se aplica directamente sobre la membrana. La sensibilidad de la técnica es de 1 pg de secuencia objetivo/ml de jugo (Conti *et al.*, 2001).

El ácido nucleico diana se desnaturaliza, se fija a la membrana para posteriormente hibridarlo con la sonda marcada y así facilitar su detección. La molécula bicatenaria formada durante la hibridación puede ser fácilmente identificada por medio del marcador llevado por la sonda. En la hibridación no radiactiva el marcador utilizado es la digoxigenina, que es un heptano enlazado mediante una larga cadena a la *uridina*. Al final de la reacción de hibridación la digoxigenina se detecta mediante el fragmento Fab de un anticuerpo (Anti-DIG) conectado con la fosfatasa alcalina. La defosforilación de un substrato quimioluminiscente (CSPD®, CDP-Star™) obtenido de la fosfatasa produce una señal luminosa capaz de impresionar un film de autoradiografía (Conti *et al.*, 2001).

Las polisondas son sondas únicas que contienen, fusionadas en tándem, diferentes secuencias virales y/o viroides, para la detección rutinaria de virus y viroides. Un resultado negativo a la misma supone un ahorro en tiempo y coste de análisis específicos, ya que indica que la muestra no está infectada con ninguno de los virus que detecta la polisonda. Por tanto, el uso de la polisonda además de conseguir la detección simultánea de diferentes patógenos, permite realizar prospecciones a gran escala con un procesado simple del tejido, en un tiempo reducido y con una sensibilidad similar al test ELISA y de bajo coste.

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

Es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN original o molde. La utilidad de esta técnica es que

tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con alta probabilidad agentes patógenos, entre ellos los virus vegetales. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo.

Para que tenga lugar la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN específico en muchas copias, se precisa de cuatro componentes principales: el ADN molde, del cual se obtendrá la copia de un fragmento, es decir el ADN a amplificar; la ADN polimerasa, una enzima capaz de generar la copia de ADN ; iniciadores de la reacción, oligonucleótidos, cebadores o primers, que son moléculas cortas de ADN de cadena sencilla entre 10 y 30 bases y sirven como punto de partida para la replicación y delimitan el fragmento a amplificar; y los nucleótidos libres, ya que la ADN polimerasa creará una cadena complementaria a la cadena molde incorporando los nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que ha unido a la cadena molde. Se agregan como desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) (Walker y Rapley, 2009).

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

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

1.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (“Reverse Transcription-PCR”, RT-PCR).

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

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

El análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) se basa en la actividad de las enzimas de restricción o endonucleasas de

restricción. Las enzimas de restricción se pueden utilizar para fragmentar el ADN en sitios conocidos de la variabilidad de modo que los fragmentos resultantes pueden ser analizados. Las enzimas de restricción reconocen secuencias de bases específicas en el ADN doble hélice y cortan en lugares concretos ambas hebras del dúplex que contienen las secuencias reconocidas.

Las enzimas de restricción se utilizan en virología vegetal para cortar longitudes de ADN de ciertas secuencias virales para que se puedan estudiar las diferencias entre virus o especies virales.. Para ello se suelen se emplear enzimas de restricción que reconocen secuencias de 4 a 8 pares de bases en una molécula de ADN de doble hebra y las cortan rompiendo uno de los puentes fosfodiésteres de la molécula. Para que se lleve a cabo la digestión de un fragmento de ADN se necesita: producto obtenido en la PCR, un enzima de restricción, y la incubación de la mezcla a temperaturas variables en función del enzima empleado. Los fragmentos generados se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% o geles de poliacrilamida (PAGE) que se tiñen con bromuro de etidio para su visualización bajo luz UV. De esta manera es posible ver si hay diferencias entre patrones de banda obtenidos (Walker y Rapley, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Debido a que los virus fitopatógenos dependen de la maquinaria celular de sus hospedantes para poder replicarse, es difícil eliminarlos sin dañar al hospedante. Por lo tanto, las estrategias para el control de enfermedades causadas por virus vegetales están dirigidas a la prevención.

La continuada presencia de CMV desde 2007, así como la detección por primera vez en Granada del EMDV en 2011 provocando graves pérdidas económicas en la producción de tomate cherry de verano en zonas productoras de Fornes y Zújar (norte de Granada), provocó una gran incertidumbre entre los productores de la Cooperativa Granada-La Palma de esta zona. Estudios posteriores realizados en colaboración con la UPV mostraron que el empleo de mallas de 10x20 hilos/cm² en perímetro y techo de las estructuras podían ayudar a reducir la incidencia de estas virosis, aunque la producción no fue la esperada. Ello motivó a la Cooperativa a seguir realizando estudios para determinar la malla más adecuada para frenar la entrada de los vectores virales en los cultivos de tomate de la zona al mismo tiempo que conseguir una buena producción.

El CMV, además de ser transmitido por forma no persistente por más de 90 especies diferentes de áfidos, también es transmitido por semilla de tomate en un 0.2%. En cambio el EMDV no se conoce su transmite por semilla ni tampoco cuál es su vector natural en territorio nacional.

Dada la inexistencia de variedades resistentes como medio de control, éste debe basarse en controlar las vías de la transmisión del virus. La transmisión por áfidos de forma no persistente limita el control de CMV mediante el tratamiento con productos insecticidas debido a su baja o nula eficiencia. Por tanto, la utilización de mallas en puertas y ventanas en el cultivo protegido o el cultivo bajo malla para evitar la entrada del vector, resultan el mejor método de control (Alfaro-Fernández *et al*, 2013).

El presente trabajo de investigación parte de la necesidad de conocer el estado fitosanitario de las plántulas empleadas por los productores, de ensayar nuevos agrotexiles que además de controlar las virosis, mejoren las condiciones climáticas dentro de los invernaderos, así como conocer a qué grupo de CMV pertenecen los aislados que afectan a los cultivos de tomate cherry de verano, dada la severidad de los síntomas observados en plantas infectadas con CMV durante el año de desarrollo del presente trabajo fin de máster (2014).

Por tanto, los objetivos planteados en el presente trabajo son:

- a) Ensayo de agrotexiles para el control de enfermedades virales al impedir la entrada de sus vectores.**
- b) Caracterización molecular del tipo de CMV que afecta a los cultivos de tomate.**
- c) Estudio del estado sanitario de las plántulas de tomate empleadas por los socios de la empresa de la zona norte y de la costa adquiridas de semilleros autorizados.**

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Ensayo de agrotexiles para el control de enfermedades virales transmitidas por vectores.

3.1.1. Ubicación del ensayo

El ensayo de agrotexiles se llevó a cabo en dos invernaderos contiguos de la finca de Ecoagraria (EcoA) en Fornes en la provincia de Granada (España) (Figura 13), a una altitud de 800 metros sobre el nivel del mar.

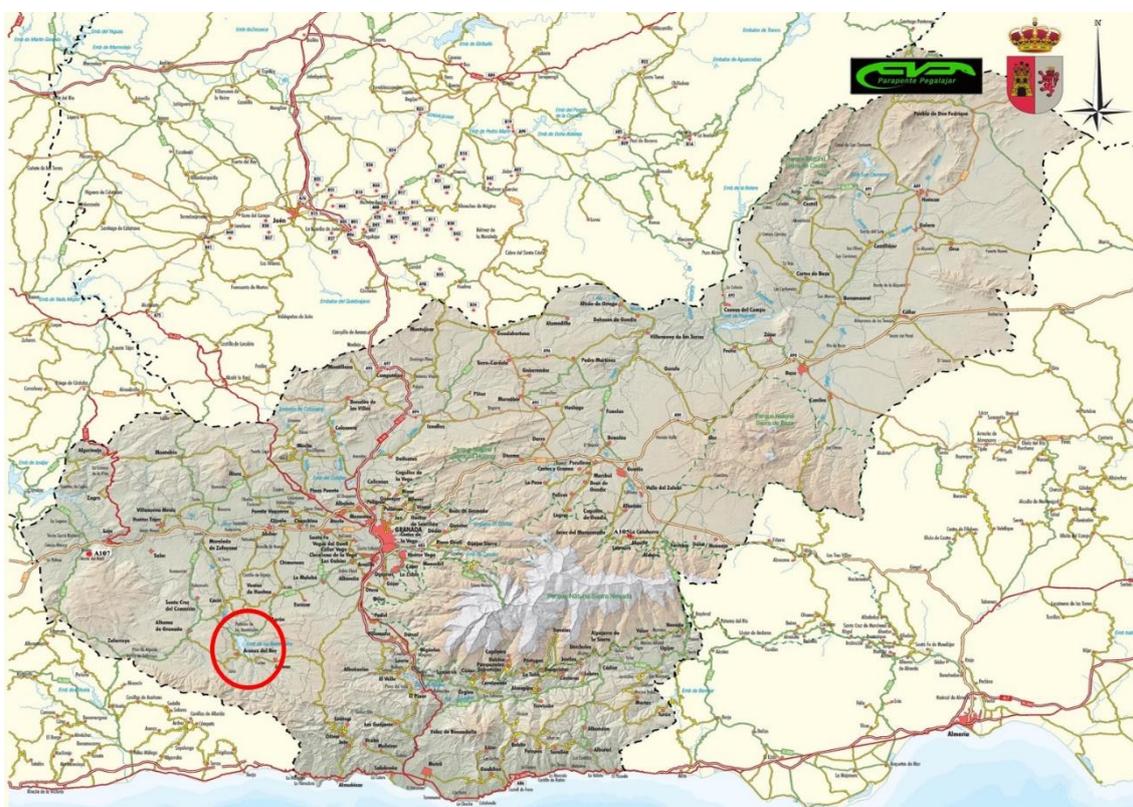


Figura 13. Situación geográfica de la finca EcoA en Fornes (Granada) donde se realizó el ensayo de agrotexiles.

3.1.2. Agrotexiles y sectores

La densidad de las mallas ensayadas (Tabla 4) fueron:

- 6x6 hilos/cm²
- 8x10 hilos/cm²
- 8X16 hilos/cm²

La malla con densidad 6x6 hilos/cm² es la empleada desde hace 15 años en los invernaderos de Fornes como medida de protección contra viento y sol. Se escogieron las nuevas densidades de malla 8x10 y 8x16 hilos/cm² (Figura 14-15) por tener una mejor relación ventilación/hermeticidad frente a los áfidos con porosidad de 51,5% y 46,7% respectivamente, frente al 58,6% de porosidad que tiene la malla 6x6 hilos/cm².

Los dos invernaderos de EcoA se dividen en dos sectores (Figura 14), de aproximadamente 500 m² de superficie cada uno. La tabla 4 muestra el número de plantas cultivadas en cada sector.

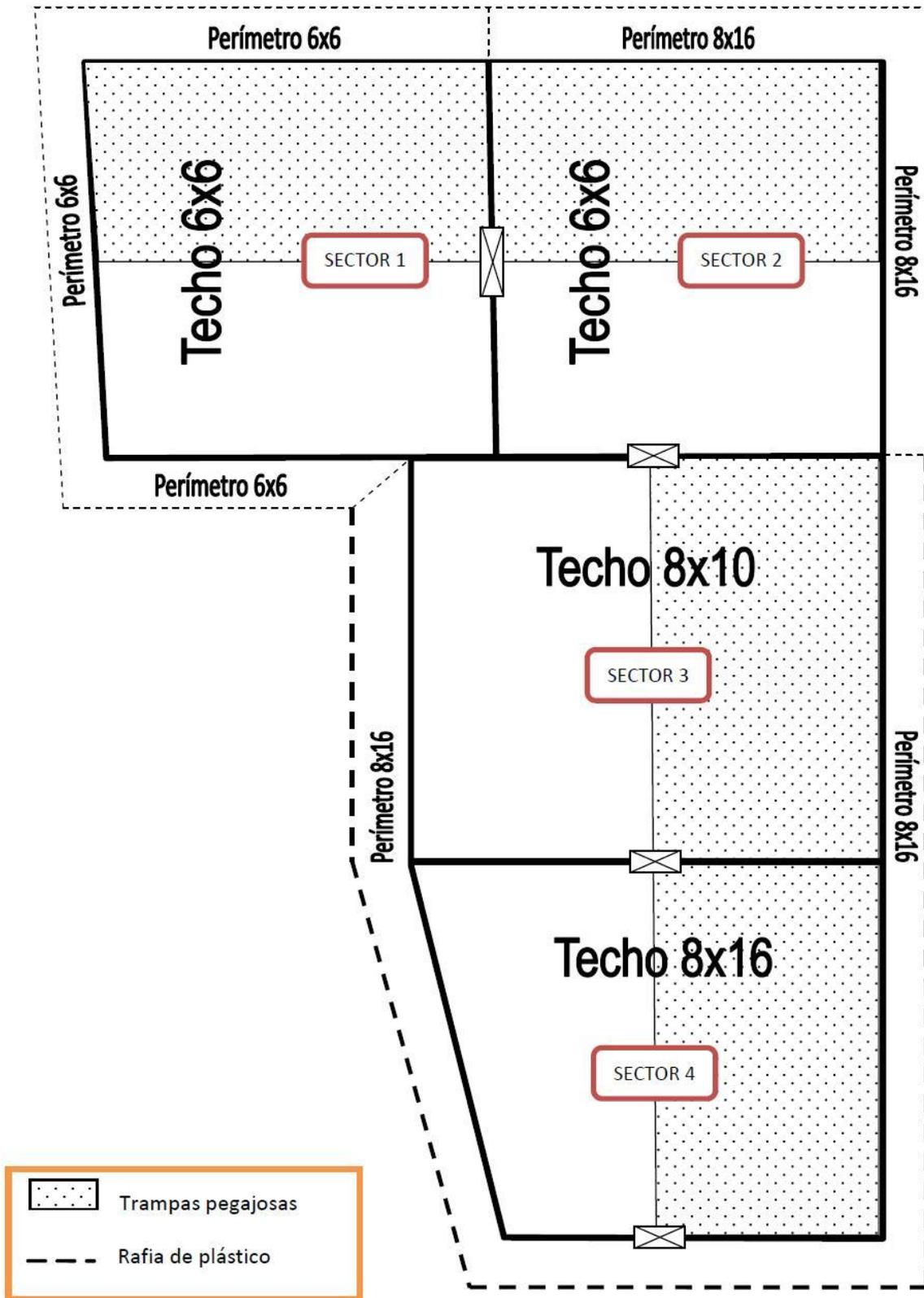


Figura 14. Distribución de los sectores 1, 2, 3 y 4 en los invernaderos de la finca EcoA, densidad de hilos de las mallas ensayadas en cada sector y distribución de las trampas pegajosas y rafia.



Figura 15. Malla de 8x16 perimetral empleada en el Sector 3 (izquierda) y malla 8x10 en el techo.

El 2 de mayo de 2014 se colocó una rafia de plástico en la banda exterior del invernadero que comprende el sector 3 y 4 para evitar daños en los tomates por temperaturas bajas que fue retirada el 12 de mayo de 2014. La ubicación de la rafia se representa en la figura 14.

Para evaluar la incidencia de vectores se colocaron en cada sector 7 trampas pegajosas distribuidas en la mitad de cada sector, es decir, 7 trampas pegajosas en 250 m². La figura 14 muestra la distribución de las trampas pegajosas en la mitad de cada uno de los sectores.

3.1.3. Material vegetal

El cultivar de tomate empleado en el ensayo fue tomate cherry suelto redondo variedad Guindo, injertado sobre Beaufort. La principal ventaja del uso de portainjertos radica en evitar problemas fitopatológicos del suelo. Si bien se observan otras ventajas como son la resistencia a la sequía, adaptación a temperaturas

extremas, encharcamientos y condiciones salinas en el suelo. Por el contrario, bajo ciertas condiciones se ha demostrado que el uso del injerto puede presentar algunos inconvenientes como incompatibilidad, excesivo vigor, problemas en los procesos de diferenciación celular y floración (Estévez, 2013). Concretamente el portainjerto Beaufort induce resistencia a *Meloydogine* spp., *Verticilium dahliae* Kleb. y diversas razas de *Fusarium oxysporum* (Schlect) (Estévez, 2013).

El número de plantas en cada sector osciló de entre 1142 plantas ubicadas en el sector 3 y 842 localizadas en el sector 4 (Tabla 4).

Tabla 4. Densidad de malla ensayada, superficie aproximada y número de plantas a ensayar en los cuatro sectores de los dos invernaderos.

Sector de Invernadero	Superficie	Densidad de malla		Número de plantas
		Techo	Perímetro	
Sector 1	500 m ²	6x6	6x6	1075
Sector 2	500 m ²	6x6	8x16	1037
Sector 3	500 m ²	8x10	8x16	1142
Sector 4	500 m ²	8x16	8x16	882

3.1.4. Ciclo de cultivo y manejo

El cultivo de tomate cherry en la zona norte de Granada se realiza tradicionalmente bajo malla, con un ciclo de cultivo de verano iniciándose la plantación en mayo y fin del cultivo en octubre. Las producciones típicas de verano tienen un máximo de producción en agosto. Las plántulas empleadas en este ensayo procedían de semillero Hortoplant S.L. (Motril, Granada) y la plantación se realizó el 2 de mayo de 2014. El cultivo fue levantado el 2 de octubre de 2014. El periodo de recolección fue desde finales de julio hasta finales de septiembre.

Las condiciones agronómicas en esta zona son: altas temperaturas, elevada insolación y graves problemas patológicos de suelo propios del monocultivo, habiéndose detectado *V. dahliae* y *Phytophthora parasitica* (Estévez, 2013). Por estos motivos, se ha extendido la utilización del injerto en el cultivo del tomate cherry (Estévez, 2013).

El cultivo se desarrolló directamente sobre el suelo, con riego localizado y con unas labores previas de preparación del suelo con un pase de fresadora. El marco de plantación fue de 1 metro entre líneas y 0,50 metros entre plantas alcanzándose una densidad de 2 plantas/m² (Figura 16). En cuanto a las labores sobre el cultivo, las plantas se fueron desarrollando a lo largo del tiempo, se fueron liando sobre el hilo o rafia, de esta manera el desarrollo de la planta se llevó hasta el alambre horizontal del emparrillado, posteriormente se volcó sobre el mismo alambre y el ápice se dejó caer en dirección al suelo para finalizar su desarrollo. El deshojado solo se realizó cuando se había iniciado la recolección (finales de julio), y se quitaron las hojas a la altura de los ramilletes en cosecha, para de esta manera facilitar la misma.



Figura 16. Marco de plantación y emparrillado en uno de los sectores del ensayo.

3.1.5. Diseño del ensayo

Para cada sector se marcaron 100 plantas por sector (10% de las plantas aproximadamente por sector) que fueron elegidas de forma que cubrieran de forma homogénea cada uno de los sectores. A estas plantas fueron analizadas mediante hibridación molecular no radiactiva con una polisonda y sondas específicas en 4

muestreos. En los casos de resultados dudosos, la hibridación se complementó con análisis de PCR y RT-PCR, por ser técnicas que presentan una mayor sensibilidad. Los datos de número de plantas infectadas según el agente causal se juntaron con los datos de producción y destrío para cada sector durante el ciclo de cultivo y sirvieron para evaluar qué densidad de malla es la más aconsejable por permitir una mejor producción con un mayor aislamiento, impidiendo la entrada de pulgones y con ello una menor incidencia de la enfermedad.

Durante el ciclo de cultivo se llevaron a cabo cuatro muestreos, tomando en cada uno de ellos muestra de 100 plantas:

- **1º Muestreo:** 12 de mayo de 2014. El personal de la UPV marcó 100 plantas de tomate en cada sector de forma aleatoria, de las cuáles se tomaron muestras para comprobar su estado fitosanitario.
- **2º Muestreo:** 23 de junio de 2014
- **3º Muestreo:** 30 de julio de 2014
- **4º Muestreo:** 5 de septiembre de 2014.

En cada muestreo se realizó una monitorización de los posibles síntomas en hojas y frutos en las plantas marcadas. Por otro lado, el personal de la Cooperativa-La Palma marcó durante todo el ciclo de cultivo otras plantas de los sectores que mostraron síntomas de enfermedad como frutos blandos y/o con tripilla, que son los síntomas característicos del problema fitosanitario que ha afectado a los socios de la Cooperativa en años anteriores.

En cada muestreo se tomó una hoja de la parte joven de la planta. En aquellos casos en los que se observaron síntomas en hojas y en frutos, también se muestrearon los frutos.

3.1.6. Análisis de las muestras mediante hibridación molecular no radiactiva.

Todas las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Virología del IAM empleando la técnica de hibridación molecular no radiactiva y usando una polisonda para 15 virus y sondas específicas de CMV y EMDV.

La polisonda poli 15, fue desarrollada por el Dr. J. A. Sánchez-Navarro y es capaz de detectar simultáneamente 15 virus (EMDV, CMV, PMoV, PepMV, TSWV, PVY, ToMV, CMV, ToTV, AMV, TICV, ToCV, TYLCV, TEV, TYLCSV y ToLCNDV) (Sánchez-Navarro et al., 2013; 2014).

Durante los muestreos se encontraron plantas con síntomas sospechosos del rizado amarillo y del bronceado del tomate, también se emplearon sondas específicas para TYLCSV, TYLCV y TSWV para su detección. Todas las sondas específicas empleadas, al igual que la polisonda (poli-15), fueron suministradas por el Dr. J. A. Sánchez-Navarro.

Para el análisis de las muestras recogidas en el primer muestreo, se utilizó únicamente la poli 15 para conocer el estado fitosanitario de las plántulas. En el resto de muestreos se emplearon tanto la poli 15 como la sonda específica de CMV, por ser el virus asociado al problema fitosanitario en los ensayos de años anteriores llevados a cabo en la Cooperativa La Palma. Debido a la observación de plantas con síntomas sospechosos en el segundo y cuarto muestreo se emplearon las sondas específicas de TSWV y TYLCV-TYLCSV, respectivamente. También se incluyó el análisis con la sonda de EMDV en el tercer muestreo al haber sido una virosis puntual en años anteriores.

La hibridación molecular no radiactiva con la polisonda Poli 15 y las sondas específicas se realizó siguiendo el protocolo del anexo 1 (Pallás *et al.*, 1998; Sánchez-Navarro *et al.*, 1999). En resumen, para el análisis de las muestras, se preparó, en primer lugar, una membrana donde se dispusieron las muestras procesadas, y que posteriormente se fijó mediante exposición con luz ultravioleta durante 3 minutos en cada lado de la membrana, siguiendo el protocolo del anexo 1 (“Preparación de la membrana”). En cada membrana se dispusieron entre 100 y 150 muestras, además de

entre 4 y 5 controles positivos (muestras de plantas infectadas con alguno de los virus a analizar, en el caso de la polisonda; o con el virus a analizar en el caso de las sondas específicas), un control negativo (planta sana de tomate) y un blanco (tampón de extracción sin adicionarle ningún material vegetal).

En el siguiente paso de la hibridación, las membranas fijadas se sometieron a un paso de detección, siguiendo el protocolo del anexo 1 (“Detección mediante polisondas”). Tras sumergir las membranas en una solución de prehibridación durante dos horas, se incubaron 24 horas con la sonda para favorecer la unión de la misma con el RNA viral determinadas en caso de estar presentes. En función del tipo de sonda varía la temperatura de hibridación empleada del protocolo. A continuación se realizaron sucesivos lavados y se concluyó la detección del marcaje de la sonda con digoxigenina, con la incubación de las membranas con un anticuerpo (anti-DIG) que se unió al híbrido en caso de no haber sido lavado y con una incubación con un sustrato quimioluminiscente (CSPD®, CDP-Star™) que se unió al anticuerpo en caso de estar presente (si se ha producido la hibridación). Para concluir la detección las membranas se revelaron en un film de autoradiografía.

3.1.7. Análisis de muestras con síntomas de virosis distintas a CMV mediante PCR y RT-PCR.

Durante el ensayo, aquellas muestras sospechosas de presentar síntomas de la infección por otros virus distintos a CMV fueron analizadas tanto por hibridación molecular con sondas específicas (en caso de disponer de ellas) como mediante técnicas moleculares de PCR y RT-PCR. Concretamente estas técnicas se emplearon para analizar muestras sospechosas a ToCV, TSWV, TYLCV y TYLCSV.

Análisis mediante RT-PCR para la detección de ToCV . Se utilizó la técnica RT-PCR para la detección de ToCV en plantas con síntomas sospechosos.

ToCV es un virus de ARN, por lo que previamente a la realización del RT-PCR, se requiere de una extracción de los ácidos nucleicos que se realizó mediante el protocolo de captura con silica (Foissac *et al*, 2001; MacKenzie *et al*, 1997) detallado en

el anexo 2. Todos los extractos obtenidos se conservaron a -20°C para su utilización posterior.

A partir de la extracción del ARN se realizó una reacción RT PCR en un solo paso utilizando la enzima SuperScript™ II One – Step RT – PCR with Platinum® Taq de la casa comercial *Invitrogen Life Technologies* (Barcelona, España), utilizando los cebadores ToCV-172(+) (5'-GCTTCCGAAACTCCGTCTTG-3') y ToCV-610(-) (5'-TGTCGAAAGTACCGCCACC-3') descritos por Louro *et al.* (2000) que amplifican un fragmento de 439 pb. Los extractos de ARN fueron previamente desnaturalizados a 65°C durante 5 minutos y rápidamente puestos en hielo. El extracto de ARN se diluyó 1:70 con H₂O Depc (Agua MQ estéril a la que se le añade Diethylpyrocarbonate). Los productos y volúmenes utilizados en la RT-PCR se muestran en el anexo 3. Las condiciones para la RT PCR fueron: 50° C durante 30 minutos para la síntesis de ADNc, 5 minutos a 94° C, seguido por 35 ciclos de: 94° C durante 15 segundos para desnaturalizar, 55° C durante 30 segundos para el anillamiento y 72° C durante 30 segundos para la extensión. Por último se incluyó un paso de 72°C durante 5 minutos para la extensión final. La reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo Sensoquest Labcycler.

Los productos obtenidos de la RT-PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1,2%, con tampón TAE 1x en una cámara de electroforesis. La tinción se realizó con bromuro de etidio para su posterior visualización bajo luz UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estableció por comparación con un marcador molecular, Gene Ruler™ 100 pb ladder plus de la casa comercial Fermentas (Vilna, Lituania).

Análisis mediante RT-PCR para la detección de TSWV. Las muestras sospechosas de estar infectadas con TSWV recogidas en el segundo muestreo, se analizaron en primer lugar por hibridación molecular no radiactiva con sonda específica de TSWV, y este análisis se complementó con RT-PCR con cebadores específicos de TSWV en el caso de resultados dudosos, por la mayor sensibilidad de esta última técnica.

Al igual que se ha indicado en el apartado anterior, previamente a la realización de la RT-PCR, se procedió a la extracción de ácidos nucleicos con silica (Foissac *et al*, 2001; MacKenzie *et al*, 1997).

A partir de la extracción del ARN se realizó una reacción RT PCR en un solo paso utilizando la enzima SuperScript™ III One – Step RT – PCR with Platinum® Taq de la casa comercial *Invitrogen Life Technologies* (Barcelona, España), utilizando los cebadores TSWV(+) (5'-ATTTGCCTTGCAACCAATTC-3') y TSWV(-) (5'-ATCAGTCGAAATGGTCGGCA-3') descritos por Mumford *et al.* (1994) que amplifican un fragmento de 297 pb. Los extractos de ARN fueron previamente desnaturalizados a 65°C durante 5 minutos y rápidamente puestos en hielo. Los productos y volúmenes utilizados en la RT-PCR se muestran en el anexo 4. Las condiciones para la RT PCR fueron: 50° C durante 30 minutos para la síntesis de ADNc, 2 minutos a 94° C, seguido por 40 ciclos de: 94° C durante 15 segundos para desnaturalizar, 55° C durante 30 segundos para el anillamiento y 68° C durante 45 segundos para la extensión. Por último se incluyó un paso de 72 °C durante 10 minutos para la extensión final. La reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo Sensoquest Labcycler.

Los productos obtenidos de la RT-PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1,2%, con tampón TAE 1x en una cámara de electroforesis. La tinción se realizó con bromuro de etidio para su posterior visualización bajo luz UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estableció por comparación con un marcador molecular, Gene Ruler™ 100 pb ladder plus de la casa comercial Fermentas (Vilna, Lituania).

Análisis mediante PCR para la detección de TYLCV y TYLCSV. Las muestras sospechosas de estar infectadas por TYLCV y TYLCSV se analizaron mediante hibridación molecular y posteriormente el resultado se confirmó mediante PCR.

Para la PCR se hizo previamente una extracción previa de ADN empleando el kit E.Z.N.A.® *DNA Isolation Kit* de la casa comercial Omega Bio – Tek (Georgia, Estados Unidos) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 5). Todos los extractos obtenidos se conservaron a -20°C para su utilización posterior.

A partir de la extracción de ADN se realizó una reacción PCR utilizando la enzima AmpliTaq ADN polimerasa (Perkin-Elmer), utilizando los cebadores TY1(+) (5'-GCCCATGTA(T/C)CG(A/G)AAGCC-3') y TY2(-) (5'-GG(A/G)TTAGA(A/G)GCATG(A/C)GTAC-3') descritos por Accotto *et al.* (2000) que amplifican un fragmento de 580 pb. Los productos y volúmenes utilizados en la PCR se muestran en el anexo 6. Las condiciones para la PCR fueron: 35 ciclos de: 95° C durante 30 segundos para desnaturalizar, 60° C durante 30 segundos para el anillamiento y 72° C durante 30 segundos para la extensión. Por último se incluyó un paso de 72 °C durante 7 minutos para la extensión final. La reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo Sensoquest Labcycler.

Los productos obtenidos de la PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1,2 %, con tampón TAE 1x en una cámara de electroforesis. La tinción se realizó con bromuro de etidio para su posterior visualización bajo luz UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estableció por comparación con un marcador molecular, Gene Ruler™ 100 pb ladder plus de la casa comercial Fermentas (Vilna, Lituania).

En el caso de producirse una amplificación, para determinar cuál de las dos especies está presente en la muestra se procedió a su digestión con la endonucleasa *AvaII* (Fermentas, Vilna, Lituania) y posterior visualización en un gel de agarosa al 3% en TAE 1x mediante electroforesis. Esta restricción genera patrones diferentes en función de la especie, TYLCV o TYLCSV, presente en la muestra.

3.2. Caracterización molecular del tipo de CMV que afecta a los cultivos de tomate del ensayo de agrotexiles.

Para la caracterización molecular del tipo de CMV que afecta a los cultivos de tomate del ensayo de agrotexiles, se escogieron al azar siete muestras positivas al virus, incluyendo las plantas marcadas por el agricultor y las plantas seleccionadas para el ensayo. Al tratarse de un virus de ARN, se realizó la extracción previa de ARN para la RT-PCR siguiendo el protocolo de extracción de ácidos nucleicos con silica (Foissac *et al.*, 2001; MacKenzie *et al.*, 1997; anexo 2).

A partir de la extracción del ARN se realizó una reacción RT PCR en un solo paso utilizando la enzima SuperScript™ III One – Step RT – PCR with Platinum® Taq de la casa comercial *Invitrogen Life Technologies* (Barcelona, España), utilizando dos parejas de cebadores distintas. La primera fue RW 8R (5' GGT TCG AA(A/G) (A/G)(A/T)A TAA CCG GG 3') y RW 11 D (5' GTT TAT TTA CAA GAG CGT ACG G 3') descritos por Finneti-Sialer et al. (1999) que amplifican un fragmento de 650 pb del RNA 2. La segunda pareja de cebadores fue CMV CP FOR (5' ATG GAC AAA TCT G(A/G)A TC(A/T) (A/C)CC 3') y CMV CP 35 REV (5' CTG GAT GGA CAA CCC GTT C 3') descritas por Deyong et al. (2005) que amplifican un fragmento de 773 – 788 pb del RNA3 (Anexo 7). Las condiciones para la RT PCR fueron: 50°C durante 30 minutos para la síntesis de ADNc, 5 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos de: 94°C durante 30 segundos para desnaturalizar, 59°C durante 45 segundos para el anillamiento y 72°C durante 60 segundos para extensión. Por último se incluyó un paso de 72°C durante 5 minutos para la extensión final. La reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo Sensoquest Labcycler.

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

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

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

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

3.3. Estudio del estado sanitario de las plántulas de tomate empleadas por los socios de la cooperativa Granada-La Palma de la zona norte y de la costa adquiridas de semilleros.

3.3.1. Material vegetal

El objetivo del estudio es determinar el estado sanitario de las plántulas injertadas procedentes de semilleros, al inicio de la plantación y a los 45 días después de su trasplante. Las plántulas se recibieron en el Laboratorio de Virología (IAM-UPV) para ser analizadas justo antes del trasplante. Estas plántulas correspondieron a las adquiridas por los socios de la Cooperativa La Palma de la zona Norte (Zújar y Fornes) cuyos ciclos de cultivo son de verano y el trasplante se realiza en mayo; así como plántulas adquiridas por los socios de la zona costa (Motril y Albuñol) cuyos ciclos de cultivo son otoñales y el trasplante se realiza en agosto-septiembre. Los semilleros que abastecen de plantas a estos productores son Saliplant S.L. y Hortoplant S.L.

Se recibieron un total de 13 envíos de plántulas (Figura 17), 5 envíos de la zona Norte y 8 envíos de los socios de la zona costa, con diferente número de plantas cada envío (Tabla 5). Los envíos se recibieron desde principios de mayo hasta mediados de septiembre de 2014, justo antes de que cada socio realizase el trasplante. En total se recibieron para análisis 175 plántulas. La tabla 5 recoge para cada envío, la zona de trasplante de las plántulas, la fecha de recepción de las plántulas en el laboratorio de Virología y el número de plantas de cada envío.



Figura 17. Plántulas procedentes de semillero para su análisis.

Tabla 5. Zona de trasplante, fecha de recepción y número de las plántulas analizadas para determinar su estado fitosanitario antes del trasplante.

Nº de envío	Código UPV	Zona de trasplante	Fecha de recepción de las plántulas	Nº de plantas enviadas para su análisis
1	107/14	Norte	06/05/2014	10
2	108/14	Norte	06/05/2014	10
3	167/14	Norte	29/05/2014	10
4	111/14	Norte	14/05/2014	7
5	112/14	Norte	14/05/2014	12
TOTAL ZONA NORTE				49
6	386/14	Costa	14/08/2014	13
7	387/14	Costa	14/08/2014	20
8	388/14	Costa	19/08/2014	15
9	406/14	Costa	29/08/2014	16
10	407/14	Costa	02/09/2014	11
11	408/14	Costa	02/09/2014	6
12	411/14	Costa	05/09/2014	7
13	440/14	Costa	12/09/2014	38
TOTAL ZONA COSTA				126

3.3.2. Diseño experimental tras la recepción

Tras la recepción de las plántulas se estudiaron los posibles síntomas anómalos y se tomaron muestras para su análisis (dos folíolos por plántula). Ante la posibilidad de que las plántulas pudieran ser portadoras de virus vegetales no detectables todavía en el momento de su recepción en el laboratorio, se decidió trasplantar estas plántulas y analizarlas a los 45 días post-trasplante. Permitiendo así que el virus se multiplicara y fuera más fácil su detección.

Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Virología del IAM-UPV empleando la técnica de hibridación molecular no radiactiva con la poli 15 (polisonda para 15 virus) descrita en el ensayo de agrot textiles y suministrada por el Dr. J.A. Sánchez-Navarro a su llegada al laboratorio y a los 45 días después.

Para su análisis a los 45 días tras el trasplante, las plántulas se etiquetaron y se plantaron en macetas de 15 cm de diámetro o en bandejas rectangulares de polietileno de 24 alveolos a una densidad de 5 plantas por bandeja, separadas la mayor distancia posible con una mezcla de turba y arena en proporción 3:1. Se mantuvieron 45 días en fitotrón (Figura 18) a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 60% de humedad relativa. A los 45 días se tomaron muestras para su análisis.



Figura 18. Plántulas de tomate en fitotrón a los 45 días post-trasplante.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayo de agrotexiles para el control de enfermedades virales transmitidas por vectores.

4.1.1. Resultados de la hibridación molecular, RT-PCR y PCR de las plantas seleccionadas para el ensayo.

Los resultados obtenidos de la hibridación molecular no radiactiva mediante sondas específicas y una polisonda (Poli 15) a las plantas seleccionadas en cada sector se muestra en el anexo 8. Las tablas 6 y 7 recogen los resultados agrupados por sectores y virus detectados. Las plantas positivas en un muestreo también lo fueron en muestreos posteriores, por lo que los datos del último muestreo muestran el total de plantas infectadas a lo largo del ciclo de cultivo.

Tabla 6. Resultados de la hibridación molecular con poli 15 y sonda CMV a las plantas marcadas, por sector y muestreo.

SECTOR	MUESTREO	Nº PLANTAS SELECCIONADAS	Nº DE PLANTAS + POLI 15	Nº DE PLANTAS + CMV
SECTOR 1	12/05/2014	100	0	NR
	23/06/2014	100	8	8
	30/07/2014	100	55	55
	05/09/2014	100	85	85
SECTOR 2	12/05/2014	100	0	NR
	23/06/2014	100	6	6
	30/07/2014	100	43	42
	05/09/2014	100	60	60
SECTOR 3	12/05/2014	100	0	NR
	23/06/2014	100	1	1
	30/07/2014	100	2	2
	05/09/2014	100	7	7
SECTOR 4	12/05/2014	100	0	NR
	23/06/2014	100	0	0
	30/07/2014	100	0	0
	05/09/2014	100	0	0

NR: análisis no realizado

Tabla 7. Resultados de la hibridación molecular con sondas específicas a TSWV, EMDV, TYLCV y TYLCSV a las plantas marcadas, por sector y muestreo.

SECTOR	MUESTREO	Nº PLANTAS SELECCIONADAS	Nº DE PLANTAS + TSWV	Nº DE PLANTAS + EMDV	Nº DE PLANTAS + TYLCV	Nº DE PLANTAS + TYLCSV
SECTOR 1	12/05/2014	100	NR	NR	NR	NR
	23/06/2014	100	0	NR	NR	NR
	30/07/2014	100	NR	0	NR	NR
	05/09/2014	100	NR	NR	0	0
SECTOR 2	12/05/2014	100	NR	NR	NR	NR
	23/06/2014	100	0	NR	NR	NR
	30/07/2014	100	0	0	NR	NR
	05/09/2014	100	NR	NR	0	0
SECTOR 3	12/05/2014	100	NR	NR	NR	NR
	23/06/2014	100	0	NR	NR	NR
	30/07/2014	100	NR	0	NR	NR
	05/09/2014	100	NR	NR	0	0
SECTOR 4	12/05/2014	100	NR	NR	NR	NR
	23/06/2014	100	0	NR	NR	NR
	30/07/2014	100	NR	0	NR	NR
	05/09/2014	100	0	NR	0*	0*

*Las muestras 4.40, 4.41, 4.42 dieron un resultado dudoso en la hibridación molecular con las sondas para TYLCV y TYLCSV, por lo que se analizaron por PCR dando negativo en todos los casos.

NR: análisis no realizado

Todas las muestras positivas a la polisonda (poli 15), resultaron positivas únicamente a CMV, lo que indica que la enfermedad observada en el cultivo de tomate cherry del ensayo está asociada a la infección por este virus. Las hojas de tomate afectadas por CMV mostraban deformación de los folíolos, reducción del limbo foliar y filiformismo (Figura 19)

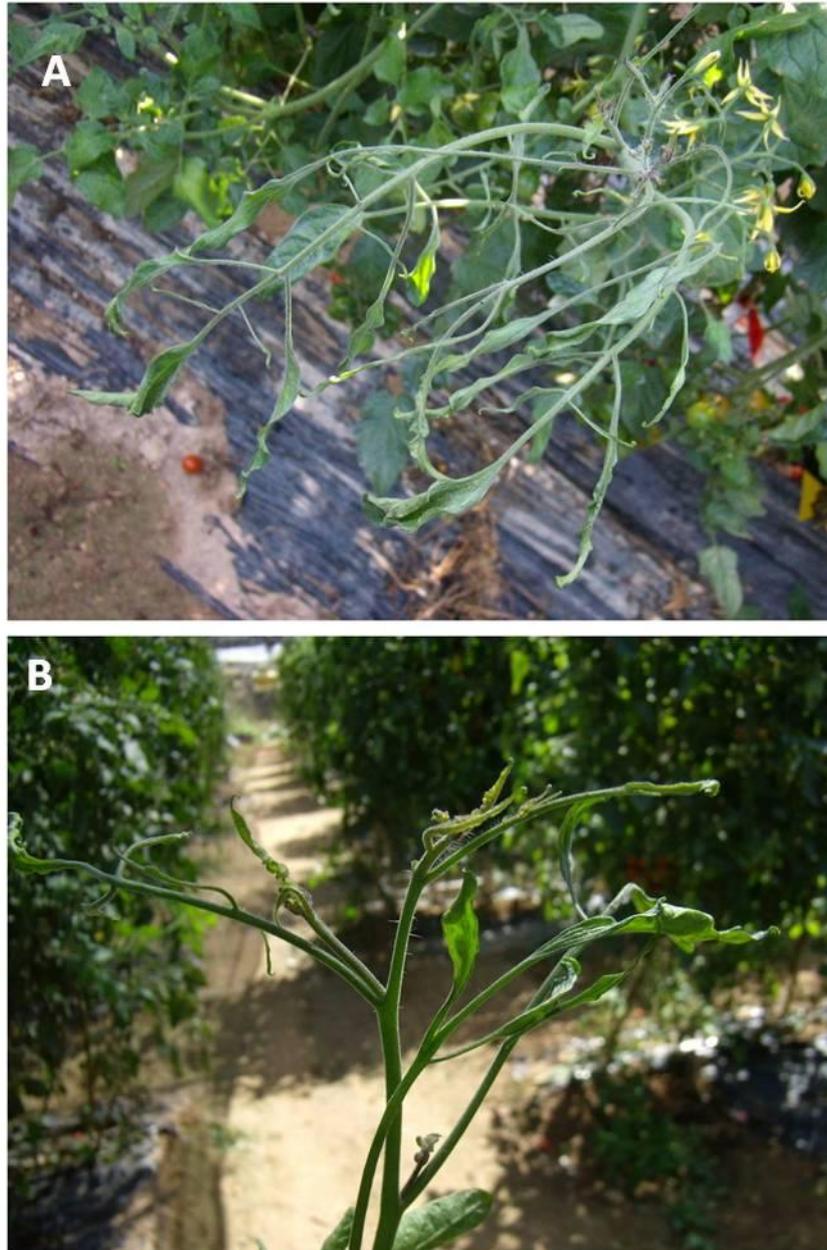


Figura 19. Síntomas de CMV en plantas de tomate de los sectores 1 y 2 de los invernaderos EcoA. A. deformación y filiformismo de los folíolos. B. Filiformismo muy acusado de los folíolos del brote de la planta.

En la Cooperativa Granada-La Palma se detectaron en el año 2011 infecciones mixtas de EMDV y CMV. En años posteriores, el número de plantas infectadas por EMDV se redujo drásticamente, por lo que la infección por EMDV fue puntual y el principal agente detectado en plantas sintomáticas fue CMV. Los datos del presente ensayo confirman que CMV parece ser el principal agente causal descartando la presencia de EMDV en el ensayo, puesto que no se observaron síntomas de EMDV en

las plantas seleccionadas y que ninguna muestra dio positivo a ese virus en los análisis realizados mediante hibridación molecular.

La muestra 2.79 presentaba síntomas similares a los causados por la infección con ToCV (amarilleo internervial) por lo que fue analizada mediante RT-PCR con cebadores específicos para la detección de este virus. No resultó positiva a ToCV (Anexo 9), por lo que los síntomas de amarilleo observados no se deben a la infección por este virus. Esa muestra únicamente presentaba infección por CMV.

Los resultados de la hibridación muestran que ninguna planta presentaba infección por TSWV. Sin embargo, las muestras 2.69 y 2.94 con aparentes síntomas de TSWV, se analizaron también por RT-PCR para confirmar el resultado de la hibridación. En la RT-PCR no se amplificó el fragmento esperado para estas dos muestras (Anexo 10) por lo que se descarta la infección por TSWV o una infección mixta con CMV, por tanto los síntomas que mostraban las muestras 2.69 y 2.94 no se pueden asociar a la infección con TSWV, ya que estas muestras únicamente estaban infectadas con CMV.

En cuanto al virus del rizado amarillo, los resultados de la hibridación mostraron tres positivos dudosos que se corresponden con las muestras 4.40, 4.41 y 4.42. El resto de muestras dieron negativo a TYLCV y TYLCSV en la hibridación molecular. Los resultados de la PCR a las tres muestras dudosas y de otras dos que mostraban síntomas sospechosos y habían resultado negativas por hibridación molecular (muestras 1.19 y 3uH; Anexo 11) indicaron que todas son negativas a rizado amarillo. Por tanto, los síntomas de amarilleo observados en las muestras 1.19 y 3uH no se deben a los virus TYLCV y TYLCSV ya que estas muestras únicamente estaban infectadas por CMV.

Esta gran variabilidad de síntomas observados en las muestras hacía sospechar de la infección mixta de CMV con otros virus típicamente asociados al cultivo del tomate, sin embargo los resultados indican la presencia de CMV en infección simple. CMV es un virus que se caracteriza por presentar variabilidad de síntomas, genética y ser capaz de infectar a un gran número de hospedantes diferentes. Esto se explica

debido al gran número de aislados diferentes de CMV por la propia complejidad de su composición y la posible presencia de ARN satélites que modifican su expresión, además de influir las condiciones ambientales y la propia planta (Alfaro-Fernández *et al*, 2013). Por tanto, no podríamos descartar la asociación de CMV con los diferentes síntomas encontrados en el ensayo que *a priori* se habían asociado a otros agentes virales.

En cuanto a los datos de producción (Tabla 8), observamos que la malla tradicionalmente usada por la cooperativa (sector 1) fue con la que se obtuvo menor rendimiento y destrío elevado, por lo que la producción en neto apenas alcanza los 2 kg/m². En los sectores 2, 3 y 4, las producciones brutas fueron bastante similares, si bien con las mallas del sector 3 se alcanzó el mayor valor. En el sector 2, sin embargo, el destrío fue mucho mayor que los sectores 3 y 4 y similar al sector 1, por lo que la producción neta resultó ser 8,5 kg/m². Este mayor destrío se debe a la mayor incidencia de CMV en el sector 2 que en los sectores 3 y 4. Por tanto el empleo de la malla perimetral de 6x6 no fue efectiva en el control de la enfermedad. En los sectores 3 y 4 la enfermedad se controló de manera eficaz lo que permitió producciones netas superiores a 12 kg/m², debido a que el destrío no superó los 0,5 kg/m². En el sector 3 se observó una ligera mayor producción que en el sector 4, debido a que en el sector 4 la malla perimetral y del techo son de 8x16, mientras que en el sector 3 la malla perimetral fue de 8x10, lo que incide en las condiciones climáticas del invernadero, generando una menor ventilación e incidencia de luz solar. Una menor ventilación también puede conllevar mayor incidencia de enfermedades bacterianas y fúngicas que mermarían la producción. Estos resultados y las características negativas de la malla del sector 4 ponen de manifiesto que la mejor malla a utilizar sería la empleada en el sector 3. La malla perimetral de 8x10 es capaz de controlar a los áfidos y por tanto la enfermedad por CMV y su propagación, lo que determina mayores producciones y menor destrío de frutos por infección de CMV. Además tiene las ventajas de ser más barata que la malla de 8x16, permitir una mejor ventilación y mayor incidencia de los rayos solares en el invernadero, lo que repercute en mejores condiciones climáticas en el mismo, y por tanto una mayor producción.

Tabla 8. Plantas positivas a CMV, producción bruta, destrío y producción neta para cada sector.

Sector	Nº Plantas seleccionadas	Plantas + CMV	Producción Kg/m ²	Destrío Kg/m ²	Producción en neto Kg/m ²
Sector 1 (CONTROL) (Techo y perímetro 6x6)	100	85	4,09	2,58	1,51
Sector 2 (techo 6x6, perímetro 8X16)	100	60	11,38	2,84	8,54
Sector 3 (techo 8X10, perímetro 8X16)	100	7	13,99	0,47	13,52
Sector 4 (techo 8X16, perímetro 8X6)	100	0	12,24	0,01	12,23

4.1.2. Resultados de la hibridación molecular de las plantas marcadas por el agricultor por mostrar síntomas de virosis.

Los resultados de la hibridación molecular (Tabla 9) muestran que todas las plantas marcadas por los agricultores por mostrar los síntomas denominados fruto blando y/o con tripilla dura o blanda, fueron positivas a CMV. Estos datos confirman la asociación de CMV con los síntomas observados en fruto durante el ensayo.

Tabla 9. Resultados de la hibridación molecular con Poli 15 y sondas específicas a CMV, TSWV, EMDV y TYLCV a las plantas marcadas por los agricultores; por sector y muestreo.

ANÁLISIS A PLANTAS SINTOMÁTICAS							
SECTOR	MUESTREO	Nº PLANTAS SINTOMÁTICAS	Nº DE PLANTAS +POLI 15	Nº DE PLANTAS + CMV	Nº DE PLANTAS + TSWV	Nº DE PLANTAS + EMDV	Nº DE PLANTAS + TYLCV
SECTOR 1	23/06/2014	12	10	10	0	NR	NR
	30/07/2014	46	46	46	NR	0	NR
	05/09/2014	282	282	NR	NR	NR	NR
	TOTAL SECTOR 1	340	338	338*			
SECTOR 2	23/06/2014	8	7	7	0	NR	NR
	30/07/2014	47	47	47	NR	0	NR
	05/09/2014	236	236	NR	NR	NR	NR
	TOTAL SECTOR 2	291	290	290*			
SECTOR 3	30/07/2014	10	10	10	NR	0	NR
	05/09/2014	28	21	21	NR	NR	0
	TOTAL SECTOR 3	38	31	31			

En el cuarto sector no se marcó ninguna planta con síntomas. *No se realiza análisis a CMV pero se asume que los + a la Poli 15 lo son también a CMV. El código NR determina que no se ha realizado análisis para ese virus.

4.1.3. Evolución y distribución de la enfermedad por sector y muestreo durante el ciclo de cultivo.

Las figuras de la 20 a la 27 muestran la evolución de la enfermedad y su distribución por sectores y muestreos. Se han agrupado los datos de las plantas seleccionadas en el ensayo junto con las plantas marcadas por el agricultor por mostrar los síntomas denominados frutos blancos y/o con tripilla y positivas a CMV.

En el caso de los sectores 1 y 2, en el segundo muestreo (52 días en campo) se observó que la enfermedad apareció en la zona con trampas pegajosas del sector 1, mientras que en el sector 2 apareció en una zona sin trampas pegajosas. En el tercer muestreo (89 días en campo), la enfermedad estaba prácticamente extendida por ambos sectores, mientras que en el último muestreo (125 días en campo) la mayor parte de las plantas muestreadas, tanto las seleccionadas como sintomáticos, presentaron infección por CMV.

En el caso del sector 3, en el segundo muestreo únicamente aparecía una planta positiva. En el 3 muestreo (89 días en campo) fue cuando se observaron síntomas de la enfermedad en diversas plantas. La enfermedad comenzó en la zona del sector 3 que delimita con el sector 2 y que presentaba trampas pegajosas. Es posible que el hecho de que el sector 2, con gran cantidad de positivos, fuera colindante al 3 influyera en la aparición de la enfermedad en el sector 3. En el último muestreo la enfermedad comenzó a extenderse y la cantidad de plantas afectadas fue similar a la situación observada en el segundo muestreo para los sectores 1 y 2. Por tanto, la malla de 8x10 hilos/cm² utilizada perimetralmente en el sector 3 es un buen método de control de la enfermedad al retrasar la aparición de la misma y su evolución.

En el caso del sector 4, no se obtuvieron resultados positivos ni se observaron plantas sintomáticas.

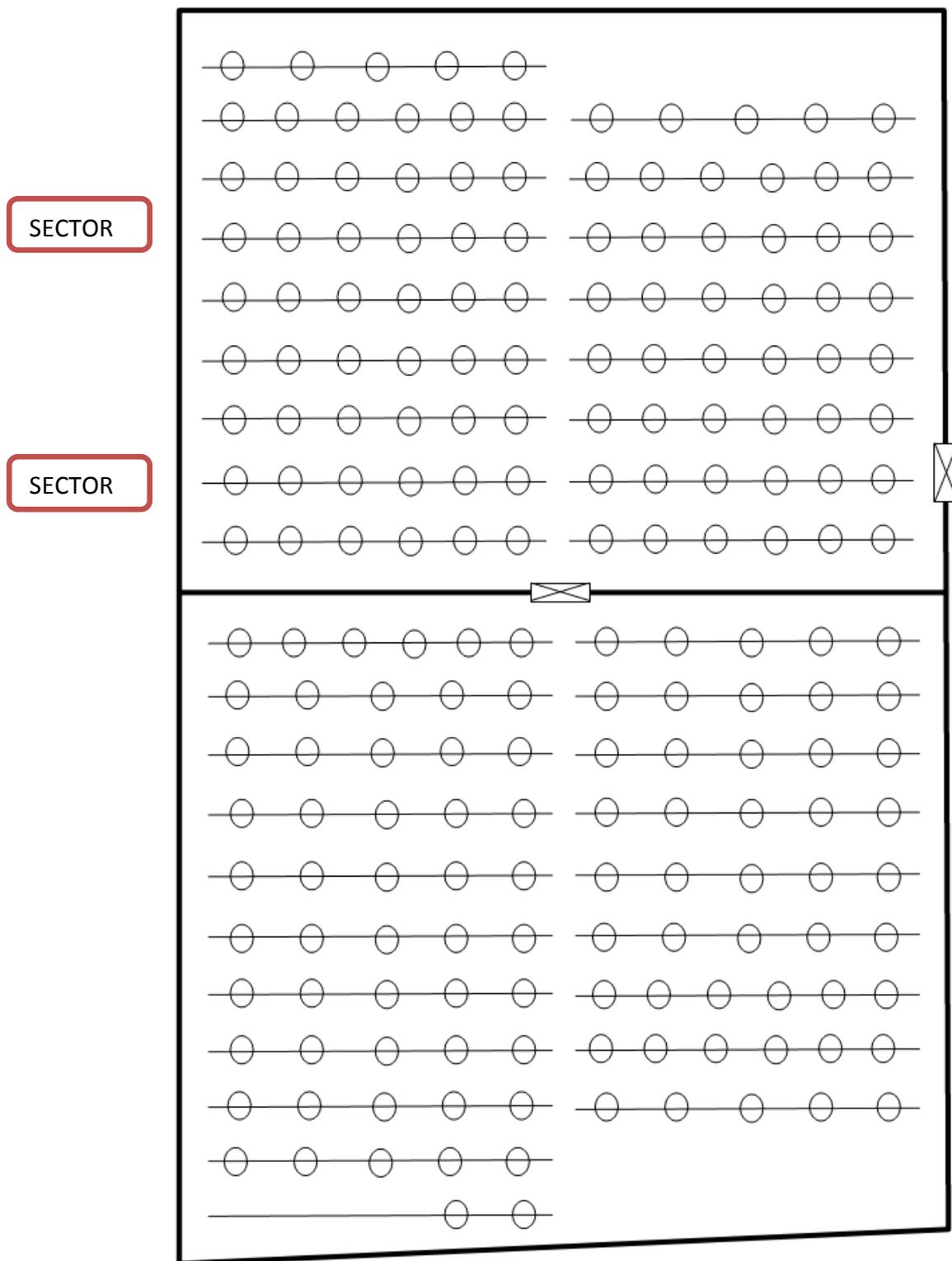


Figura 20. Distribución esquemática de las plantas en los invernaderos. Sectores 1 y 2. 1º Muestreo de 12 de mayo de 2014. Las plantas seleccionadas se representan con un círculo. En este muestreo ninguna planta seleccionada dio positivo a la polisonda.

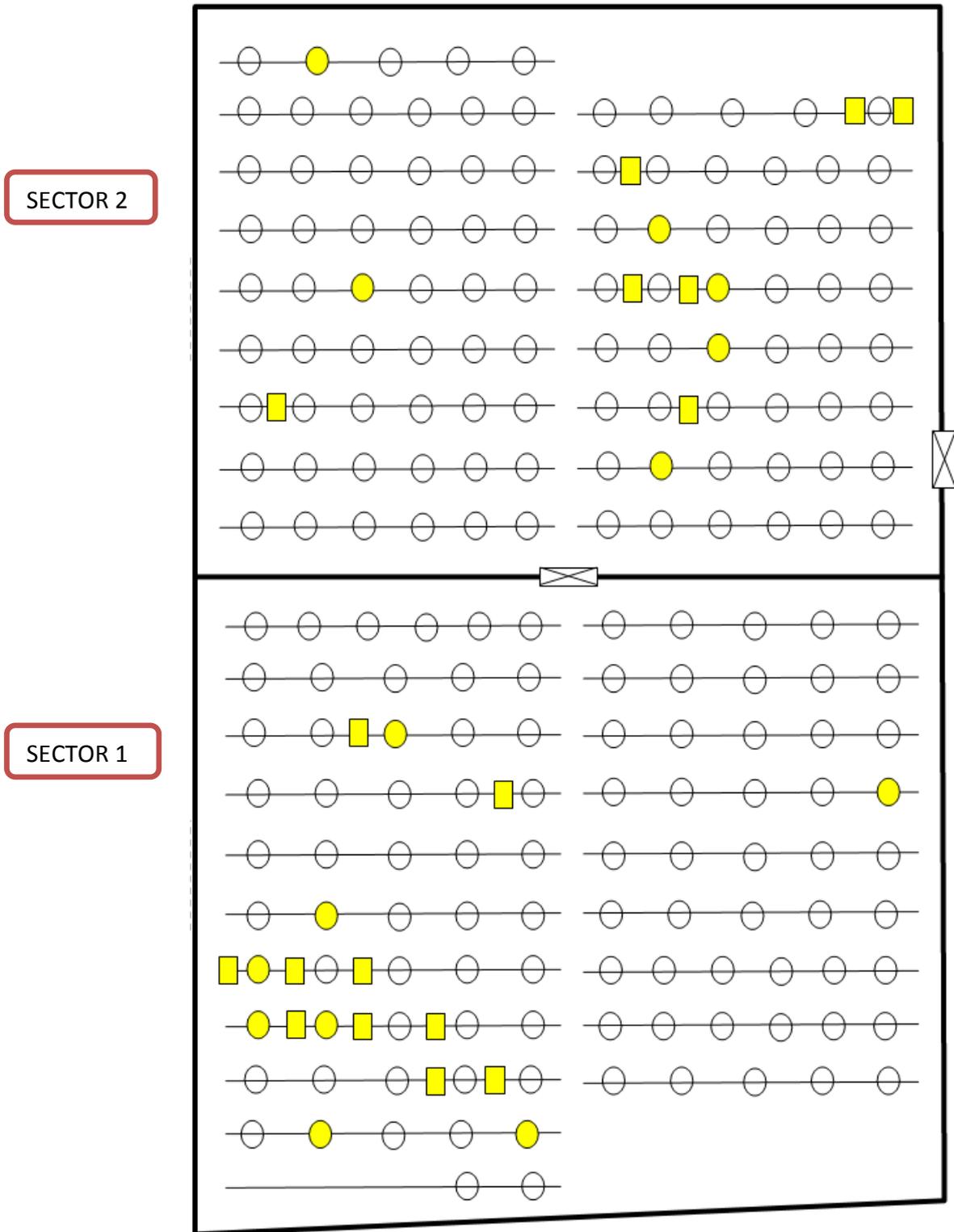


Figura 21. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus, seleccionadas y sintomáticas marcadas por el agricultor. Sectores 1 y 2. 2º Muestreo de 23 de junio de 2014. Las plantas seleccionadas se representan con un círculo, en amarillo las positivas a la polisonda. Las plantas sintomáticas marcadas por el agricultor y positivas a la polisonda, se marcan con un cuadrado amarillo.

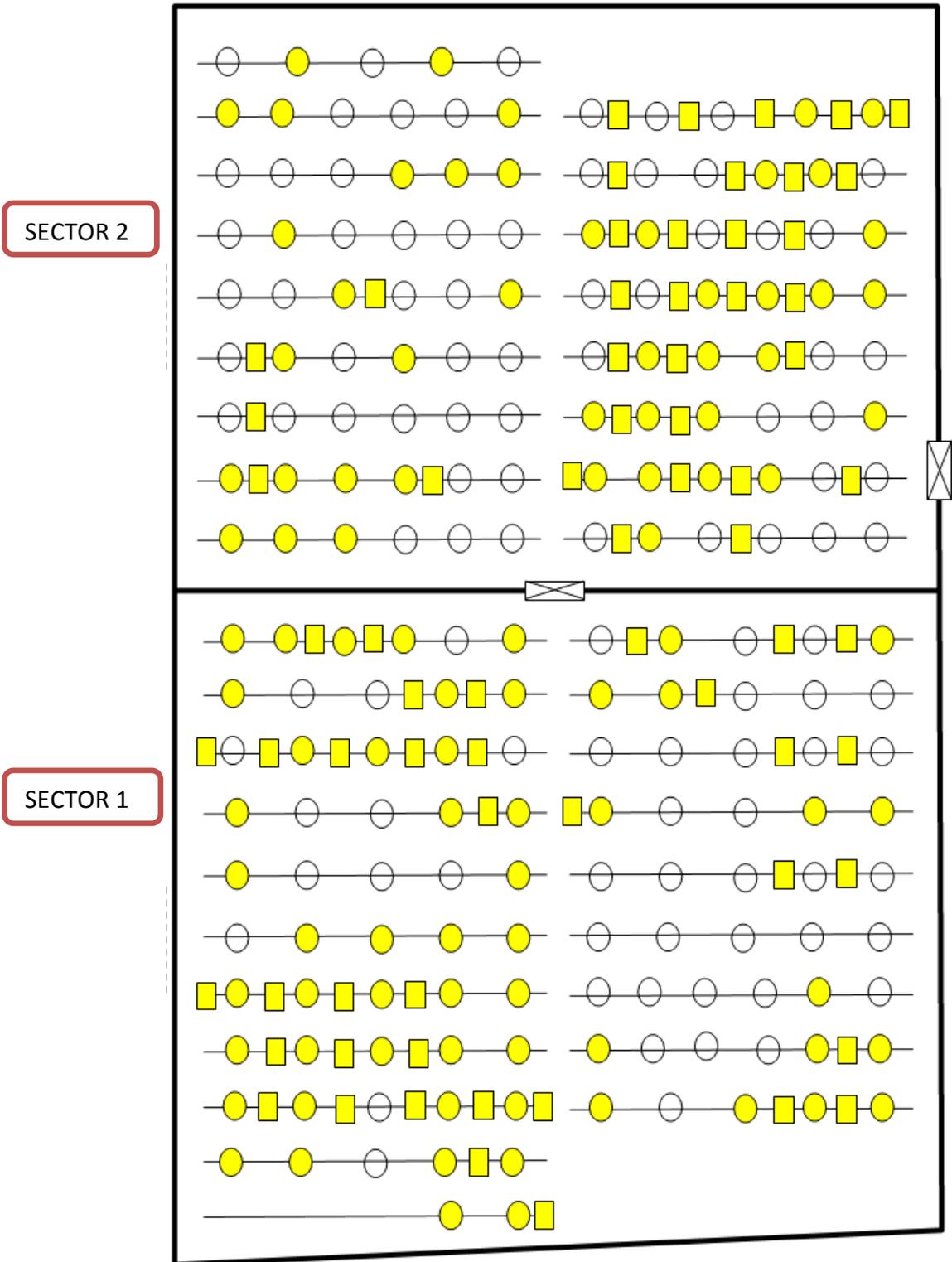


Figura 22. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus, seleccionadas y sintomáticas marcadas por el agricultor. Sectores 1 y 2. 3º Muestreo de 30 de julio de 2014. Las plantas seleccionadas se representan con un círculo, en amarillo las positivas a la polisonda. Las plantas sintomáticas marcadas por el agricultor y positivas a la polisonda, se marcan con un cuadrado amarillo.

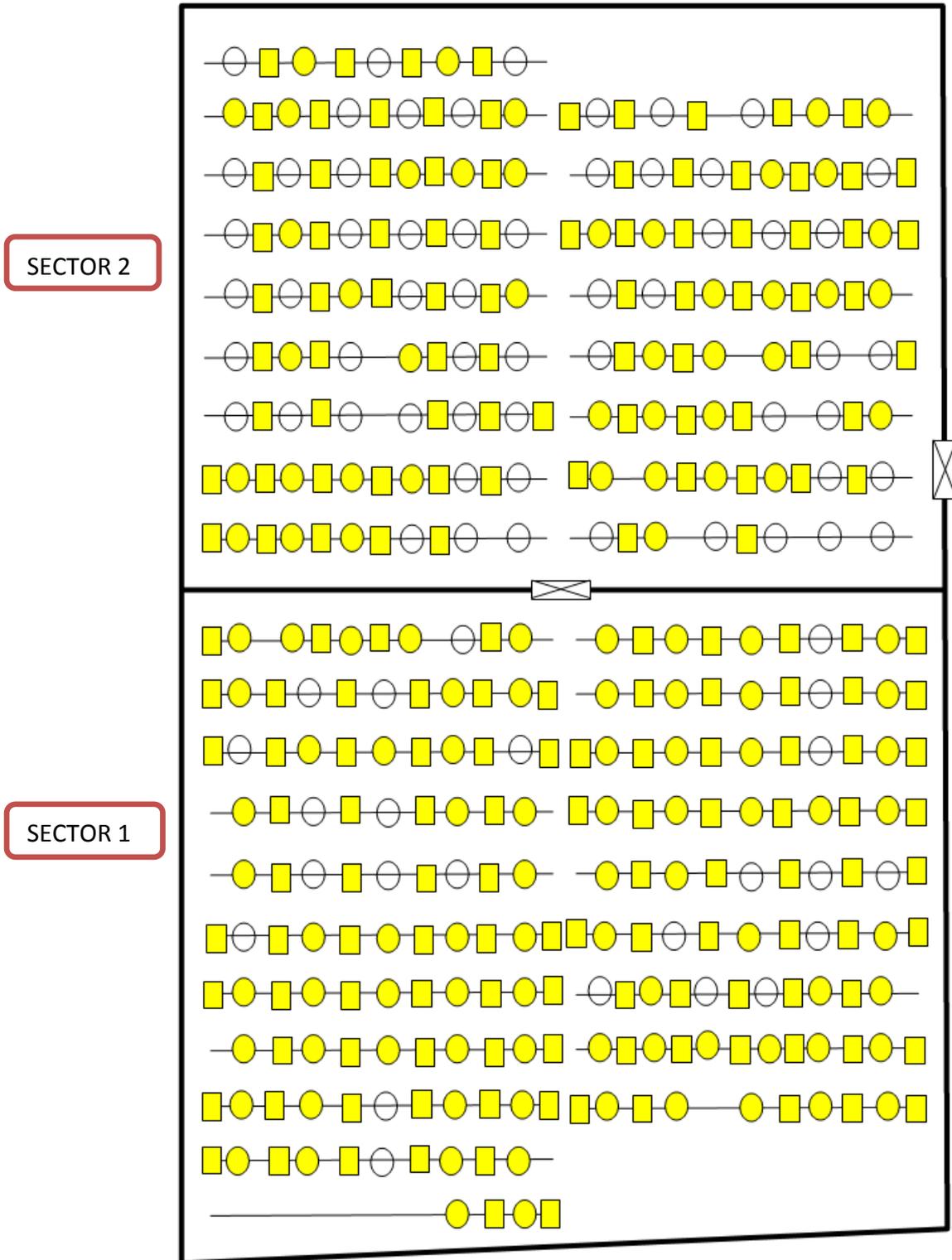


Figura 23. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus, seleccionadas y sintomáticas marcadas por el agricultor. Sectores 1 y 2. 4º Muestreo de 5 de septiembre de 2014. Las plantas seleccionadas se representan con un círculo, en amarillo las positivas a la polisonda. Las plantas sintomáticas marcadas por el agricultor y positivas a la polisonda, se marcan con un cuadrado amarillo.

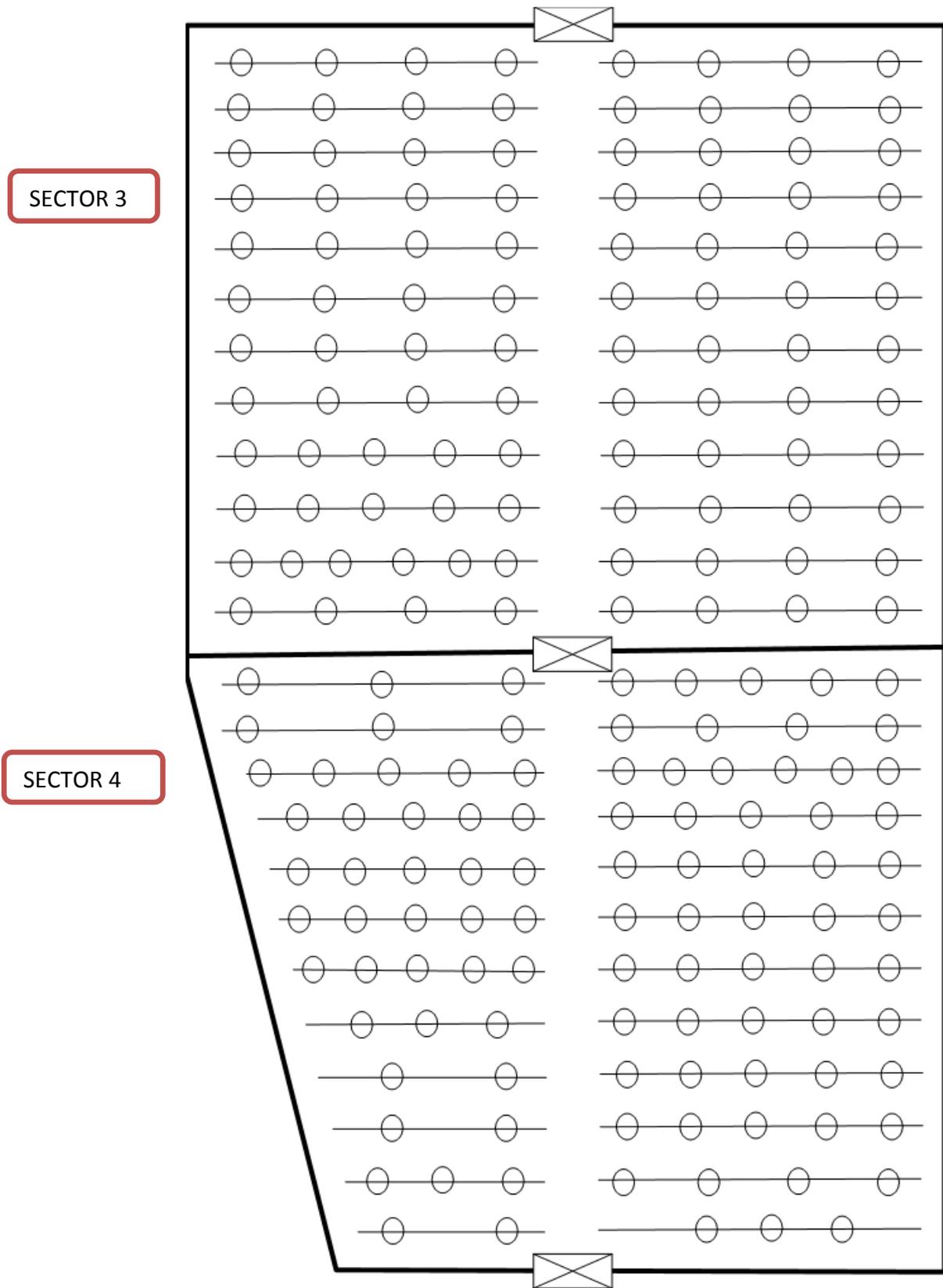


Figura 24. Distribución esquemática de las plantas en los invernaderos. Sectores 3 y 4. 1º Muestreo de 12 de mayo de 2014. Las plantas seleccionadas se representan con un círculo, en este muestreo ninguna planta seleccionada dio positivo a la polisonda.

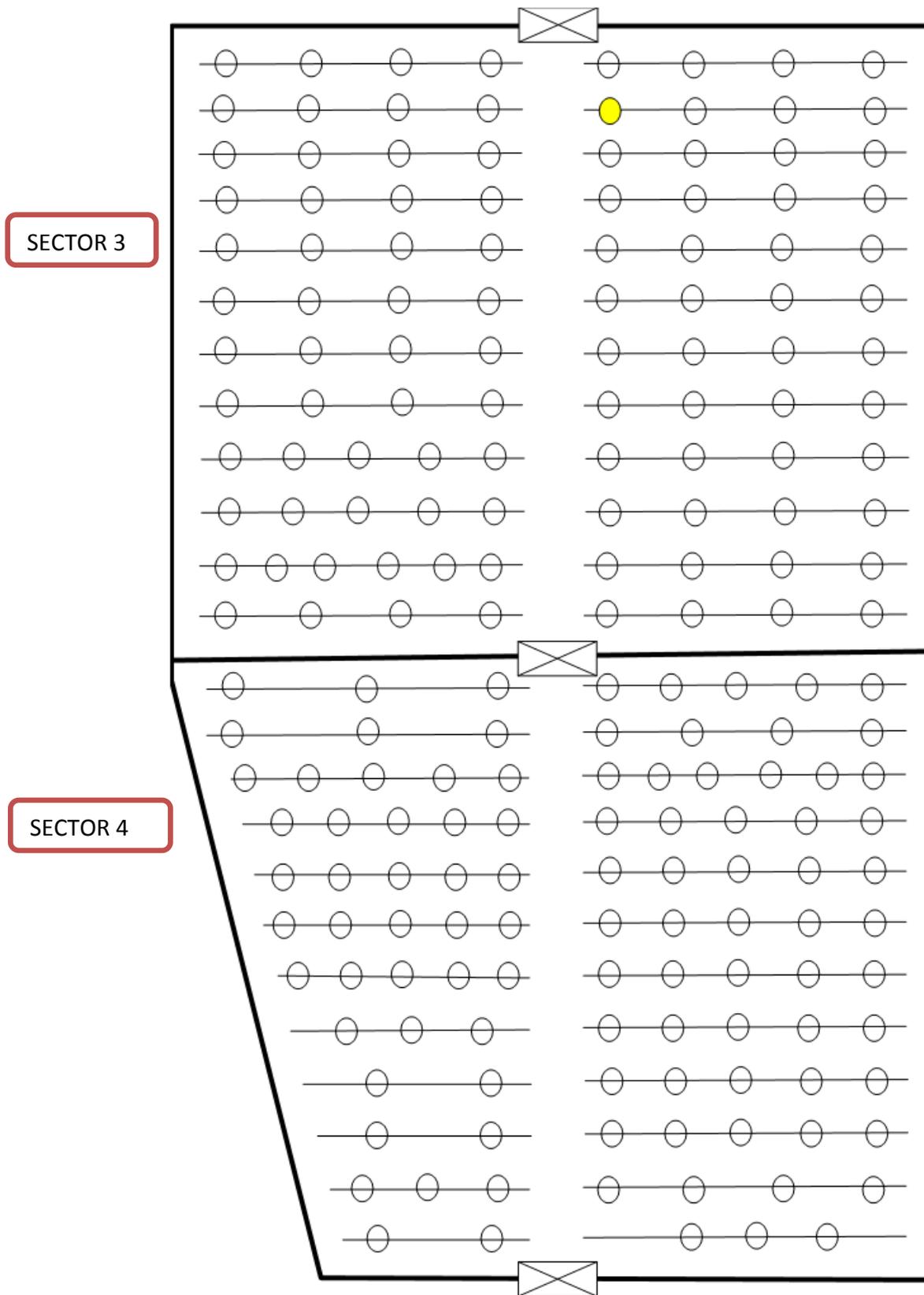


Figura 25. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus. Sectores 3 y 4. 2º Muestreo de 23 de junio de 2014. Las plantas seleccionadas se representan con un círculo, en amarillo las positivas a la poliovirus.

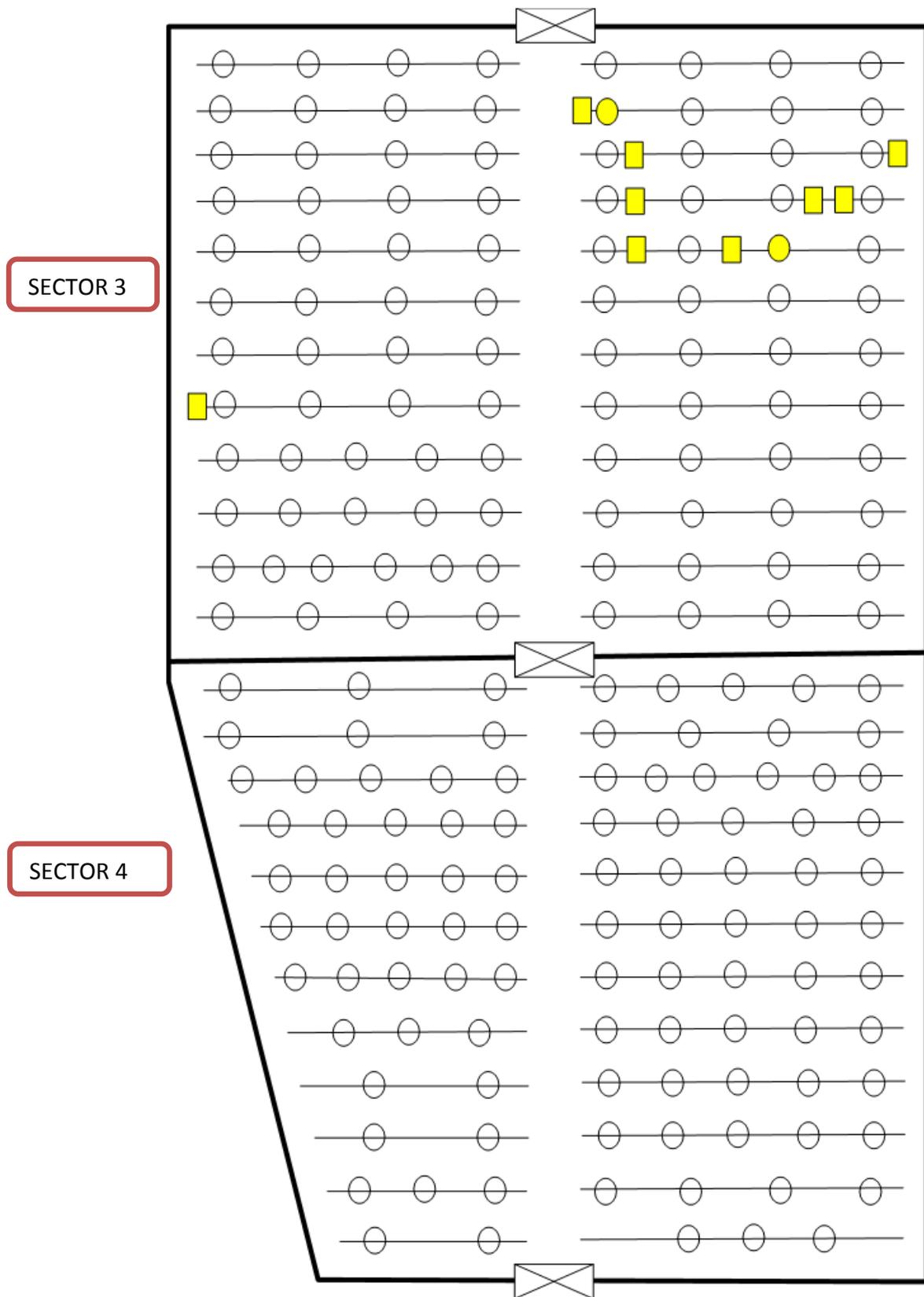


Figura 26. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus, seleccionadas y sintomáticas marcadas por el agricultor. Sectores 3 y 4. 3º Muestreo de 30 de julio de 2014. Las plantas seleccionadas se representan con un círculo, en amarillo las positivas a la polisonda. Las plantas sintomáticas marcadas por el y positivas a la polisonda, se marcan con un cuadrado amarillo.

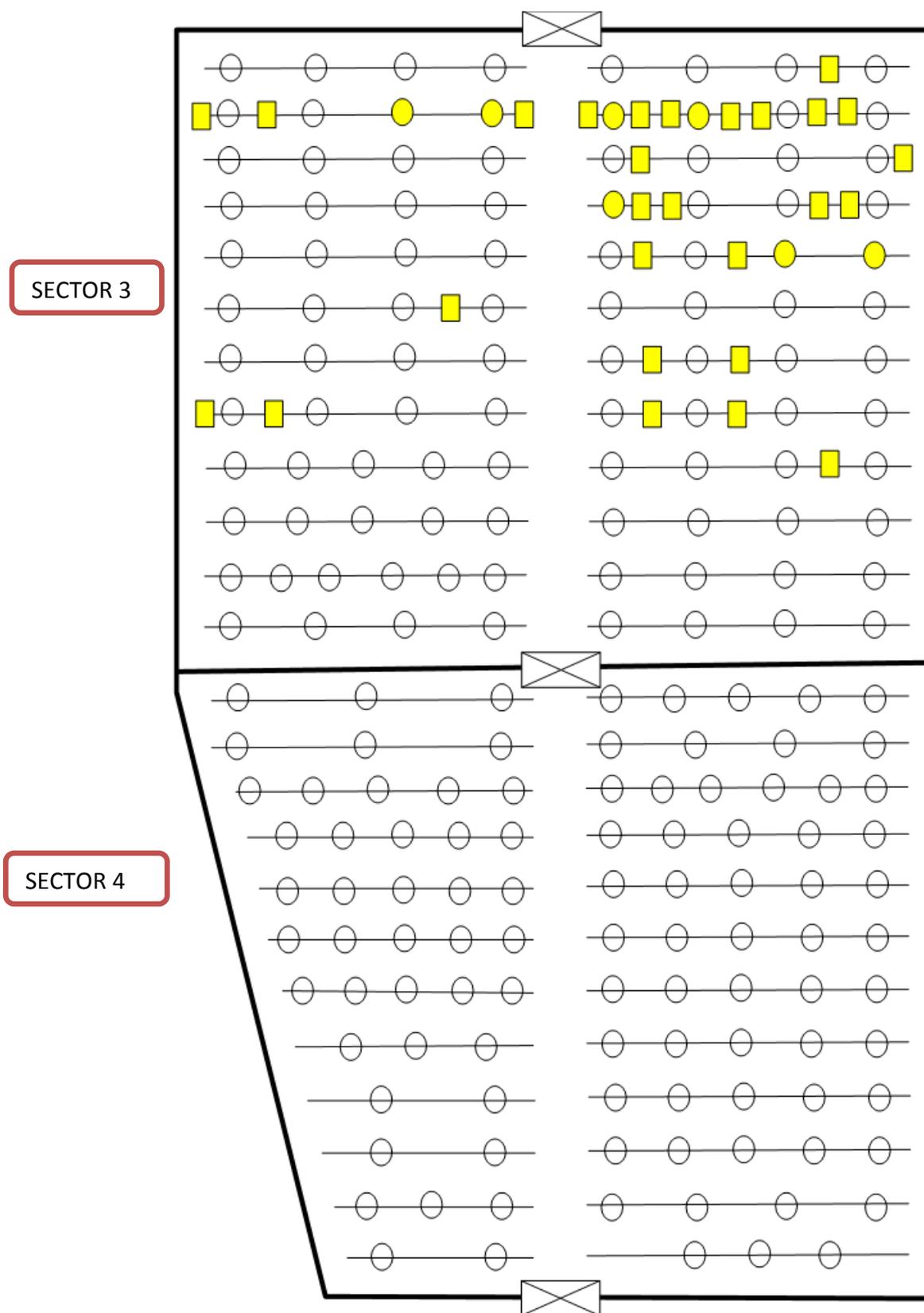


Figura 27. Distribución esquemática de las plantas positivas a virus, seleccionadas y sintomáticas marcadas por el agricultor. Sectores 3 y 4. 4º Muestreo de 5 de septiembre de 2014. Las plantas seleccionadas se representan con un círculo, en amarillo las positivas a la polisonda. Las plantas sintomáticas marcadas por el agricultor y positivas a la polisonda, se marcan con un cuadrado amarillo.

4.2. Caracterización molecular del tipo de CMV que afecta a los cultivos de tomate del ensayo de agrotextiles.

Las muestras positivas a CMV escogidas para la caracterización molecular del tipo de CMV fueron las codificadas como 1.6, 1.32, 2.19, 2.68, 2.92, 3.42 y 3JH, donde el primer número indica el sector del que fueron muestreadas y el segundo el número de planta. En todas las muestras se amplificó la banda esperada de 650 pb con los cebadores descritos por Finneti-Sialer *et al.* (1999) y la de 773-788 pb con los cebadores descritos por Deyong *et al.* (2005) (Anexo 12).

Los productos de PCR obtenido se analizaron mediante RFLPs con las enzimas de restricción *MluI* para los productos amplificados con los cebadores descritos por Finneti-Sialer *et al.* (1999) y *Hpa* II para los productos amplificados con los cebadores descritos por Deyong *et al.* (2005).

Todas las muestras analizadas mediante RFLPs con el enzima de restricción *MluI* muestran dos bandas de 470 y 160 pb que se corresponden con CMV tipo I.B (Figura 28).

Todas las muestras analizadas mediante con el enzima de restricción *Hpa*II muestran tres bandas de 449, 296 y 28 pb que se corresponden con CMV tipo I (Figura 29).

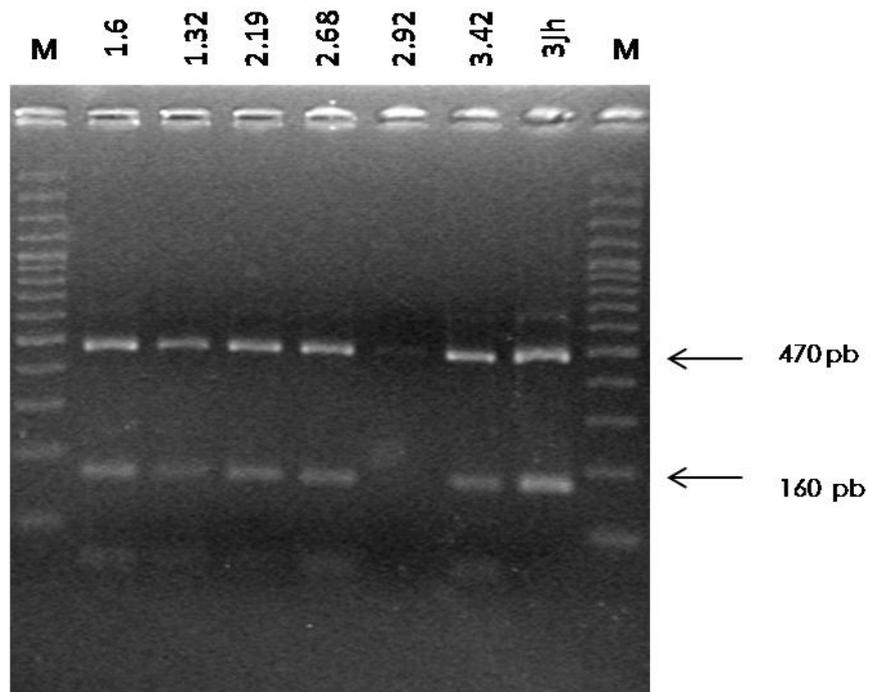


Figura 28. Visualización de los productos obtenidos de la digestión con *Mlu* I de los productos de la RT-PCR realizada con los cebadores descritos por Finneti-Sialer *et al.* (1999).

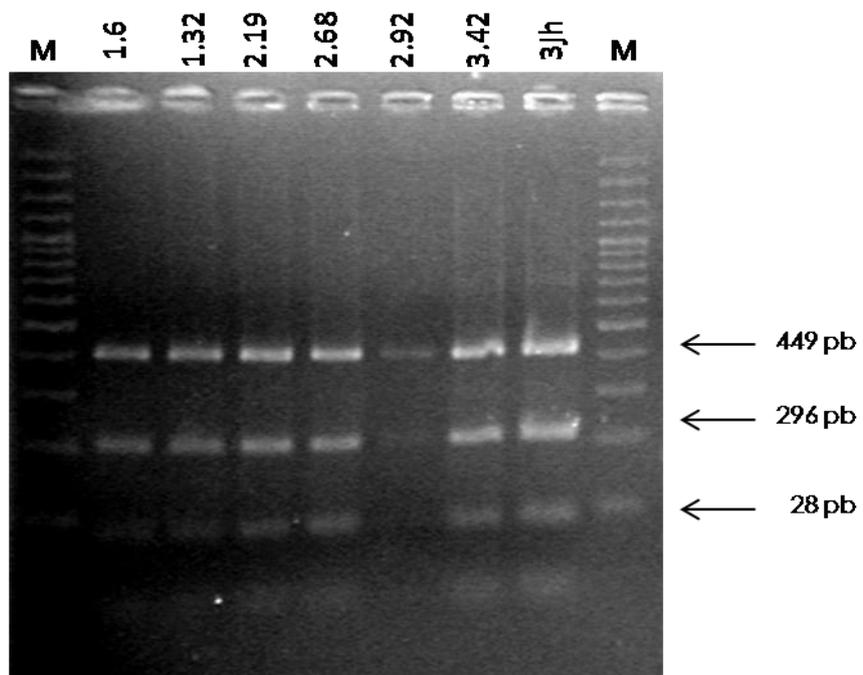


Figura 29. Visualización de los productos obtenidos de la digestión con *Hpa* II de los productos de la RT-PCR realizada con los cebadores descritos por Deyong *et al.* (2005).

Dada la complejidad de la partícula viral del CMV, la aparición de nuevos tipos de aislados es bastante frecuente y pueden llegar a mostrar una gran variabilidad genética y fenotípica, con un amplio abanico de síntomas que en ocasiones dificultan la identificación del agente causal. En este caso, el tipo I.B de CMV del ensayo se corresponde con el tipo habitual de CMV que afecta a los cultivos de tomate cherry de los socios de la Cooperativa en la provincia de Granada.

4.3. Estudio del estado sanitario de las plántulas de tomate empleadas por los socios de la empresa de la zona norte y de la costa adquiridas de semilleros.

Los resultados de los análisis de las plántulas injertadas procedentes de semillero a los 0 días y a los 45 días del trasplante mediante hibridación molecular no radiactiva con poli 15 dieron negativo en todos los casos (Tabla 10). No se observaron síntomas de virosis en ninguna plántula enviada para el análisis ni en la recepción de la plántula ni a los 45 días de su trasplante.

Tabla 10. Resultados de la hibridación molecular con poli15 a las plantas injertadas procedentes de semilleros a los 0 días y a los 45 días del trasplante.

Nº de envío	Código del envío	Zona de trasplante	Fecha de envío de las plántulas	Nº de plantas enviadas para su análisis	A los 0 días. Plántulas positivas a Poli 15 virus	A los 45 días. Plántulas positivas a Poli 15 virus
1	107/14	Norte	06/05/2014	10	0	0
2	108/14	Norte	06/05/2014	10	0	0
3	167/14	Norte	29/05/2014	10	0	0
4	111/14	Norte	14/05/2014	7	0	0
5	112/14	Norte	14/05/2014	12	0	0
TOTAL ZONA NORTE				49	0	0
6	386/14	Costa	14/08/2014	13	0	0
7	387/14	Costa	14/08/2014	20	0	0
8	388/14	Costa	19/08/2014	15	0	0
9	406/14	Costa	29/08/2014	16	0	0
10	407/14	Costa	02/09/2014	11	0	0
11	408/14	Costa	02/09/2014	6	0	0
12	411/14	Costa	05/09/2014	7	0	0
13	440/14	Costa	12/09/2014	38	0	0
TOTAL ZONA COSTA				126	0	0

Los resultados confirman el buen estado sanitario de las plántulas injertadas procedentes de semillero y empleadas por los socios de la cooperativa Granada-La Palma. Por tanto, el problema fitosanitario del cultivo de tomate cherry de los socios de la Cooperativa no tiene como origen que la infección por CMV se produzca en la fase de semillero, lo que confirma que la mejor estrategia de control de CMV en el presente ensayo es la prevención de la infección mediante el empleo de agrotexiles que impidan la entrada de vectores y, por tanto la dispersión de la enfermedad.

Sin embargo, CMV se transmite en porcentaje alto por semilla (Tomlinso y Carter, 1970) por lo que es recomendable que todos los años se compruebe el buen estado fitosanitario de una pequeña muestra de plántulas procedentes de semillero para descartar la entrada de CMV o de cualquier otra virosis por esta vía.

5. CONCLUSIONES

- La malla de 6x6 hilos/cm², usada tradicionalmente por los socios de la Cooperativa Granada-La Palma de Fornes, no frena la entrada de áfidos vectores de CMV, siendo la malla que presenta producciones menores y mayores destríos.
- La malla 8x10 hilos/cm², empleada perimetralmente, en combinación con la malla 8x16 hilos/cm², es la combinación que se muestra más eficaz en impedir la entrada de áfidos vectores de CMV, y por tanto el mejor método de control de la enfermedad al retrasar la aparición de la misma y su posterior dispersión. La malla 8x10 hilos/cm², permite obtener las mayores producciones al controlar la enfermedad, obtener unos destríos mínimos y conseguir unas condiciones climáticas en el invernadero óptimas para la producción.
- La malla 8x16 hilos/cm² empleada en perímetro y en techo, se muestra muy efectiva en el control de la enfermedad pero presenta un mayor coste que la malla de 8x10 hilos/cm². Su mayor densidad ofrece condiciones climáticas peores en el invernadero que afectan a la producción, además de que podría favorecer enfermedades fúngicas y bacterianas en años húmedos por la menor ventilación.
- El tipo de CMV detectado en el ensayo de agrotexiles es I.B, siendo el tipo molecular habitual en los cultivos de tomate cherry de verano en los socios de la Cooperativa Granada-La Palma.
- Se ha comprobado el buen estado sanitario de las plántulas injertadas procedentes de semillero empleadas por los socios de la Cooperativa Granada-La Palma y suministradas por semilleros de la zona.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Accotto, G.P.; Navas-Castillo, J.; Noris, E.; Moriones, E. y Louro D. (2000). Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 106: 179–186.
- Alfaro-Fernández, A.O.; Córdoba, M.C.; Font, I.; Jordá, M.C. (2013). Virosis relevantes en el cultivo del tomate: detección, diagnóstico y control. Phytoma. Valencia (España).
- Blancard, D. (2011). Enfermedades del tomate: identificar, conocer, controlar. Mundi-Prensa. España.
- Conti, M.; Gallitelli, D.; Lisa, V. Lovisolo, O.; Martelli, G.P.; Ragozzino, A. (2001). Principales virus de las plantas hortícolas. Mundi-Prensa. España.
- Deyong Z; Willingmann P.; Heinze C.; Adam G.; Pfunder M.; Frey B.; Frey J.E. (2005). Differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates by hybridization to oligonucleotides in a microarray format. *Journal of Virological Methods* 123(1):101-108.
- Estévez, J.M. (2013). Influencia de la técnica del injerto sobre la producción y calidad de diversos cultivares de tomate cherry tipo pera. Universidad de Almería. Departamento de Agronomía. Almería. España.
- Fineti-Sialer, M. M.; F. Cillo; L. Barbarossa; D. Gallitelli. 1999. Differentiation of cucumber mosaic virus subgroups by RE – PCR RFLP. *Journal of Plant Pathology*. 81 (2): 145 – 148.
- Foissac, X.; Svanella-Dumas, L.; Duluq, M.J.; Candresse, T.; Gentit, P.; Clark, M.F. (2001). Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveavirus by nested

RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae* 550: 37-43.

Jones, J.B.; Stall, R.E.; Zitter, T.A. (2001). Plagas y enfermedades del tomate. *The American Phytopathological Society*. Mundi-Prensa. España.

Louro, D.; Accotto, G.P.; Vaira, A.M. (2000). Occurrence and diagnosis of Tomato Chlorosis virus in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 106:589-592.

MacKenzie, D.J.; McLean, M.A.; Mukerji, S.; Green, M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for detection of viral pathogens by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81: 222-226.

Maroto, J.V. (2002). Horticultura herbácea especial. 5ta edición. Mundi-Prensa. España.

Melgarejo, P.; García-Jiménez, J.; Jordá, M.C.; López, M.M.; Andrés, M.F. y Duran-Vila, N. (2010). Patógenos de plantas descritos en España. 2a edición. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España.

MAGRAMA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2012). Anuario de Estadística 2013. Madrid (España).

Mumford R.A.; Barker I.; Wood K.R.. (1994). The detection of *Tomato spotted wilt virus* using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 46: 303-311.

Pallás, V., Mas, P., & Sánchez-Navarro, J. A. (1998). Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. *Methods in Molecular Biology* 81: 461-468.

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.

Sánchez-Navarro, J.A.; Font, M.I. et al. (2013). Puesta a punto de una polisonda para la detección simultánea de 13 virus y 4 viroides que afectan al cultivo del tomate. I Reunión Grupo Especializado en Detección, Diagnóstico e Identificación (GEDDI-SEF). Logroño (España).

Sánchez-Navarro, J.A.; Font, M.I. et al. (2014). Puesta a punto de una polisonda para la detección simultánea de 13 virus y 4 viroides que afectan al cultivo del tomate. XVII Congreso e la Sociedad Española de Fitopatología. Lérida (España).

Soler, S.; Prohens, J.; López C.; Aramburu, J.; Galipienso, L. (2010). Viruses infecting tomato in Valencia, Spain: Occurrence, distribution and effect of seed origin. *Journal of Phytopathology*. 158: 797-805.

Tomlinso, J.A.; Carter, A.L. (1970). Studies on seed transmission of cucumber mosaic virus in chickweed (*Stellaria media*) in relation to ecology of virus. *Annals of applied Biology*. 66: 381-386.

Van Koot, Y. (1949). Enkele nieuwe gezichtspunten betreffende het virus van het tomatenmosaiek. *Tijdschr PIZiek* 55:152-166.

Walker, J. M. y Rapley, R. (2009). Molecular biology and biotechnology. *Royal Society of Chemistry*. Reino Unido. 271 p.p.

7. ANEXO

ANEXO 1. PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS VEGETALES MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR NO RADIOACTIVA (DIGOXIGENINA)

PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA

1. Cortar la membrana al tamaño deseado y marcar con lápiz los recuadros de la plantilla.
2. Machacar la muestra en tampón citrato en una proporción aproximada de 1 gramo de tejido: 2-3 ml de tampón.
3. Aplicar sobre cada cuadrado de la membrana 0,6-0,7 μ l de la preparación.
4. Fijar las muestras en la membrana mediante exposición con luz ultravioleta durante 3 minutos en cada lado.

DETECCIÓN MEDIANTE POLISONDAS

5. Introducir la membrana en el tubo de hibridación y añadir 10 ml de la solución de hibridación y mantener durante 1-2 h en un horno de hibridación con rotación suave a una temperatura de 55°C para polisondas, 68°C para sondas específicas de virus de ARN o 60°C para sondas específicas de virus de ADN.
6. Eliminar el volumen de la prehibridación y añadir la sonda e incubar toda la noche a 60°C.
7. Recuperar la sonda y guardar en el congelador (-20°C).

LAVADOS

8. Realizar 2 lavados de 5 min a Tª ambiente en Tampón de Lavado 1 (2x SSC + 0.1 % SDS).
9. Realizar 2 lavados de 30 min a una temperatura de: 68°C para polisondas y sondas específicas de virus de ARN o 60°C para sondas específicas de virus de ADN; en Tampón de Lavado 2 (0.1x SSC + 0.1 % SDS).
10. A partir de aquí todos los pasos se realizan a temperatura ambiente (20-25°C).

DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA

11. Equilibrar la membrana en tampón de lavado (tampón maleato+ 0.3% tween) durante 5 min.
12. Lavar brevemente en tampón 1 (tampón maleato).
13. Bloqueo: incubación de 30 min con una cantidad de 10 ml de solución bloqueante al 1% .
14. Incubación 30 min con Anticuerpo (Ac): Hacer una dilución 1: 10000 en solución bloqueante al 1%, es decir 1 μ l de AC y 10 ml de solución bloqueante al 1%.
15. Lavar dos veces con tampón de lavado durante 15 min.
16. Lavar brevemente con tampón 1.
17. Incubar 5 min en tampón 3 (tampón de detección).
18. Sacar la membrana del tubo y meterla en una funda de plástico (preparada previamente), seguidamente añadir un volumen suficiente de la dilución 1:100 del sustrato quimioluminiscente CSPD o CDP Star (5 μ l en 500 μ l de tampón de detección por membrana).
19. Mantener en oscuridad 5 min.
20. Sacar la membrana de la funda y eliminar el exceso de CSPD/CDP Star transfiriendo la membrana a nuevas fundas, evitando que la membrana se quede seca.
21. Sellamos la funda con celo y la colocamos en un cassette de autoradiografías durante 20 minutos más o menos.

REVELADO

22. En la cámara oscura, introducir el film en el revelador y cuando se observen las membranas, lavar el film con agua y a continuación introducirlo en el fijador durante 1 minuto.

ANEXO 2. PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS CON SILICA

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS CON SILICA

1. 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.
2. Transferir 500 μ l del homogeneizado a un tubo eppendorf de 1.5 ml con punta recortada y mezclar (no con vortex).
3. Añadir 100 μ l de n-lauryl sarcosina 10% e incubar a 70°C durante 10 min (agitando los tubos de vez en cuando, no con vortex).
4. Incubar en hielo 5 min.
5. Centrifugar 10 min a 13000 rpm a 4°C.
6. Transferir 300 μ l a un nuevo tubo eppendorf y añadir:
 - 150 μ l EtOH
 - 300 μ l Solución 6M NaI
 - 50 μ l Solución Silica
7. Incubar a temperatura ambiente durante 30 min, agitando los tubos de vez en cuando.
8. Centrifugar 1 min a 6000 rpm, temperatura ambiente.
9. Eliminar el sobrenadante.
10. Lavar el sedimento con 1 ml de tampón de lavado, agitar con el vortex.
11. Centrifugar 1 min a 6000 rpm, temperatura ambiente.
12. Repetir los pasos de lavado (9, 10 y 12) dos veces más.
13. Tras el último lavado, después de eliminar el sobrenadante secar los tubos con papel de trapicel.
14. Resuspender el sedimento en 150 μ l de H₂O MQ estéril, mezclar con el vórtex.
15. Incubar a 70°C durante 4 min.
16. Centrifugar 3 min a 13000 rpm, temperatura ambiente.
17. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml y almacenar a -20°C.

TAMPON EXTRACCIÓN SILICA:

Guanidine hypochloride	4M	
Acetato Sódico	0.2M	(Solución Stock AcNa 3M pH 5.5)
EDTA	25mM	
Acetato Potásico	1.0M	
PVP40	2.5%	
β-mercaptoetanol	1%	En el momento de usarlo

TAMPON DE LAVADO:

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	0.5 mM
NaCl	50 mM
Etanol Absoluto	50 %

ANEXO 3. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA RT-PCR

ToCV EN UN PASO

RT- PCR ToCV con cebadores ToCV(+) y ToCV (-).

	1 (x) μ l
2 mix buffer III	6.25
ToCV(+)	0.25
ToCV (-)	0.25
One Step Taq III	0.25
Agua Dep	3
ARN 1:70	1.2

ANEXO 4. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA RT-PCR

TSWV EN UN PASO

RT- PCR TSWV con cebadores TSWV(+) y TSWV (-).

	1 (x) μ l
2 mix buffer II	5
TSWV 10X	1
PVP40	1
RNAse out	0.1
One Step Taq III	0.4
Agua MQ	1.9
ARN	0.6

ANEXO 5. EXTRACCIÓN DE ADN CON KIT E.Z.N.A.® DNA ISOLATION KIT DE LA CASA COMERCIAL OMEGA BIO – TEK, GEORGIA, ESTADOS UNIDOS.

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

ANEXO 6. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA PCR TYLCV-

TYLCSV

PCR TYLCV-TYLCSV con cebadores TY1(+) y TY2 (-).

	1 (x) μ l
Tampón10x	2.5
TY1(+)	0.5
TY2 (-)	0.5
dNTPs [1mm]	2.5
Agua PCR	15.8
biotools	0.7
ADN	2.5

ANEXO 7. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA RT-PCR EN UN PASO CON DOS PAREJAS DIFERENTES DE CEBADORES ESPECÍFICOS DE CMV Y POSTERIOR ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS MEDIANTE RFLPS CON DOS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DIFERENTES.

RT- PCR CMV con cebadores RW

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

RFLP CMV MLUI

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

RT PCR CMV con cebadores CP

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

RFLP CMV HAP II

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

ANEXO 8. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE VIRUS POR HIBRIDACIÓN MOLECULAR.

El signo – indica un resultado negativo y el signo + indica un resultado positivo en la hibridación molecular. Las 100 muestras del sector 4 no se muestran al dar un resultado negativo en todas las hibridaciones realizadas. *Las muestras 4.40, 4.41 y 4.42 dieron un positivo dudoso en la hibridación molecular con las sondas TYLCV y TYLCSV, por lo que se analizaron por PCR.

MUESTRA	Poli 15 (1º MUESTREO)	2º MUESTREO			3º MUESTREO			4º MUESTREO			
		Poli 15	CMV	TSWV	POLI 15	CMV	EMDV	POLI 15	CMV	TYLCV	TYLCSV
SECTOR 1											
1.1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.2	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.6	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.8	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.9	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.10	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.11	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.12	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.13	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.15	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.16	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
1.17	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.18	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.19	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.20	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.21	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.22	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.26	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.28	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.30	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MUESTRA	Poli 15 (1º MUESTREO)	2º MUESTREO			3º MUESTREO			4º MUESTREO			
		Poli 15	CMV	TSWV	POLI 15	CMV	EMDV	POLI 15	CMV	TYLCV	TYLCSV
1.32	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.35	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.36	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.37	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.38	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.39	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.40	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.41	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.42	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.43	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.44	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.45	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.46	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.47	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.48	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.49	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.50	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
1.51	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.52	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.53	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
1.54	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.55	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.57	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.58	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.59	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.60	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.61	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.62	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.63	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
1.64	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
1.65	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.66	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.67	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.68	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.69	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
1.70	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
1.71	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.72	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.73	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-

MUESTRA	Poli 15 (1º MUESTREO)	2º MUESTREO			3º MUESTREO			4º MUESTREO			
		Poli 15	CMV	TSWV	POLI 15	CMV	EMDV	POLI 15	CMV	TYLCV	TYLCSV
1.74	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.75	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.76	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.78	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.79	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.80	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.81	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.83	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.84	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.85	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.86	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.87	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
1.88	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.89	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.90	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.91	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.92	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.93	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1.94	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.95	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.96	-	-	-	-			-	+	+	-	-
1.97	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.98	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.99	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
1.100	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
SECTOR 2											
2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.9	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.10	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.11	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
2.12	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.13	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MUESTRA	Poli 15 (1º MUESTREO)	2º MUESTREO			3º MUESTREO			4º MUESTREO				
		Poli 15	CMV	TSWV	POLI 15	CMV	EMDV	POLI 15	CMV	TYLCV	TYLCSV	
2.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.16	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.17	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.18	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.19	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.21	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.22	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.23	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.24	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2.25	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.26	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.27	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.28	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.29	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.31	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.35	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.36	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.38	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.39	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.42	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2.43	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.44	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.45	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2.46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.47	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2.48	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2.49	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.50	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2.51	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.53	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
2.54	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2.55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MUESTRA	Poli 15 (1º MUESTREO)	2º MUESTREO			3º MUESTREO			4º MUESTREO			
		Poli 15	CMV	TSWV	POLI 15	CMV	EMDV	POLI 15	CMV	TYLCV	TYLCSV
2.57	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.58	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.59	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.60	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.61	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.63	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2.64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.65	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2.66	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2.67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.68	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2.69	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.71	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.74	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
2.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.79	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.81	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.82	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2.83	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2.84	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2.85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.88	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2.89	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2.90	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2.91	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.92	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.93	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.94	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
2.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.98	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-

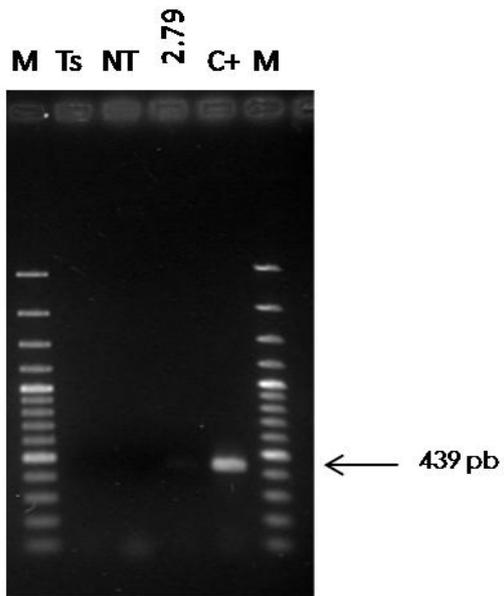
MUESTRA	Poli 15 (1º MUESTREO)	2º MUESTREO			3º MUESTREO			4º MUESTREO			
		Poli 15	CMV	TSWV	POLI 15	CMV	EMDV	POLI 15	CMV	TYLCV	TYLCSV
2.99	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2.100	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
SECTOR 3											
3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.31	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
3.32	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
3.33	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
3.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MUESTRA	Poli 15 (1º MUESTREO)	2º MUESTREO			3º MUESTREO			4º MUESTREO			
		Poli 15	CMV	TSWV	POLI 15	CMV	EMDV	POLI 15	CMV	TYLCV	TYLCSV
3.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.41	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
3.42	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
3.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.53	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
3.54	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
3.55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MUESTRA	Poli 15 (1º MUESTREO)	2º MUESTREO			3º MUESTREO			4º MUESTREO			
		Poli 15	CMV	TSWV	POLI 15	CMV	EMDV	POLI 15	CMV	TYLCV	TYLCSV
3.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SECTOR 4											
4.1-4.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	_*	_*

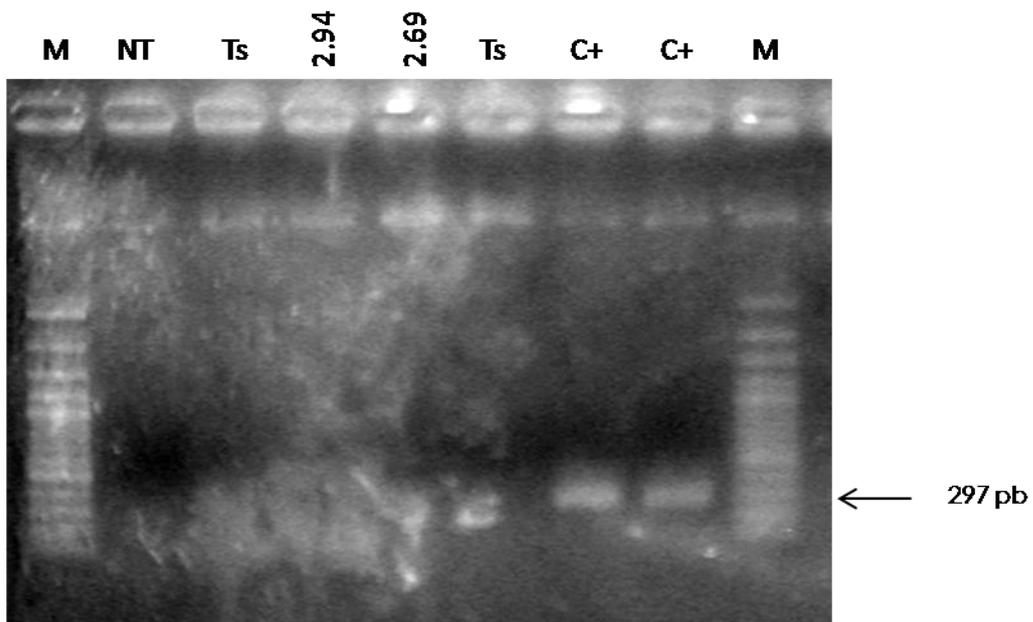
ANEXO 9. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA RT-PCR PARA ToCV.

RT-PCR ToCV



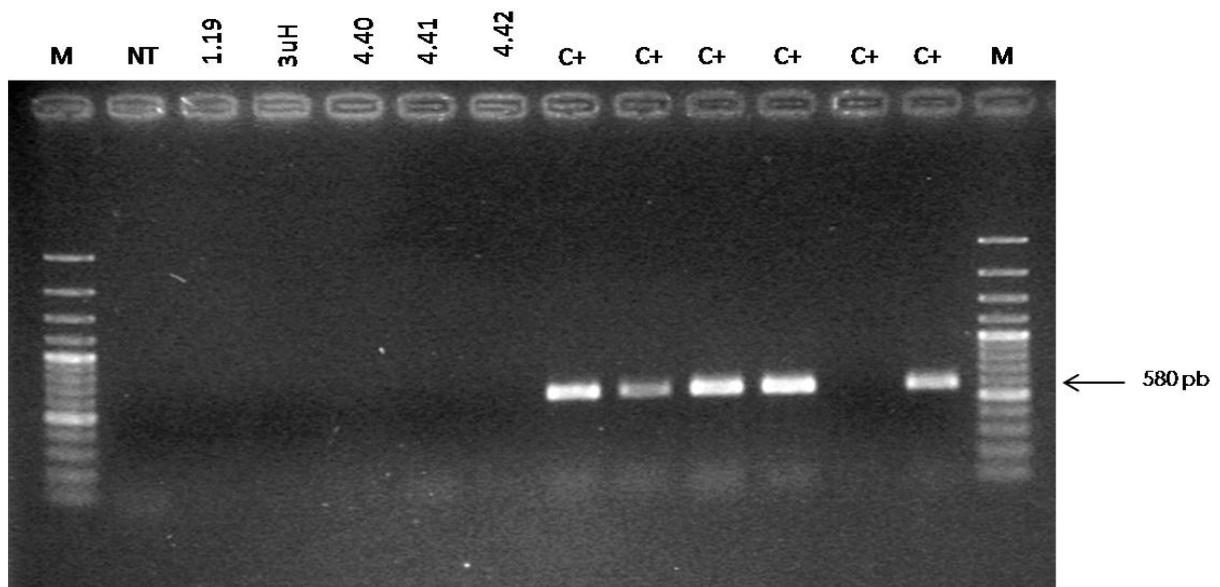
NT= Blanco
TS= Tomate sano
M= Marcador
C+=Control positivo

ANEXO 10. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA RT-PCR PARA TSWV.



NT= Blanco
TS= Tomate sano
M= Marcador
C+=Control positivo

ANEXO 11. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR PARA TYLCV Y TYLCSV.



*El quinto control positivo no ha funcionado.

NT= Blanco

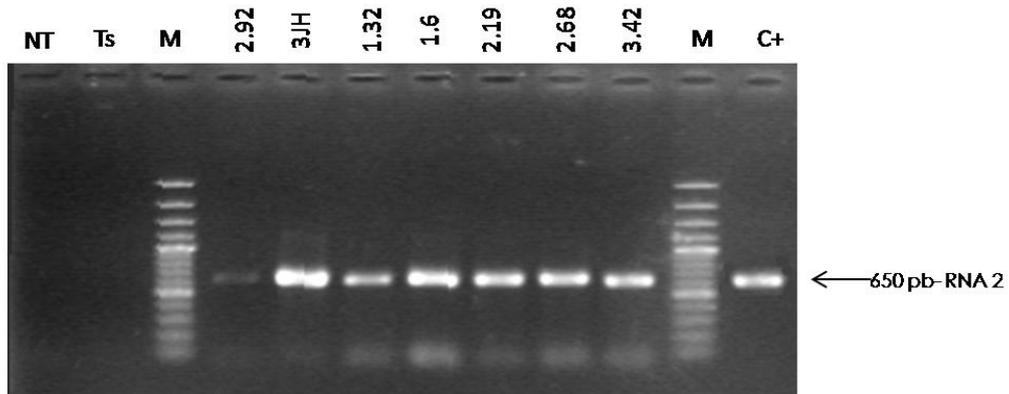
TS= Tomate sano

M= Marcador

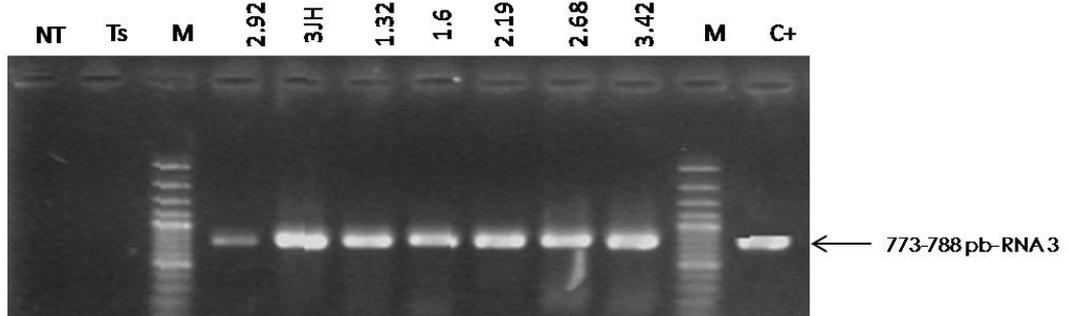
C+=Control positivo

ANEXO 12. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA RT-PCR PARA CMV.

RT-PCR- Sialer



RT-PCR- Deyong



NT= Blanco
TS= Tomate sano
M= Marcador
C+=Control positivo