



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES

**Búsqueda de posibles reservorios de
Southern tomato virus (STV) en
especies arvenses y otros cultivos
hortícolas distintos del tomate**

Trabajo final de Máster
Sanidad y Producción Vegetal

PRESENTADO POR:
Raúl Bosch Serrano

DIRIGIDO POR:
M^a Isabel Font San Ambrosio
Ana O. Alfaro Fernández

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2017

RESUMEN

El virus meridional del tomate (*Southern tomato virus*, STV), es un virus cuyo genoma consta de una molécula de RNA de doble cadena de 3.5 Kb. Ese virus está relacionado filogenéticamente con las familias *Totiviridae* (contiene virus de nematodos y protozoos) y *Partitiviridae* (que contiene virus de hongos y plantas). Forma parte del nuevo género *Almagavirus* (familia *Almagaviridae*) catalogado como un grupo de criptovirus. STV no se transmite de forma mecánica ni por injerto, pero sí por semilla, con una altísima eficiencia que puede alcanzar hasta más del 90%. Desde su primera de detección en España en 2013, se ha detectado en numerosas plantaciones de tomate tanto en variedades comerciales como locales de distintas zonas productoras, sin haberse determinado ningún otro hospedante del virus. El papel patogénico de este virus aún no está bien definido, ya que se ha detectado con frecuencia en plantas asintomáticas y en infecciones mixtas con otros virus de tomate en plantas sintomáticas.

Los objetivos planteados en este trabajo fueron analizar diferentes especies arvenses muestreadas en campos de tomate con STV de Gran Canaria para determinar si pueden ser hospedantes de este virus y poder así actuar como reservorio del mismo, y determinar si el STV está presente en otros cultivos además del tomate mediante el análisis de plántulas de diferentes especies hortícolas.

Los análisis de las muestras de flora arvense y cultivos hortícolas se realizaron mediante la técnica molecular RT-PCR con dos parejas de cebadores específicos de STV que amplifican un fragmento de 440 pb y 894 pb. Se realizó la secuenciación de las muestras positivas y su comparación con las secuencias de la base de datos del GenBank.

Los resultados obtenidos determinaron que ninguna de las especies arvenses analizadas (*Chenopodium murale*, *Conyza sumatrensis*, *Coronopus didymus*, *Malva parviflora*, *Patellifolia patellaris*, *Portulaca* spp., *Setaria adhaerens*, *Sonchus oleraceus* y *Urtica urens*) pertenecientes a 7 familias botánicas diferentes estaba infectada con STV, ya que no pudo confirmarse la identidad del virus ni mediante secuenciación del genoma de las muestras donde hubo amplificaciones con los cebadores de 440 pb, ni mediante el uso de otros cebadores específicos a STV que amplifican una longitud mayor.

Respecto a los resultados de detección de STV en cultivos hortícolas distintos al tomate, no se logró detectar la partícula viral de STV en un total de 22 muestras analizadas en los cultivos de apio, calabacín, lechuga, melón y pimiento.

Palabras Clave: STV, gama de hospedantes, RT-PCR, cebadores específicos.

ABSTRACT

Southern tomato virus (STV) has a double stranded RNA genome of 3.5 Kb. This virus is phylogenetically related to the families *Totiviridae* (which contains nematode and protozoan viruses) and *Partitiviridae* (containing fungal and plant viruses). It belongs to the new genus *Almagavirus* (family *Almagaviridae*) cataloged as a group of cryptovirus. STV is not transmitted mechanically or by grafting, but is highly efficiently transmitted by seeds, with transmission rate of 90% or more. Since its first detection in Spain in 2013, it has been detected in many tomato plantations of commercial and local varieties of different producing areas of the country. The pathogenic role of this virus is not yet well defined, as it has been frequently detected in asymptomatic plants and in mixed infections with other tomato viruses in symptomatic plants.

The objectives of this work were to analyze different weeds sampled collected in tomato fields infected with STV in Gran Canaria to determine if they can be hosts of this virus and act as reservoirs; and determine if STV is present in other crops besides tomato by analyzing samples of different horticultural species.

The analyses of weeds and horticultural crops were performed by RT-PCR with two types of STV-specific primers which amplify a 440 pb and 894 pb fragments. Positive samples were sequenced and compared to the sequences from the Genbank database.

The results obtained in the detection of STV in the weeds species determined that none of the 9 species analysed (*Chenopodium murale*, *Conyza sumatrensis*, *Coronopus didymus*, *Malva parviflora*, *Patellifolia patellaris*, *Portulaca* spp., *Setaria adhaerens*, *Sonchus oleraceus* and *Urtica urens*) were infected with the virus, because the identity of the virus was not confirmed neither by sequencing the amplification of the samples with the 440 bp STV-specific primers or by the use of other STV-specific primers that amplify a longer length fragment.

Regarding the results of STV detection in horticultural crops other than tomatoes, it was not possible to detect the STV in a total of 22 samples analyzed of celery, melon, lettuce, pepper and zucchini.

Key Words: STV, host range, RT-PCR, specific primers.

Agradecimientos

Con la entrega de este Trabajo Final de Máster se cierra mi etapa docente en la Universitat Politècnica de València así como mi estancia en el laboratorio de Virología, donde he permanecido durante estos últimos tres años aprendiendo de dos de las mejores investigadoras en el ámbito de la sanidad vegetal. Y es por ello, por lo que me gustaría agradecer de una manera especial a Isabel Font y Ana Alfaro la oportunidad de poder realizar bajo su tutela este TFM, acercarme al mundo de la virología vegetal y, sobre todo, haber confiado en mí, haciéndome sentir como uno más del grupo. Gracias.

También me gustaría expresar mi agradecimiento a las personas que desde Canarias han colaborado de una u otra forma en el desarrollo de este TFM y que sin ellas no habría sido posible su desarrollo. En especial a D. Alberto Betancourt del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), D^a Ana Isabel Espino del Laboratorio de Sanidad Vegetal de Tenerife, D^a Purificación Benito y D. Juan Monagas del Laboratorio Agroalimentario y Fitopatológico de Gran Canaria.

Por otra parte, también me gustaría dar las gracias a D^a M^a José Muñoz del Laboratorio de Diagnóstico Fitopatológico Virología de la Generalitat Valenciana y D. Luis Galipienso del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), coordinador del proyecto E-RTA2014-00010-C02-00 (Emergencia del virus meridional del tomate (*Southern tomato virus*, STV) en cultivos del tomate en España: Caracterización, epidemiología y desarrollo de estrategias para su control).

Por último, agradecer a mis padres la confianza siempre depositada en mí. Como siempre, va por vosotros.

Índice

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EL CULTIVO DEL TOMATE.....	1
1.1.1. Origen, descripción botánica y encuadre taxonómico	1
1.1.2. Importancia económica del tomate.....	2
1.2. VIRUS MERIDIONAL DEL TOMATE (STV)	4
1.2.1. Distribución geográfica y encuadre taxonómico	4
1.2.2. Morfología de la partícula viral y organización genómica	6
1.2.3. Sintomatología en tomate	7
1.2.4. Formas de transmisión.....	8
1.2.5. Gama de hospedantes	8
1.2.6. Medidas de control del STV	9
1.3. PAPEL DE LAS ESPECIES ARVENSES EN LA INCIDENCIA DE ENFERMEDADES DE ETIOLOGÍA VIRAL.....	9
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
3.1. DETECCIÓN DE STV EN ESPECIES ARVENSES ASOCIADAS AL CULTIVO DEL TOMATE	12
3.1.1. Descripción del ensayo y recogida de muestras.....	12
3.1.2. Identificación botánica y conservación.....	13
3.1.3. Análisis de las especies arvenses mediante RT-PCR con cebadores específicos de STV	15
3.1.4. Purificación y secuenciación	17
3.2. DETECCIÓN DE STV EN OTROS CULTIVOS HORTÍCOLAS DISTINTOS AL TOMATE	18
3.2.1. Material vegetal	18

3.2.2. Análisis a STV mediante RT-PCR.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. DETECCIÓN DE STV EN ESPECIES ARVENSES ASOCIADAS AL CULTIVO DEL TOMATE	21
4.2. DETECCIÓN DE STV EN OTROS CULTIVOS HORTÍCOLAS DISTINTOS DEL TOMATE	24
5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA	27
7. ANEXOS	30
Anexo 7.1. Importancia económica del tomate.....	30
Anexo 7.2. Material y Métodos.....	33
Anexo 7.3. Resultados y Discusión.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales países productores de tomate fresco a nivel mundial en 2015. Fuente: Elaboración propia en base a datos de FAO (2015).....	2
Figura 2. Principales países productores de tomate en la Unión Europea. Fuente: Elaboración propia en base a datos de FAO (2015).....	3
Figura 3. Principales comunidades autónomas productoras de tomate en España. Fuente: Elaboración propia en base a datos de MAPAMA (2015).	3
Figura 4. Representación esquemática de la organización del genoma de STV y miembros representativos de la familia <i>Totiviridae</i> y <i>Partiviridae</i> . Las proteínas con la misma función se indican con el mismo color. Fuente: Sabanadzovic et al. (2009).	7
Figura 5. Sintomatología observada en frutos de tomate cherry con infección simple de STV (a) o coinfectados con CMV y PepMV (b). Fuente: IAM-UPV.	8
Figura 6. Esquema de la distribución de plantas en las dos parcelas: al aire libre (a) y bajo invernadero (b).....	12
Figura 7. Muestras de especies arvenses antes de su procesado.....	15
Figura 8. Detalle de los tubos eppendorf de 1,5 ml con el ARN extraído de las muestras y tubos de 0,2 ml donde se mezcla este ARN con el cóctel de reacción para la realización de la RT-PCR, todo sobre hielo picado.	16
Figura 9. Resultados tras la RT-PCR de las muestras seleccionadas con los cebadores STV-for/STV-rev que amplifican un fragmento de 894 pb.	22
Figura 10. Detalle de los resultados de RT-PCR a STV a unas muestras de pimiento, melón y calabacín.	25

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Especies arvenses muestreadas en las parcelas experimentales de tomate en la Granja Experimental del Cabildo de Gran Canaria (Gran Canaria) para determinar posibles reservorios de STV.....	14
Tabla 2. Cebadores empleados de STV para la realización de la RT-PCR.....	17
Tabla 3. Cultivos hortícolas incluidos en el análisis a STV para determinar posibles reservorios del virus.	18
Tabla 4. Resultados del análisis a STV de las muestras de flora arvense recogidas en dos parcelas experimentales de Gran Canaria.	21
Tabla 5. Resultados de la secuenciación y análisis Blast de los fragmentos amplificados con los cebadores de STV de las muestras de flora arvense seleccionadas.....	23

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CULTIVO DEL TOMATE

1.1.1. Origen, descripción botánica y encuadre taxonómico

El tomate es originario de la región andina compartida por Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador y Perú. Aunque su domesticación ha creado mucha controversia entre los botánicos, todo apunta que fue en México donde tuvo lugar. Así pues, el tomate cultivado tuvo su origen en el Nuevo Mundo y a su llegada a Europa y Asia había alcanzado una fase avanzada de domesticación, distinguiéndose ya una variedad de tipos caracterizados por la forma, acostillado, tamaño y color de los frutos (Rick, 1978).

El nombre científico tradicional que se empleaba hasta hace unos años era el de *Lycopersicon esculentum* Mill, aunque recientes estudios en su estructura molecular han generado un nuevo encuadre taxonómico, incluyendo al tomate en el género *Solanum* e identificándolo como *Solanum lycopersicum* L. (Peralta *et al.*, 2005). Esta especie, perteneciente a la familia de las solanáceas, constituida por 98 géneros y unas 2.500 especies (Olmstead *et al.*, 2008), se trata de una planta dicotiledónea cultivada normalmente de forma anual. Su duración vegetativa puede prolongarse varios años si las condiciones climáticas son favorables (Maroto, 2002).

Posee un sistema radicular amplio, constituido por una raíz principal que puede alcanzar hasta 50-60 cm de profundidad y provista de una gran cantidad de ramificaciones secundarias, reforzado por la presencia de un gran número de raíces adventicias surgidas desde la base de los tallos. Dichos tallos están totalmente recubiertos de pelos siendo algunos de naturaleza glandular y confiriendo a la planta su olor tan característico. Las hojas se disponen sobre los tallos alternadamente y son compuestas e imparipinnadas, constituidas generalmente por 7-8 foliolos lobulados o dentados. Su floración se produce en forma de racimos simples o ramificados y en diferentes pisos o estratos siendo lo normal que por inflorescencia haya entre 3-10 flores. El fruto del tomate es una baya globosa, de color generalmente rojo en fase de maduración, aunque esto varía en función de la variedad. La superficie puede ser acostillada o lisa y en su interior se definen perfectamente los lóculos carpelares, pudiendo variar entre 2 y 30. El diámetro oscila entre 3 y 16 cm. Las semillas son

grisáceas, de pequeño tamaño, discoidales y están recubiertas de vellosidades, pudiendo durar su capacidad germinativa entre 4 y 5 años (Maroto, 2002).

1.1.2. Importancia económica del tomate

En la actualidad, el cultivo del tomate se ha convertido en un producto básico en la horticultura española alcanzando una gran importancia a escala mundial. Según los últimos datos publicados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el año 2015 los países líderes en producción de este producto fueron China, India, Estados Unidos, Turquía y Egipto, destacando el primero por encima del resto con una producción de 52,5 millones de toneladas frente a las 18,7 de India, segundo mayor productor, como puede observarse en la figura 1. España se sitúa como el octavo país en la producción de esta hortaliza.

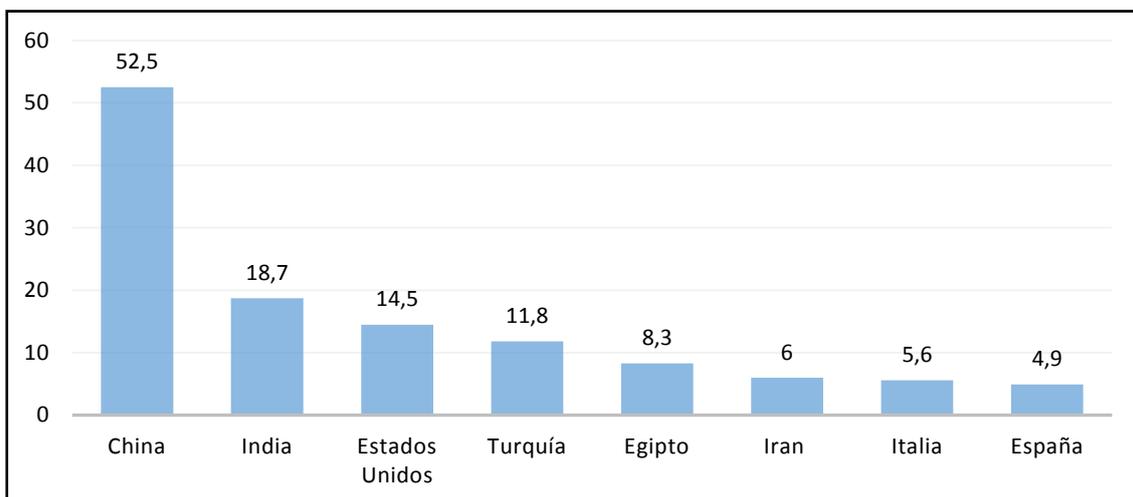


Figura 1. Principales países productores de tomate fresco a nivel mundial en 2015. Fuente: Elaboración propia en base a datos de FAO (2015).

A nivel europeo, España e Italia son líderes en producción y superficie dedicada a este cultivo, abarcando alrededor del 66% del total producido en el continente. El clima favorable de la vertiente mediterránea, unido a suelos con buenas características para su cultivo, hacen posible estos datos tan relevantes. Portugal, Grecia y Holanda les siguen en cuanto a volumen de producción de tomate fresco, aunque se encuentran actualmente muy lejos de las cifras generadas por Italia y España (Figura 2).

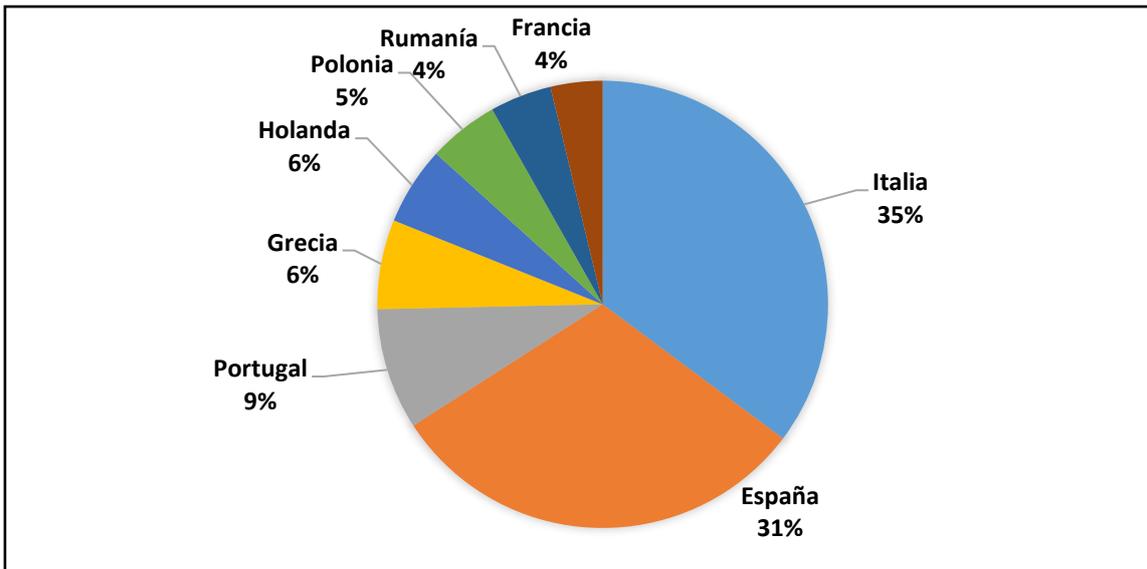


Figura 2. Principales países productores de tomate en la Unión Europea. Fuente: Elaboración propia en base a datos de FAO (2015).

Como se observa en la figura 3, las comunidades autónomas con mayor producción de tomate son Extremadura y Andalucía. La mayoría proviene de cultivo en regadío donde se observa que los rendimientos de producción son mucho mayores que en secano. El tomate protegido mediante invernaderos y mallas también tiene una tendencia positiva, aunque queda aún lejos de la superficie total cultivada al aire libre (Anexo 7.1. Importancia económica del tomate. Tabla I).

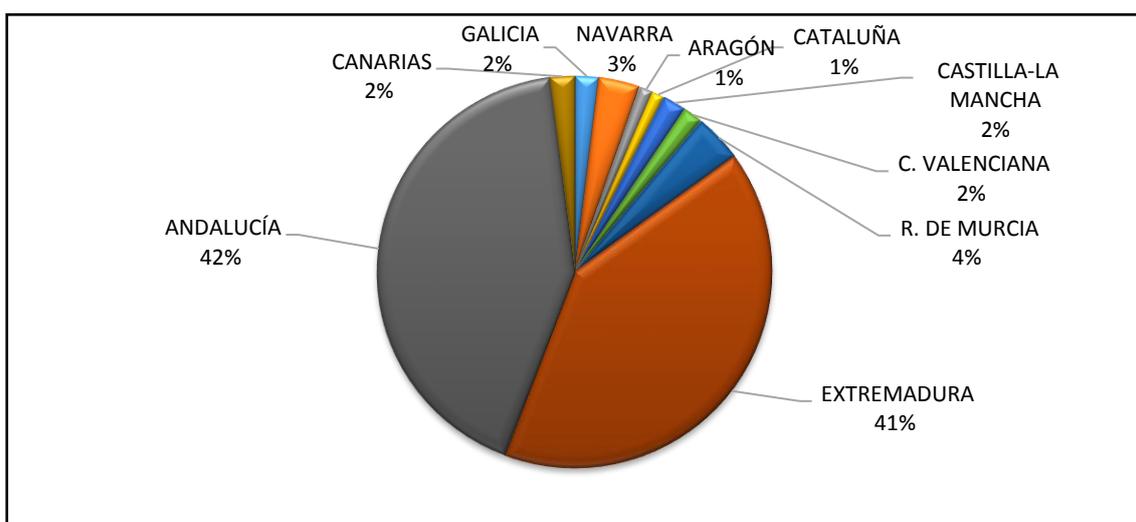


Figura 3. Principales comunidades autónomas productoras de tomate en España. Fuente: Elaboración propia en base a datos de MAPAMA (2015).

Las estadísticas facilitadas por el MAPAMA muestran que la superficie destinada al cultivo se redujo de manera significativa a partir del año 2009, alcanzando las cifras más bajas de los últimos diez años en 2013. A partir de ese año, la superficie dedicada al tomate volvió a aumentar de manera considerable, llegando en 2015 a registrar un incremento de diez mil hectáreas, frente a los datos de 2013. Algo similar sucede con la producción, que sufrió una fuerte caída a partir de ese mismo año, pero mostró signos de recuperación a partir de 2011. Aunque la reducción de la superficie cultivada es evidente, este dato se ve compensado por el crecimiento del rendimiento del cultivo, fijándose en el año 2015 en 83 T/Ha, cuando en 2005 se encontraba en 67 T/Ha (Anexo 7.1. Importancia económica del tomate. Tabla II). Estos datos reflejan la progresiva introducción de cultivares mucho más productivos y la selección varietal realizada gracias a los avances en la mejora genética, así como las implementaciones tecnológicas que van surgiendo en el sector (MAPAMA, 2015).

Por último, a nivel de la Comunidad Valencia, según los últimos datos estimados por la Generalitat Valenciana correspondientes al año 2016, el tomate es la hortaliza con mayor producción con 78.375 toneladas siendo los municipios de Mutxamel y El Campello (ambos en la comarca de L'Alacantí) los que mayor superficie destinan a este cultivo con 197 y 75 Ha, respectivamente (GVA, 2016) (Anexo 7.1. Importancia económica del tomate. Tabla III).

1.2. VIRUS MERIDIONAL DEL TOMATE (STV)

1.2.1. Distribución geográfica y encuadre taxonómico

El virus meridional del tomate (*Southern tomato virus*, STV) fue descubierto hace relativamente poco tiempo, detectándose por primera vez en el año 2009 en plantaciones de tomate de Estados Unidos, concretamente en los estados de California y Misisipi, y en el suroeste de México (Sabanadzovic *et al.*, 2009). Unos años más tarde, en 2013, STV fue detectado en cultivos de tomate del sureste de Francia que mostraban síntomas de mosaico y distorsión foliar, y presentaban asimismo infección por el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) y el virus Y de la patata (*Potato virus Y*, PVY) (Candresse *et al.*, 2013).

En 2015, se publica la detección del virus en las Islas Canarias (España), en plantas de tomate muestreadas en 2006 en Gran Canaria y que fueron analizadas mediante secuenciación masiva (Next-Generation Sequencing, NSG). De este modo se determinó la presencia de STV en coinfección con el virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, ToTV) y el virus de la clorosis del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV). En mayo de 2014, se muestreó de nuevo en la misma zona donde se había detectado por primera vez STV, confirmándose su presencia en plantaciones de tomate, pero en este caso STV se encontró en infección mixta con el virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV), el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) y el virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (Verbeek *et al.*, 2015).

A raíz de la detección de este nuevo virus en las Islas Canarias, se han realizado estudios por el personal del Grupo de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València (IAM-UPV), el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Tenerife y el Laboratorio Agroalimentario y Fitopatológico de Gran Canaria, detectándose este virus en plantas con una sintomatología similar a la provocada por la infección de PepMV, así como en plantas asintomáticas. Dada la similitud de la sintomatología por la originada por PepMV, esta enfermedad ha sido denominada por los productores canarios como el síndrome del “falso PepMV” (Font y Alfaro-Fernández, 2015). Muestreos realizados en la zona de Granada por el Grupo de Virología IAM-UPV han determinado la presencia de este virus también en la Península Ibérica.

STV ha sido descrito también en Italia, en muestras de tomate coinfectadas con PepMV y PVY (Iacono *et al.*, 2015). En Asia, el virus está descrito en dos países por el momento, China y Bangladesh. En China, las plantas infectadas con STV mostraban mosaicos severos, epinastia y la deformación de hojas, presentando además coinfección con el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), TYLCV y ToCV (Padmanabhan *et al.*, 2015a). En Bangladesh, las plantas tenían síntomas similares a las anteriores, y STV estaba en infección mixta con PVY y CMV (Padmanabhan *et al.*, 2015b). En febrero de 2017 también se detectó el virus en el estado de Florida (EEUU) en tomates asintomáticos (Alcalá-Briseño *et al.*, 2017).

Su encuadre taxonómico ha creado también problemas a muchos investigadores, ya que por las características filogenéticas y estructura genética parecía tener vínculos entre las familias *Partitiviridae* y *Totiviridae* (Sabanadzovic *et al.*, 2009). Por un lado, comparte propiedades con los miembros del género *Totivirus* por la conformación de su genoma, mientras que los análisis filogenéticos mostraban una evolución más próxima a la de los integrantes en el género *Partivirus*. En el año 2013, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) creó una nueva familia que denominaron *Amalgaviridae* y el género *Amalgavirus* en el cual incluyeron *Southern tomato virus* (STV), como miembro tipo, además de *Blueberry latent virus* (BBLV), *Rhododendron virus A* (RhVA) y *Vicia cryptic virus M* (VCVM) (Tzanetakis y Sabanadzovic, 2013; ICTV, 2017).

Estos cuatro virus han sido identificados en la última década, con una evolución histórica común y compartiendo muchas propiedades genéticas, filogenéticas y biológicas. Por estas razones y por la incompatibilidad de inclusión en las otras familias de virus vegetales se justificaba el reconocimiento oficial de un nuevo taxón (Martin *et al.*, 2006; Liu y Chen, 2009; Sabanadzovic *et al.*, 2009; 2010; Martin *et al.*, 2011).

1.2.2. Morfología de la partícula viral y organización genómica

La partícula viral de STV, así como la de los otros tres virus incluidos en el nuevo género, no ha podido ser purificada y observada en tejidos infectados. Este hecho podría deberse a dos causas hipotéticas: que STV forme muy pocos viriones, como ocurre en otros miembros de la familia *Partitiviridae*, o que el virus exista en la célula en forma de ácido nucleico no encapsidado, como ocurre en otras especies de los géneros *Endornavirus*, *Hypovirus* o *Umbravirus*, donde las partículas que forman consisten en vesículas citoplasmáticas con actividad ARN-polimerasa ARN-dependiente (RNA dependent RNA-polymerase, RdRp) asociada a los ácidos nucleicos genómicos (Sabanadzovic *et al.*, 2009).

El genoma de STV consta de una molécula de ARN de doble hebra y una longitud de 3.5 Kb. Además, la secuenciación y clonación del genoma viral muestra la existencia de dos marcos abiertos de lectura (Open Reading frames, ORFs) o genes solapados parcialmente. La ORF 1 (próxima al extremo 5') codifica largas cadenas lineales de aminoácidos que podrían dar lugar a la proteína de cubierta, aunque por el momento se desconoce la función específica de esta proteína. Por otro lado, la ORF 2 está próxima al

extremo 3' y codificaría la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp), involucrada en la replicación del ARN del virus (Sabanadzovic *et al.*, 2009).

STV muestra una notable similitud en la forma en la que se encuentra organizado el genoma del virus con la familia *Totiviridae*, con cierta homología en las secuencias nucleotídicas (Figura 4).

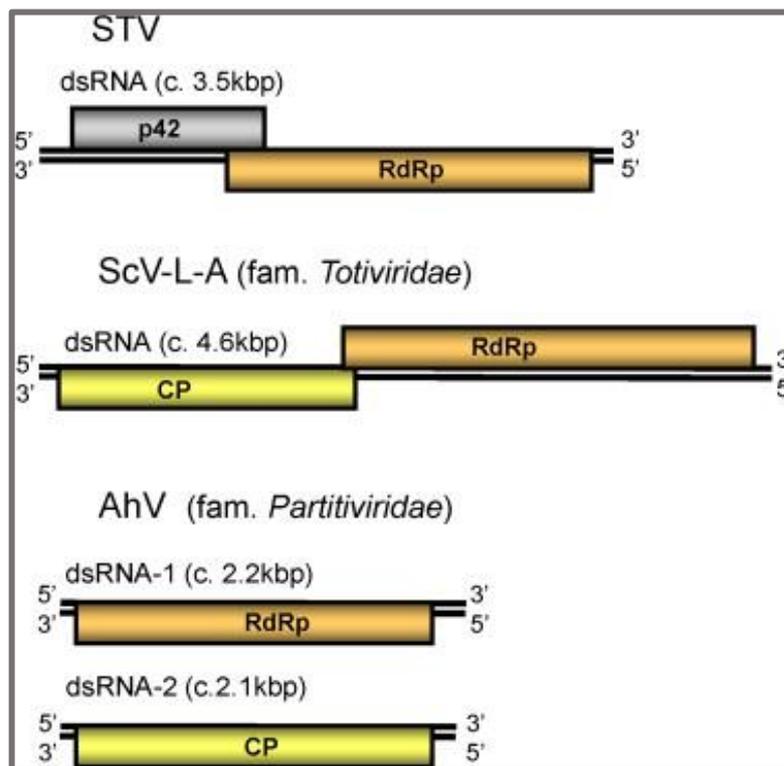


Figura 4. Representación esquemática de la organización del genoma de STV y miembros representativos de la familia *Totiviridae* y *Partitiviridae*. Las proteínas con la misma función se indican con el mismo color. Fuente: Sabanadzovic *et al.* (2009).

1.2.3. Sintomatología en tomate

La sintomatología que STV induce en tomate no está muy clara por el momento por tres motivos: se ha detectado frecuentemente en infección mixta con otros virus, plantas con sintomatologías similares a la descrita para STV han resultado negativas al virus y se detecta STV también en plantas asintomáticas (Candresse *et al.*, 2013). Los síntomas que se han venido asociando a este virus en las distintas detecciones descritas son mosaico, distorsión foliar, epinastia, deformación, amarilleo, falta de cuajado y decoloración de los frutos (Sabanadzovic *et al.*, 2009; Padmanabhan *et al.*, 2015a; 2015b). En cultivos de tomate españoles de Gran Canaria, Tenerife y más recientemente

en Granada se han detectado una serie de síntomas, denominados por los productores como síndrome del “falso PepMV”, que consisten en amarilleos generalizados, pobre desarrollo de las plantas, falta de cuajado, maduración incompleta y reducción del tamaño de los frutos. En muestras recogidas de plantas con este síndrome se ha detectado STV en infección simple (Figura 5a) o mixta con otros virus como PepMV y CMV (Figura 5b).



Figura 5. Sintomatología observada en frutos de tomate cherry con infección simple de STV (a) o coinfectados con CMV y PepMV (b). Fuente: IAM-UPV.

1.2.4. Formas de transmisión

Se ha comprobado que el virus no se trasmite ni mecánicamente ni por injerto. Sin embargo, la transmisión por semilla es muy elevada, con una eficiencia comprendida entre el 70-90%, lo que ha ocasionado preocupación entre los productores y casas comerciales de semillas (Sabanadzovic *et al.*, 2009). Tampoco se ha identificado ningún vector de transmisión horizontal, aunque la alta incidencia del virus en las parcelas infectadas y la distribución de las plantas infectadas en las mismas sugiere un vector aéreo, posiblemente con la ayuda de otro virus (*virus helper*), como sucede en otras especies del género *Umbravirus* (Sabanadzovic *et al.*, 2009).

1.2.5. Gama de hospedantes

Hasta la fecha, STV se ha detectado únicamente en tomate, encontrándose un mayor porcentaje de infección en variedades híbridas respecto a variedades de tomate locales. Las variedades híbridas donde se ha detectado STV son: Armstrong, Anairis, Angelle, Angellety, Bambelo, Barón, Better Boy, Boludo, Brentyla, Celebrity, Conquista, Dorothy, Dumas, Ercole, Eufrates, Flavoriti, Globe Trotter, Guindo, Ibargarza, Invictus, Jack, Júpiter, Katalina, Kukuyu, Loica, Malpica, Mariana, Marinova, Mini Star, Montenegro, Olympte, Óptima, Ornela, Ramyle, Realeza, Red Sky, Río Grande, Robin,

Royesta, Seychelles, Shiren, Summer Sun, Sweet Heart, Sybilla, Top 111, Tovi Sacro, Trust, Tyking, UC-82, Vernal y Vilma (Sabanadzovic *et al.*, 2009; Font San-Ambrosio *et al.*, 2017). En cuanto a variedades locales infectadas encontramos Muchamiel, Penjar, Pera de Orihuela, Rosa Cándido, Valenciano y Valenciano Gordal (Font San-Ambrosio *et al.*, 2017).

1.2.6. Medidas de control del STV

Por el momento no hay suficiente información sobre la epidemiología de STV para establecer medidas de control, no estando claro tampoco su naturaleza patogénica.

1.3. PAPEL DE LAS ESPECIES ARVENSES EN LA INCIDENCIA DE ENFERMEDADES DE ETIOLOGÍA VIRAL

El mantenimiento de los campos de cultivo libres de todas aquellas plantas no deseadas siempre ha tenido como principal objetivo mejorar la producción y controlar de manera indirecta la transmisión de muchas virosis a través de especies arvenses al cultivo.

A pesar de que las especies arvenses pueden constituir un reservorio de virus, actualmente existen métodos de manejo de cultivos que permiten mantener e incluso mejorar las propiedades edafológicas del suelo de cultivo con el uso de coberteras entre las líneas del cultivo. Además, es interesante mantener en el campo las especies arvenses asociadas a los cultivos que actúen como hospedantes de ciertos depredadores o parasitoides de plagas del cultivo, aumentando así la efectividad del control biológico (Montserrat, 2002). Recientes estudios que evaluaban la movilidad de vectores transmisores de virus, en concreto *Papaya ringspot virus* (PRSV) y *Watermelon mosaic virus* (WMV) por los áfidos *Aphis craccivora* (Koch), *Therioaphis trifolii* (Monell) y *Rhopalosiphum padi* (L.), aseguran que la influencia de la cobertura vegetal de los alrededores de un cultivo ejerce una mayor influencia en la dispersión de los vectores que la flora arvense encontrada en el interior de las parcelas del cultivo, lo que lleva a cuestionar que el manejo de la flora arvense local prevenga la dispersión de virosis en determinados sistemas (Angelella *et al.*, 2016).

Sin embargo, existen numerosos estudios que determinan que hay multitud de especies arvenses que pueden actuar como posible reservorio de virosis y otros agentes

fitopatógenos. Ejemplo de ello podría ser la detección del virus del torrado del tomate (ToTV) en especies de las familias *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cruciferae* y *Malvaceae* (Alfaro-Fernández *et al.*, 2008); el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) detectado en Canarias sobre *Amaranthus* sp., en Alicante sobre *Heliotropium europaeum* L., *Coronopus* sp., *Sisymbrium irio* L., *Conyza albida* Willd. ex Spreng, *Onopordum* sp., *Calystegia sepium* (L.) R. Br., *Convolvulus althaeoides* L., *Diploaxis eruroides* (L) DC, *Moricandia arvensis* (L.) DC, *Plantago afra* L., *Rumex* sp. (Jordá *et al.*, 2001) y en Murcia sobre *Echium creticum* L., *E. humile* Desf, *Sonchus oleraceus* L., *S. terrenimus* L., *Taraxacum vulgare* (Lam.) Schrank., *C. arvensis* L., *Piptatherum multiflorum* (Cav.) Beauv., *Malva parviflora* L. (Córdoba *et al.*, 2004). También se ha citado al virus de los amarillos necróticos de la lechuga (*Lettuce necrotic yellows virus*, LNYV), el cuál es transmitido por el áfido *Hyperomyzus lactucae* L. tras alimentarse de las especies arvenses *S. oleraceus* y *Lactuca serriola* L. previa adquisición de la partícula viral, permitiendo la supervivencia del vector y actuando como reservorios naturales del LNYV. En el caso de otros patógenos del suelo, como el nematodo *Xiphinema* spp. transmisor de *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV) y el hongo *Olpidium* spp. transmisor del virus de la necrosis del tabaco (*Tobacco necrosis virus*, TNV), se ha confirmado su supervivencia en una amplia gama de arvenses, reduciendo mucho su incidencia cuando las arvenses eran eliminadas de los campos agrícolas (Duffus, 1971).

Justificación y Objetivos

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde 2015 se viene detectando STV en zonas productoras de tomate de Gran Canaria, Tenerife, Granada y Comunidad Valenciana tanto en plantas de tomate que muestran una falta de maduración de frutos, como en plantas asintomáticas. Sin embargo, todavía queda por precisar el papel que desempeña el virus en el desarrollo de los síntomas, puesto que casi siempre se detecta en coinfección con otros virus como CMV, PepMV, ToCV, ToTV y/o TSWV, además de no detectarse siempre en plantas con sintomatologías similares e incluso detectarse el virus en plantas asintomáticas (Font y Alfaro-Fernández, 2015; Verbeek *et al.*, 2015). En 2014, se solicitó un proyecto de investigación I+D+i INIA del Plan Nacional que fue concedido en 2015 (E-RTA2014-00010-C02-02), para profundizar la epidemiología del STV y determinar su implicación en los desórdenes vegetativos observados en plantas de tomate con el síndrome del “falso PepMV”. Dentro de los objetivos del proyecto estaba la búsqueda de reservorios naturales del virus, ya que, hasta la fecha, STV únicamente se ha detectado en diferentes variedades de tomate tanto híbridas como locales (Font-San-Ambrosio *et al.*, 2017).

Los objetivos concretos que se plantearon desarrollar en este Trabajo Fin de Máster fueron:

1. Búsqueda de reservorios naturales de STV en especies arvenses asociadas al cultivo del tomate en Gran Canaria.
2. Búsqueda de la presencia de STV en otros cultivos hortícolas diferentes al tomate.

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DETECCIÓN DE STV EN ESPECIES ARVENSES ASOCIADAS AL CULTIVO DEL TOMATE

3.1.1. Descripción del ensayo y recogida de muestras

Las especies arvenses a estudiar en este TFM se recogieron en dos parcelas experimentales ubicadas en la Granja Experimental del Cabildo de Gran Canaria (Gran Canaria), una al aire libre y la otra bajo estructura de invernadero de malla. El objetivo de los ensayos realizados en estas dos parcelas era profundizar en diversos aspectos de la epidemiología de STV. Por un lado, el estudio de la transmisión horizontal del virus mediante vectores aéreos en la parcela situada al aire libre, para ello se situaron las plantas infectadas con STV en la zona de la parcela donde incidían los vientos dominantes, y siguiendo esa dirección se ubicaron las plantas sanas, buscando así las condiciones más favorables para la transmisión del virus por vía entomológica (Figura 6a). Por otro lado, se estudió la transmisión horizontal del virus mediante contacto entre plantas o vectores terrestres en invernadero donde se dispusieron en líneas alternas de plantas infectadas con STV y sanas para comprobar si existía transmisión del virus mediante el agua de riego, hongos de suelo o mediante contacto entre plantas (Figura 6b).

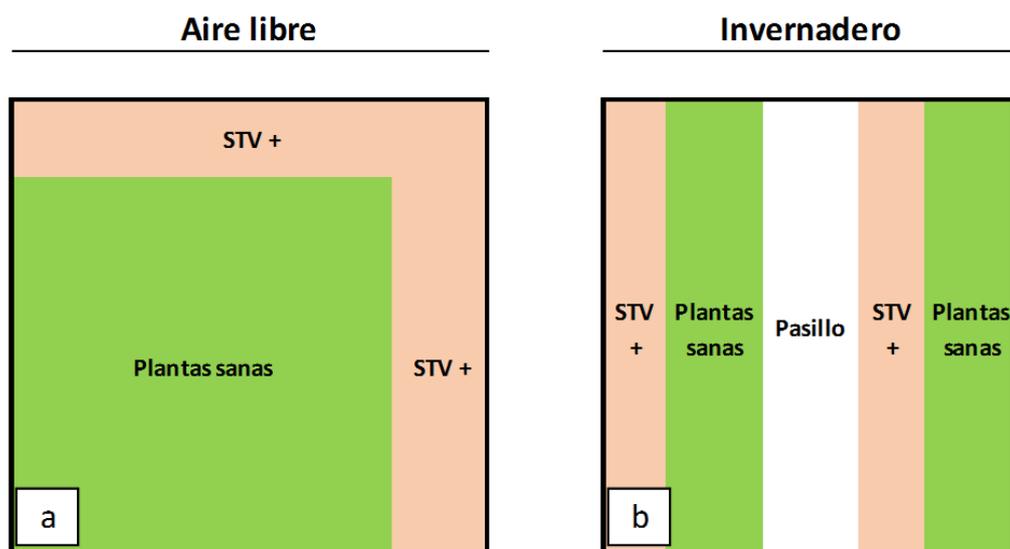


Figura 6. Esquema de la distribución de plantas en las dos parcelas: al aire libre (a) y bajo invernadero (b).

Para el estudio de posibles reservorios naturales de STV dentro de la flora arvense asociada al cultivo del tomate, se recogieron todas las especies arvenses crecidas dentro y en los márgenes de las parcelas experimentales establecidas en el proyecto INIA, tanto del ensayo al aire libre (codificado como mhe) como dentro del invernadero (codificado como mhi). Se cogieron, siempre que fue posible, 10 individuos por especie de arvense, identificándose la especie con un número y cada uno de los diez individuos con una letra de la “a” a la “j”. Los muestreos en campo fueron realizados por el personal de apoyo a la investigación del Cabildo y Gobierno de Canarias y la clasificación e identificación botánica fue llevada a cabo por el Dr. Alfredo J. Reyes Betancort (ICIA). Las muestras se deshidrataron para su conservación y posterior procesado en papel secante dentro de un recipiente de plástico con silica gel y se conservaron a 4 °C.

Para tener una mayor cantidad de datos disponibles, las muestras fueron recogidas en diferentes momentos del cultivo realizándose en total, seis momentos de recolección en la parcela al exterior y siete en la protegida bajo invernadero. Simultáneamente a la toma de las muestras se tomaron fotos de las distintas especies arvenses recogidas (Anexo 7.2. Material y Métodos. Fotografías de las especies arvenses de Gran Canaria incluidas en el estudio).

3.1.2. Identificación botánica y conservación

Las muestras se clasificaron en el laboratorio del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) mediante claves botánicas por el Dr. Alfredo Reyes Betancort. En total, se recogieron 9 especies diferentes de 7 familias botánicas distintas (Tabla 1).

Material y Métodos

Tabla 1. Especies arvenses muestreadas en las parcelas experimentales de tomate en la Granja Experimental del Cabildo de Gran Canaria (Gran Canaria) para determinar posibles reservorios de STV.

Localización	Especie inventariada	Familia botánica	Nº individuos
Invernadero	<i>Chenopodium murale</i> L. (mhi 1 ^a)	<i>Chenopodiaceae</i>	10
	<i>Setaria adherens</i> (Forssk) Chiov. (mhi 2)	<i>Poaceae</i>	10
	<i>Urtica urens</i> L. (mhi 3)	<i>Urticaceae</i>	10
	<i>Malva parviflora</i> L. (mhi 4)	<i>Malvaceae</i>	10
	<i>Conyza sumatrensis</i> (S.F. Blake) Pruski & G. Sancho (mhi 5)	<i>Asteraceae</i>	8
	<i>Sonchus oleraceus</i> L. (mhi 6)	<i>Asteraceae</i>	9
	<i>Portulaca</i> spp. (mhi 7)	<i>Portulacaceae</i>	10
Aire libre	<i>Patellifolia patellaris</i> (Moq.) A.J.Scott, Ford-Lloyd & J.T.Williams (mhe 1 ^b)	<i>Chenopodiaceae</i>	9
	<i>Malva parviflora</i> L. (mhe 2)	<i>Malvaceae</i>	10
	<i>Urtica urens</i> L. (mhe 3)	<i>Urticaceae</i>	10
	<i>Sonchus oleraceus</i> L. (mhe 4)	<i>Asteraceae</i>	10
	<i>Chenopodium murale</i> L. (mhe 5)	<i>Chenopodiaceae</i>	10
	<i>Coronopus didymus</i> L. Sm. (mhe 6)	<i>Brassicaceae</i>	4

^amhi: ensayo en invernadero

^bmhe: ensayo al aire libre

Por último, las especies ya deshidratadas y conservadas en papel secante, se enviaron al laboratorio de Virología de la Universitat Politècnica de València (Grupo de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València, IAM-UPV), donde se guardaron a 4 °C hasta el momento de su análisis.

3.1.3. Análisis de las especies arvenses mediante RT-PCR con cebadores específicos de STV

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en producir múltiples copias de un segmento determinado de DNA, amplificando parte del genoma viral y permitiendo así su detección. El genoma de la mayoría de los virus vegetales está constituido por RNA, por tanto, para realizar la PCR es necesario incluir un paso preliminar donde una transcriptasa reversa (RT) realiza la transcripción de RNA a la cadena complementaria de DNA (cDNA) que servirá de molde para la PCR (De Blas *et al.*, 1996). Esta modalidad se denomina RT-PCR y es la que se aplicará en el presente trabajo, ya que el genoma de STV es de RNA.

Previamente a la realización de la RT-PCR, se llevó a cabo la extracción del ácido ribonucleico (RNA) total de las muestras de especies arvenses recogidas con el método de captura con silica descrito por Mackenzie *et al.* (1997). El protocolo que se ha seguido se encuentra detallado en el protocolo 1 del Anexo 7.2. Material y Métodos. Cada muestra consistía en 100 miligramos de material vegetal deshidratado depositado en una bolsita de plástico transparente (Figura 7). Una vez extraído el RNA total éste se resuspendió en 150 µl de agua desionizada estéril y se procedió a analizar las muestras para detectar STV mediante RT-PCR (protocolo 2 del Anexo 7.2. Material y Métodos).



Figura 7. Muestras de especies arvenses antes de su procesado.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador *Labcycler* (SensoQuest, Göttingen, Alemania) ubicado en un cuarto con refrigeración continua. Antes de preparar el cóctel para la RT-PCR, se realizó una desnaturalización del RNA, que consistió en una incubación a 65°C durante 5 minutos. La RT-PCR se realizó en un solo paso empleando el enzima SuperScript™ III RT with Platinum Taq kit (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España) y los cebadores específicos de STV descritos por Sabanadzovic *et al.* (2009) recogidos en la tabla 2 que amplifican un fragmento de 440 pb (Figura 8).

El programa empleado para la RT-PCR consistió: en primer lugar, de una incubación a 50°C durante 30 minutos para conseguir la transcripción reversa del RNA a DNA complementario (cDNA). Después se elevó la temperatura hasta 94°C y se mantuvo durante dos minutos para desnaturalizar el cDNA molde. Posteriormente, se llevaron a cabo 40 ciclos que consistían en una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, seguida de una fase de anillamiento de los cebadores durante 45 segundos a 53°C y por último una fase de elongación de 1 minuto a 68°C. Se incluyó para finalizar un paso más de elongación consistente en un ciclo de 10 minutos a 68°C para completar los fragmentos de PCR que hubieran quedado incompletos. Una vez finalizada la reacción, el termociclador mantuvo los productos obtenidos a 10 °C para su conservación en buenas condiciones.

Para visualizar los productos amplificados se sometieron a un proceso de electroforesis a 120 V en gel de agarosa al 1,2% en el tampón de electroforesis TAE 1X (Tris, Ácido acético y EDTA) que posteriormente fue teñido en bromuro de etidio y visualizado en un equipo de fotodocumentación de geles (Gel Printer Plus, TDI, Madrid, España) bajo luz UV (protocolo 3 del Anexo 7.2. Material y Métodos).



Figura 8. Detalle de los tubos eppendorf de 1,5 ml con el ARN extraído de las muestras y tubos de 0,2 ml donde se mezcla este ARN con el cóctel de reacción para la realización de la RT-PCR, todo sobre hielo picado.

Posteriormente, en el caso de obtenerse alguna amplificación con los cebadores de 440 pb descritos por Sabanadzovic *et al.* (2009), con el fin de obtener un fragmento mayor, secuenciarlo y confirmar el resultado obtenido, se emplearon los cebadores específicos de STV descritos por Candresse *et al.* (2013) que amplifican un fragmento de 894 pb (Tabla 2), realizando en ese caso la RT-PCR como se ha indicado anteriormente.

3.1.4. Purificación y secuenciación

Para llevar a cabo la secuenciación en caso de amplificaciones positivas para confirmar que los productos amplificados mediante la técnica RT-PCR correspondían a STV, estos se purificaron empleando el kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante (protocolo 4 del Anexo 7.2. Material y Métodos). Las muestras purificadas se cuantificaron y se procedió a su secuenciación directa en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (IBMCP). Las secuencias obtenidas se visualizaron mediante el software Chromas Little versión 2.6.4 y se compararon con secuencias nucleotídicas del virus depositadas en la base de datos del GenBank, realizando un análisis Blast (Basic Local Alignments Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabla 2. Cebadores empleados de STV para la realización de la RT-PCR.

Nombre del cebador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Localización en el genoma	Gen amplificado	Tamaño amplificado	Referencia
STV-F ^b	CGTTATCTTAGGCGTCAGCT	993-1012 ^a	Polimerasa	440 pb	Sabanadzovic <i>et al.</i> (2009)
STV-R ^c	GGAGTTTGATTGCATCAGCG	1413-1432 ^a	-	-	
STV-for ^b	CTGGAGATGAAGTGCTCGAAGA	2331-2352 ^d	Polimerasa	894 pb	Candresse <i>et al.</i> (2013)
STV-rev ^c	TGGCTCGTCTCGCATCCTTCG	3204-3224 ^d	-	-	

^a Localización en el genoma referido al aislado MT-1 (México) depositado en la base de datos del GenBank con Número de Acceso EF442780.

^b Cebador de sentido directo.

^c Cebador de sentido reverso.

^d Localización en el genoma referido al aislado Gimcheon depositado en la base de datos del GenBank con Número de Acceso LC270272.1.

3.2. DETECCIÓN DE STV EN OTROS CULTIVOS HORTÍCOLAS DISTINTOS AL TOMATE

3.2.1. Material vegetal

Para determinar la presencia de STV en cultivos distintos al tomate, las muestras empleadas fueron suministradas por Dña. María José Muñoz Yerbes, Responsable del Laboratorio de Diagnóstico Fitopatológico de la Generalitat Valenciana ubicado en la localidad de Silla (Valencia). Este servicio realiza prospecciones periódicas en las distintas empresas comercializadoras de plántulas y viveros de la Comunidad Valenciana para evaluar la presencia de TSWV, TYLCV, PepMV y PVY en función de la especie hortícola muestreada, para certificar que las plantas suministradas por el vivero están libres de estos virus. Una vez realizados los análisis pertinentes, Dña. María José Muñoz Yerbes envió las muestras de plántulas de diferentes cultivos hortícolas distintos al tomate al laboratorio de Virología de la UPV con el objetivo de analizarlas a STV y determinar así otros reservorios del virus.

Dentro del estudio se incluyeron muestras de cinco cultivos hortícolas diferentes al tomate: 2 muestras de apio (*Apium graveolens* L.), 1 muestra de calabacín (*Cucurbita pepo* L.), 12 muestras de lechuga (*Lactuca sativa* L.), 5 muestras de melón (*Cucumis melo* L.) y 2 de pimiento (*Capsicum annum* L.) recogidas en diferentes viveros de municipios de Alicante (Tabla 3).

Tabla 3. Cultivos hortícolas incluidos en el análisis a STV para determinar posibles reservorios del virus.

Código de muestra	Cultivo	Variedad	Vivero	Localidad
362/17	Apio	Kelvin	Simón Carel	Orihuela, Alicante
363/17		Kelvin	Simón Carel	Orihuela, Alicante

370/17	Calabacín	Cora	Semiflor	Elche, Alicante
360/17		Neruda	Simón Carel	Orihuela, Alicante
361/17		Neruda	Simón Carel	Orihuela, Alicante
364/17		Duende	Raal Cox	Orihuela, Alicante
365/17		Duende	Raal Cox	Orihuela, Alicante
366/17		Garbo	Raal Cox	Orihuela, Alicante
367/17		Garbo	Raal Cox	Orihuela, Alicante
406/17	Lechuga	Baqueria	Baby Plant	Orihuela, Alicante
407/17		Baqueria	Baby Plant	Orihuela, Alicante
408/17		Baby Derby	Baby Plant	Orihuela, Alicante
409/17		Baby Derby	Baby Plant	Orihuela, Alicante
410/17		Radicchio	Baby Plant	Orihuela, Alicante
411/17		Radicchio	Baby Plant	Orihuela, Alicante
319/17		Lual	Serviplant	Dolores, Alicante
320/17		Amarillo Doral	Serviplant	Dolores, Alicante
322/17	Melón	Amarillo Doral	Serviplant	Dolores, Alicante
323/17		Amarillo Doral	Serviplant	Dolores, Alicante
355/17		Amarillo Canario	Vegaplant	Dolores, Alicante
317/17	Pimiento	Alcudia	Serviplant	Dolores, Alicante
318/17		Alcudia	Serviplant	Dolores, Alicante

Las muestras llegaron envueltas en papel secante para su conservación. Al llegar al laboratorio, tras asignarle un código de entrada consistente en un número de registro seguido del año de toma de muestra, se tomaron 100 mg de material vegetal que se

introdujeron en el interior de bolsitas transparentes de plástico y se conservaron a 4 °C hasta la extracción de RNA.

3.2.2. Análisis a STV mediante RT-PCR

Para el análisis de las muestras de hortícolas se siguió el mismo procedimiento que el desarrollado en el punto 3.1.3., extrayendo en primer lugar RNA total de las muestras (protocolo 2 del Anexo 7.2. Material y Métodos) y analizándolo posteriormente por RT-PCR usando la pareja de cebadores que amplifican a 440 pb (Sabanadzovic *et al.*, 2009) descritos en la tabla 2 (protocolo 3 del Anexo 7.2. Material y Métodos).

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETECCIÓN DE STV EN ESPECIES ARVENSES ASOCIADAS AL CULTIVO DEL TOMATE

Tras realizar los análisis de RT-PCR con cebadores específicos de STV que amplifican un fragmento de 440 pb de todas las muestras de flora arvense recogidas en las dos parcelas experimentales de la Granja Experimental del Cabildo de Gran Canaria que habían sido incluidas en el estudio (Tabla I del Anexo Resultados y Discusión), se amplificaron los fragmentos esperados en 12 y 5 muestras recogidas del invernadero y la parcela al aire libre, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del análisis a STV de las muestras de flora arvense recogidas en dos parcelas experimentales de Gran Canaria.

Especie	Familia	Número positivas STV/Total de muestras analizadas		Total positivas STV/especie analizada	Porcentaje de positivas
		Invernadero	Aire libre		
<i>C. murale</i>	<i>Chenopodiaceae</i>	1/10	3/10	4/20	20%
<i>C. sumatrensis</i>	<i>Asteraceae</i>	2/8	-	2/8	25%
<i>C. didymus</i>	<i>Brassicaceae</i>	-	0/4	0/4	0%
<i>M. parviflora</i>	<i>Malvaceae</i>	1/10	0/10	1/20	5%
<i>P. patellaris</i>	<i>Chenopodiaceae</i>	-	1/9	1/9	11,10%
<i>Portulaca spp.</i>	<i>Portulacaceae</i>	2/10	-	2/10	20%
<i>S.adhaerens</i>	<i>Poaceae</i>	2/10	-	2/10	20%
<i>S. oleraceus</i>	<i>Asteraceae</i>	2/9	0/10	2/19	10,53%
<i>U. urens</i>	<i>Urticaceae</i>	2/10	1/10	3/20	15%
Total		12/67	5/49		
% muestras positivas		17,9 %	10,2%		

En todas las especies muestreadas se obtuvo una amplificación del fragmento de 440 pb esperada. La única especie que no amplificó ninguna banda tras los análisis moleculares realizados fue *C. didymus*, que había sido recolectada únicamente en la parcela al aire libre.

Como muestra la tabla 4, la especie que presentó un mayor ratio de muestras amplificadas por muestras analizadas fue *C. sumatrensis* obteniendo un 25% de amplificaciones del total de muestras analizadas, en este caso fueron 2 positivas de 8

muestras analizadas, todas recogidas en el invernadero. Le siguen *C. murale*, *S. adhaerens* y *Portulaca* spp., destacando que la primera tiene mayor número de muestras positivas cuando se encuentra al aire libre, mientras que las dos últimas sólo han sido recolectadas bajo invernadero. De los resultados obtenidos, se observa un mayor número de muestras positivas al virus cuando son recogidas en el invernadero (17,90%) en comparación con las recogidas en la parcela al aire libre (10,20%).

Para confirmar los resultados mediante la secuenciación de un fragmento más largo del genoma de STV, todas las muestras que habían presentado amplificación con los cebadores de 440 pb se analizaron mediante RT-PCR con otra pareja de cebadores específicos al virus que amplifican a 894 pb descritos por Candresse *et al.* (2013) (Tabla 2). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9, donde se observa que únicamente aparece una amplificación inespecífica en la muestra 190/17, que no corresponde al fragmento de 894 pb esperado.

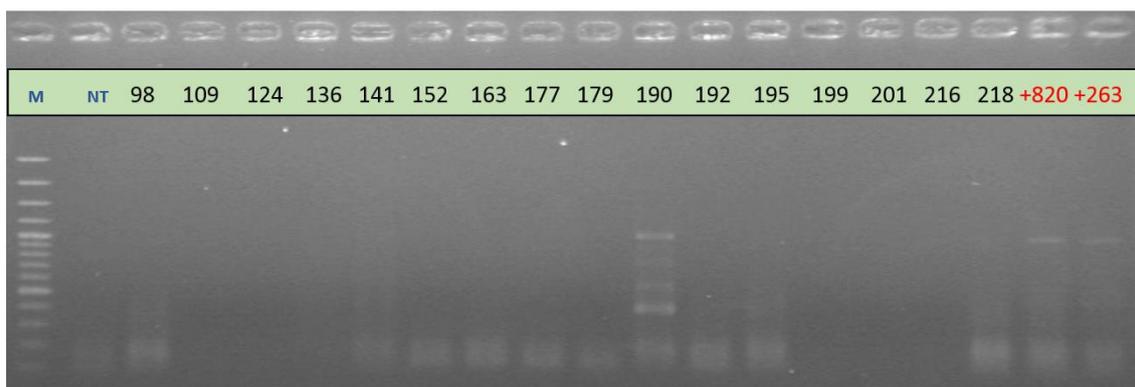


Figura 9. Resultados tras la RT-PCR de las muestras seleccionadas con los cebadores STV-for/STV-rev que amplifican un fragmento de 894 pb.

Al no conseguir amplificar ningún fragmento con los cebadores de 894 pb, se decidió secuenciar el fragmento obtenido de 440 pb. Para ello, del total de muestras analizadas, se seleccionaron 5 muestras donde la banda amplificada era más intensa, correspondiendo a tres especies diferentes: *C. murale* (98/17, 192/17 y 195/17), *U. urens* (136/17) y *S. oleraceus* (199/17). Los productos de PCR obtenidos se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación del IBMCP para confirmar la presencia de STV en las muestras de flora arvense recogidas. De los 5 productos de PCR enviados, los dos correspondientes a las muestras 195/17 y 199/17 resultaron ser secuencias muy

pequeñas y con cromatogramas solapados, lo que hizo que no se encontrara ninguna homología con secuencias contenidas en la base de datos del GenBank al hacer el análisis Blast. Con los otros tres fragmentos enviados correspondientes a muestras de *C. murale* y *U. urens* sí se obtuvieron secuencias más largas y sin solapes en el cromatograma, obteniéndose por tanto homologías con secuencias recogidas en el GenBank, no siendo ninguna de ellas el fragmento esperado de STV (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la secuenciación y análisis Blast de los fragmentos amplificados con los cebadores de STV de las muestras de flora arvense seleccionadas.

Muestra	Organismo	Amplificación	% Identidad	Longitud amplificada	Nº Accesoión GenBank
98/17	<i>Coprinopsis cinerea</i> Okayama	Proteína de choque térmico	86%	306 pb	XM_002911897.1
136/17	<i>Bemisia tabaci</i> Gennadius	Proteína activadora de proteína quinasa	95%	180 pb	XR_002009951.1
192/17	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	Subunidad complejo SSRP-1	92%	206 pb	XM_021914623.1
195/17	-	-	-	-	-
199/17	-	-	-	-	-

En el caso de la muestra 98/17 correspondiente a *C. murale* el amplicón obtenido con los cebadores de STV y secuenciado fue un 85 % idéntico a un fragmento de la especie *Coprinopsis cinerea* Okayama (Número de Accesoión XM_002911897.1), que se trata de un hongo basidiomiceto comestible. En la muestra 136/17, correspondiente a *U. urens*, 180 pb de la secuencia obtenida presentaron un 95% de identidad con la proteína activadora de la quinasa de la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius (Número de Accesoión XR_002009951.1). Por último, la secuencia de la muestra 192/17, correspondiente a la muestra *C. murale*, presentó un 92% de identidad nucleotídica con una proteína que forma parte del complejo SSRP-1 de *Chenopodium quinoa* Willd (Número de Accesoión XM_021914623.1). Probablemente, en este último caso los cebadores específicos de STV amplificaron el hospedante, es decir el DNA de la especie arvense recogida. Aunque, en este caso la

especie arvense se había identificado taxonómicamente como *C. murale*, la secuencia obtenida correspondía a *C. quinoa*. Para aclarar este último resultado se hizo una búsqueda general en el GenBank y no se encontró ningún número de accesoión para la secuencia del genoma de *C. murale*, mientras que para *C. quinoa* sí había dos entradas registradas: Cultivar QQ74 con Número de Accesoión GCA_001683475.1 y Experimental strain Kd con Número de Accesoión GCA_001742885.1. Por lo tanto, es probable que la proteína amplificada sea común a ambas especies, siendo la identificación taxonómica correcta.

Estos resultados indican que los cebadores usados de 440 pb descritos por Sabanadzovic *et al.* (2009) no son tan específicos como en principio deberían ser, dando positivos que posteriormente no se han confirmado mediante la secuenciación del fragmento amplificado.

Por lo tanto, en vista a los resultados obtenidos, se determina que todas las muestras de flora arvense recogidas en las parcelas experimentales de la Granja Experimental del Cabildo de Gran Canaria fueron negativas a STV, no encontrándose ningún nuevo hospedante natural del mismo en las muestras analizadas.

4.2. DETECCIÓN DE STV EN OTROS CULTIVOS HORTÍCOLAS DISTINTOS DEL TOMATE

Tras realizar la RT-PCR con los cebadores que amplifican un fragmento de 440 pb en las 22 muestras recogidas de distintos cultivos hortícolas (apio, calabacín, lechuga, melón y pimiento) los resultados obtenidos fueron negativos, ya que no se logró amplificar el fragmento deseado en las muestras analizadas (Figura 10).



Figura 10. Detalle de los resultados de RT-PCR a STV a unas muestras de pimiento, melón y calabacín.

Por lo tanto, no se ha detectado en el presente TFM ningún hospedante natural de STV en otros cultivos hortícolas distintos del tomate. Actualmente, se siguen analizando más muestras de estos y otros cultivos hortícolas para comprobar si la gama de hospedantes de STV se restringe únicamente al germoplasma tomate, como se ha visto hasta el momento (Font-San-Ambrosio *et al.*, 2017) o esta se amplía a otros cultivos, contribuyendo así a la dispersión del virus por las principales zonas agrícolas españolas.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

- No se logró detectar STV en las especies arvenses *Chenopodium murale*, *Conyza sumatrensis*, *Coronopus didymus*, *Malva parviflora*, *Patellifolia patellaris*, *Portulaca* spp., *Setaria adhaerens*, *Sonchus oleraceus* y *Urtica urens* recogidas en dos parcelas experimentales con cultivo del tomate infectado con STV bajo invernadero y al aire libre localizadas en la Granja Experimental del Cabildo de Gran Canaria.
- La pareja de cebadores que amplifican 440 pb descritas por Sabanadzovic *et al.* (2009) resultó ser poco específica para la detección de STV, obteniéndose resultados más fiables con los cebadores descritos por Candresse *et al.* (2013) que amplifican un fragmento mayor de 894 pb.
- No se detectó STV en ninguna de las 22 muestras de apio, calabacín, lechuga, melón y pimiento provenientes de viveros ubicados en las principales zonas agrícolas de la provincia de Alicante.
- En base a los resultados obtenidos en este TFM, se concluye que no se han encontrado otros hospedantes naturales de STV distintos del tomate, ni en especies de flora arvense ni en los cinco cultivos hortícolas analizados.

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcalá-Briseño RI, Coşkan S, Londoño MA, Polston JE. (2017). Genome sequence of *Southern tomato virus* in asymptomatic tomato 'Sweet Hearts'. *Genome Announcements*, 5(7), 1374-1416.
- Alfaro-Fernández, A.; Córdoba-Sellés, C.; Cebrián, M. C.; Herrera-Vásquez, J. A.; Sánchez-Navarro, J. A.; Juárez, M.; Espino, A.; Martín, R.; Jordá, C. (2008). First Report of *Tomato torrado virus* on Weed Hosts in Spain. *Plant Disease*, 92(5), 831.
- Angelella, G. M.; Holland, J.D.; Kaplan, I. (2016). Landscape composition is more important than local management for crop virus–insect vector interactions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 233, 253-261.
- Candresse, T.; Marais, A.; Faure, C. (2013). First report of *Southern tomato virus* on tomatoes in Southwest France. *Plant Disease*, 97, 1124.
- Córdoba, M.C.; Martínez-Priego, L.; Jordá, C. (2004). New natural hosts of *Pepino mosaic virus* in Spain. *Plant Disease*, 88, 906.
- De Blas, C.; Zabalgoceazcoa, I.; Castro, S.; Romero, J. (1996). Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales. En *Patología Vegetal-Tomo I* (2ª ed., págs. 255-274). Mundi-Prensa Barcelona.
- Duffus, J. E. (1971). Role of weeds in the incidence of virus diseases. *Annual Reviews of Phytopathology*, 9, 319-340.
- FAO,2015. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat Statistical Databases*. [Fecha de consulta: 10 de Mayo del 2017]. Obtenido de <http://faostat.fao.org>.
- Font, I.; Alfaro-Fernández, A. (2015). Virus emergentes en cultivos hortícolas en España. *Agrícola Vergel*, 387, 307-313.
- Font San-Ambrosio, M. I.; Alfaro-Fernández, A.; Puchades, A.; Rubio, L.; Estévez-Caparrós, J. M.; Muñoz-Yerbes, M. J.; Espino, A.; Benito, P.; Monagas, J. J.; Serra, J.; Rosello, J.; Hernández, D.; Blanco, L.; Bosch, R.; Guerri, J.; Cano-García, A. M.;

- Reyes-Betancort, J. A.; Galipienso, L. (2017). Detection of *Southern tomato virus* (STV) in seed and seedlings of commercial tomato varieties. *15 Congress of the Mediterranean Phytopathological Union* (pág. Abstract nr 105). Córdoba: Plant Health Sustaining Mediterranean Ecosystems.
- GVA. (2016). *Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural*. [Fecha de consulta: 12 de Mayo del 2017]. Obtenido de <http://www.agroambient.gva.es/estadisticas1>
- Iacono, G.; Hernández-Llopis, D.; Alfaro-Fernández, A.; Davino, M.; Font, M.I.; Panno, S.; Galipienso, L.; Rubio, L.; Davino, S. (2015). First report of *Southern tomato virus* in tomato crops in Italy. *New Disease Reports*, 32, 27.
- ICTV, 2017. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. [Consultado en Mayo del 2017]. Obtenido de <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
- Jordá, C.; Lázaro, A.; Martínez-Culebras, P.; Lacasa, A. (2001). First report of *Pepino mosaic virus* on natural hosts. *Plant Disease*, 85, 1292.
- Liu, W.; Chen, J. (2009). A doubled-stranded RNA as the genome of a potential virus infecting *Vicia faba*. *Virus Gene*, 39, 126-131.
- MacKenzie, D.J.; McLean, M.A.; Mukerji, S.; Green, M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81, 222-226.
- MAPAMA, 2015. *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente*. [Fecha de consulta: Mayo del 2017]. Obtenido de <http://www.mapama.gob.es/es/>
- Maroto, J. (2002). Tomate. En J. Maroto, *Horticultura herbácea especial* (págs. 403-455). Madrid: Mundi-Prensa.
- Martin, R.R.; Tzanetakis, I.E.; Sweeney, M.; Wegener, L. (2006). A virus associated with blueberry fruit drop disease. *Acta Horticulturae*, 715, 497-501.
- Martin, R.R.; Zhou, J.; Tzanetakis, I.E. (2011). *Blueberry latent virus*: An amalgam of the *Partitiviridae* and the *Totiviridae*. *Virus Research*, 155, 175-180.

- Montserrat, A. (2002). En *Manejo y control de la flora arvense en cultivos de invernadero* (Vol. 135, págs. 8-54). Phytoma España.
- Olmstead, R.; Bohs, L.; Migid, H.; Santiago-Valentin, E.; Garcia, V.; Collier, S. (2008). A molecular phylogeny of the *Solanaceae*. *Taxon*, 4, 1159-1181.
- Padmanabhan, C.; Zheng, Y.; Li, R.; Sun, S.E.; Zhang, D.; Liu, Y.; Fei, Z.; Ling, K.S (2015a). Complete genome sequence of *Southern tomato virus* identified in China using next-generation sequencing. *Genome Announcements*, 3(5), 1226-15.
- Padmanabhan, C.; Zheng, Y.; Li, R.; Fei, Z.; Ling, K.S. (2015b). Complete genome sequence of *Southern tomato virus* naturally infecting tomatoes in Bangladesh. *Genome Announcements*, 3(6), 1522-15.
- Peralta, I.E.; Knapp, S.K.; Spooner, D.M. (2005). New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Perú. *Systematic Botany*, 30(2), 424-434.
- Rick, C. (1978). The Tomato. *Scientific American*, 239(2), 76-87.
- Sabanadzovic, S.; Valverde, R.A.; Brown, J.K.; Martin, R.R.; Tzanetakis, I.E. (2009). *Southern tomato virus*, The link between the families *Totiviridae* and *Partitiviridae*. *Virus Research*, 140, 130-137.
- Sabanadzovic, S.; Abou Ghanem-Sabanadzovic, N.; Valverde, R.A. (2010). A novel monopartite dsRNA virus from rhododendron. *Archives of Virology*, 55, 1859-1863.
- Tzanetakis, I.E.; Sabanadzovic, S. (2013). Establishment of the family *Amalgaviridae*, the genus *Amalgavirus* and inclusion of four species in the genus. *ICTV*, 2, 1-9.
- Verbeek, M.; Dulleman, A.M.; Espino, A.; Botella, M.; Alfaro-Fernández, A.; Font, M.I. (2015). First report of *Southern tomato virus* in tomato in the Canary Islands, Spain. *Journal of Plant Pathology*, 97(2), 392.

Anexos

7. ANEXOS

Anexo 7.1. Importancia económica del tomate

Tabla I: Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción en 2015.

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)				Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
	Secano	Regadío		Total	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
A Coruña	–	58	230	288	–	53.690	85.800	22.848
Lugo	–	40	141	181	–	66.990	89.870	15.351
Ourense	–	47	181	228	–	66.110	107.860	22.630
Pontevedra	–	76	324	400	–	57.900	84.200	31.681
GALICIA	–	221	876	1.097	–	60.186	90.421	92.510
P. DE ASTURIAS	40	28	28	96	10.000	25.000	45.000	2.360
CANTABRIA	16	–	–	16	20.250	–	–	324
Alava	–	44	11	55	–	20.750	58.800	1.560
Guipúzcoa	30	30	15	75	11.200	25.200	57.150	1.949
Vizcaya	50	65	49	164	8.750	18.900	48.600	4.047
PAÍS VASCO	80	139	75	294	9.669	20.845	51.806	7.556
NAVARRA	–	2.009	47	2.056	–	79.631	70.766	163.305
LA RIOJA	–	152	18	170	–	73.000	105.000	12.986
Huesca	5	42	4	51	16.250	69.994	170.000	3.701
Teruel	2	1	3	6	15.000	30.000	110.000	390
Zaragoza	14	619	8	641	16.250	74.999	100.000	47.452
ARAGÓN	21	662	15	698	16.131	74.613	120.667	51.543
Barcelona	49	193	98	340	5.120	34.775	121.744	18.893
Girona	1	262	6	269	5.000	35.536	70.000	9.735
Lleida	–	185	16	201	–	31.513	77.122	7.064
Tarragona	–	341	35	376	–	35.000	70.000	14.385
CATALUÑA	50	981	155	1.186	5.118	34.441	103.451	50.077
BALEARES	14	214	57	285	7.200	34.800	55.100	10.689
Ávila	–	8	8	16	–	39.500	90.500	1.040
Burgos	–	2	1	3	–	44.000	62.000	150
León	–	15	10	25	–	30.000	80.000	1.250
Palencia	–	7	3	10	–	40.714	55.000	450
Salamanca	–	30	5	35	–	31.000	38.000	1.120
Segovia	–	40	–	40	–	40.000	–	1.600
Soria	–	–	–	–	–	–	–	–
Valladolid	–	8	3	11	–	44.000	69.666	561
Zamora	–	5	4	9	–	24.450	100.000	522
CASTILLA Y LEÓN	–	115	34	149	–	36.028	75.000	6.693
MADRID	–	22	34	56	–	50.000	120.000	5.180
Albacete	–	233	30	263	–	86.500	160.000	24.955
Ciudad Real	–	285	–	285	–	78.421	–	22.350
Cuenca	–	9	–	9	–	45.000	–	405
Guadalajara	3	2	–	5	15.000	20.000	–	85
Toledo	–	566	–	566	–	78.074	–	44.190
CASTILLA-LA MANCHA	3	1.095	30	1.128	15.000	79.579	160.000	91.985
Alicante	–	130	408	538	–	35.000	112.721	50.540
Castellón	38	497	20	555	8.211	35.820	55.000	19.215
Valencia	–	98	52	150	–	40.510	59.000	7.038
C. VALENCIANA	38	725	480	1.243	8.211	36.307	104.496	76.793
R. DE MURCIA	–	–	2.397	2.397	–	–	79.468	190.484
Badajoz	–	19.823	–	19.823	–	87.136	–	1.727.297
Cáceres	–	2.630	–	2.630	–	86.172	–	226.633
EXTREMADURA	–	22.453	–	22.453	–	87.023	–	1.953.930
Almería	–	123	10.222	10.345	–	32.163	95.950	984.757
Cádiz	–	1.125	–	1.125	–	48.098	–	54.110
Córdoba	7	283	5	295	12.500	35.000	98.000	10.483
Granada	–	765	3.497	4.262	–	42.255	102.079	389.295
Huelva	–	182	–	182	–	40.200	–	7.316
Jaén	2	180	–	182	10.000	41.550	–	7.500
Málaga	16	281	621	918	3.000	42.590	78.897	61.011
Sevilla	10	6.415	100	6.525	30.000	77.642	80.000	506.373
ANDALUCÍA	35	9.354	14.445	23.834	13.014	66.831	96.591	2.020.845
Las Palmas	–	42	618	660	–	46.872	110.604	70.322
S.C. de Tenerife	–	45	271	316	–	40.000	86.042	25.118
CANARIAS	–	87	889	976	–	43.318	103.117	95.440
ESPAÑA	297	38.257	19.580	58.134	10.119	77.898	94.461	4.832.700

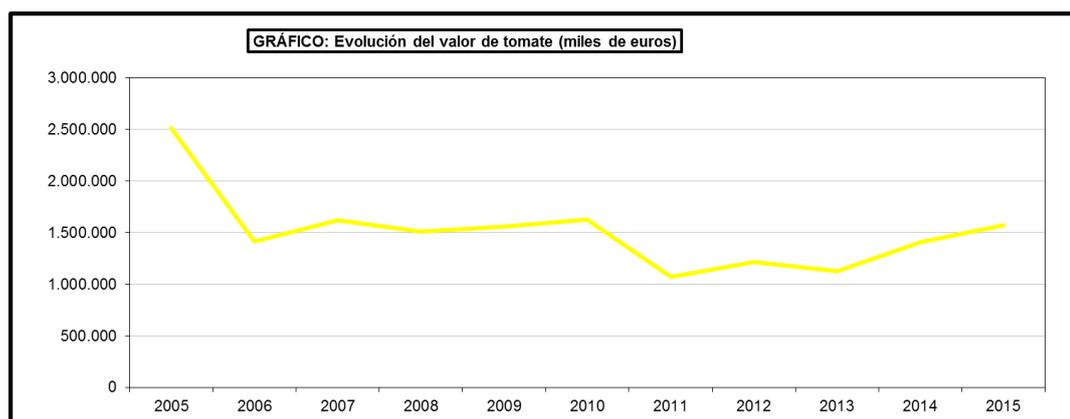
Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015.

Tabla II: Evolución de la superficie, producción y rendimiento del tomate en España en los últimos años.

Años	Superficie	Rendimiento	Producción
	(miles de hectáreas)	(T/Ha)	(miles de toneladas)
2005	72,3	67	4.810,0
2006	56,7	67	3.801,0
2007	53,3	77	4.082,0
2008	54,9	74	4.050,0
2009	63,8	75	4.798,0
2010	59,3	73	4.313,0
2011	51,2	76	3.864,0
2012	48,6	83	4.046,0
2013	46,6	81	3.772,8
2014	54,7	90	4.865,5
2015	58,1	83	4.832,7

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015.

Gráfica I: Evolución del valor del tomate (miles de euros) en España entre 2005-2015.



Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015.

Tabla III: Principales superficies cultivadas de tomate por municipios y comarcas en la Comunidad Valenciana en 2016.

PROVINCIA	COMARCA	MUNICIPIO	SUPERFICIE (Ha)
ALICANTE	MUTXAMEL	L'ALACANTÍ	197
ALICANTE	CAMPELLO (EL)	L'ALACANTÍ	75
CASTELLON	PENÍSCOLA/PEÑÍSCOLA	EL BAIX MAESTRAT	47
CASTELLON	ALCALÀ DE XIVERT	EL BAIX MAESTRAT	32
CASTELLON	ALMENARA	LA PLANA BAIXA	32
ALICANTE	ELCHE/ELX	BAIX VINALOPÓ	31
CASTELLON	TORREBLANCA	LA PLANA ALTA	30
CASTELLON	BENICARLÓ	EL BAIX MAESTRAT	29
CASTELLON	MONCOFA	LA PLANA BAIXA	25
CASTELLON	CABANES	LA PLANA ALTA	24
CASTELLON	LLOSA (LA)	LA PLANA BAIXA	23
CASTELLON	VALL D'ALBA	LA PLANA ALTA	22
VALENCIA	SAGUNTO/SAGUNT	EL CAMP DE MORVEDRE	22
ALICANTE	SAN VICENTE DEL RASPEIG	L'ALACANTÍ	21
CASTELLON	COVES DE VINROMÀ (LES)	LA PLANA ALTA	21
VALENCIA	VILAMARXANT	EL CAMP DE TÚRIA	21
ALICANTE	ORIHUELA	BAIX SEGURA/VEGA BAJA	17
VALENCIA	SUECA	LA RIBERA BAIXA	16
CASTELLON	NULES	LA PLANA BAIXA	15
CASTELLON	VINARÒS	EL BAIX MAESTRAT	13
VALENCIA	MUSEROS	L'HORTA NORD	13
CASTELLON	BENLLOCH	LA PLANA ALTA	12
ALICANTE	ALICANTE/ALACANT	L'ALACANTÍ	11
CASTELLON	CHILCHES/XILXES	LA PLANA BAIXA	11
ALICANTE	NOVELDA	VINALOPÓ MITJÀ/VINALOPÓ MEDIO	10
VALENCIA	LLÍRIA	EL CAMP DE TÚRIA	10
VALENCIA	MELIANA	L'HORTA NORD	10
CASTELLON	SEGORBE	ALTO PALANCIA	9
CASTELLON	VILAFAMÉS	LA PLANA ALTA	9
ALICANTE	PILAR DE LA HORADADA	BAIX SEGURA/VEGA BAJA	8
CASTELLON	CASTELLÓ DE LA PLANA	LA PLANA ALTA	8
ALICANTE	ASPE	VINALOPÓ MITJÀ/VINALOPÓ MEDIO	7
CASTELLON	JÉRICA	ALTO PALANCIA	6
CASTELLON	SANTA MAGDALENA DE PULPIS	EL BAIX MAESTRAT	6

Fuente: Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural, 2016.

Anexo 7.2. Material y Métodos

Protocolo 1: Extracción de ácidos nucleicos mediante el método de captura con silica descrito por Mackenzie *et al.* (1997).

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 un 1% de β -mercaptoetanol.
2. Transferir 500 μ l del homogeneizado a un tubo eppendorf de 1,5 ml con punta recortada y mezclar (no con vórtex).
3. Añadir 100 μ l de n-lauryl sarcosina al 10% e incubar a 70°C durante 10 min (agitando los tubos de vez en cuando, no con vórtex).
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 vórtex.
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 µl 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	4 M	
Acetato Sódico	0,2 M	(Solución Stock AcNa 3M pH 5.5)
EDTA	25 mM	
Acetato Potásico	1,0 M	
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 %

SOLUCIÓN NaI 6M:

NaI	6 M
Na ₂ SO ₃	150 mM
H ₂ O MQ estéril	40 ml

N- LAURYL SARCOSINA 10%:

N-lauryl sarcosina	10 g
H ₂ O MQ estéril	100 ml

No autoclavar. Usar guantes. Almacenar a temperatura ambiente.

Protocolo 2: RT-PCR con desnaturalización del ARN, electroforesis de los productos PCR en gel de agarosa y lectura

1. Poner en hielo las muestras de ARN.
2. Descongelar productos para el cóctel y positivos.
3. Desnaturalización del ARN (1,9 μ l H₂O Dep + 0,6 μ l ARN). Rotular e introducir muestras en el termociclador donde este el programa guardado.
4. Preparar el cóctel, añadiendo al final la RT-III y RNaseOUT. Agitar el tubo.
5. Añadir 7,5 μ l del cóctel a las muestras ya desnaturalizadas (empezar por el blanco).
6. Guardar productos y muestras en congelador.
7. Introducir en el termociclador en función del virus que se está analizando y número de muestras. Activar el programa seleccionado.
8. Preparar el gel de agarosa, con TAE 1x y Agarosa D1 al 1,2%. Dejar enfriar y solidificar antes de verterlo a la cubeta de electroforesis.
9. Cargar el gel, usando un volumen de 5 μ l de muestra y 2 μ l de tampón de carga 6x LD. El marcador BP plus 100 se cargará en los pocillos de los extremos (preferiblemente), usando un volumen de 1,5 μ l.
10. Se conectan los electrodos a los bornes de la cubeta, aplicando una tensión de 120V durante 20-30 min aproximadamente según las bandas amplificadas.
11. Desconectar electrodos y verter el gel al bromuro de etidio, dejándolo sumergido 45 minutos para asegurar una buena tinción.
12. Retirar el gel y enjuagar en una cubeta con agua.
13. Introducirlo en una cabina de luz ultravioleta para su lectura.
14. Obtener la foto del gel ya leído y/o guardarla en el PC conectado.

Protocolo 3: Elementos utilizados para la realización de la RT-PCR

STV	1X	
2X MIX III	5	
PVP 40	1	
PRIMER STV-F	0,5	Termociclador: Labcycler
PRIMER STV-R	0,5	Programa: Tospoeiras 53
RT-TAQ III	0,4	Tª anillamiento: 53°C
RNASEOUT	0,1	Tª elongación: 68°C
H ₂ O DEP	1,9	
MUESTRA ARN	0,6	

Protocolo 5: Purificación de producto de PCR: High Pure PCR Product Purification**Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)**

1. Ajustar el volumen de cada tubo PCR a 100 µl con H₂O PCR.
2. Añadir 500 µl de Binding Buffer a cada tubo y mezclar bien.
3. Insertar las columnas en los tubos colectores. Transferir el volumen de la mezcla anterior a la columna.
4. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente.
5. Desconectar el tubo colector y descartar la solución recogida. Volver a insertar el tubo colector en la columna.
6. Añadir 500 µl de Wash Buffer a cada tubo.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente.
8. Desconectar el tubo colector y descartar la solución recogida. Volver a insertar el tubo colector en la columna.
9. Añadir 200 µl de Wash Buffer a cada tubo.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente.
11. Descartar la solución recogida en el tubo colector y el propio tubo colector.

12. Insertar la columna en un tubo eppendorf de 1,5 ml correctamente rotulado.
13. Añadir 50 μ l de Elution Buffer a la columna.
14. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente.

Fotografías de las especies arvenses de Gran Canaria incluidas en el estudio

Patellifolia patellaris (mhe1):



Malva parviflora (mhe2):



Urtica urens (mhe3):



Sonchus oleraceus (mhe4):



Chenopodium murale (mhe5):



Coronopus didymus (mhe6):



Chenopodium murale (mhi1):



Setaria adhaerens (mhi2):



Urtica urens (mhi3):



Mallva parviflora (mhi4):



Conyza sumatrensis (mhi5):



Sonchus oleraceus (mhi6):



Portulaca spp. (mhi7):



Anexo 7.3. Resultados y Discusión

Tabla I: Resultados de la RT-PCR de la flora arvense de Gran Canaria.

Nº	Nombre	Cód. UPV	Fecha RT-PCR STV (1:1)	RESULTADO 1:1	Fecha RT-PCR STV (1:10)	RESULTADO 1:10
1	<i>Chenopodium murale</i> (mhi1)	96/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
2	<i>Chenopodium murale</i> (mhi1)	97/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
3	<i>Chenopodium murale</i> (mhi1)	98/17	22/05/2017	-	26/05/2017	+
4	<i>Chenopodium murale</i> (mhi1)	99/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
5	<i>Chenopodium murale</i> (mhi1)	100/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
6	<i>Chenopodium murale</i> (mhi1)	101/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
7	<i>Chenopodium murale</i> (mhi1)	102/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
8	<i>Chenopodium murale</i> (mhi1)	103/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
9	<i>Chenopodium murale</i> (mhi1)	104/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
10	<i>Chenopodium murale</i> (mhi1)	105/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
11	<i>Patellifolia patellaris</i> (mhe1)	106/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
12	<i>Patellifolia patellaris</i> (mhe1)	108/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
13	<i>Patellifolia patellaris</i> (mhe1)	109/17	22/05/2017	-	26/05/2017	+
14	<i>Patellifolia patellaris</i> (mhe1)	110/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
15	<i>Patellifolia patellaris</i> (mhe1)	111/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
16	<i>Patellifolia patellaris</i> (mhe1)	112/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
17	<i>Patellifolia patellaris</i> (mhe1)	113/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
18	<i>Patellifolia patellaris</i> (mhe1)	114/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
19	<i>Patellifolia patellaris</i> (mhe1)	115/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
20	<i>Setaria adhaerens</i> (mhi2)	116/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
21	<i>Setaria adhaerens</i> (mhi2)	117/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
22	<i>Setaria adhaerens</i> (mhi2)	118/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
23	<i>Setaria adhaerens</i> (mhi2)	119/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
24	<i>Setaria adhaerens</i> (mhi2)	120/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
25	<i>Setaria adhaerens</i> (mhi2)	121/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
26	<i>Setaria adhaerens</i> (mhi2)	122/17	22/05/2017	-	26/05/2017	+
27	<i>Setaria adhaerens</i> (mhi2)	123/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
28	<i>Setaria adhaerens</i> (mhi2)	124/17	22/05/2017	-	26/05/2017	+
29	<i>Setaria adhaerens</i> (mhi2)	125/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
30	<i>Malva parviflora</i> (mhe2)	126/17	22/05/2017	-	26/05/2017	-
31	<i>Malva parviflora</i> (mhe2)	127/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
32	<i>Malva parviflora</i> (mhe2)	128/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
33	<i>Malva parviflora</i> (mhe2)	129/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
34	<i>Malva parviflora</i> (mhe2)	130/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-

35	<i>Malva parviflora</i> (mhe2)	131/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
36	<i>Malva parviflora</i> (mhe2)	132/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
37	<i>Malva parviflora</i> (mhe2)	133/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
38	<i>Malva parviflora</i> (mhe2)	134/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
39	<i>Malva parviflora</i> (mhe2)	135/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
40	<i>Urtica urens</i> (mhi3)	136/17	23/05/2017	+	30/05/2017	+
41	<i>Urtica urens</i> (mhi3)	137/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
42	<i>Urtica urens</i> (mhi3)	138/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
43	<i>Urtica urens</i> (mhi3)	139/17	23/05/2017	+	30/05/2017	-
44	<i>Urtica urens</i> (mhi3)	140/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
45	<i>Urtica urens</i> (mhi3)	141/17	23/05/2017	-	30/05/2017	+
46	<i>Urtica urens</i> (mhi3)	142/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
47	<i>Urtica urens</i> (mhi3)	143/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
48	<i>Urtica urens</i> (mhi3)	144/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
49	<i>Urtica urens</i> (mhi3)	145/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
50	<i>Urtica urens</i> (mhe3)	146/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
51	<i>Urtica urens</i> (mhe3)	147/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
52	<i>Urtica urens</i> (mhe3)	148/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
53	<i>Urtica urens</i> (mhe3)	149/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
54	<i>Urtica urens</i> (mhe3)	150/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
55	<i>Urtica urens</i> (mhe3)	151/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
56	<i>Urtica urens</i> (mhe3)	152/17	23/05/2017	-	30/05/2017	+
57	<i>Urtica urens</i> (mhe3)	153/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
58	<i>Urtica urens</i> (mhe3)	154/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
59	<i>Urtica urens</i> (mhe3)	155/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
60	<i>Malva parviflora</i> (mhi4)	156/17	23/05/2017	-	30/05/2017	-
61	<i>Malva parviflora</i> (mhi4)	157/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
62	<i>Malva parviflora</i> (mhi4)	158/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
63	<i>Malva parviflora</i> (mhi4)	159/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
64	<i>Malva parviflora</i> (mhi4)	160/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
65	<i>Malva parviflora</i> (mhi4)	161/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
66	<i>Malva parviflora</i> (mhi4)	162/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
67	<i>Malva parviflora</i> (mhi4)	163/17	24/05/2017	+	31/05/2017	+
68	<i>Malva parviflora</i> (mhi4)	164/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
69	<i>Malva parviflora</i> (mhi4)	165/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
70	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhe4)	166/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
71	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhe4)	167/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
72	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhe4)	168/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
73	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhe4)	169/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
74	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhe4)	170/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-

75	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhe4)	171/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
76	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhe4)	172/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
77	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhe4)	173/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
78	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhe4)	174/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
79	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhe4)	175/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
80	<i>Conyza sumatrensis</i> (mhi5)	176/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
81	<i>Conyza sumatrensis</i> (mhi5)	177/17	24/05/2017	-	31/05/2017	+
82	<i>Conyza sumatrensis</i> (mhi5)	178/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
83	<i>Conyza sumatrensis</i> (mhi5)	179/17	24/05/2017	-	31/05/2017	+
84	<i>Conyza sumatrensis</i> (mhi5)	180/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
85	<i>Conyza sumatrensis</i> (mhi5)	181/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
86	<i>Conyza sumatrensis</i> (mhi5)	182/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
87	<i>Conyza sumatrensis</i> (mhi5)	183/17	24/05/2017	-	31/05/2017	-
89	<i>Chenopodium murale</i> (mhe5)	186/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
90	<i>Chenopodium murale</i> (mhe5)	187/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
91	<i>Chenopodium murale</i> (mhe5)	188/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
92	<i>Chenopodium murale</i> (mhe5)	189/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
93	<i>Chenopodium murale</i> (mhe5)	190/17	04/07/2017	-	05/07/2017	+
94	<i>Chenopodium murale</i> (mhe5)	191/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
95	<i>Chenopodium murale</i> (mhe5)	192/17	04/07/2017	-	05/07/2017	+
96	<i>Chenopodium murale</i> (mhe5)	193/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
97	<i>Chenopodium murale</i> (mhe5)	194/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
98	<i>Chenopodium murale</i> (mhe5)	195/17	04/07/2017	-	05/07/2017	+
99	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhi6)	196/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
100	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhi6)	197/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
101	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhi6)	198/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
102	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhi6)	199/17	04/07/2017	-	05/07/2017	+
103	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhi6)	200/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
104	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhi6)	201/17	04/07/2017	-	05/07/2017	+
105	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhi6)	202/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
106	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhi6)	203/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
107	<i>Sonchus oleraceus</i> (mhi6)	204/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
108	<i>Coronopus didymus</i> (mhe6)	205/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
109	<i>Coronopus didymus</i> (mhe6)	206/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
110	<i>Coronopus didymus</i> (mhe6)	207/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
111	<i>Coronopus didymus</i> (mhe6)	208/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
112	<i>Portulaca spp.</i> (mhi7)	209/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
113	<i>Portulaca spp.</i> (mhi7)	210/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
114	<i>Portulaca spp.</i> (mhi7)	211/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
115	<i>Portulaca spp.</i> (mhi7)	212/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-

116	<i>Portulaca spp.</i> (mhi7)	213/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
117	<i>Portulaca spp.</i> (mhi7)	214/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
118	<i>Portulaca spp.</i> (mhi7)	215/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
119	<i>Portulaca spp.</i> (mhi7)	216/17	04/07/2017	-	05/07/2017	+
120	<i>Portulaca spp.</i> (mhi7)	217/17	04/07/2017	-	05/07/2017	-
121	<i>Portulaca spp.</i> (mhi7)	218/17	04/07/2017	-	05/07/2017	+

Visualización de las muestras de flora arvensis de Gran Canaria tras la RT-PCR

En todas las lecturas se incluyen al menos un marcador (M), un blanco (NT) y un positivo al virus. El tamaño esperado de la banda amplificada será de 440 pb.

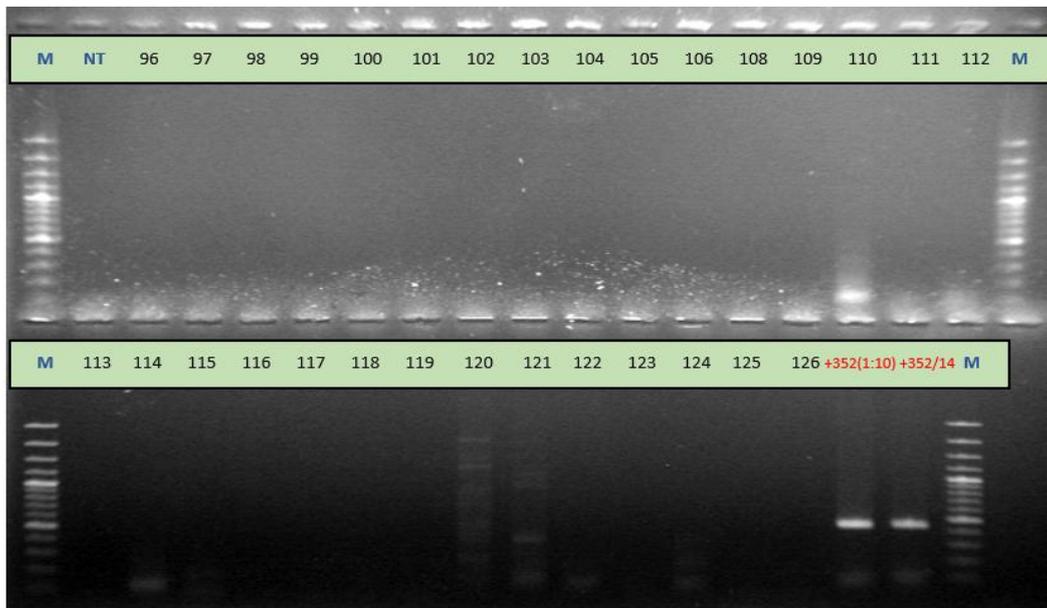


Foto 1. Muestras de la 96/17 a 126/17 (Directo).

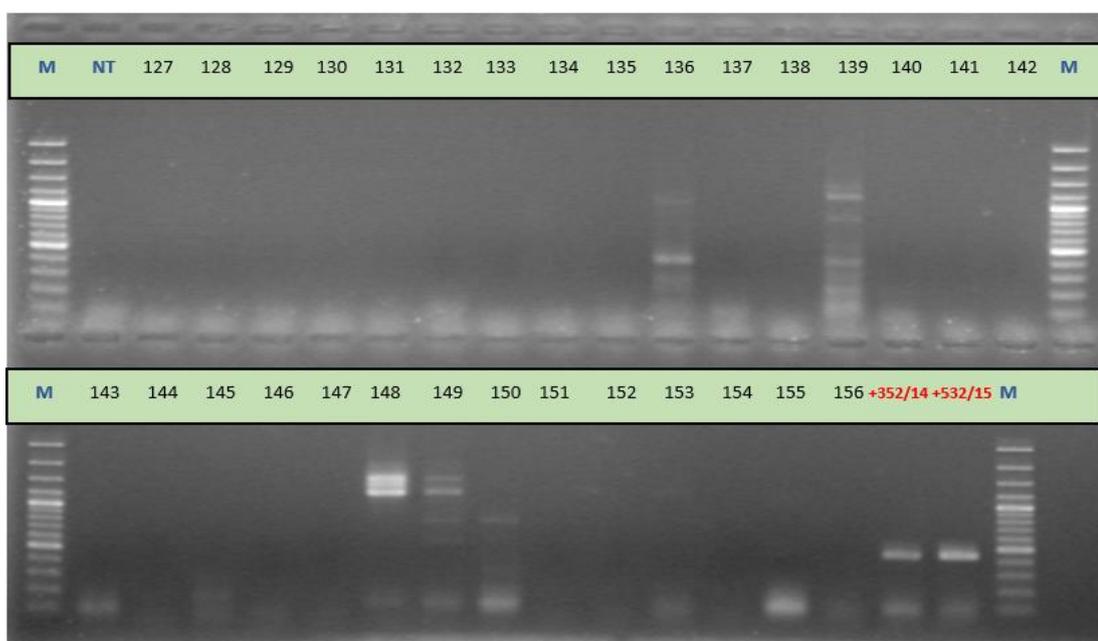


Foto 2. Muestras de la 127/17 a 156/17 (Directo).

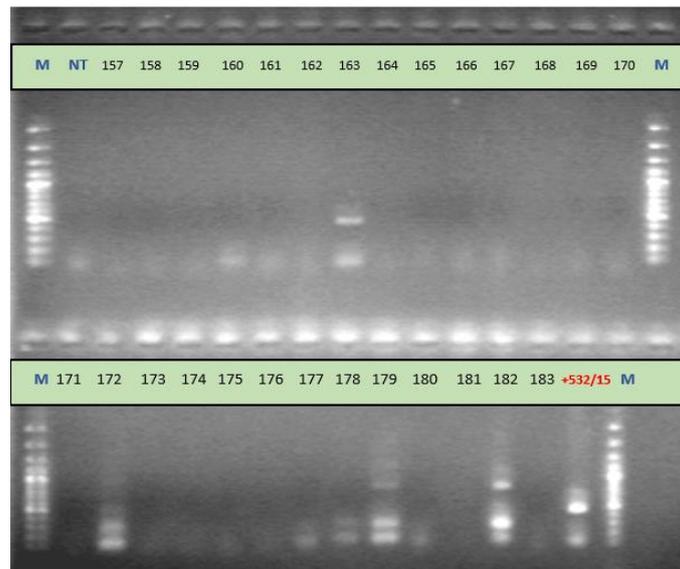


Foto 3. Muestras de la 157/17 a 183/17 (Directo).

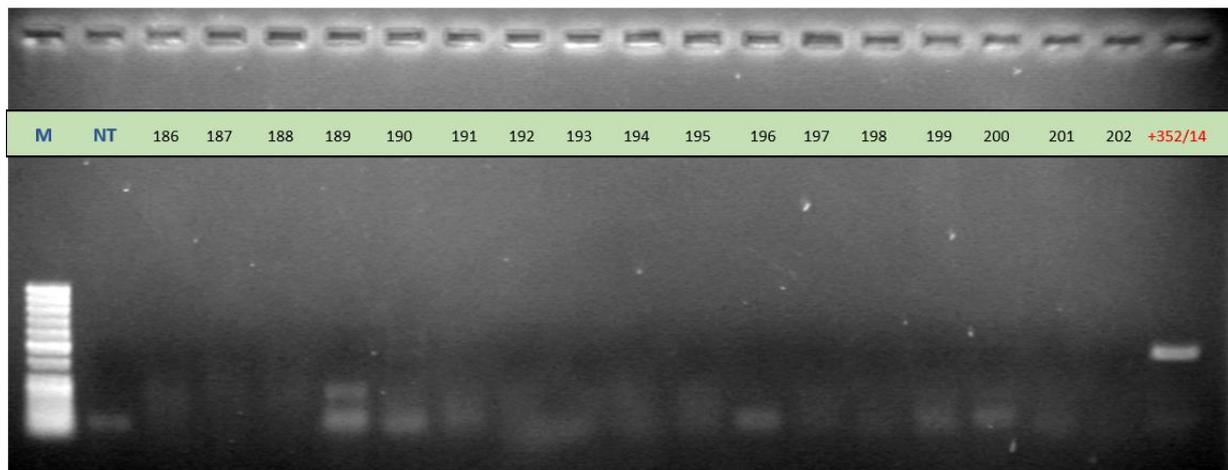


Foto 4. Muestras de la 18/17 a 202/17 (Directo).

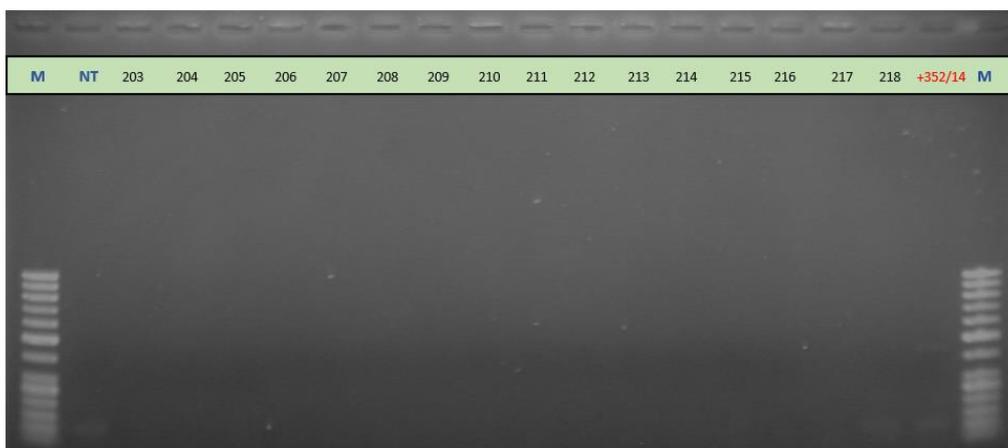


Foto 5. Muestras de la 202/17 a 218/17 (Directo).

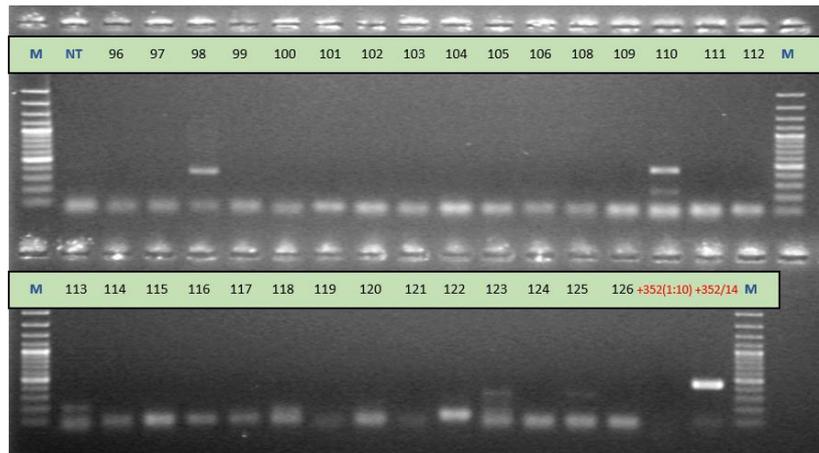


Foto 6. Muestras de la 96/17 a 126/17 (Dilución 1:10).

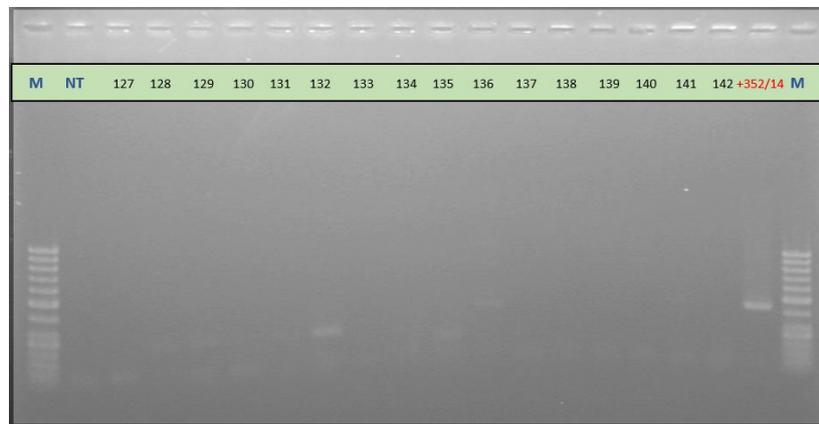


Foto 7. Muestras de la 127/17 a 142/17 (Dilución 1:10).

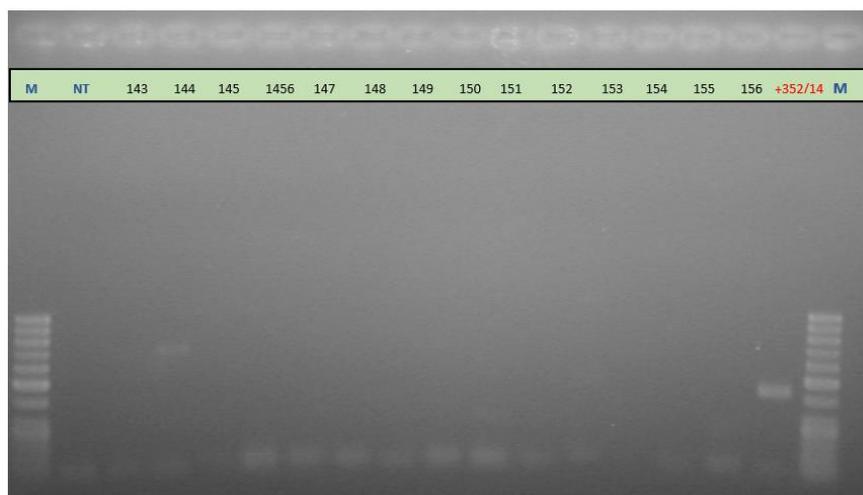


Foto 8. Muestras de la 143/17 a 156/17 (Dilución 1:10).

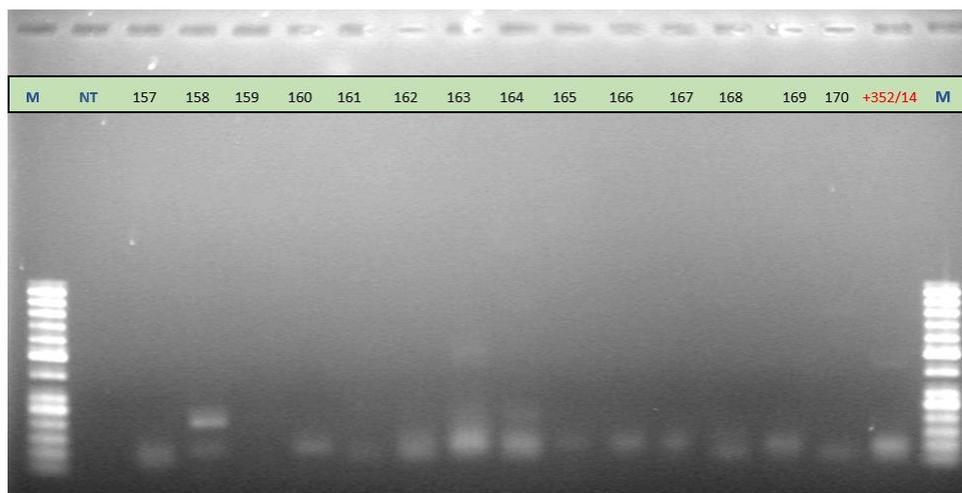


Foto 9. Muestras de la 157/17 a 170/17 (Dilución 1:10).

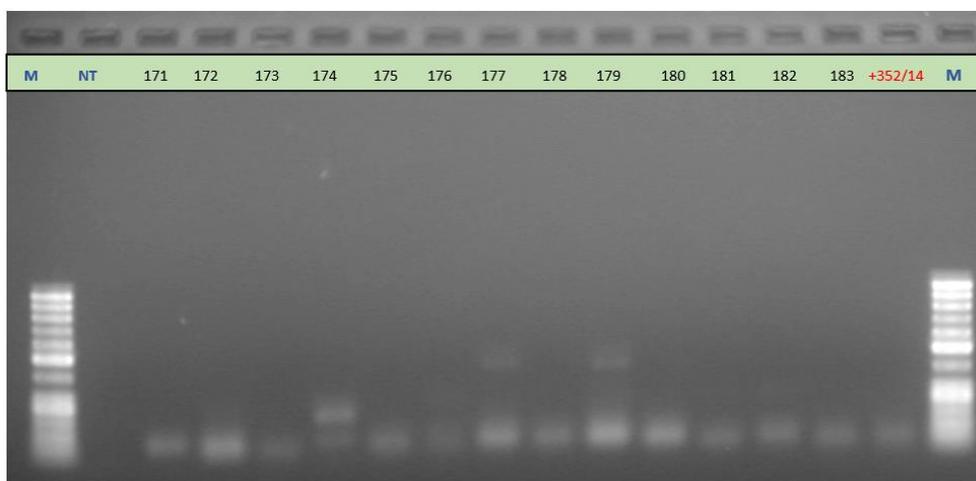


Foto 10. Muestras de la 171/17 a 183/17 (Dilución 1:10).

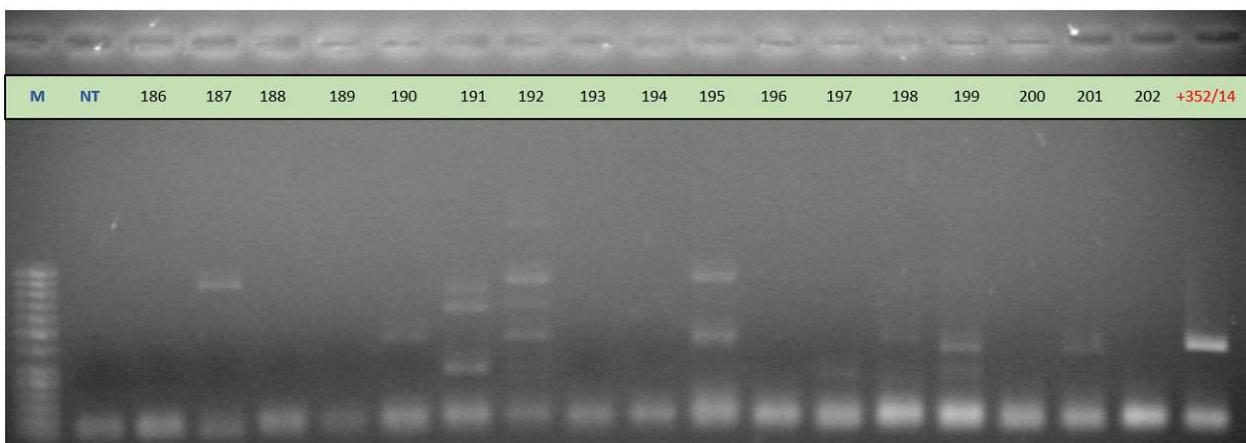


Foto 11. Muestras de la 186/17 a 202/17 (Dilución 1:10).

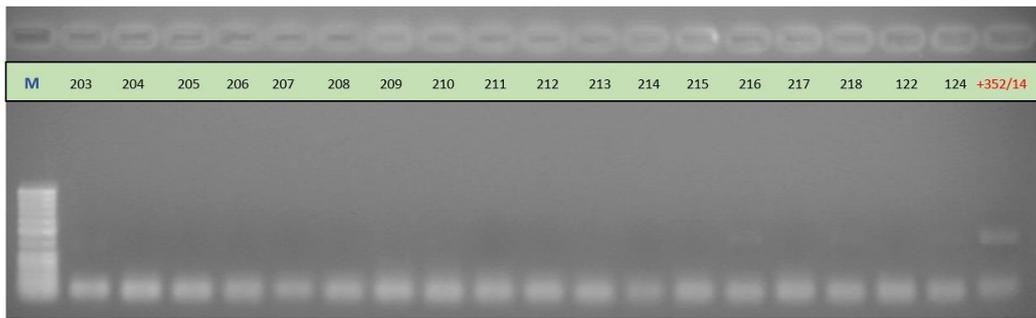


Foto 12. Muestras de la 203/17 a 218/17 (Dilución 1:10). Repetición de 122/17 y 124/17.

Visualización de las muestras de cultivos hortícolas distintos al tomate

En todas las lecturas se incluyen al menos un marcador (M), un blanco (NT) y un positivo al virus. El tamaño esperado de la banda amplificada será de 440 pb.

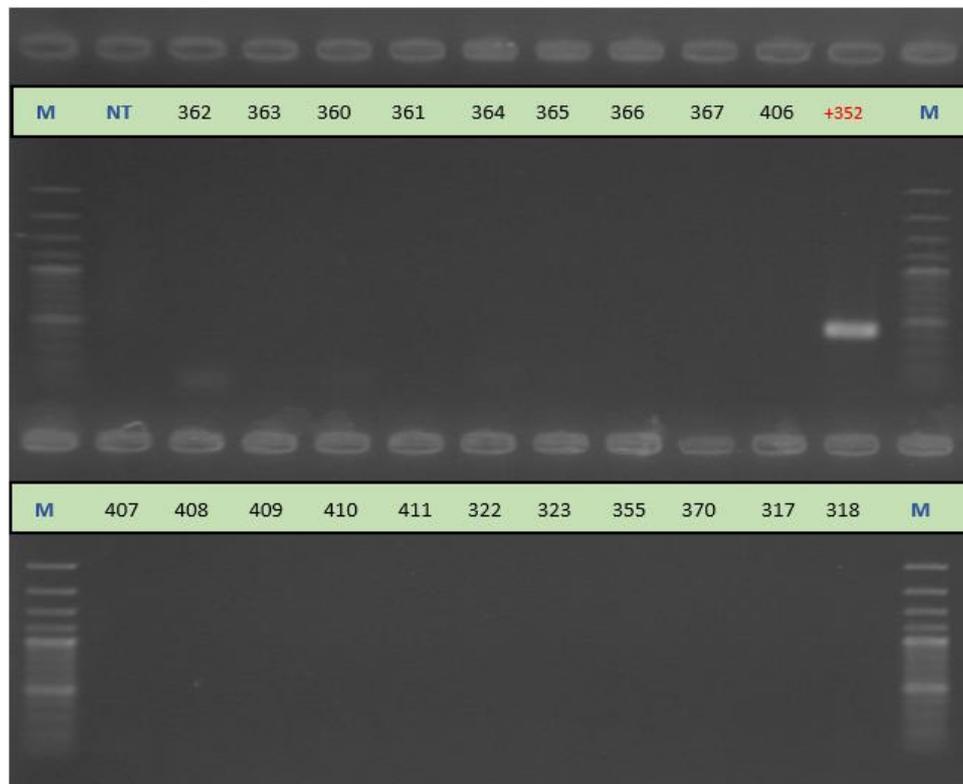


Foto 13. Resultados de las muestras de los cultivos hortícolas analizadas a STV.