

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



**DETECCIÓN DE VIRUS EN PLANTAS
DE VIVERO DE *Ficus carica* L.**

DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES
MÁSTER UNIVERSITARIO EN SANIDAD Y PRODUCCIÓN
VEGETAL

ALUMNA: DÑA. MARÍA DEL MAR MONREAL GONZÁLEZ
TUTORA ACADÉMICA: DÑA. MARÍA ISABEL FONT SAN AMBROSIO
TUTORA EXPERIMENTAL: DÑA. ANA OLVIDO ALFARO FERNÁNDEZ

CURSO ACADÉMICO 2020-2021
VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2021

RESUMEN

El vivero de plantas Orvifrusa S.L., situado en el municipio de Chiva (Valencia), tiene una amplia gama de árboles frutales, entre los que destacan sus variedades de higuera (*Ficus carica* L.). Este vivero obtiene los plántones de dicha especie mediante propagación vegetativa a partir de plantas madre. Durante 2020 y 2021 se observaron, tanto en las higueras empleadas para la propagación como en los plántones obtenidos, síntomas que podrían estar relacionados con la enfermedad del mosaico de la higuera (Fig Mosaic Disease, FMD). Aunque hay distintos virus asociados a esta enfermedad, en España sólo se han detectado hasta la fecha: fig mosaic virus (FMV), fig leaf mottle-associated virus 1 (FLMaV-1) y fig mild mottle-associated virus (FMMaV). Con la finalidad de conocer si el material vegetal de higuera de este vivero estaba infectado con estos virus, el vivero ha contratado al Laboratorio de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València para analizar estos tres virus.

Los objetivos de este TFM fueron: analizar los plántones obtenidos en 2021 de distintas variedades de higuera para verificar si están infectadas con FMV, FLMaV-1 y FMMaV mediante la técnica molecular RT-PCR; establecer un catálogo de síntomas asociados a los virus detectados en higuera en este vivero y establecer el estado sanitario de los plántones obtenidos en 2020 para seleccionar árboles libres de FMV y aislarlos como fuente de material libre del virus.

Para ello, se llevaron a cabo dos muestreos en las instalaciones de esta empresa. En el primero, de las dos variedades estudiadas, Blanca Gota de Miel y Cuello de Dama Blanca, se detectó un 100% (n=6) de positivos para FMV en la primera especie, mientras que para la segunda fue de un 83,33 %, estando co-infectadas con FLMaV-1 en el 66,67 % (n=6) de los casos. Sin embargo, no se obtuvo ningún positivo en FMMaV en ninguna de las dos variedades. Por el momento, no se pudo establecer una relación entre la sintomatología y el virus presente en las muestras, debido al elevado porcentaje de infecciones mixtas detectadas. En el segundo muestreo se analizaron 4 variedades para FMV, el orden de positivos fue del 80 % (n=5) en Blanca Gota de Miel, 33,3% (n=3) en la variedad Ronde de Bordeaux, de un 66,67 % (n=4) en Cuello de Dama Blanca y del 50% (n=2) en Brevia. Estos resultados permitieron separar un total de 10 plántones asintomáticos y negativos a FMV: 2 de Blanca Gota de Miel, 3 de Ronde de Bordeaux, 3 de Cuello Dama Blanca y 2 de Brevia.

Estos serán monitorizados y analizados, y en caso de confirmarse los resultados negativos a FMV podrán ser empleados como material de propagación libre del virus.

Palabras clave: Enfermedad, FMD, higuera, RT-PCR, síntomas

ABSTRACT

The plant nursery Orvifrusa S.L., placed in Chiva (Valencia), cultivates a broad range of fruits trees, among them different fig tree varieties (*Ficus carica* L.). This nursery obtains the fig seedlings by vegetative propagation from mother plants. During 2020 and 2021, symptoms related to the Fig Mosaic Disease (FMD) were observed in the fig trees used for propagation and in the seedlings obtained. There are different viruses associated to this disease, however in Spain only three have been detected to date: fig mosaic virus (FMV), fig leaf mottle-associated virus 1 (FLMaV-1) and fig mild mottle-associated virus (FMMAV). In order to determine if the fig tree plant material of this nursery was infected by these viruses, the Virology Laboratory of the Mediterranean Agroforestry Institute of the Polytechnic University of Valencia was hired to analyse the material for these three viruses.

The objectives of this TFM were: to analyse the seedlings obtained in 2021 from different fig tree varieties to verify if are infected with FMV, FLMaV-1 y FMMAV; to establish a catalogue of symptoms associated to each of these three viruses and to establish the sanitary status of the seedlings obtained in 2020 to select trees free of FMV and to isolate them as source of free virus plant material.

For that, two samplings in the installations of this company were carried out. In the first one, the results of the analyses determined that the two studied varieties, Blanca Gota de Miel and Cuello de Dama Blanca, a 100% (n=6) and 83,33% of positives to FMV were detected respectively. In the second variety, a mixed infection of FMV and FLMaV-1 was detected in 66,67 % (n=6). FMMAV was not detected in any of the two varieties. It was not possible to perform the symptom catalog for each viruses due to the high range of plants mix infected with the two viruses (FMV and FLMaV-1) In the second sampling, 4 varieties were analyzed to FMV and the results obtained showed: 80 % (n=5), 33,3% (n=3), 66,67 % (n=4) and 50% (n=2) tested positive to FMV for Blanca Gota de Miel, Ronde de Bordeaux, Cuello de Dama Blanca and Breva, respectively.. A total of 10 symptomless plants which tested negative to FMV were isolated: 2 of Blanca Gota de Miel, 3 of Ronde de Bordeaux, 3 of Cuello Dama Blanca and 2 of Breva. These plants will be monitored and analyzed in the future to confirm these negative results and will be destined as source of propagation material free of FMV.

Key words: Disease, FMD, fig tree, RT-PCR, symptoms

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutoras, María Isabel Font San Ambrosio y Ana Olvido Alfaro Fernández por brindarme esta oportunidad y con ella su atención, paciencia, experiencia y conocimientos. Y a todos los integrantes del Departamento de Virología, en especial a Esmeralda, que me han hecho sentir muy acogida.

Así como a la Universitat Politècnica de València y al claustro del Master en Sanidad y Producción Vegetal, que me ha permitido especializarme en lo que me apasiona.

A Orvifrusa S.L. y a Andreu, por confiar en nosotros a la hora de realizar los análisis para su plantación.

También he agradecerles de todo corazón, que se confiase en mí como profesional para realizar prácticas de empresa en el Instituto Agroforestal Mediterráneo.

Por último, a mi madre Toñi, a mi padre Pepe, aunque ya no esté, y al resto de mi familia, porque sin ellos esto no habría sido posible sin su apoyo. A mis amigos Lázaro y Álvaro, en especial a mi mejor amiga Paula, a mi pareja Samuel y a mis compañeras Ana y Andrea, ya que todos ellos han compartido conmigo este proceso en cada momento.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	El cultivo de higuera.....	1
1.1.1.	Taxonomía, origen y características de la especie.....	1
1.1.2.	Importancia económica del cultivo.....	3
1.2.	Propagación de higuera	5
1.3.	Principales virosis en higuera	6
1.3.1.	Enfermedad del mosaico de la higuera (Fig mosaic disease, FMD).....	1
1.3.2.	Virus del mosaico de la higuera (<i>Fig mosaic virus</i> , FMV).....	3
1.3.3.	Virus asociado de la hoja moteada de la higuera (<i>Fig leaf mottle-associated virus 1</i> , FLMaV-1).....	4
1.3.4.	Virus asociado del moteado suave de la higuera (<i>Fig mild mottle-associated virus</i> , FMMaV)	4
1.3.5.	Medidas de control.....	5
1.4.	Técnicas de detección, diagnóstico e identificación de virus vegetales ...	5
1.4.1.	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)	6
1.4.2.	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).....	6
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	8
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1.	Material vegetal	10
3.2.	Toma de muestras y zona de muestreo	10
3.3.	Evaluación de los síntomas y clasificación de las muestras en laboratorio	12
3.4.	Extracción de RNA y análisis RT-PCR.....	16
3.4.1.	Electroforesis en gel de agarosa	17

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1.	Detección de posible vectores en las hojas de higuera	20
4.2.	Estado sanitario de los plántones de 1-3 meses de edad frente a FMV, FLMaV-1 y FMMaV.....	20
4.3.	Catálogo de síntomas asociados a los virus detectados	23
4.4.	Estado sanitario de los plántones de 1 año frente a FMV	25
4.5.	Selección del material vegetal LIBRE DE FMV.....	28
5.	CONCLUSIONES.....	29
6.	BIBLIOGRAFÍA	30
7.	ANEXOS	33
7.1.	ANEXO 1. Protocolo de extracción de RNA con el kit comercial NucleoSpin™ RNA Plant Kit (Macherey-Nagel™, Düren, Alemania).....	33
7.2.	ANEXO 2. Tampón de extracción	34
7.3.	ANEXO 3. Productos y volúmenes empleados para la realización de la RT- PCR FMV en un paso	35
7.4.	ANEXO 4. Productos y volúmenes empleados para la realización de la RT- PCR FMMaV en un paso	36
7.5.	ANEXO 5. Productos y volúmenes empleados para la realización de la RT- PCR FLMaV-1 en un paso.....	37
7.6.	ANEXO 6. Programas de los termocicladores	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.Principales virosis de la higuera.

Tabla 2.Cebadores específicos utilizados para la detección de FMV, FLMaV-1, FMMaV.

Tabla 3.Resultados de las muestras recogidas durante el primer muestreo para los tres virus analizados.

Tabla 4.Relación y proporción de síntomas de los plantones del primer muestreo para FMV, FLMaV-1 y FMMaV.

Tabla 5.Resultados obtenidos en los análisis mediante RT-PCR con cebadores específicos a FMV de las muestras recogidas en el segundo muestreo.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Blastophaga psenes penetrando el sicono. (Fuente: Melgarejo, 1999)

Figura 2. Producción y rendimiento del cultivo de higuera a nivel mundial (Fuente: FAO 2021).

Figura 3. Producción de los principales productores (Fuente: FAO 2021).

Figura 4. Producción y extensión del cultivo de higuera en España (Fuente: FAO 2021).

Figura 5. Producción y extensión del cultivo de higuera por Comunidad Autónoma (Fuente: FAO 2021)

Figura 6. Hojas de Ficus carica. A: asintomática, B, C y D: con síntomas de FMD (Fuente: Preising et al., 2021).

Figura 7. Frutos de una planta de Ficus carica con síntomas de FMD (Fuente: Preising et al., 2021).

Figura 8. Aceria ficus Cotte. (Fuente: Coviello and Bentley, 2015)

Figura 9. Cebadores específicos de virus en higuera (Fuente: Preising et al., 2021).

Figura 10. Invernadero con planta de higuera esquejadas de 1-3 meses de edad de las variedades Blanca Gota de Miel y Cuello de Dama Blanca muestreadas en Orvifrusa S.L. durante el 1º muestreo (12 de marzo de 2021).

Figura 11. Higueras al aire libre de 1 año de edad muestreadas en el 2º muestreo (7 de junio de 2021) en Orvifrusa S.L.

Figura 12. Esquejes de higuera de Blanca Gota de Miel recogidos en el primer muestreo.

Figura 13. Esquejes de higuera de Cuello de Dama Blanca recogidos en el primer muestreo.

Figura 14. Hojas asintomáticas de la variedad Blanca Gota de Miel .

Figura 15. Hojas asintomáticas de la variedad Blanca Gota de Miel .

Figura 16. Detalle de rozos de hoja de higuera dentro de una bolsa de extracción universales de 12x15 (BIOREBA, Reinach, Suiza) para su triturado y homogenización.

Figura 17. Hojas de higueras asintomáticas correspondientes al segundo muestreo. A: Blanca Gota de Miel, B: Ronde de Bourdeaux, C: Cuello de Dama Blanca y D: Brevia.

Figura 18. Detalle de la mezcla de RNA y tampón de carga previo a su carga en el gel de agarosa

Figura 19. Detalle de la carga de las muestras en gel de agarosa 1,2% en TAE 1x para electroforesis.

Figura 20. Visualización de productos obtenidos en la RT-PCR para FMV (A), FLMaV-1 (B) y FMaV (C). M: marcador molecular; NT: No Template (Blanco); C-: control negativo; C+: control positivo.

Figura 21. Porcentaje de muestras positivas a FMV, FLMaV-1 y FMaV según la variedad

Figura 22. Hojas sintomáticas de la variedad Blanca Gota de Miel. A: Mosaico; B: Mosaico “oakleaf” (mosaico en hoja de roble) con avance desde la base; C: Bandeado de venas; D: Mosaico, “oakleaf” (mosaico en hoja de roble)” y necrosis; E: Mosaico y manchas en anillo.

Figura 23. Detalle de los síntomas observados en hojas de Ficus carica de la variedad Cuello de Dama Blanca. A: Mosaico, oakleaf y necrosis; B: Mosaico, abullonado y deformación; C: Bandeado de venas; D: Mosaico verde-claro y manchas en anillo; E: Moteado amarillo internervial.

Figura 24. Visualización de productos obtenidos en la RT-PCR para FMV. M: marcador molecular; NT: No Template (Blanco); C-: control negativo; C+: control positivo.

Figura 25. Porcentaje de muestras positivas para FMV según la variedad.

Figura 26. Separación de plantones libres de FMV.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CULTIVO DE HIGUERA

1.1.1. TAXONOMÍA, ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE

La higuera (*Ficus carica* L.) tiene su origen en Asia Occidental y es una de las especies leñosas domésticas de mayor antigüedad. Su cultivo se extendió desde Egipto y Siria por todo el Mediterráneo, adaptándose las exigencias de su cultivo a las condiciones climáticas de la zona (Maroto, 2002).

Es un frutal caducifolio perteneciente a la familia *Moraceae* que en su origen era monoico, pero se ha transformado en dioico para adaptarse al himenóptero *Blastophaga psenes* Linneaus (Hymenoptera: Agaonidae) (Figura 1) que ayuda a la polinización de la especie, denominada caprifricación, que sólo se da en las higueras variedades San Pedro y Esmirna. Las hembras de este insecto, depositan los huevos en las flores femeninas, que se convertirán en agallas desarrollándose los insectos en su interior. En primer lugar, eclosionan los machos que hacen una cavidad, proceso en el que mueren, para que las hembras puedan salir con el polen adherido a sus cuerpos y polinizan las flores femeninas al introducirse en la inflorescencia (Agustí, 2010). La parte de la higuera que se consume es la infrutescencia llamada sicono. Éste puede ser comercializado tanto en fresco, cuando los frutos tienen un calibre determinado y propiedades organolépticas adecuadas, como en seco, aquellos siconos que tienen un elevado contenido en azúcares, pero son poco jugosos y que la industria los transforma en pastas (Melgarejo, 1999).

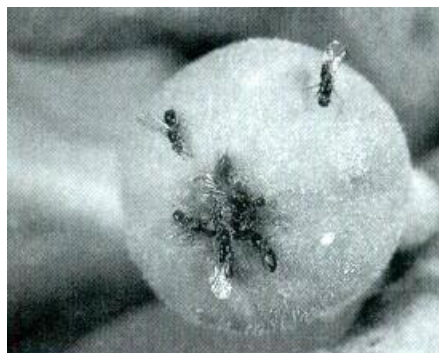


Figura 1. *Blastophaga psenes* penetrando el sicono. (Fuente: Melgarejo, 1999)

Según Agustí (2010), las variedades más destacadas de higuera cultivada se encuentran clasificadas según su capacidad productiva y el proceso por el cual llevan a cabo la fructificación. Siguiendo esta clasificación, las que tienen un interés varietal se agrupan en:

- Higueras de flores masculinas
 - Cabrahigo o higueras macho. Son higueras silvestres, que sólo poseen flores macho.
- Higueras de flores femeninas
 - Higueras comunes (Melgarejo, 1999)
 - Bíferas. También conocidas como reflorecientes o brevales, lo que significa que tienen dos épocas de maduración, una en junio de brevas y otra en agosto-septiembre de higos. Las brevas, con alto valor comercial por su calibre, proceden de siconos que no maduran en otoño, pero permanecen durante el invierno en el árbol, como pequeños botones, madurando así al verano siguiente. En cambio, los higos corresponden a la segunda cosecha, con menor tamaño y aroma, pero mayor dulzor, se forman sobre madera del mismo año.
 - Uníferas. Sólo producen una cosecha de higos, entre finales de verano y principios de otoño, normalmente de agosto a octubre.
 - Esmirna. Cultivadas principalmente en el Norte de África y Oriente medio. Al sólo poseer flores femeninas, se polinizan con cabrahígo (higueras silvestres, flores macho) por la polinización entomófila de *B. psenes*.
 - San Pedro. Producen dos tipos de frutos comestibles, las brevas sin que ocurra la caprifricación y los higos en el caso de que sí.

Las especies más cultivadas habitualmente en España son partenocárpicas y autofértiles, produciendo flores femeninas y masculinas en el mismo pie de flor y se produce la polinización, pero no la fecundación, desarrollando los frutos sin necesidad de que tenga lugar la caprifricación por el estímulo de polen sobre el estigma (Flores 1990).

Los principales problemas sanitarios en el cultivo de la higuera son la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: *Aleyrodidae*) y las virosis, que no afectan demasiado

al desarrollo vegetativo, pero su acción conjunta produce afecciones que deprecian a nivel comercial, afectando negativamente a su posible exportación.

1.1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO

Según los datos registrados por la FAO hasta 2019, a nivel mundial se obtenía una reducida producción de higos en comparación con la elevada superficie cultivada hasta 2016. La máxima superficie cultivada de higuera se registró en 2013 con 315.121 ha, a partir de ese momento comenzó a descender. Sin embargo la producción comenzó a crecer a partir de 2016, alcanzándose su máximo en 2019, con 1.315.588 toneladas. Este aumento de la producción contrasta con la disminución del área cosechada (Figura 2).

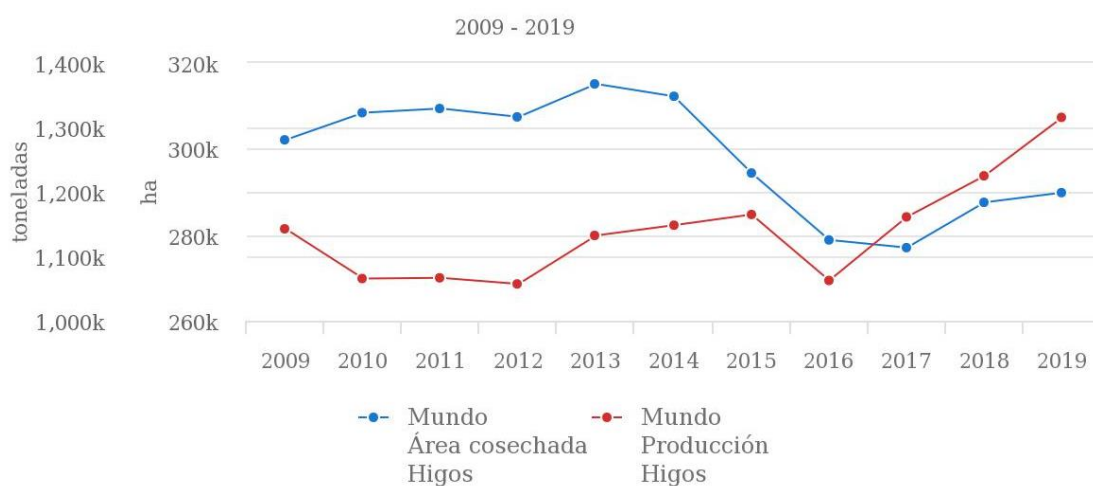


Figura 2. Producción y rendimiento del cultivo de higuera a nivel mundial (Fuente: FAO 2021).

En los últimos diez años, España se encuentra en el séptimo puesto de los diez países con mayor producción a nivel mundial promedio con 34.452 toneladas de higos, después de Siria y seguido por Estados Unidos, mientras que el primer puesto lo ocupa Turquía, que produce 287.124 toneladas (Figura 3).

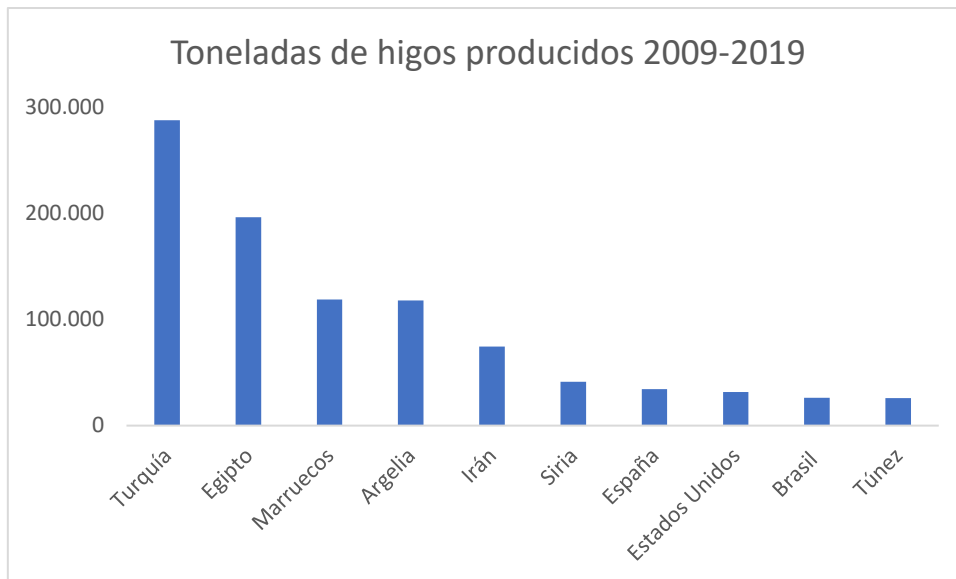


Figura 3. Producción de los principales productores (Fuente: FAO 2021).

En España, de forma tradicional la higuera se ha cultivado en secano principalmente y en minifundios o de manera dispersa, contando así con una reducida superficie de cultivo, pero durante 2019 se alcanzó tanto el máximo de área cultivada, contando con 14.600 hectáreas, y de producción, hasta la cifra de 51.600 toneladas (Figura 4). Este aumento es debido a un cambio en las preferencias de mercado, con base en un aumento de la demanda internacional de los higos por sus cualidades alimenticias y organolépticas. Este hecho ha supuesto que, por lo que España se sitúe entre los diez países más productores a nivel mundial.

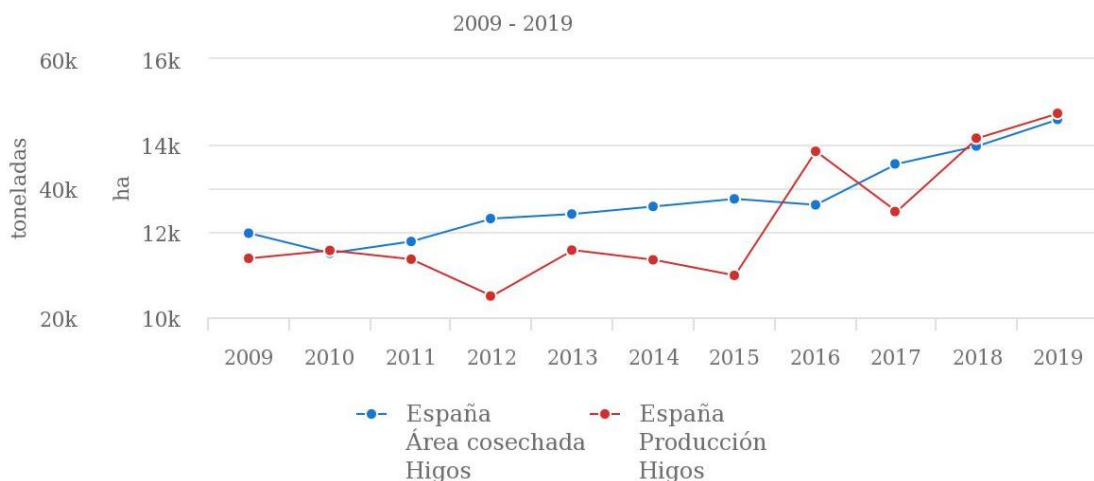


Figura 4. Producción y extensión del cultivo de higuera en España (Fuente: FAO 2021).

Según el avance de datos del análisis provincial de superficie, árboles diseminados, rendimiento y producción de 2020 (MAPA, 2021), la Comunidad Autónoma con mayor

superficie de cultivo y producción es Extremadura contando con 7.034 ha y 37.382 toneladas, respectivamente (Figura 5).

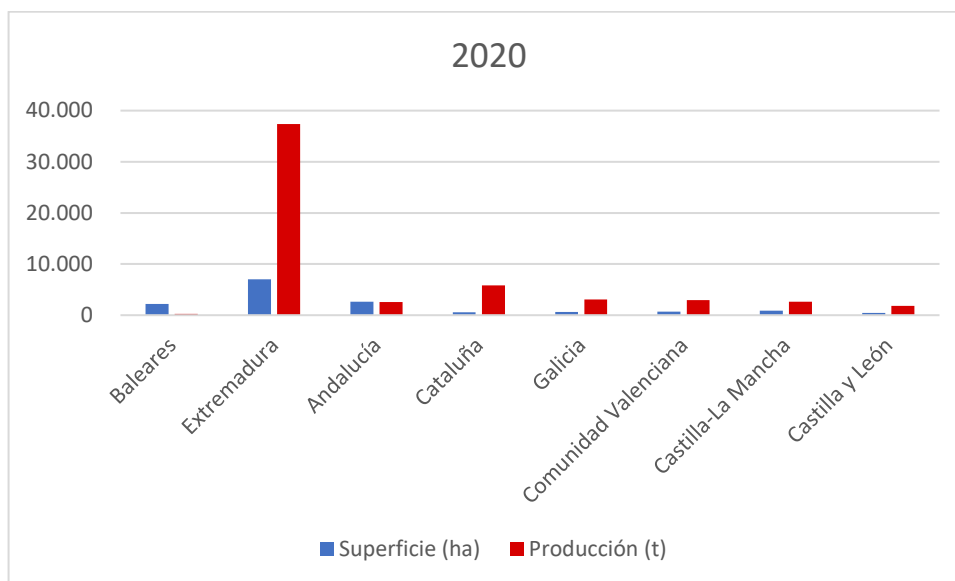


Figura 5. Producción y extensión del cultivo de higuera por Comunidad Autónoma en 2020 (Fuente: FAO 2021)

1.2. PROPAGACIÓN DE HIGUERA

La principal forma de propagación de la higuera se lleva a cabo principalmente por estaca leñosa, de uno o dos años en vivero, aunque existen otros métodos como el cultivo de meristemas, injertos, renuevos y acodos. Se realiza de tal manera, ya que, si se reproducen por semillas para obtener individuos productivos, se debe esperar unos 10 años, mientras que los plantones producen en un período de tiempo de un año, aproximadamente (Melgarejo, 1999).

Con motivo del aumento de demanda del cultivo de la higuera y el objeto de poder cubrirla, se deben replantear e innovar las técnicas y el manejo de este cultivo, comenzando con las orientadas a la Sanidad Vegetal debido a que, para este cultivo la presencia de patógenos es muy limitante (Casadomet *et al.*, 2016).

La propagación de la higuera por estaca leñosa, se realiza cortando los esquejes de la planta madre durante la parada vegetativa a principios de invierno, el cual, que debe tener unas 3 o 4 yemas. En primer lugar, se desinfecta con fungicida durante un par de horas. Una vez secos, se mantiene durante al menos 21 días en cámara a 5 grados transcurrido ese tiempo, se traspasan a una habitación oscura a 18 grados, durante 8 a 15 días, según la variedad.

Una vez se hincha la corona de raíces, se trasplantan en fibra de coco en un invernadero con calefacción, colocando las bandejas en mesas de cultivo con calefacción radiante, no menor de 12 grados. Cuando presentan suficientes raíces, se sacan aclimatándolas.

1.3. PRINCIPALES VIROSIS EN HIGUERA

Los virus vegetales suponen una merma en el rendimiento de los cultivos y la calidad de sus frutos, lo que puede desencadenar pérdidas económicas importantes (Bos, 1982).

En todo el mundo se han identificado diferentes virus que afectan al cultivo de la higuera, en su mayoría distribuidas desde Asia y Oriente Próximo, hasta la Cuenca Mediterránea (Jamous *et al.*, 2020). Entre ellos destacan los presentados en la Tabla 1.

Además de estas especies virales, se ha detectado la presencia de viroides en diferentes áreas productoras, destacando entre ellos: *Apple dimple fruit viroid* (ADFVd) en Italia (Chiumenti *et al.*, 2014), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) en Túnez (Yakoubi *et al.*, 2007) y *Hop stunt viroid* (HSVd) en Túnez y Siria (Yakoubi *et al.*, 2007; Elbeaino *et al.*, 2012).

En la Cuenca Mediterránea, se han detectado varios de los virus mencionados en la Tabla 1. Detectándose en mayor medida FLMaV-1 y FMV, con un 43,24 % y 34,52 % de las muestras positivas, respectivamente (Elbeaino *et al.*, 2006; Nahdi *et al.*, 2006; Caglar *et al.*, 2011; Elbeaino *et al.*, 2012; Voncina *et al.*, 2015)

En España, Alfaro-Fernández y col. tomaron muestras sintomáticas de higueras en 2013 ocho provincias españolas que se analizaron a FMV, FLMaV-1, FMLaV2, FMMaV, FLV-1 y FFkaV, detectándose principalmente FMV en infección simple o mixta con FMMaV y FLMaV-1. Lo que supuso la primera detección de FMMaV y FLMaV en España (Alfaro-Fernández *et al.*, 2014).

Tabla 1. Principales virosis de la higuera.

Virus	Acrónimo	Familia	Género	Transmisión	Autor
Virus del mosaico de la higuera (<i>Fig mosaic virus</i>)	FMV	<i>Fimoviridae</i>	<i>Emaravirus</i>	<i>Aceria ficus</i> Propagación	Elbeaino <i>et al.</i> 2009
Virus asociado del moteado suave de la higuera (<i>Fig mild mottle-associated virus</i>)	FMMaV	<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	Propagación	Elbeaino <i>et al.</i> 2010
Virus asociado de la hoja moteada de la higuera 1 (<i>Fig leaf mottle-associated virus 1</i>)	FLMaV-1	<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Ceroplastes rusci</i> L.	Elbeaino <i>et al.</i> 2006
Virus asociado de la hoja moteada de la higuera 2 (<i>Fig leaf mottle-associated virus 2</i>)	FLMaV-2	<i>Closteroviridae</i>	<i>Ampelovirus</i>	<i>Ceroplastes rusci</i> L.	Elbeaino <i>et al.</i> 2006
Virus asociado de la mancha de la higuera (<i>Fig fleck-associated virus</i>)	FFkaV	<i>Tymoviridae</i>	<i>Maculavirus</i>	Desconocida	Elbeaino <i>et al.</i> 2011a
Virus latente de la higuera 1 (<i>Fig latent virus 1</i>)	FLV-1	Betaflexiviridae	<i>Trichovirus</i>	Semilla	Elbeaino <i>et al.</i> 2012
Badnavirus de la higuera (<i>Fig badnavirus-1</i>)	FBV-1	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Badnavirus</i>	Áfidos y coccinélidos por confirmar	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010
Virus críptico de la higuera (<i>Fig cryptic virus</i>)	FCV	<i>Partitiviridae</i>	<i>Deltapartivirus</i>	Semilla y polen	Elbeaino <i>et al.</i> 2011b
Virus asociado de la hoja moteada de la higuera 1 (<i>Fig leaf mottle-associated virus 3</i>)	FLMaV-3	<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Ceroplastes rusci</i> L.	Norozian <i>et al.</i> , 2014
<i>Closterovirus de la higuera de Arkansas 1 (Arkansas fig closterovirus-1)</i>	AFCV-1	<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	Desconocida	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010
<i>Closterovirus de la higuera de Arkansas 2 (Arkansas fig closterovirus-2)</i>	AFCV-2	<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	Desconocida	Tzanetakis <i>et al.</i> 2010

1.3.1. ENFERMEDAD DEL MOSAICO DE LA HIGUERA (FIG MOSAIC DISEASE, FMD)

Es una enfermedad distribuida por todo el mundo y la que tiene mayor repercusión en esta especie. Se citó por primera vez en 1922 en California (Condit, 1993), mientras que, en España fue citada por primera vez en Alicante en 2005, identificando a FMV como su principal agente causal (Segarra *et al.*, 2005).

Asociados a esta enfermedad se han identificado al menos 12 virus (Tabla 1 y Figura 9) y tres viroides (Preising *et al.*, 2021), los cuales se citaron en el apartado anterior.

En el mesófilo de las hojas de higueras con síntomas de FMD, se observan los denominados DMBs (“double membrane bodies”), de naturaleza no conocida, dispersos o formando masas en el citoplasma. Se han observado también dos tipos de partículas semejantes a virus: una filamentososa-flexuosa en los tubos cribosos y en las células adyacentes a éstos, y partículas isométricas en las células del floema. Los cloroplastos aparecen hipertrofiados, con acumulación anormal de almidón, y presencia de cuerpos osmiófilos. (Melgarejo *et al.*, 2010).

Los síntomas de las higueras con FMD muestran un amplio abanico de síntomas en las hojas, desde grandes zonas con clorosis, decoloraciones, moteado, deformación, aclarado de venas, a bandas necróticas que rodean los nervios, con mayor incidencia en las hojas jóvenes (Figura 6). En algunos casos también aparecen estos síntomas en los frutos, siendo el principal síntoma el mosaico (Figura 7) (Bayoudh *et al.*, 2017). Se cree que esta variedad de síntomas se produce debido a que la enfermedad es producida por un complejo de virus que la inducen (Elbeaino *et al.*, 2007; Caglar *et al.*, 2011), pero la etiología de esta aún no ha sido descubierta por su gran complejidad.

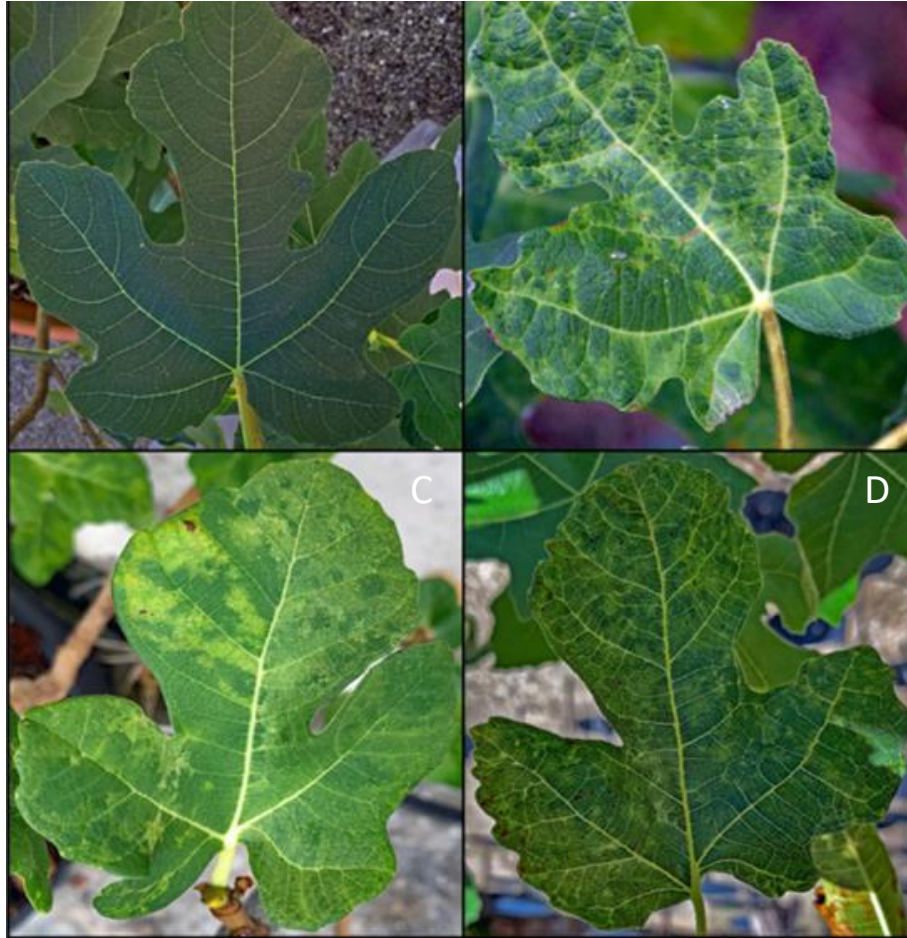


Figura 6. Hojas de *Ficus carica*. A: asintomática, B, C y D: con síntomas de FMD (Fuente: Preising et al., 2021).



Figura 7. Frutos de una planta de *Ficus carica* con síntomas de FMD (Fuente: Preising et al., 2021).

Hasta la fecha, sólo se conoce la higuera como hospedante de FMD, en cualquiera de sus variedades. Además de poder ser transmitidos algunos de sus virus asociados por propagación vegetativa, se ha conseguido realizar con éxito la transmisión mecánica

artificial de AFCV-2 y FBV-1 a diferentes especies de las familias *Chenopodiaceae* y *Solanaceae*, desarrollando síntomas de mosaico (Tzanetakis *et al.*, 2010). Esto es debido a que una de las partículas virales asociadas a la enfermedad se transmite por inoculación mecánica (Melgarejo *et al.*, 2010).

1.3.2. VIRUS DEL MOSAICO DE LA HIGUERA (*Fig mosaic virus*, FMV)

FMV es el virus más frecuente, y quizás el más importante componente de FMD, aunque se piensa que la interacción de este virus con los otros es lo que produce la gran variabilidad de síntomas en las plantas afectadas (Caglar *et al.*, 2011).

Pertenece a la familia *Fimoviridae* género *Emaravirus*. Es un virus monocatenario de RNA negativo, (-)ssRNA, con genoma multipartito en 6 segmentos, en el que cada uno tiene un único ORF, marco de lectura abierta o gen (Walia *et al.*, 2014) con una longitud de 7,039 bp. El ORF que codifica la RNA polimerasa dependiente del RNA es utilizado como marcador molecular para su diagnóstico por RT-PCR y análisis filogenéticos (Preising *et al.*, 2021).

Además de la higuera, se ha hallado este virus infestando de manera natural a plantas de cliclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) (Elbeaino *et al.*, 2018).

Produce síntomas tanto en hojas como en frutos. Las hojas infestadas presentan manchas en mosaico, de manera uniforme o irregular, de color amarillo que en los márgenes se aclaran fundiéndose con el color de la hoja sana, para más tarde adquirir un color pardo en los bordes debido a la muerte de las células epidérmicas (Mergarejo *et al.*, 2010).

Se transmite por el vector *Aceria ficus* Cotte (Arachnida: Eriophyidae) denominado el ácaro de la higuera, de manera semi-persistente (Abou-Awad *et al.*, 2000; Hafez *et al.*, 2011). Este ácaro no lo transmite a la descendencia, pero sí se mantiene infectivo entre mudas una vez ha adquirido el virus por alimentación. Es un eriófido con el cuerpo de color amarillo pálido (Figura 8), que se protege de posibles ataques externos en las yemas y en el envés de las hojas de higuera, al alimentarse de estos provoca “russeting”, provocando la caída de las hojas y retraso del crecimiento (Flock & Wallace, 1955).



Figura 8. *Aceria ficus* Cotte. (Fuente: Coviello and Bentley, 2015)

FMV también es transmitido por propagación mediante esquejes o estacas y por injerto, pero no se han encontrado indicios de que sea transmitido por semilla (Segarra *et al.*, 2005; Caglayan *et al.*, 2012).

1.3.3. VIRUS ASOCIADO DE LA HOJA MOTEADA DE LA HIGUERA (*Fig leaf mottle-associated virus 1*, FLMAV-1)

Pertenece a la familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*. Es un virus de RNA monocatenario positivo, (+) ssRNA, sus partículas filamentosas cuentan con una longitud de 1,800 nm (Elbeaino *et al.*, 2006), estando su genoma completo aún por secuenciar.

Es un virus asociado a FMD, por lo que plantas con síntomas característico de esta enfermedad, como el mosaico muy avanzado en hojas jóvenes, suelen presentar un elevado índice de infección con FLMAV-1,

Los síntomas asociados a la infección por FLMAV-1 en las hojas consisten en deformaciones y una amplia gama de decoloraciones, como moteado clorótico, manchas, venas aclaradas, manchas en anillo cloróticas y/o necrosadas y patrones lineales (Appiano *et al.*, 1990)

Este virus no se transmite por propagación, pero sí por la caparreta blanca de la higuera, *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae) (Yorganci & Acigöz, 2019).

1.3.4. VIRUS ASOCIADO DEL MOTEADO SUAVE DE LA HIGUERA (*Fig mild mottle-associated virus*, FMMAV)

Pertenece a la familia *Closteroviridae* y género *Closterovirus*. Al igual que el FLMAV-1, su genoma aún no ha sido secuenciado, pero se conocen 26 secuencias parciales que corresponden a 7 marcos de lectura abierta (ORF) (Elbeaino *et al.*, 2010).

Este virus sólo se ha hallado en individuos que presentan síntomas característicos de la FMD (Preising *et al.*, 2021) y es transmitido a través de la propagación de material vegetal (Elbeaino *et al.*, 2010).

1.3.5. MEDIDAS DE CONTROL

Como en el resto de enfermedades de origen viral, el control sólo se puede llevar a cabo de forma preventiva para evitar la presencia de fuentes de inóculo.

El control de FMD se basa en la obtención y uso de material vegetal sano y el uso de variedades resistentes, así como el saneamiento mediante termoterapia y cultivo *in vitro*, o ambos combinados, pero es indispensable el conocimiento de la enfermedad y su situación actual para poder desarrollar técnicas de control eficaces (Segarra *et al.*, 2005).

Para evitar la transmisión de FMV por medio del vector *A. ficus*, el control se debe llevar a cabo de manera preventiva, monitoreando las hojas durante mayo, su época de aumento de la población, con una lente portátil. De forma curativa, se recomienda tratar en cuanto aparecen los primeros indicios de daños en las hojas, realizando una segunda aplicación si fuese necesario (Coviello & Bentley, 2015).

A la hora de llevar a cabo las labores de cultivo se recomienda encarecidamente la desinfección de los útiles entre cada planta, sobre todo a la hora de realizar la propagación de higueras. Otro método, pero de mayor complejidad, es el saneamiento de material vegetal infectado con FMV mediante la micropropagación *in vitro* (Al-Zahrani *et al.*, 2018).

1.4. TÉCNICAS DE DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE VIRUS VEGETALES

Entre las técnicas de detección, diagnóstico e identificación de virus vegetales se encuentran técnicas serológicas que se basan en la detección de proteínas virales mediante el empleo de anticuerpos por la reacción antígeno-anticuerpo, como es el caso de la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Por otro lado, están las técnicas moleculares basadas en la detección de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que componen el genoma viral, como es el caso de la RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). Ambas técnicas se describen a continuación.

1.4.1. ENSAYO POR INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, ELISA)

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

Recientemente se han desarrollado, aunque no para su comercialización, anticuerpos contra la cápside del FMV (Shahmirzaie *et al.*, 2019), lo que facilitará en un futuro la detección de este virus por medio de análisis serológicos como las bandas de flujo lateral o la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), lo que disminuirá el coste y tiempo de su diagnóstico.

1.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN INVERSA (REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION, RT-PCR)

La PCR es una técnica molecular ampliamente extendida que se basa en la obtención de un elevado número de copias de un fragmento de DNA molde, por medio de la enzima DNA polimerasa, que se encarga de producir copias del DNA molde, ayudada por los cebadores (fragmentos cortos monocatenarios de DNA), los que sirven de guía para la replicación de la cadena molde, que surgirá a partir de nucleótidos libres desde los extremos de los cebadores, agregados como dNTPs (Walker & Rapley, 2009).

Esta reacción se produce en tres fases diferentes, llamadas: desnaturalización, hibridación y elongación. La primera ocurre a 94 °C durante unos 60', en la que se separan las dos cadenas de ADN. En la hibridación, los cebadores se unen al DNA molde por complementariedad entre 35 y 60 °C. El último paso, la elongación, donde se añaden los nucleótidos complementarios desde el extremo 3' libre al 5' con ayuda de la DNA polimerasa a 72 °C.

Mientras que la RT-PCR, es una modalidad de PCR utilizada en Virología, ya que el genoma viral en gran cantidad de virus vegetales es de RNA y antes de comenzar la reacción de PCR, ha de realizarse una transcripción inversa del RNA en su DNA complementario de cadena simple (cDNA) mediante la enzima transcriptasa inversa. Una vez se ha realizado dicha transcripción reversa, se continuará el proceso como una PCR convencional utilizando como molde el cDNA obtenido (Walker & Rapley, 2009).

En la Figura 9, se presenta una recopilación de los cebadores específicos comúnmente utilizados para la detección de virus y viroides de higuera que están asociados a FMD.

Virus/viroid	Primer	Sequence	Gene	Reference
FLMaV-1	CPtr-a	5'-CGTGGCTGATGCCAAAGTTTA-3'	HSP70h	Elbeaino et al. 2007a
	N17-s	5'-GTTAACGCATGCTTCCATGA-3'		
FLMaV-2	F3-s	5'-GAACAGTGCCATCAGTTT GATTTG-3'	HSP70h	Elbeaino et al. 2007a
	F3-a	5'-TCCCACCTCCTGCGAAG CTAGAGAA-3'		
FLMaV-3	FLMaV-3sF	5'-CTGTATCTGTCATTACCTCTTCGGG-3'	HSP70h	Norozian et al. 2014
	FLMaV-3sR	5'-CTGTATCTGTCATTACCTCTTCGGG-3'		
FMV	EMARV-GP-s	5'-GGGTACATATGCGTCATTCTTG-3'	RdRp	Walia et al. 2009
	EMARV-GP-a	5'-CGTTTGTCTTGATCACAGCAA-3'		
FLV-1	FLV1-s	5'-CCATCTTCACCACAAAATGTC-3'	Coat protein	El-Air et al. 2013
	FLV1-a	5'-CAATCTTCTTGGCCTCCATAAG-3'		
AFCV-1	AFCV1F	5'-CTGTATCTGTCATTACCTCTTCGGG-3'	—	Tzanetakis et al. 2010
	AFCV1R	5'-ATGCTTCTCCTCGGCTGC-3'		
AFCV-2	AFCV2F	5'-GTTCGGAATTAGTTAATAVTA-3'	—	Tzanetakis et al. 2010
	AFCV2R	5'-ACCCGCTAGAGTAATCAGTC AAAGTT-3'		
FMMaV	LM3s	5'-AAGGGGAATCTACAAGGGTCG-3'	HSP70h	Elbeaino et al. 2010
	LM3a	5'-TATTACGCGCTTGAGGATTGC-3'		
FCV	FCV-R2s	5'-TGGCCGACTACTCAAGTCA-3'	CP	Elbeaino et al. 2011b
	FCV-R2a	5'-TGCGAGGTAGCATGTGTAGC-3'		
FFKaV	D8-s	5'-TCAATCCCAAGGAGGTGAAG-3'	RdRp	Elbeaino et al. 2012
	D8-a	5'-ACACGGTCAATGAGGGAGTC-3'		
FBV-1	1094F	5'-ACCAGACGGAGGGAAGAAAT-3'	Polyprotein	Laney et al. 2012; Tzanetakis et al. 2010
	1567R	5'-TCCTTGCCATCGGTTATCTC-3'		
ADFVd	ADFVd-for	5'-CCCCCTGCGCTACTGACTAAAAG-3'	—	Chiumenti et al. 2014
	ADFVd-rev	5'-GTGTTTTACCCTGGAG GCTCCACTC-3'		
CEVd	CEVd-F	5'-GGAAACCTGGAGGAAGTCGAGG-3'	—	Yakoubi et al. 2007
	CEVd-R	5'-CCGCCTTTTTTCTTTTCT GCCTGC-3'		
HSVd	78P	5'-AACCCGGGGCAACTCTTCTC-3'	—	Elbeaino et al. 2012
	83M	5'-AACCCGGGGCTCCTTCTCA-3'		

Figura 9. Cebadores específicos de virus en higuera (Fuente: Preising et al., 2021).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En Valencia, concretamente en el término municipal de Chiva, se ubica la empresa Orvifrusa S.L. con sede también en Extremadura. Esta empresa fue fundada en la década de los 70 y desde entonces se dedica al cultivo de ornamentales, vid y otros frutales. Su especialidad son los frutales con fin ornamental de los que exportan el 38% de la producción, destacando entre ellos el de higuera con fines ornamentales. En los últimos 10 años ha llegado a producir medio millón de higueras en diferentes formatos que mayoritariamente han exportado a Marruecos, Turquía, Emiratos Árabes y Qatar.

Orvifrusa S.L. tiene en su catálogo una amplia gama de variedades de higuera y obtienen los plantones de la misma mediante propagación vegetativa a partir de plantas madre. Durante 2020 y 2021, tanto las higueras madre empleadas para la propagación como los plantones obtenidos mediante esta técnica, mostraron síntomas que podrían estar relacionados con la enfermedad del mosaico de la higuera (Fig Mosaic Disease, FMD).

Debido a las dificultades de Orvifrusa S.L. para conseguir material vegetal certificado libre de virus para su empleo en la propagación, la no existencia de cultivares resistentes a estos virus y la posible modificación del Reglamento Técnico de Control y Certificación de Plantas de Vivero de Frutales (Real Decreto 929/1995, del 9 de junio) para que se exija que el material vegetal de higuera esté libre de FMV, la empresa ha contratado al Laboratorio de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València (IAM-UPV) para analizar su material vegetal, descartar el material infectado y seleccionar el material libre de virus para realizar las futuras propagaciones y obtener de nuevos plantones libres de FMV. Este estudio se llevó a cabo durante el desarrollo de este TFM.

Por ello, los objetivos planteados para este TFM fueron los siguientes:

- Determinar el estado sanitario de los plantones (1-3 meses de edad) obtenidos en 2021, frente a FMV (Fig mosaic virus), FLMaV-1 (Fig leaf mottle-associated virus 1) y/o FMMaV (Fig mild mottle-associated virus) en las variedades Blanca Gota de Miel y Cuello de Dama Blanca, ya que son los únicos virus asociados a FMD detectados en España hasta la fecha.
- Establecer un catálogo de síntomas asociados a los virus detectados en higuera en este vivero.

- Determinar el estado sanitario frente a FMV de plántones obtenidos en 2020 (1 año de edad) de las variedades: Blanca Gota de Miel, Cuello de Dama Blanca, Ronde de Bordeaux y Breva.
- Seleccionar material vegetal libre de FMV para su empleo como plantas madre en las nuevas propagaciones a realizar entre octubre y noviembre de 2021.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Las variedades de *F. carica* que se utilizaron para su análisis en este trabajo, fueron las siguientes:

- **Blanca Gota de Miel.** Es bífera, su fruto tiene la piel de color amarillo dorado con carne rosada y presenta forma de gota, como indica su nombre. Se consume en fresco.
- **Breva.** Es una variedad que, a pesar de tener producción en ambas épocas del año, es más productiva en la de brevas.
- **Cuello de Dama Blanca.** Hay dos variedades, una unífera y otra bífera, con el mismo nombre, siendo más cultivada la del último caso. De fruto aperado y verde, con pulpa ámbar. Su maduración es tardía, escasa en brevas y elevada en higos, y se consume en fresco.
- **Ronde de Bordeaux.** Es unífera, produce higos pequeños con piel negra de azulada a rojiza, con la carne roja. Es de maduración temprana, a finales de julio hasta octubre.

3.2. TOMA DE MUESTRAS Y ZONA DE MUESTREO

En los invernaderos de Orvifrusa S.L., localizado en el municipio de Chiva (Valencia), se llevaron a cabo dos muestreos de distinto material vegetal en dos fechas diferentes. El muestreo 1º se llevó a cabo para determinar el estado sanitario de los plantones de 1-3 meses de edad obtenidos en 2021 frente a FMV, FLMaV-1 y FMaV, así como establecer un catálogo de síntomas asociados a los virus detectados en higuera en este vivero. El muestreo 2º se realizó para determinar el estado sanitario frente a FMV de plantones obtenidos en 2020.

- **Muestreo 1º:** Fue realizado el 12 de marzo de 2021 y se muestrearon al azar hojas de plantones asintomáticos y plantones enteros sintomáticos de las variedades Blanca Gota de Miel y Cuello de Dama Blanca de 1 a 3 meses de edad desde el esquejado. Las hojas sintomáticas se muestrearon para determinar la infección por FMV, FLMaV-1 y/o FMaV y realizar una asociación de síntomas con estos virus. Las hojas de plantones asintomáticos

se muestrearon para comprobar si la no presencia de síntomas correspondía con la no infección por FMV, FLMaV-1 y/o FMMaV. Los plántones asintomáticos muestreados se repicaron, en el momento de la toma de muestra, a nuevas bandejas para poder disponer de posible material vegetal para futuras propagaciones en el caso de estar libre de virus. En total se muestrearon hojas de 21 plántones de Blanca Gota de Miel y 16 de Cuello de Dama Blanca ubicados en bandejas de alveolos (Figura 10).



Figura 10. Invernadero con planta de higuera esquejadas de 1-3 meses de edad de las variedades Blanca Gota de Miel y Cuello de Dama Blanca muestreadas en Orvifrusa S.L. durante el 1º muestreo (12 de marzo de 2021).

- **Muestreo 2º:** Fue realizado el 7 de junio de 2021. En este se tomaron hojas de plántones asintomáticos de cuatro variedades con un estado de desarrollo de aproximadamente de 1 año aproximadamente (Figura 11): Blanca Gota de Miel, Cuello de Dama Blanca, 'Ronde de Bordeaux' y 'Breva'. Previamente a la toma de muestras, se realizó un reconocimiento visual de síntomas de los árboles de 70 hileras, marcando los árboles aparentemente asintomáticos (4-10 árboles según la variedad) sobre los que se realizó la toma de muestras. Se muestrearon 10 plántones de la var. Blanca Gota de Miel, 6 de la var. Cuello de Dama Blanca, 7 de la var. 'Ronde de Bordeaux' y 4 de la var. 'Breva'. En esta toma de muestra se seleccionaron tres hojas asintomáticas por árbol, con la intención de analizar y descartar los plántones con infección por FMV. Los plántones negativos a FMV se seleccionarían posteriormente como material libre de este virus y a partir de

ello se podrían realizar las futuras propagaciones para la obtención de nuevos plantones libres de FMV.



Figura 11. Higueras al aire libre de 1 año de edad muestreadas en el 2º muestreo (7 de junio de 2021) en Orvifrusa S.L.

El material vegetal de los dos muestreos, se introdujo en bolsas de plástico herméticas que se etiquetaron con el nombre de la variedad, número de planta y fecha de muestreo para su transporte al Laboratorio de Virología (IAM-UPV) y posterior análisis. En la toma de muestras se emplearon guantes de nitrilo que se cambiaron o desinfección con alcohol 70% al finalizar cada toma .

3.3. EVALUACIÓN DE LOS SÍNTOMAS Y CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO

Una vez en el Laboratorio, los esquejes que se estaban utilizando para formar los futuros plantones de 1-3 meses de edad que presentaban síntomas (21 plantones de la variedad Blanca Gota de Miel y 16 de la variedad Cuello de Dama Blanca) fueron clasificados según la sintomatología que presentaban y por variedad. Para ello se estudió detenidamente la sintomatología que presentaban (Figuras 12 y 13) y además se determinó la proporción de plantones que mostraba cada uno de los síntomas identificados.



Figura 12. Esquejes de higuera de *Blanca Gota de Miel* recogidos en el primer muestreo.



Figura 13. Esquejes de higuera de *Cuello de Dama Blanca* recogidos en el primer muestreo.

Para su análisis se agruparon hojas de 3 o 4 plantones/esquejes con la misma sintomatología, obteniendo 6 submuestras de cada variedad.

En el caso de las hojas de los plantones asintomáticos, estas se agruparon en una única submuestra de 30 hojas para cada variedad para su posterior análisis (Figuras 14 y 15).



Figura 14. Hojas asintomáticas de la variedad Blanca Gota de Miel .



Figura 15. Hojas asintomáticas de la variedad Blanca Gota de Miel .

De cada muestra se tomaron fragmentos de hoja con porción de nervio y se introdujeron en bolsas de extracción universales de 12x15 (BIOREBA, Reinach, Suiza) asignándoles un código del laboratorio (Figura 16). El material se trituró y homogenizó en estas bolsas para su posterior extracción de RNA.

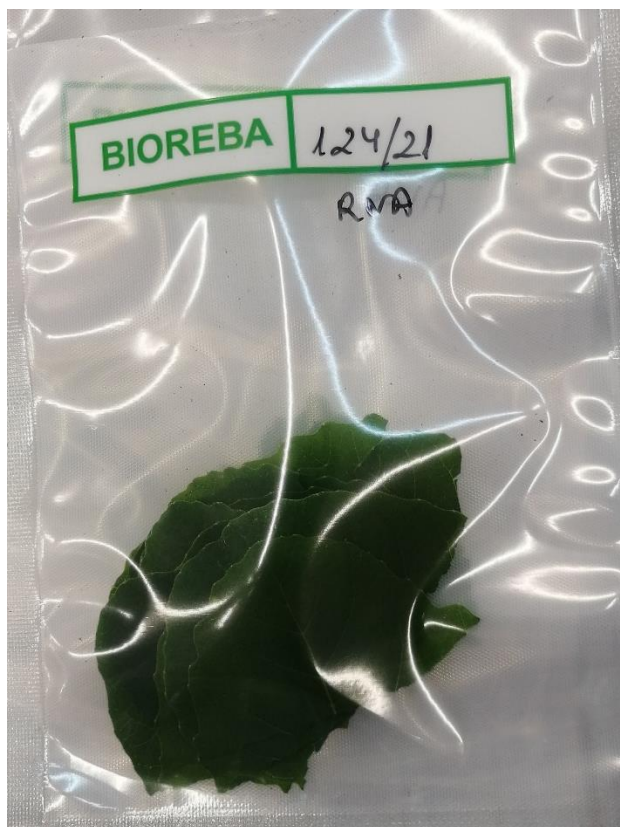


Figura 16. Detalle de rozos de hoja de higuera dentro de una bolsa de extracción universales de 12x15 (BIOREBA, Reinach, Suiza) para su triturado y homogenización.

Para procesar el material vegetal asintomático correspondiente al segundo muestreo (higueras de 1 año de edad), se agruparon las 3 hojas muestreadas de cada dos higueras de la misma variedad y tomando para su análisis un fragmento de cada una de ellas. De la var. Blanca Gota de Mie se obtuvieron 5 submuestras, 3 submuestras de Cuello de Dama Blanca, 3 submuestras de 'Ronde de Bordeaux' y 2 submuestras de 'Breva' (Figura 17). Los trozos de cada hoja (6 trozos) se introdujeron de nuevo en bolsas de extracción universales de 12x15 (BIOREBA, Reinach, Suiza). Se analizó el material vegetal realizando agrupaciones para reducir los costes de los análisis.

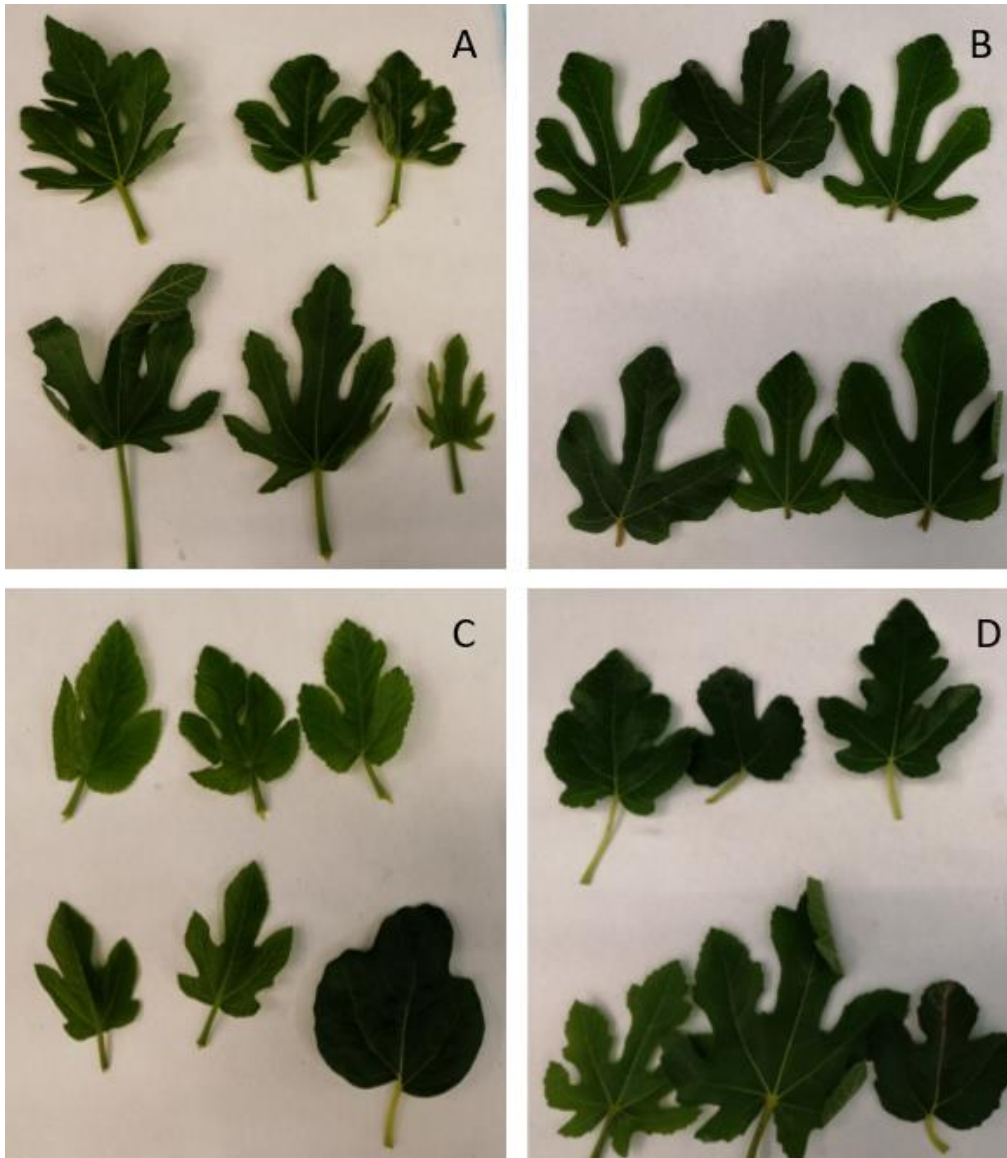


Figura 17. Hojas de higueras asintomáticas correspondientes al segundo muestreo. A: Blanca Gota de Miel, B: Ronde de Bourdeaux, C: Cuello de Dama Blanca y D: Breva.

Antes de tomar los fragmentos de las hojas para su análisis, se llevó a cabo una observación previa mediante lupa binocular con el fin de encontrar la presencia o indicios del eriófido *A. ficus*. Las muestras embolsadas se conservaron en frigorífico a 8°C hasta la extracción de RNA. La parte sobrante de las muestras recogidas se conservó a -20°C, envueltas en papel no satinado y numeradas con sus respectivos códigos de entrada, dentro de bolsas de plástico herméticas.

3.4. EXTRACCIÓN DE RNA Y ANÁLISIS RT-PCR

Previa al análisis por RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, “Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction”) Se realizó la extracción de

RNA de cada una de las muestras. Para la extracción de RNA se empleó el kit comercial NucleoSpin™ RNA Plant Kit (Macherey-Nagel™, Düren, Alemania), como se indica en el Anexo 1. Una vez obtenidos los extractos de RNA, se almacenaron a -20°C para su conservación hasta su empleo en el análisis mediante RT-PCR.

La detección de los virus objeto de estudio de este trabajo (FMV, FLMaV-1 y FMMaV) se llevó a cabo mediante RT-PCR con cebadores específicos para cada uno de virus (Tabla 2) empelando el kit comercial SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, Barcelona, España) con las concentraciones que se indican en los Anexos 3, 4 y 5.

El RNA extraído de cada una de las muestras se empleó inicialmente en la RT-PCR sin diluir directamente, y una vez obtenidos los resultados, las muestras negativas se volvieron a analizar por RT-PCR en dilución 1:10 con H₂O DEPC. El análisis de las muestras con dilución se realizó ya que puede darse el caso que existan inhibidores que impidan la reacción, y al diluirlos no interfieran en esta.

Tabla 2. Cebadores específicos utilizados para la detección de FMV, FLMaV-1, FMMaV.

Virus	Tipo	Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')	Posiciones (bp)	Zona de amplificación del genoma	Fuente
FMV	Forward	E5-S	CGGTAGCAAATGGAATGAAA	302	RNA1-RdRp	Elbeaino <i>et al.</i> 2009
	Reverse	E5-AS	AACACTGTTTTGCGATTG			
FLMaV-1	Forward	N17s	CGTGGCTGATGCAAAGTTTA	340	HSP70	Elbeaino <i>et al.</i> 2006
	Reverse	N17a	GTTAACGCATGCTTCCATGA			
FMMaV	Forward	LM3s	AAGGGGAATCTACAAGGGTCG	308	HSP70	Elbeaino <i>et al.</i> 2010
	Reverse	LM3a	TATTACGCGCTTGAGGATTGC			

Los programas de termociclador empleados en las diferentes reacciones de RT-PCR, y los modelos de los termocicladores empleados están reflejados en el Anexo 6.

3.4.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los resultados obtenidos de los análisis mediante RT-PCR se obtuvieron tras la electroforesis en gel de agarosa, su tinción y visualización bajo luz ultravioleta como se detalla a continuación.

Para preparar el gel se utilizó Agarosa D1 Baja EEO (Conda S.A., Madrid, España) al 1,2% en TAE 1x (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA a pH 8.0). El gel una vez solidificado, se sumergió en una cubeta de electroforesis con tampón TAE 1x. El gel de agarosa se cargó con 5 μ l de cada uno de los productos amplificados en las RT-PCRs (Figura 18), previamente mezclados con 2 μ l de tampón de carga (6X TriTrack DNA Loading Dye, ThermoScientifics, Vilna, Lituania) (Figura 19). Los carriles de los extremos de cada gel se destinaron para cargar el marcador de 100 pb con los fragmentos de tamaño conocidos (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder de Thermo Scientific™, Vilna, Lituania).

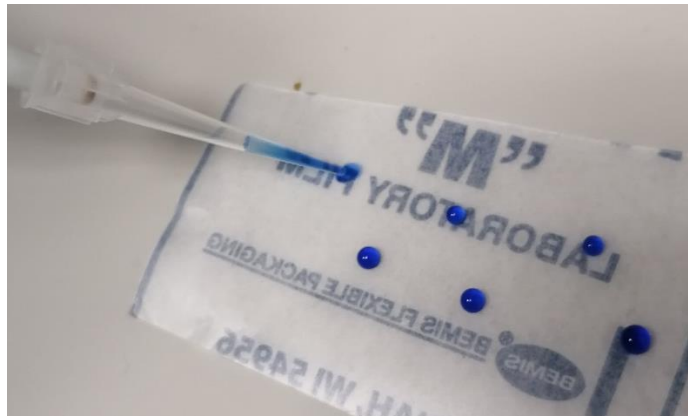


Figura 18. Detalle de la mezcla de RNA y tampón de carga previo a su carga en el gel de agarosa

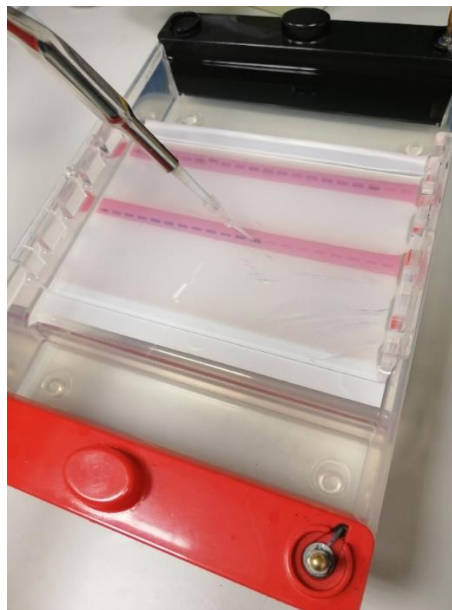


Figura 19. Detalle de la carga de las muestras en gel de agarosa 1,2% en TAE 1x para electroforesis.

Una vez completada la migración del fragmento amplificado en la electroforesis, se sumergió el gel para su tinción en un baño con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium,

Hayward, USA), y tras 30 minutos se obtuvieron los resultados al visualizarlo bajo luz UV empleando el transiluminador UV gelONE Gel Documentation System (Cleaver Scientifics, Cambridge, Reino Unido).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETECCIÓN DE POSIBLE VECTORES EN LAS HOJAS DE HIGUERA

Previamente al análisis se observaron las hojas recogidas mediante lupa binocular con el fin de encontrar la presencia o indicios del eriófido *A. ficus*, no encontrándose indicio alguno de este artrópodo.

4.2. ESTADO SANITARIO DE LOS PLANTONES DE 1-3 MESES DE EDAD FRENTE A FMV, FLMAV-1 Y FMMaV

Las muestras recogidas durante el primer muestreo, 21 plantones de las variedades Blanca Gota de Miel y 16 de la variedad Cuello de Dama Blanca, que se clasificaron por síntomas y se agruparon de 2 en 2, al ser analizadas mediante RT-PCR con cebadores específicos de FMV, FLMAV-1 y FMMaV se obtuvieron los resultados recogidos en la Tabla 3. También se presentan los productos de los mismos en la Figura 20.

Tabla 3. Resultados de las muestras recogidas durante el primer muestreo para los tres virus analizados.

MUESTREO 1º (12/03/2021)				
VARIEDAD	CÓDIGO LABORATORIO	FMV	FLMaV-1	FMMaV
Blanca Gota de Miel	114/21	+	-	-
	115/21	+	-	-
	116/21	+	-	-
	117/21	+	-	-
	118/21	+	-	-
	124/21	+	-	-
Cuello de Dama Blanca	119/21	+	+	-
	120/21	+	-	-
	121/21	+	-	-
	122/21	+	+	-
	123/21	-	+	-
	125/21	+	+	-

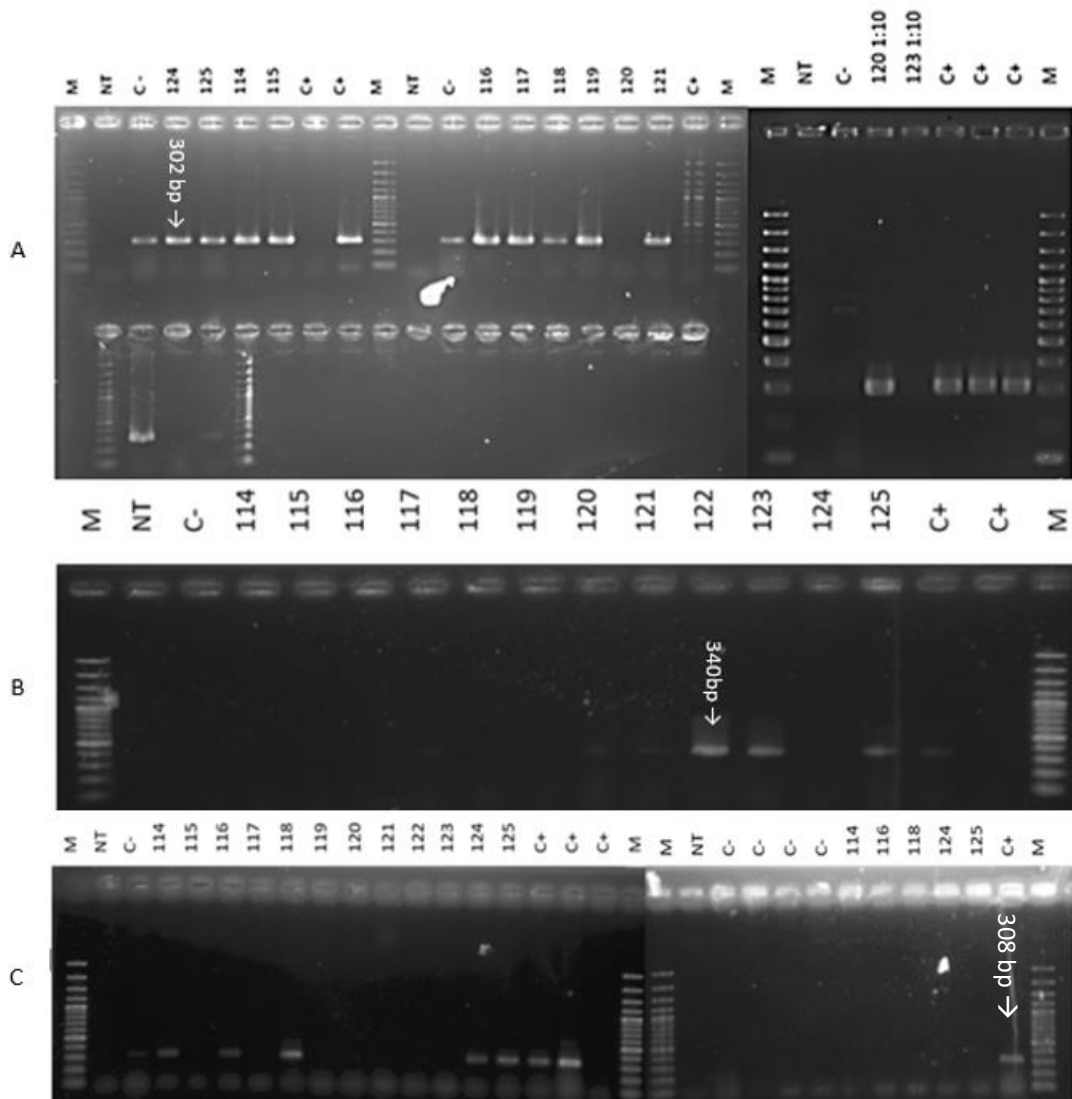


Figura 20. Visualización de productos obtenidos en la RT-PCR para FMV (A), FLMaV-1 (B) y FMMAV (C). M: marcador molecular; NT: No Template (Blanco); C-: control negativo; C+: control positivo.

Del total de las 12 muestras analizadas, se obtuvo un elevado porcentaje de positivos para FMV frente al resto de virus, siendo del 100 % en la variedad Blanca Gota de Miel y del 83,33 % en las muestras de Cuello de Dama Blanca, como se muestra en la Figura 21.

Para FLMaV-1, sólo resultaron positivas el 66,67 % de las muestras analizadas de la variedad Cuello de Dama Blanca, pero ninguna de la var. Blanca Gota de Miel.

Todas las muestras de ambas variedades, fueron negativas a FMMAV.

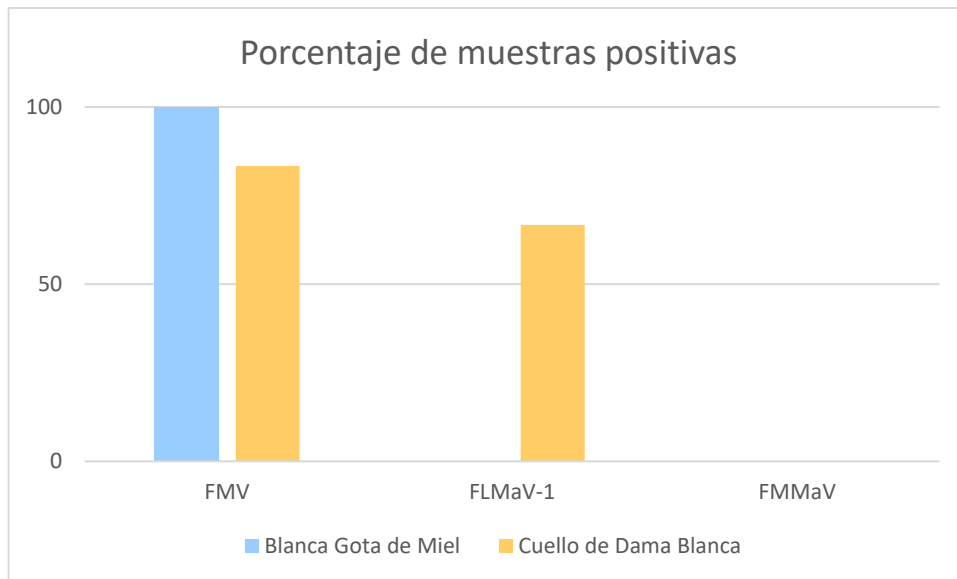


Figura 21. Porcentaje de muestras positivas a FMV, FLMaV-1 y FMMAV según la variedad

Aunque los virus relacionados con la enfermedad del mosaico de la higuera han sido ampliamente trabajados en cultivos de higuera dedicados al consumo en diferentes países de la cuenca Mediterránea, no se dispone de trabajos de investigación con muestras de viveros para el cultivo ornamental de la higuera, por lo que los datos con los que se discute a continuación versan sobre muestras recogidas en árboles cultivados para el consumo de sus frutos. Asimismo, cabe destacar la limitación para conseguir fuentes que traten en concreto estos virus en España, por ello se comparan los datos del trabajo con los casos de la Cuenca Mediterránea como referencia.

Los virus estudiados en este TFM se han detectado y establecido su incidencia en diferentes países de la Cuenca Mediterránea, como es el caso de Montenegro y Croacia, donde FMV fue detectado con una incidencia del 43% (n=21) y 87% (n=30), respectivamente (Vončina *et al.*, 2015; Perović *et al.*, 2016). Estos valores son significativamente menores a los obtenidos en las muestras ensayadas en el presente trabajo.

FMMAV, que no ha sido detectado en el presente estudio, si se detectó en Montenegro (Perović *et al.*, 2016) con una baja incidencia, del orden del 10 % (n=21).

Realizando un cómputo total de los resultados de los estudios realizados en la Cuenca Mediterránea en países como Irán, Turquía, Siria y otros, la incidencia de cada virus fue del 34,52 % (n=252) (Caglar *et al.*, 2011; Elbeaino *et al.*, 2012; Voncina *et al.*, 2015;) en

FMV, mientras que para FLMaV-1 fue del 43,24 % (n=148) (Elbeaino *et al.*, 2006; Nahdi *et al.*, 2006) y del 11,81 % (n=134) (Elbeaino *et al.*, 2012; Alishiri *et al.*, 2018) en FMMaV.

Según el trabajo realizado por Alfaro *et al.* (2014), el 96,7 % (n=30) de higueras muestreadas en distintas zonas de España, presentaban infección con FMV, encontrándose dentro del rango de valores obtenidos en este trabajo. Las mayores diferencias se dan en FLMaV-1, en el que el 16,7% de las muestras fueron positivas, valor más reducido que los presentes, mientras que fueron positivas el 26,7 % en FMMaV contrastando con los resultados del presente estudio, donde no se detectó en ninguna de las muestras.

Fuera de la Cuenca Mediterránea también se han detectado estos tres virus en China, pero en unos porcentajes del rango entre 0,4 % en FMMaV al 44,40 % en FMV (n=252), debido a que no está tan extendida su presencia como en España (Mijit *et al.*, 2017).

4.3. CATÁLOGO DE SÍNTOMAS ASOCIADOS A LOS VIRUS DETECTADOS

En la evaluación de síntomas llevada a cabo con las muestras recogidas durante el primer muestreo en plántones de 1-3 meses de edad esquejados en 2021, se observaron síntomas diversos (Figuras 22 y 23) como: mosaico y deformación de hojas (Figura 23A), "oakleaf" (mosaico en hoja de roble) (Figura 23B), bandeado de venas en oscuro (Figura 22C), necrosis/oak leaf con necrosis, manchas en anillo (Figura 23D), y moteado amarillo internervial (Figura 23E).

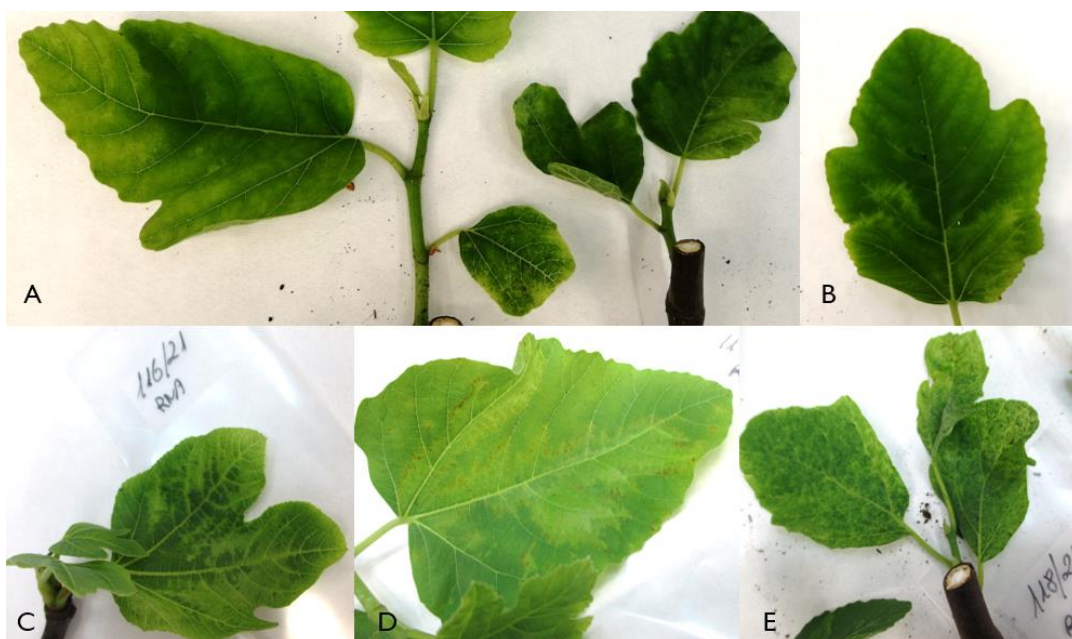


Figura 22. Hojas sintomáticas de la variedad Blanca Gota de Miel. A: Mosaico; B: Mosaico “oakleaf” (mosaico en hoja de roble) con avance desde la base; C: Bandeado de venas; D: Mosaico, “oakleaf” (mosaico en hoja de roble)” y necrosis; E: Mosaico y manchas en anillo.

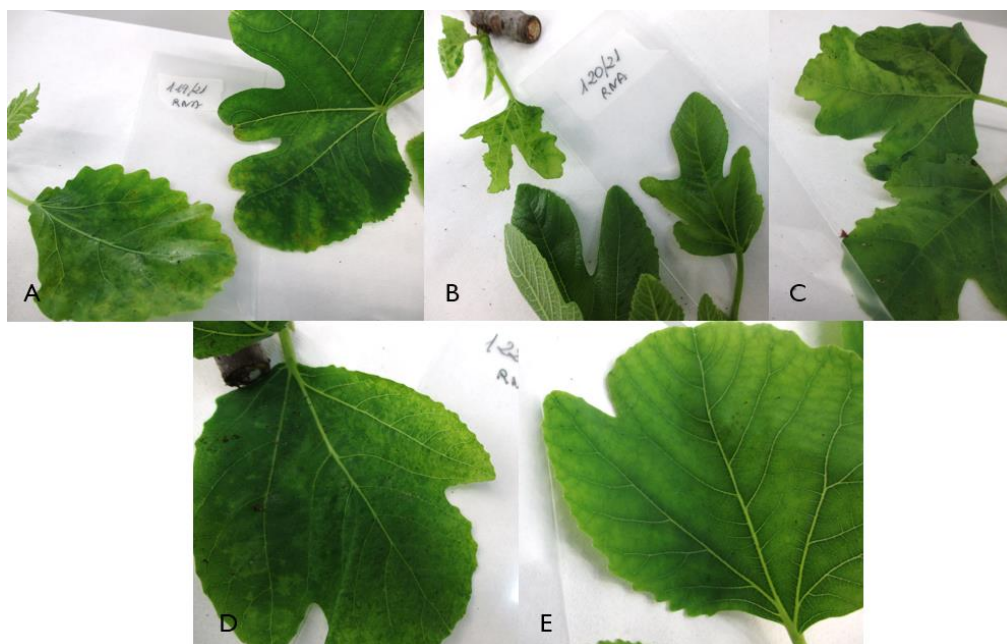


Figura 23. Detalle de los síntomas observados en hojas de *Ficus carica* de la variedad Cuello de Dama Blanca. A: Mosaico, oakleaf y necrosis; B: Mosaico, abullonado y deformación; C: Bandeado de venas; D: Mosaico verde-claro y manchas en anillo; E: Moteado amarillo internervial.

Al clasificarse las muestras por sintomatología (Figuras 22 y 23), como se explicó con anterioridad, se obtuvo la proporción de síntomas presentada en la Tabla 4, presentándose para Blanca Gota de Miel un elevado número de muestras ‘Mosaico y manchas en anillo’ (14 muestras de 21), mientras que para Cuello de Dama Blanca fue el ‘Amarilleo suave hasta verde claro internervial’ (5 muestras de 16).

En la primera variedad el 100% de las muestras dieron positivo para FMV. En el caso de la segunda en relación con los síntomas, todas dieron positivo para FMV, excepto para FLMaV-1, donde sólo se dio en ‘Amarilleo suave hasta verde claro internervial’, y dos de los síntomas, ‘Mosaico, oakleaf y necrosis’ y ‘Mosaico y manchas en anillo’, dieron positivo para infección mixta de FMV y FLMaV-1.

En vista a estos resultados podemos decir que, por el momento, no es posible establecer una relación entre la sintomatología y el virus, ya que es habitual encontrar infecciones mixtas en higuera con una gran variedad de síntomas diferentes, por lo que es difícil asociar a síntomas concretos la presencia de determinados virus (Alfaro *et al.*, 2014).

Tabla 4. Relación y proporción de síntomas de los plántones del primer muestreo para FMV, FLMaV-1 y FMMAV.

Variedad	Síntomatología	Proporción	Positivo para		
			FMV	FLMaV-1	FMMAV
Blanca Gota de Miel	Mosaico	1/21	x		
	Mosaico en oakleaf con avance desde la base	2/21	x		
	Bandeado de venas	2/21	x		
	Mosaico, oakleaf y necrosis	2/21	x		
	Mosaico y manchas en anillo	14/21	x		
Cuello de Dama Blanca	Mosaico, oakleaf y necrosis	3/16	x	x	
	Mosaico, abullonado y deformación	3/16	x		
	Bandeado de venas	1/16	x		
	Mosaico y manchas en anillo	3/16	x	x	
	Moteado amarillo internervial	5/16		x	

4.4. ESTADO SANITARIO DE LOS PLANTONES DE 1 AÑO FRENTE A FMV

Los resultados que se obtuvieron del segundo muestreo en los análisis a FMV a higueras de 1 año se muestran en la Tabla 5 y la visualización de los productos que fueron obtenidos por PCR en la Figura 24.

Tabla 5. Resultados obtenidos en los análisis mediante RT-PCR con cebadores específicos a FMV de las muestras recogidas en el segundo muestreo.

MUESTREO 07/06/2021		
VARIEDAD	MUESTRA	FMV
Blanca Gota de Miel	357/21 (1-2)	+
	357/21 (3-4)	+
	357/21 (5-6)	+
	357/21 (7-8)	-
	357/21 (9-10)	+
Ronde de Bordeaux	358/21 (1-2)*	+
	358/21 (3-4)	-
	358/21 (5- 359/21 (7))	-
Cuello de Dama Blanca	359/21 1-2	+
	359/21 (3-4)*	+
	359/21 (5-6)	-
Breva	360/21 (2-3)	-
	360/21 (4)	+

Las muestras marcadas (*), dieron positivo en dilución 1:10

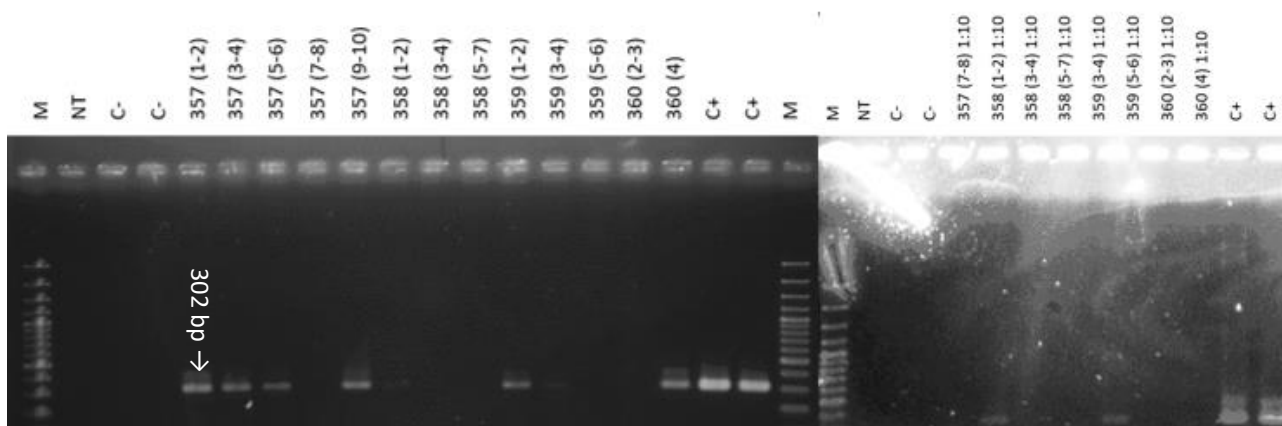


Figura 24. Visualización de productos obtenidos en la RT-PCR para FMV. M: marcador molecular; NT: No Template (Blanco); C-: control negativo; C+: control positivo.

En la Figura 25, se muestra que para FMV, el mayor porcentaje de positivos se dio en las variedades Blanca Gota de Miel y Cuello de Dama Blanca detectándose un 80 % y un 66,67 % de las muestras analizadas, respectivamente

Mientras que en las variedades Ronde de Bordeaux y Breva, se detectó FMV en un 33,33 % y 50 % de las muestras analizadas, respectivamente.

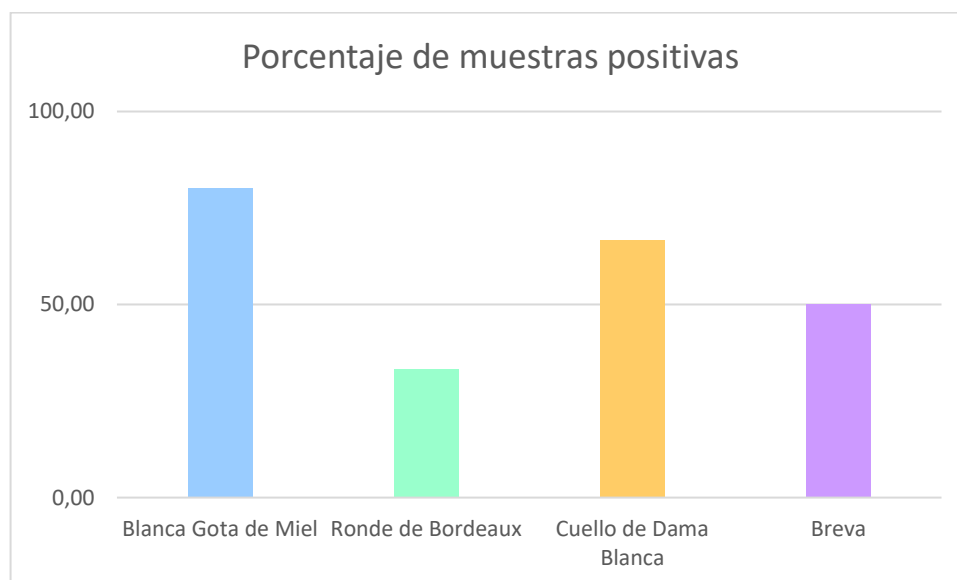


Figura 25. Porcentaje de muestras positivas para FMV según la variedad.

En este muestreo, se obtuvo un porcentaje de positivos del 61,54%, bastante reducido con respecto a los resultados del estudio realizado por Alfaro *et al.* (2014) que fue del 96,70% como se comentó con anterioridad, sin embargo, se debe tener en cuenta que en este estudio se trataba de árboles de 1 año de edad seleccionados por ser asintomáticos. Aunque se realizaron los análisis en muestras asintomáticas, el elevado porcentaje de positivos resulta preocupante para la empresa Orvifrusa S.L., ya que no podrá emplear este material como planta madre para obtener esquejes y exportar planta libre de FMV. Aunque de momento no se exige, si en un futuro se llevara a cabo la modificación del Reglamento Técnico de Control y Certificación de Plantas de Vivero de Frutales (Real Decreto 929/1995, del 9 de junio), se debería únicamente comercializar material libre de FMV.

Es muy difícil conseguir material vegetal de higuera libre de virus debidamente certificado, dado su elevado precio y la ausencia de cultivares resistentes a estos patógenos. Las formas más viables de obtener higueras sanas son: por semillas y por propagación a partir de un individuo sano. Como se ha comentado en la introducción, la propagación de higueras por semillas es muy lenta, recurriéndose habitualmente a la propagación

vegetativa, con la problemática fitosanitaria asociada a virosis que esto conlleva, ya que la mayor parte de virus que afectan a la higuera se transmiten de manera mecánica durante la propagación y apenas por semilla (Melgarejo, 1999). Por lo tanto, para lograr el éxito realizando esta práctica, siempre se debe mantener una correcta higiene en el invernadero, desinfectando los útiles de las labores con frecuencia, además del buen estado del material parental.

4.5. SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL LIBRE DE FMV

Una vez se disponía de los resultados de los análisis a FMV realizados a las muestras recogidas durante el segundo muestreo, el 25 de junio de 2021, se realizó una tercera visita a Orvifrusa S.L., con el fin de separar del resto de la producción aquellos plantones libres de FMV (Figura 24). Estas plantas fueron trasladadas a una parcela aparte, marcando su variedad y el número de ramas a partir de las cuales se podrá llevar a cabo la propagación a principios del siguiente invierno cuando tengan de 3 a 4 yemas, para formar los esquejes. Se separaron un total de 10 plantones: 2 de Blanca Gota de Miel, 3 de Ronde de Bordeaux, 3 de Cuello Dama Blanca y 2 de Breva. Esto se realizó con el fin de evitar posibles infecciones y llevar a cabo la propagación a partir de estos en un futuro. En septiembre se realizará una nueva visita con el fin de revisar si ha habido desarrollo de síntomas en los plantones aislados y volver a analizar las muestras para confirmar la ausencia de FMV ya que por el estado temprano en el que se analizó el material vegetal podría haber algunos falsos negativos y conseguir así resultados definitivos.



Figura 26. Separación de plantones libres de FMV.

5. CONCLUSIONES

- Los plántones (1-3 meses de edad) obtenidos en 2021 de las variedades Blanca Gota de Miel y Cuello de Dama Blanca, no presentan un buen estado sanitario frente a FMV y FLMaV-1, aunque sí frente a FMaV, a pesar de ser un virus presente en España.
- La mayoría del material esquejado en 2021 presentan infección mixta de FLMaV-1 y FMV.
- La observación de síntomas virales en algunas muestras y la no detección de FMV, FLMaV-1 y FMaV, nos lleva a pensar en la infección de otros virus no estudiados en el presente trabajo.
- No se ha podido establecer un catálogo de síntomas asociados a los virus detectados en higuera en Orvifrusa S.L., al presentar el material vegetal analizado infecciones mixtas, pero sí se puede confirmar que la sintomatología más frecuente observada fue el Mosaico y Manchas en anillo.
- El estado sanitario frente a FMV de plántones de un año de edad obtenidos en 2020 de las variedades Blanca Gota de Miel, Cuello de Dama Blanca, Ronde de Bordeaux y Brea no es bueno, ya que se ha detectado un elevado porcentaje de muestras infectadas incluso en asintomáticas.
- Se ha podido seleccionar un bajo número de higueras libres de FMV para su empleo en futuras propagaciones.
- El elevado porcentaje de muestras positivas a FMV nos ayuda a entender el porqué de su amplia presencia en España y otros países de la Cuenca Mediterránea.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABOU-AWAD, B.A., EL-SAWAF, B.M., REDA, A.S., ABDEL-KHALEK, A.A. (2000). Environmental management and biological aspects of the two eriophyoid fig mites *Aceria ficus* (Cotte) and *Rhyncaphytoptus ficifoliae* Keifer in Egypt. *Anzeiger für schädlingkunde*, 73(1): 5-12
- AGUSTÍ, M. (2010). *Arboricultura (2ª edición)*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 509 pp
- ALFARO-FERNÁNDEZ, A., HERNÁNDEZ-LLOPIS, D., FONT, M. (2013). Fig Viruses in Mainland Spain. *Journal of Phytopathology*, 162: 332-337
- ALISHIRI, A., RAKHSHANDEHROO, F., JOUZANI, G., SHAMS-BAKHS, M. (2018). First report of fig mild mottle-associated virus in Iran. *Plant Pathology*, 100: 135
- AL-ZAHRANI, H., ALMAGHRABI, O., FULLER, M., SOLIMAN, H., FAROOQ, M., METWALI, E. (2018). Micropropagation of virus-free plants of Saudi fig (*Ficus carica* L.) and their Identification through enzyme-linked immunosorbent assay methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 54: 626-636
- APPIANO A., CONTI M., LOVISOLO O. (1990). Mosaico del fico: stato attuale delle conoscenze e nuove osservazioni. *Agricoltura Ricerca*, 112-113: 109-112.
- BAYOUDH, C., ELAIR, M., LABIDI, R., MAJDOUB, A., MAHFOUDHI, N., MARS, M. (2017). Efficacy of Tissue Culture in Virus Elimination from Caprifig and Female Fig Varieties (*Ficus carica* L.). *Plant Pathology Journal*, 33(3): 288-295
- BOS, L. (1982). Crop losses caused by viruses. *Crop Protection*, 1(3): 263-282
- CAGLAR, B.K., FIDAN, H., GULDUR, M. E., ELBEAINO, T. (2011), The Prevalence of Three Viruses Infecting Fig in Southern Turkey. *Journal of Phytopathology*, 159(3): 181
- CAGLAYAN, K., ELCI, E., SERCE, C. U., KAYA, K., GAZEL, M., MEDINA, V. (2012) Detection of Fig mosaic virus in viruliferous eriophyid mite *Aceria ficus*. *Journal of Plant Pathology*, 96: 629-634
- CASADOMET, E., LÓPEZ, M., PÉREZ, F., SENERO, M., PEREZ, J., DEL MORAL, J. (2016). Plagas y enfermedades del cultivo de la higuera. *Hojas Divulgadoras*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente Editor: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2146, 32 pp
- CHIUMENTI, M., TORCHETTI, E.M., DI SERIE, F., MINAFRA, A. (2014). Identification and characterization of a viroid resembling apple dimple fruit viroid in fig (*Ficus carica* L.) by next generation sequencing of small RNAs. *Virus Research*, 188: 54-59
- CONDIT, J. (1993). Fig Culture in California. Facsimile Publisher, 73 pp
- COVIELLO, R. and BENTLEY, W. (2015). Fig Mite / Fig / Agriculture: Pest Management Guidelines / UC Statewide IPM Program (UC IPM). Retrieved June 13, 2021, from Ucanr.edu website: <https://www2.ipm.ucanr.edu/agriculture/fig/Fig-Mite>
- ELBEAINO, T., DIGIARO, M., ALABDULLAH, A., DE STRADIS, A., MINAFRA, A., MIELKE, M. (2009). A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *Journal of General Virology*, 90: 1281-1288
- ELBEAINO, T., DIGIARO, M., DE STRADIS, A., MARTELLI, G.P. (2006). Partial characterisation of a closterovirus associated with a chlorotic mottling of fig. *Journal of Plant Pathology*, 88 (2): 187-192
- ELBEAINO, T., DIGIARO, M., DE STRADIS, A., MARTELLI, G.P. (2007). Identification of a second member of the family Closteroviridae in mosaic-diseased figs. *Journal of Plant Pathology*, 89: 119-124.
- ELBEAINO, T., DIGIARO, M., HEINOUN, K., DE STRADIS, A. and MARTELLI, G.P. (2010). Fig mild mottle-associated virus, a novel Closterovirus infecting fig. *Journal of Plant Pathology*, 92: 165-172

- ELBEAINO, T., DIGIARO, M., MARTELLI, G.P. (2011a). Complete secuencia of Fig fleck-associated virus, a novel member of the family Tymoviridae. *Virus Research*, 161:198-202
- ELBEAINO, T., KUBAA, R., DIGIARO, M., MINAFRA, A., MARTELLI, G.P. (2011b). The complete nucleotide secuencia and genoma organization of Fig cryptic virus, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin. *Virus Genes* 42:415-421
- ELBEAINO, T., KUBAA, R., ISMAEIL, F., MANDO, J., DIGIARO, M. (2012). Viruses and hop stunt viroid of fig trees in Syria. *Journal of Plant Pathology*, 94. 687-691
- ELBEAINO, T., MARAIS, A., FAURE, C., TROIANO, E., CANDRESSE, T., PARRELLA, G. (2018). High-throughput sequencing reveals *Cyclamen persicum* Mill. As a natural host for Fig mosaic virus. *Viruses*.10: 684
- FAO (2021). Datos sobre Alimentación y Agricultura. Producción de Cultivos de Higuera. [Última actualización: 15/08/2021. Acceso: septiembre, 2021. <http://www.fao.org/faostat/es/>
- FLOCK R.A., WALLACE J.M. (1955). Transmission of fig mosaic by the eriophid mite *Aceria ficus*. *Phytopathology*, 45: 52-54
- FLORES, A. (1990). La higuera. Mundi-Prensa. Madrid. 190 pp
- HAFEZ, E., EL-MORSI. A., ABDELKHALEK, A. (2011). Biological and Molecular Characterization of the Fig Mosaic Disease. *Molecular Pathogens*, 2(2): 10-17
- JAMOUS, R. M., ZAITOUN, S., MALLAH, O. B., SHTAYA, M., ELBEAINO, T., ALI-SHTAYEH, M. S. (2020). Detection and Phylogenetic Analysis of Viruses Linked with Fig Mosaic Disease in Seventeen Fig Cultivars in Palestine. *The plant pathology journal*, 36(3): 267–279
- LLÁCER, G., LÓPEZ, M. M., TRAPERÓ, A., BELLO, A. (1996). Patología vegetal. Valencia: Sociedad Española de Fitopatología y Phytoma
- MAPA (2021). Ministerio de Agricultura, Pesca y Medioambiente. Estadísticas Agrarias 2019. Frutales no cítricos y frutales de hueso seco. Acceso: junio, 2021. <https://www.mapa.gob.es/>
- MAROTO, V. (2002). Los cultivos tradicionales mediterráneos. *Agricultura Revista Agropecuaria*, 843: 572-583
- MELGAREJO, P. (1999). *El cultivo de la higuera (Ficus carica L.)*. Frutales de zonas áridas. Editorial A. Madrid Vicente. 114 pp
- MELGAREJO, P., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., JORDÁ, M., LÓPEZ, M., ANDRÉS, M., DURAN-VILA, N. (2010). Patógenos de plantas descritos en España 2ª edición. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid. 854pp. Página 128 Fig mosaic disease (Mosaico de la higuera)
- MIJIT, M., HE, Z., HONG, J., LU, M.-G., LI, S.-F., ZHANG, Z.-X. (2017). Analysis of fig tree virus type and distribution in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 16: 1417-1421
- NAHDI, S., ELBEAINO, T., DIGIARO, M., MARTELLI, G. P. (2006). First record of Fig leaf mottle-associated virus 1 in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*, 88: 570
- NOROZIAN, E., RAKHSHABDEHROO, F., SHAMS-BAKHSI, M. (2014). Presence of fig leaf mottle-associated virus 3 in an Iranian fig orchard. *Journal of Plant Pathology*, 94: 1474-1480
- ORVIFRUSA (2021). Acceso: junio, 2021. <https://orvifrusa.com/>
- PEROVIĆ, T., HRNČIĆ, S., ČIZMOVIĆ, M., LOLIĆ, B., ĐURIĆ, G., DELIĆ, D. (2016). First report of fig mosaic virus, fig leaf mottle-associated virus 1 and fig mild mottle-associated virus infecting fig (*ficus carica*) in montenegro. *Journal of Plant Pathology*, 98: 678
- PREISING, S., FERREIRA, D., DE QUEROZ, M., DA SILVA W. (2021). A Fig Deal: A Global Look at Fig Mosaic Disease and its Putative Associates. *Plant Disease*. 105 (4): 727-738.

- REAL DRECRETO 929/1995, del 9 de junio, por el que se aprueba el Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de frutales. Boletín Oficial del Estado. Madrid, 14 de junio de 1995, núm 141, pp. 17713-17735
- SEGARRA, J., JUÁREZ, M., CASTELLVELL, D., ACHÓN, M. A., MEDINA, V. (2005). Incidencia del mosaico de la higuera en dos zonas del este de España. *Boletín Sanidad Vegetal. Plagas*, 31: 407-415
- SHAHMIRIZAIE, M., SAFARNEJAD, M., RAKHSHABDEHROO, F., SAFAPOUR, H., RABBANI, H., ZAMANIADETH, H. (2019). Production of a polyclonal antiserum against recombinant nucleocapsid protein and its application for the detection of fig mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 265: 22-25
- TZANETAKIS, I.E., LANEY, A.G., KELLER, K.E., MARTIN, R.R. (2010). New viruses found in fig exhibiting mosaic symptoms. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Disease of Fruits Drops. Pages: 79-82
- VONČINA, D., PILIPOVIĆ, P., ŠKORIĆ, D., KRAPAC, M., PRGOMET, Ž. MILIČEVIĆ, T. (2015). First report of fig mosaic virus and fig badnavirus 1 on common fig trees in Croatia. *Journal of Plant Pathology*, 97: S71-S74
- WALIA, J., WILLEMSSEN, A., ELICI, E., CAGLAYAN, K., FALK, B., RUBIO, L. (2014). Genetic variation and possible mechanisms driving the evolution of worldwide Fig mosaic virus isolates. *Phytopathology*, 104: 108-114
- WALKER, J. M., RAPLEY, R. (2009). Molecular biology and biotechnology. Royal Society of Chemistry. Reino Unido. 271 p.p.
- YAKOUBI, S., ELLEUCH, A., BESAIES, N., MARRAKCHI, M., FAKHFAKH, H. (2007). First report of Hop stunt viroid and Citrus exocortis viroid on fig with symptoms of fig mosaic disease. *Journal of Phytopathology*, 155: 125-128
- YORGANCI, S., ACIKGÖZ, S. (2019). Transmission of fig leaf mottle-associated virus by Ceroplastes rusci. *Journal of Plant Pathology*, 101: 1199-1201

7. ANEXOS

7.1. ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE RNA CON EL KIT COMERCIAL NUCLEOSPIN™ RNA PLANT KIT (MACHEREY-NAGEL™, DÜREN, ALEMANIA)

1. Se tritura la muestra con ayuda de una maza
2. Se añade tampón de extracción (Anexo 2) en proporción 1:10 con respecto a la muestra
3. Se continúa triturando hasta obtener un extracto lo más homogéneo posible
4. Transferir 300 µL de extracto ELISA a un tubo estéril de 1,5 mL
5. Añadir 200 µL de Lysis Buffer RA1 y vórtex
6. Transferir 350 µL del homogeneizado a un nuevo tubo de 1,5 mL, añadir 3,5 µL de β-mercaptoetanol y mezclar
7. Transferir el lisado a una columna morada, en la que previamente se ha insertado un tubo colector de 2 mL
8. Centrifugar 1' a 11.000 g
9. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 mL con cuidado de no traspasar el pellet y descartar la columna con el tubo colector
10. Añadir 350 µL de Etanol al 70 % y mezclar rápidamente con pipeta
11. Transferir el lisado a una columna azul
12. Centrifugar 30'' a 11.000 g
13. Descartar el sobrenadante y el tubo colector
14. Colocar un nuevo tubo colector de 2 mL y añadir 350 µL de Membrane Desalting Buffer MDB
15. Centrifugar 1' a 11.000 g
16. Preparar DNase reaction mixture en un tubo estéril de 1,5 mL o en un vaso de precipitado. Por cada muestra añadir 90 µL de Reaction Buffer for rDNase y 10 µL de reconstituted rDNase
17. Añadir 95 µL de DNase reaction mixture en el centro de la columna
18. Incubar 15' a Tª ambiente
19. Añadir 200 µL de Wash Buffer RAW2
20. Centrifugar 30'' a 11.000 g
21. Descartar el sobrenadante y el tubo colector
22. Colocar un nuevo tubo colector de 2 mL y añadir 600 µL de Wash Buffer RA3
23. Centrifugar 30'' a 11.000 g
24. Descartar el sobrenadante y añadir 250 µL de Wash Buffer RA3
25. Centrifugar 2' a 11.000g
26. Descartar el sobrenadante con el tubo colector y colocar la columna en un nuevo tubo de 1,5 mL
27. Eluir el RNA en 60 µL de RNase-free H2O
28. Centrifugar 1' a 11.000g
29. Almacenar a -20 °C

7.2. ANEXO 2. TAMPÓN DE EXTRACCIÓN

Para realizar el tampón de lavado de la casa comercial LOEWE® se disuelven los productos recogidos en la Tabla 1 en unos 800 ml de agua destilada, se ajusta el pH en un rango de 7,2 a 7,4 y luego se enrasa hasta 1000 ml con agua destilada.

Tabla 1. Compuestos requeridos para la preparación del tampón de lavado de la casa comercial LOEWE®

Compuestos	Cantidad
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml

Para obtener el tampón de extracción, se disuelven los productos de la tabla 2 en unos 200 ml de tampón de lavado, se ajusta el pH a 7,4 y se enrasa a 250 ml con el tampón de lavado.

Tabla 2. Productos necesarios para la realización del tampón de extracción de la casa comercial LOEWE®

Compuestos	Cantidad
PVP (Polivinilpirrolidona)	5 g
BSA (Albúmina de suero bobino)	0,5 g
NaN ₃	0,025 g

7.3. ANEXO 3. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA RT-PCR FMV EN UN PASO

REACTIVOS	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final (μl)
2X Reaction Mix	2x	1x	5
PVP40	10x	1x	1
FMV mix (sense, anti-sense primers)	10 μM	Forward 0,5 μM Reverse 5 μM	1
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	-	-	0,4
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	40 U/μl	4 U/μl	0,1
Desnaturalización RNA previa 1,9 μl H₂O DEPC 0,6 μl RNA → 5' a 65°C			

7.4. ANEXO 4. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA RT-PCR FMMAV EN UN PASO

REACTIVOS	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final (µl)
2X Reaction Mix	2x	1x	5
PVP40	10x	1x	1
FMMaV mix (sense, anti-sense primers)	10 µM	Forward 0,5 µM Reverse 5 µM	1
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	-	-	0,4
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	40 U/µl	4 U/µl	0,1
Desnaturalización RNA previa 1,9 µl H2O DEPC 0,6 µl RNA → 5' a 65°C			

7.5. ANEXO 5. PRODUCTOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA RT-PCR FLMAV-1 EN UN PASO

REACTIVOS	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final (µl)
2X Reaction Mix	2x	1x	5
PVP40	10x	1x	1
FLMaV-1 mix (sense, anti-sense primers)	10 µM	Forward 0,5 µM Reverse 5 µM	1
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	-	-	0,4
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	40 U/µl	4 U/µl	0,1
Desnaturalización RNA previa 1,9 µl H2O DEPC 0,6 µl RNA → 5' a 65°C			

7.6. ANEXO 6. PROGRAMAS DE LOS TERMOCICLADORES

Virus	Termociclador	Programa			
		Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
FMV	MWG Biotech Inc Primus 25 Thermal Cycler	Transcripción inversa	50	30'	1
		Desnaturalización	94	2'	1
		Alineamiento de cebadores	94	30''	35
		Extensión de la Taq DNA polimerasa	50	30''	
		Extensión final	68	45''	
		Conservación	68	10'	1
		FLMaV-1	Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler	Transcripción inversa	50
Desnaturalización	94			2	1
Alineamiento de cebadores	94			30''	35
Extensión de la Taq DNA polimerasa	55			30''	
Extensión final	68			30''	
Conservación	68			10'	1
FMMAV	Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler	Transcripción inversa	50	30'	1
		Desnaturalización	94	2'	1
		Alineamiento de cebadores	94	1'	40
		Extensión de la Taq DNA polimerasa	53	45''	
		Extensión final	68	1'	
		Conservación	68	10'	1