

# ÍNDICE

---

<b>Índice de abreviaturas.....</b>	<b>i</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>iii</b>
<b>Summary.....</b>	<b>vii</b>
<b>Resum.....</b>	<b>xi</b>
<b>Capítulo 1. Introducción General.....</b>	<b>1</b>
1.1 Importancia del cultivo de frutales de hueso y de la citricultura en España... 1	1
1.2 Patrones utilizados en el cultivo de frutales de hueso y cítricos. Cultivo en vivero..... 2	2
1.3 Virosis transmitidas por pulgones. Mecanismos de transmisión..... 7	7
1.4 La enfermedad de la sharka de frutales de hueso..... 10	10
1.5 La enfermedad de la tristeza de los cítricos..... 12	12
1.6 Métodos de detección de <i>Plum pox virus</i> y <i>Citrus tristeza virus</i> ..... 14	14
1.7 Parámetros de validación de técnicas de diagnóstico y medida de la coincidencia entre dos técnicas de diagnóstico (índice kappa de Cohen)..... 17	17
1.8 Métodos de control de enfermedades virales en vegetales..... 23	23
<b>Capítulo 2. Objetivos Generales.....</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo 3. Materiales y Métodos Generales.....</b>	<b>29</b>
3.1 Material vegetal: parcelas experimentales, localización y diseño experimental..... 29	29
3.1.1 Parcela situada en Lliria..... 29	29
3.1.2 Parcela situada en Carlet..... 33	33
3.1.3 Parcela situada en Moncada..... 37	37
3.2 Muestro vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo..... 40	40
3.2.1 Parcelas de Lliria y Carlet..... 40	40
3.2.2 Parcela de Moncada..... 40	40
3.3 Técnicas de detección de virus..... 41	41
3.3.1 Técnicas de detección de virus en material vegetal..... 41	41
3.3.1.1 Detección de PPV en material vegetal..... 41	41
3.3.1.1.1 ELISA-DASI (“Double Antibody Sandwich Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)..... 42	42
3.3.1.1.2 “Spot” RT-PCR a tiempo real..... 42	42
3.3.1.2 Detección de CTV en material vegetal..... 43	43
3.3.1.2.1 Inmunoimpresión-ELISA o “Tissue print”-ELISA..... 43	43

3.3.1.2.2 “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real.....	44
3.3.2 Técnicas empleadas en la detección de ambos virus.....	45
3.4 Caracterización serológica y molecular de los aislados de PPV.....	45
3.5 Métodos de muestreo de pulgones.....	46
3.5.1 Trampa de Moericke.....	46
3.5.2 Planta pegajosa.....	46
3.6 Cálculo de la superficie foliar de aterrizaje disponible para los pulgones.....	47
3.6.1 Método de determinación de la superficie foliar aplicado durante el período de brotación.....	48
3.6.2 Método de determinación de la superficie foliar aplicado en los meses posteriores al período de brotación.....	49
3.7 Métodos estadísticos.....	50

**Capítulo 4. Susceptibilidad a PPV-D de diferentes patrones de frutales de hueso cultivados en vivero y estudio de factores que condicionan la infección natural..... 51**

4.1 Introducción.....	51
4.2 Objetivos.....	52
4.3 Materiales y métodos.....	52
4.3.1 Localización de las parcelas.....	52
4.3.2 Patrones empleados.....	52
4.3.3 Muestro vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo.....	52
4.3.4 Caracterización serológica y molecular de los aislados de PPV.....	52
4.3.5 Muestreo de pulgones y detección de pulgones virulíferos.....	52
4.3.6 Estima de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones.....	53
4.3.7 Análisis estadísticos.....	54
4.4 Resultados.....	55
4.4.1 Incidencia viral.....	55
4.4.2 Caracterización de los aislados de PPV presentes en la parcela.....	57
4.4.3 Estudio de la relación de algunos de los factores que condicionan la incidencia de la infección viral.....	58
4.4.3.1 Estima de la población de pulgones visitantes y porcentaje de individuos virulíferos.....	58
4.4.3.1.1 Capturas mediante trampas Moericke.....	58
4.4.3.1.2 Capturas mediante el método de la planta pegajosa.....	60
4.4.3.1.3 Estima del número de pulgones virulíferos en las parcelas experimentales.....	69
4.4.3.2 Estima de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones.....	72
4.4.3.2.1 Parcela situada en Lliria.....	72
4.4.3.2.2 Parcela situada en Carlet.....	75
4.4.3.3 Relación entre la superficie de aterrizaje disponible para los pulgones y el número de pulgones visitantes.....	78
4.5 Discusión.....	80

<b>Capítulo 5. Incidencia del Virus de la Tristeza de los cítricos en bloques de vivero de <i>Citrus macrophylla</i> cultivado en campo.....</b>	<b>89</b>
5.1 Introducción.....	89
5.2 Objetivos.....	90
5.3 Materiales y métodos.....	91
5.3.1 Localización de la parcela.....	91
5.3.2 Muestreo vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo.....	91
5.3.3 Muestreo de pulgones y detección de individuos virulíferos.....	91
5.3.4 Medición de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones.....	92
5.3.5. Métodos estadísticos.....	92
5.4 Resultados.....	93
5.4.1 Incidencia viral.....	93
5.4.2 Estudio de la relación de algunos de los factores que condicionan la incidencia viral.....	93
5.4.2.1 Estima de la población de pulgones visitantes y porcentaje de individuos virulíferos.....	93
5.4.2.1.1 Capturas mediante trampa Moericke.....	93
5.4.2.1.2 Capturas mediante el método de la planta pegajosa.....	94
5.4.2.1.3 Estima del número de pulgones virulíferos que visitaron las plantas de la parcela experimental.....	97
5.4.2.2 Estima de la superficie foliar de aterrizaje para los pulgones.....	98
5.4.2.3 Relación entre la superficie de aterrizaje disponible para los pulgones y el número de pulgones visitantes.....	100
5.5 Discusión.....	101
 <b>Capítulo 6. Validación de “Spot” y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real. Comparación con técnicas serológicas y cálculo de parámetros de diagnóstico.....</b>	 <b>105</b>
6.1 Introducción.....	105
6.2 Objetivos.....	109
6.3 Materiales y métodos.....	109
6.3.1 Determinación del número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar en un extracto para tener una adecuada precisión de detección de PPV.....	109
6.3.1.1 Métodos estadísticos.....	110
6.3.2 Validación de “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV. Comparación con la técnica ELISA-DASI y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero.....	111
6.3.2.1 Material vegetal: parcelas experimentales.....	111
6.3.2.2 Cálculo de la concordancia entre técnicas.....	111

6.3.2.3 Cálculo de los parámetros de diagnóstico de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en condiciones de vivero.....	111
6.3.3 Validación de “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección de CTV. Comparación con Inmunoimpresión-ELISA y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero...	114
6.3.3.1 Material vegetal: parcelas experimentales.....	114
6.3.3.2 Cálculo de la concordancia entre técnicas.....	114
6.3.3.3 Cálculo de los parámetros de diagnóstico de las técnicas Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real en condiciones de vivero.....	114
6.4 Resultados.....	116
6.4.1 Determinación del número máximo de plantas de vivero que se pueden mezclar en un extracto para tener una adecuada precisión de detección de PPV.....	116
6.4.2 Validación de “Spot” RT-PCR a tiempo real para la detección de PPV. Comparación con la técnica ELISA-DASI y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero.....	121
6.4.2.1 Resultados obtenidos en las diferentes parcelas y concordancia entre técnicas.....	121
6.4.2.2 Cálculo de la sensibilidad y especificidad de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en primavera.....	124
6.4.2.2.1 Cálculo de la sensibilidad y la especificidad de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en primavera mediante análisis de las plantas con resultados analíticos discrepantes.....	124
6.4.2.2.2 Determinación de la sensibilidad y de la especificidad de las técnicas ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real en primavera mediante modelos latentes.....	127
6.4.2.3 Cálculo de las razones de verosimilitud y de las probabilidades post-test de ELISA-DASI y “Spot” RT-PCR a tiempo real.....	130
6.4.3 Validación de “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real para la detección de CTV. Comparación con la técnica Inmunoimpresión-ELISA y cálculo de los parámetros de diagnóstico en condiciones de vivero...	136
6.4.3.1 Resultados obtenidos en las diferentes parcelas y concordancia entre técnicas.....	136
6.4.3.2 Resultados obtenidos mediante injerto en lima mejicana de material de las parcelas situadas en Tulare (EEUU).....	138
6.4.3.3 Determinación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR en condiciones de vivero.....	139

6.4.3.4 Cálculo de las razones de verosimilitud y de las probabilidades post-test de Inmunoimpresión-ELISA y “Tissue-print” RT-PCR a tiempo real.....	142
6.5 Discusión.....	144
<b>Capítulo 7. Evaluación del efecto de tratamientos con aceites minerales sobre la incidencia viral y sobre el desarrollo vegetativo de las plantas en bloques de vivero.....</b>	<b>153</b>
7.1 Introducción.....	153
7.2 Objetivos.....	158
7.3 Materiales y métodos.....	158
7.3.1 Localización de las parcelas.....	158
7.3.2 Tratamiento con aceites minerales.....	158
7.3.3 Muestreo vegetal y evaluación de la incidencia viral en el cultivo.....	159
7.3.4 Medición de parámetros relacionados con el desarrollo vegetativo (superficie foliar y altura de la planta).....	159
7.3.5 Análisis estadísticos.....	160
7.4 Resultados.....	161
7.4.1 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en la incidencia viral en las parcelas experimentales.....	161
7.4.1.1 Parcela de Lliria (PPV, alta densidad de inóculo).....	161
7.4.1.2 Parcela de Carlet (PPV, baja densidad de inóculo).....	161
7.4.1.3 Parcela de Moncada (CTV, alta densidad de inóculo).....	162
7.4.2 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en el desarrollo vegetativo de los patrones.....	163
7.4.2.1 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en la altura de los patrones.....	163
7.4.2.1.1 Parcela de Lliria.....	163
7.4.2.1.2 Parcela de Carlet.....	165
7.4.2.1.3 Parcela de Moncada.....	168
7.4.2.2 Estudio del efecto del tratamiento con aceites minerales en la superficie foliar de los patrones.....	169
7.4.2.2.1 Parcela de Lliria.....	169
7.4.2.2.2 Parcela de Carlet.....	172
7.4.2.2.3 Parcela de Moncada.....	175
7.4.3 Otros efectos producidos por el tratamiento con aceites minerales en las plantas.....	176
7.5 Discusión.....	179
<b>Conclusiones.....</b>	<b>183</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>187</b>
<b>Anejos.....</b>	<b>225</b>

