

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



TRABAJO FINAL DE GRADO (TFG)

EVALUACIÓN DE LA PERSISTENCIA DEL VIRUS DEL MOSAICO VERDE JASPEADO DEL PEPINO (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) EN DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS SOLARIZADOS.

Titulación: Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural.

Presentado por: Carlota María Moratilla Vega.

Directora: María Isabel Font San Ambrosio.

Directora experimental: Ana Olvido Alfaro Fernández

Curso académico 2017-2018

Valencia, 27 de noviembre de 2017.

Resumen.

El virus del mosaico verde jaspeado del pepino (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) pertenece al género *Tobamovirus* y afecta diferentes especies de cucurbitáceas, en especial al pepino. CGMMV es un virus muy estable, con una alta capacidad infectiva y que puede mantenerse infectivo en el suelo en los restos de cosecha infectada durante más de 10 meses. Los síntomas típicos de CGMMV en pepino son una menor intensidad del color verde y una distribución variable de los pigmentos en el fruto y hoja, dando lugar a un moteado verde claro que deprecia la calidad del fruto. Este virus fue detectado en España en 1996 en cultivos de pepino en invernadero. Desde entonces, ha reaparecido periódicamente en cultivos de pepino, así como en sandía y melón.

Debido a una creciente problemática de infección con CGMMV en cultivos de pepino en invernaderos de Granada, el objetivo de este trabajo fue evaluar la persistencia del CGMMV tras la solarización con humectación o no de dos sustratos: suelo y sacos de perlita; permitiendo su reutilización durante varias campañas sin comprometer la sanidad del cultivo y mejorando, por tanto, la rentabilidad de la explotación.

Tras la solarización, se analizaron mediante RT-PCR con cebadores específicos de CGMMV raíces del cultivo anterior que quedaban en los sacos de perlita para confirmar la presencia del virus.

Posteriormente, para comprobar la capacidad infectiva de CGMMV en los restos vegetales después de la solarización se sembraron en cada sustrato semillas de pepino var. Quarto, previamente termotratadas a 70°C durante 3 días.

Trascurridos 3 meses de la siembra se procedió a analizar las plantas desarrolladas mediante DAS-ELISA y RT-PCR específicas a CGMMV. Ninguno de los tratamientos ensayados fue efectivo para inactivar la partícula viral presente en los sustratos evaluados. Sin embargo, deben realizarse más estudios, ya que los sustratos tratados con solarización con humedad que quedaron en las parcelas afectadas en Granada no han manifestado síntomas durante la presente campaña.

Palabras clave

Pepino, virus, solarización, transmisión, sustrato.

Resum.

El virus del mosaic verd jaspiat del cogombre (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) pertany al gènere *Tobamovirus* i afecta diferents espècies de cucurbitàcies, especialment al cogombre. El CGMMV és un virus molt estable, amb una alta capacitat infectiva i que pot mantenir-se infectiu en el sòl en les restes de collita infectada durant més de 10 mesos. Els símptomes típics del CGMMV en el cogombre són una menor intensitat del color verd i una distribució variable dels pigments en el fruit i fulla, donant lloc a un clapejat verd clar que deprecia la qualitat del fruit. Aquest virus va ser detectat a Espanya en 1996 en cultius de cogombre en hivernacle. Des de llavors, ha reaparegut periòdicament en cultius de cogombre així com en meló d'alger i meló.

A causa d'una creixent problemàtica d'infecció amb CGMMV en cultius de cogombre en hivernacles de Granada, l'objectiu d'aquest treball va ser avaluar la persistència del CGMMV després de la solarització amb humectació o no de dos substrats: sòl i sacs de perlita; permetent la seva reutilització durant diverses campanyes sense comprometre la sanitat del cultiu i millorant per tant la rendibilitat de l'explotació.

Després de la solarització, es van analitzar mitjançant RT-PCR amb cebadors específics de CGMMV arrels del cultiu anterior que quedaven en els sacs de perlita per confirmar la presència del virus.

Posteriorment per a comprovar la capacitat infectiva del CGMMV en les restes vegetals, després de la solarització es van sembrar en cada substrat llavors de cogombre var. Quarto, prèviament termotractades a 70°C durant 3 dies.

Transcorreguts 3 mesos de la sembra es va procedir a analitzar les plantes desenvolupades mitjançant DAS-ELISA i RT-PCR específiques a CGMMV. Cap dels tractaments assajats va ser efectiu per inactivar la partícula viral present en els substrats avaluats. No obstant això, han de realitzar-se més estudis, ja que els substrats tractats amb solarització amb humitat que van quedar en les parcel·les afectades a Granada no han manifestat símptomes durant la present campanya.

Paraules clau:

Cogombre, virus, solarització, transmissió, substrat.

Abstract.

Cucumber Green Mottle Mosaic Virus (CGMMV) belongs to the genus *Tobamovirus* and affects cucurbits, especially cucumber. CGMMV is a very stable virus, with a high infectious capacity and that can remain on soil in plant debris during more than 10 months. The typical symptoms of the CGMMV in the cucumber are a decrease in the brightness of the green colour, and an irregular distribution of the pigments in the fruit and the leaf, giving a light green speckled that reduces the fruit quality. This virus was first detected in Spain in 1996 in a greenhouse with cucumber crops. Since then, it has reappeared periodically in cucumber crops, as well as in watermelon and melon.

Due to the subsequently CGMMV infection in cucumber crops in the greenhouses of Granada, the aim of this project was to evaluate the persistence of CGMMV after the solarization with or without humidification of two substrates: soil and perlite sacks. These treatments were performed in order to allow improve the self-life of the substrates, allowing their reuse, without compromising the health of the crop. After solarization, the root debris of the previous crop that remain in the perlite substrate were analysed through RT-PCR using specific primers of CGMMV to confirm the presence of the virus.

Later, to test the infectivity of CGMMV in plant debris after solarization, seeds of cucumber var. Quarto, previously heat-treated at 70° C for 3 days, were sown in the substrates.

After three months of the sowing, the plants were evaluated using DAS-ELISA and RT-PCR specifics to CGMMV. None of the analyzed treatments was effective to neutralize the viral particle present in the tested substrates. However, more studies are needed because the plants grown in the same treated substrates maintained in Granada greenhouses were symptomless during the present growing season.

Palabras clave

Cucumber, virus, solarization, transmission, substrate.

Agradecimientos.

“Cuando el objetivo te parezca difícil, no cambies de objetivo, busca un nuevo camino para llegar a él” – Confucio.

Con la presentación de este Trabajo Final de Grado concluye para mí una etapa muy importante en mi vida, un periodo en el que aprendí en las aulas pero también fuera de ellas, de mis profesores, compañeros y amigos.

En primer lugar, agradecer a mis padres y mi hermano el apoyo mostrado durante estos años, y la paciencia que han tenido conmigo, sobre todo al principio de la carrera. Gracias por todo el cariño y comprensión mostrados.

A Mateu, mi compañero de piso, sin ti no habría sido posible llegar hasta aquí.

A mis amigos, los de siempre y los que he hecho con el paso de los años en la universidad. Juntos hemos sobrellevado los malos momentos y celebrado los buenos.

A mis compañeros y “jefes” en el despacho donde he estado haciendo prácticas, gracias por vuestro apoyo y por vuestros consejos durante todo este tiempo, habéis hecho mucho por mi.

A los amigos que he dejado atrás en Paraguay, habéis sido mi mayor apoyo cuando todo parecía venirse abajo, gracias.

Y por último a mis compañeros de laboratorio y a Amparo, Ana e Isabel, sin vuestra eterna paciencia y ayuda esto no habría sido posible.

1 ÍNDICE GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El cultivo del pepino.....	1
1.1.1 Origen y encuadre taxonómico.	1
1.1.2 Importancia económica del pepino.	1
1.2 El virus del mosaico verde jaspeado del pepino (CGMMV).	4
1.2.1 Origen, encuadre taxonómico y distribución geográfica.....	4
1.2.2 Morfología de la partícula viral y organización genómica.....	5
1.2.3 Sintomatología en pepino.	6
1.2.4 Formas de transmisión.	7
1.2.5 Medidas de control.....	8
1.3 Desinfección de sustratos.	9
1.3.1 Desinfección en sustratos artificiales.	9
1.3.2 Desinfección en suelo.....	11
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
3.1 Sustratos y material vegetal.....	14
3.1.1 Sustratos.....	14
3.1.2 Material vegetal.....	16
3.2 Siembra y monitoreo.	18
3.2.1 Siembra.....	18
3.2.2 Monitoreo.....	19
3.3 Detección de CGMMV.....	19
3.3.1 DAS-ELISA	20
3.3.2 RT-PCR	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1 Ensayo de germinación.....	23
4.2 Suelo solarizado con y sin humedad.	23
4.3 Sacos de perlita.....	26
5. CONCLUSIONES.....	31
6. BIBLIOGRAFÍA.....	32

2 ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Producción a nivel mundial en porcentaje relativa al año 2014 de los principales productores [Fuente: Elaboración propia en base a los datos de FAO (2014)].	2
Figura 2: Variación de la superficie cultivada de pepino en España desde el año 2004 al año 2014 [Fuente: Elaboración propia en base a datos de FAO (2014)].	3
Figura 3: Evolución de la Producción de pepino en España entre los años 2004-2014 [Fuente Elaboración propia en base a datos de FAO (2014)].	4
Figura 4: Distribución mundial de CGMMV [Fuente: Dombrovsky <i>et al.</i> (2017)].	5
Figura 5: Organización genómica del virus CGMMV [Fuente: Mandal <i>et al.</i> , (2008)].	6
Figura 6: Síntomas típicos de CGMMV en pepino: en hojas (6a) y frutos con mosaico y deformación (6b).	7
Figura 7: Sintomatología presentada en los invernaderos afectados durante la campaña anterior a la solarización realizada.	14
Figura 8: Suelo solarizado con humedad (A) y suelo solarizado en seco (B)	15
Figuras 9: Tratamientos para la desinfección de CGMMV en sacos de perlita: solarización húmeda en invernadero (A y B) y tratamiento térmico en laboratorio (C y D).	16
Figura 10: Semillas comerciales de la variedad "Quarto RZ" empleados en el ensayo.	17
Figura 11: Preparación del ensayo de germinación: disponiendo las semillas en el papel absorbente (A) y colocando dicha preparación en el fitotrón (B).	18
Figura 12: Siembra en maceteros de las semillas comerciales en el ensayo de evaluación de la persistencia de CGMMV en sustratos solarizados.	18
Figura 13: Plantas de pepino variedad "Quatro rz" a los 15 días de su siembra, con los cotiledones totalmente emergidos en todos los casos.	19
Figura 14: Análisis mediante la técnica serológica DAS-ELISA de los plantas crecidas sobre sustratos solarizados con humedad y en los sustratos no solarizados.	21
Figura 15: Ensayo de germinación realizado con (A) semillas no termotratadas y (B) semillas termotratadas.	23
Figura 16: Síntomas de amarilleo internervial en las plantas cultivadas sobre suelo solarizado con humedad observados el 30/01/2017.	24
Figura 17: Síntomas detectados en el saco 2 no solarizado (S2NS).	27
Figura 18: Síntomas detectados en plantas desarrolladas en diferentes sacos.	27

3 ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Clasificación mundial de los 10 mayores productores de pepino ordenador por la cantidad de producción y su porcentaje frente al total a nivel mundial. Fuente: FAO (2014).	3
Tabla 2: Propiedades de la perlita [Fuente: (Fernández <i>et al.</i> , 1998)]	11
Tabla 3: Cebadores específicos de cgmmv empleados en RT-PCR para el análisis de plantas y raíces del ensayo.	22
Tabla 4: Resultados obtenidos de los análisis de las técnicas DAS-ELISA y RT-PCR obtenidos a partir del cultivo de semillas de pepino termotratadas sobre suelo solarizado con y sin humedad.	25
Tabla 5: Resultados de los análisis mediante las técnicas DAS-ELISA y RT-PCR obtenidos a partir de la siembra de semillas de pepino termotratadas sobre sustrato artificial de perlita solarizado con humedad, no solarizado y solarizado en seco.	28

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 EL CULTIVO DEL PEPINO.

1.1.1 ORIGEN Y ENCUADRE TAXONÓMICO.

El pepino se originó en la India hace 3.000 años aproximadamente, y pronto se cultivó en el sur y el este del Himalaya. Desde la India, el pepino fue llevado a Grecia e Italia y posteriormente a China. Los registros confirmaron en cultivo del pepino en Francia en el siglo IX, Inglaterra en el siglo XIV y en América del Norte a mediados del siglo XVI (Bisognin, 2002).

El pepino, cuyo nombre científico es *Cucumis sativus* L., pertenece a la familia de las *Cucurbitaceae*. Es una planta herbácea anual, es decir, que desarrolla su ciclo de cultivo en menos de un año; con raíces fasciculadas poco profundas. Posee tallos trepadores o rastreros, muy ramificados en la base, con cuatro ángulos marcados y zarcillos helicoidales; sus hojas son muy pecioladas y de forma pentagonal. Tienen flores unisexuales en plantas monoicas; las flores femeninas presentan ovario ínfero cubierto de vellosidad y son solitarias, mientras que las flores masculinas presentan 3 estambres y se presentan agrupadas (Santamarina y Roselló, 2009).

Actualmente, las plantas que se cultivan de pepino son ginoicas puesto que solamente poseen flores femeninas, las cuales se diferencian claramente de las masculinas al ser portadoras de un ovario ínfero, que se desarrolla en la base del cáliz de la flor. Es planta herbácea tiene una vida media de 4,5 meses, dando frutos de forma continua hasta que la planta se seca por completo.

El pepino es una hortaliza alargada y cilíndrica; de tamaño variable, pudiéndose clasificar en corta (menor a 15 cm de largo) o tipo español, media (20-25 cm de largo) o tipo francés, y largo (más de 25 cm de largo) o tipo holandés (Eroski consumer, 2011).

1.1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL PEPINO.

El pepino es una de las especies hortícolas de mayor importancia, siendo China el mayor productor a nivel mundial y España a nivel Europeo (Rodríguez y Peiró, 2015)

A nivel mundial, el cultivo de cucurbitáceas es muy importante, puesto que se están cultivando alrededor de 8.772.230 ha y con una producción alrededor de 247.935.454 toneladas.

Respecto al pepino, la superficie cultivada aumentó en un 1,13% entre 2004 y 2014. En 2004 rondaban las 1.943.979 ha de pepino y en 2014 2.178.613 ha. En cambio, tanto la producción y la exportación, se han incrementado anualmente (FAO, 2014).

Según los datos recogidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, 2014), los países líderes en la producción de pepino a nivel mundial y en orden decreciente son: China, Federación Rusa, Irán, Turquía, Ucrania, EEUU y España, destacando China muy por encima del resto (Figura 1).

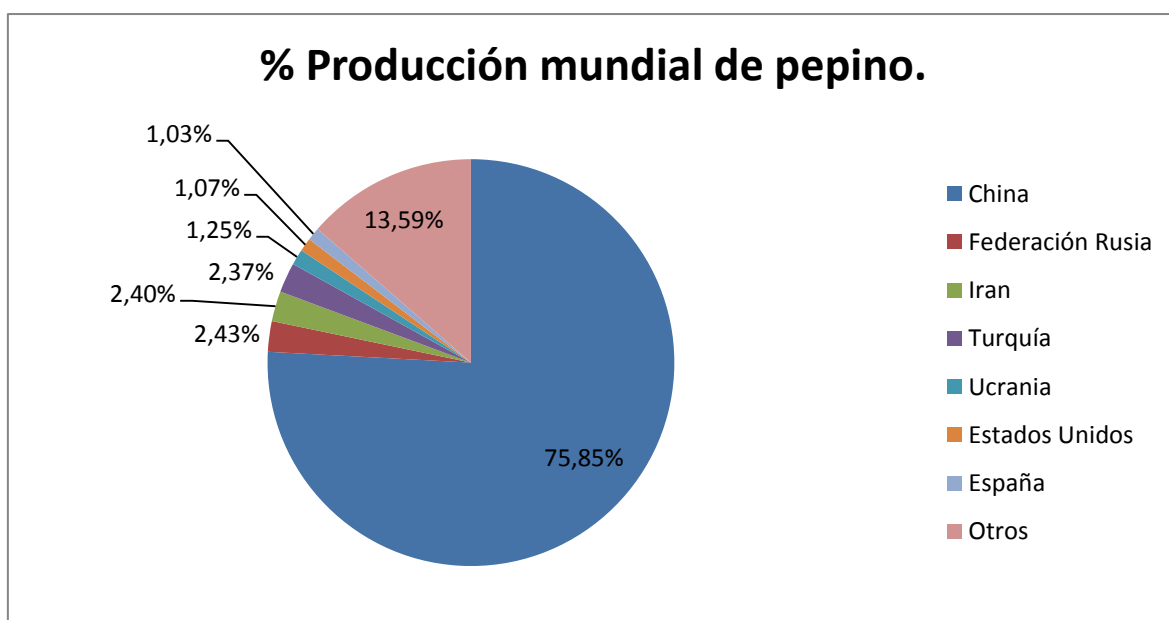


Figura 1: Producción a nivel mundial en porcentaje relativa al año 2014 de los principales productores [Fuente: Elaboración propia en base a los datos de FAO (2014)].

China es el principal país productor a nivel mundial, con 56.904.098 toneladas cultivadas en el 2014. Teniendo en cuenta que el segundo mayor productor es Rusia con 1.820.123 toneladas, la diferencia entre ambos es muy elevada, produciendo China un 75,85 % del pepino mundial (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación mundial de los 10 mayores productores de pepino ordenador por la cantidad de producción y su porcentaje frente al total a nivel mundial. Fuente: FAO (2014).

Área	Año	Producción (T)	Porcentaje
1. China	2014	56.904.098,00	75,85%
2. Federación Rusa	2014	1.820.123,00	2,43%
3. Irán	2014	1.804.184,00	2,40%
4. Turquía	2014	1.780.472,00	2,37%
5. Ucrania	2014	940.940,00	1,25%
6. Estados Unidos	2014	799.820,00	1,07%
7. España	2014	775.903,00	1,03%
8. Uzbekistán	2014	718.570,00	0,96%
9. México	2014	707.632,00	0,94%
10. Japón	2014	548.800,00	0,73%

A nivel nacional, la superficie de cultivo dedicada en España al pepino, se ha mantenido más o menos estable en los últimos diez años (Figura 2).

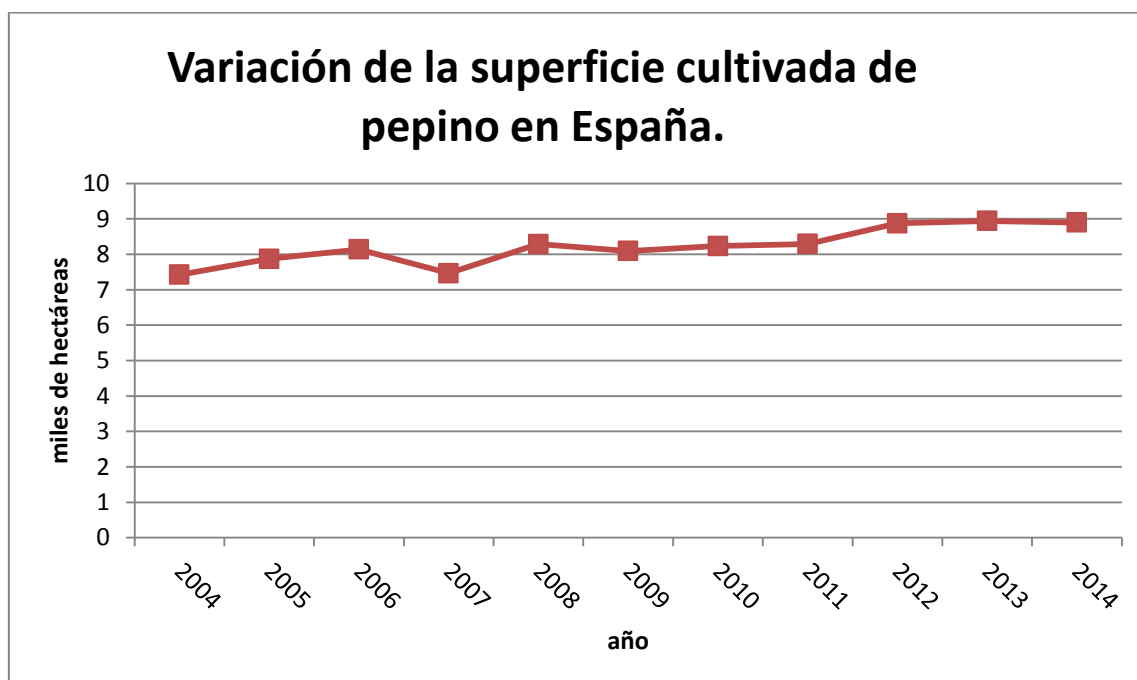


Figura 2: Variación de la superficie cultivada de pepino en España desde el año 2004 al año 2014 [Fuente: Elaboración propia en base a datos de FAO (2014)].

Con respecto a la producción nacional de pepino, se produjeron muchas fluctuaciones en su producción hasta aproximadamente el año 2011 donde empieza a presentar una tendencia al alza (Figura 3). Destaca la provincia de Almería con un 55% de la superficie total cultivada (MAGRAMA, 2015).

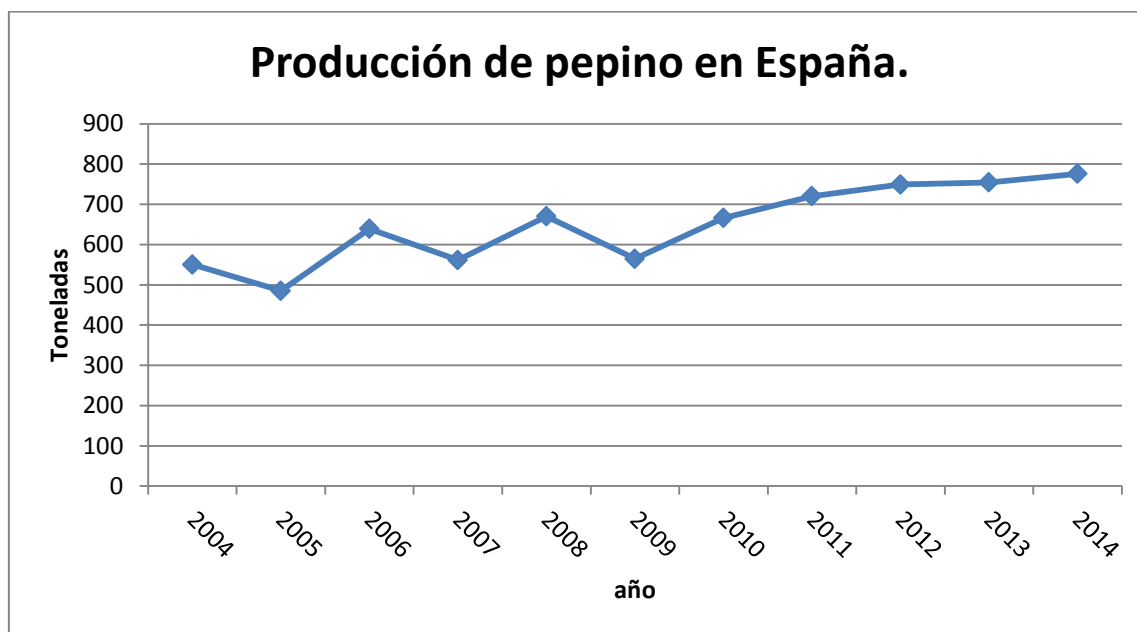


Figura 3: Evolución de la Producción de pepino en España entre los años 2004-2014 [Fuente Elaboración propia en base a datos de FAO (2014)].

1.2 EL VIRUS DEL MOSAICO VERDE JASPEADO DEL PEPINO (CGMMV).

1.2.1 ORIGEN, ENCUADRE TAXONÓMICO Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

El virus del mosaico verde jaspeado del pepino (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV), fue descrito por primera vez en el año 1935 en cultivos de pepino en Inglaterra. En un primer momento, los virus observados de pepinos afectados se denominaron aislados Cucumber virus 3 o CV3 y Cucumber virus 4 o CV4 (Ainsworth, 1935). Este virus se engloba dentro del género *Tobamovirus* y la familia *Virgaviridae*.

CGMMV se transmite a través del suelo y el agua de riego contaminada con restos de plantas infectadas (Mandal *et al.*, 2008). Las epidemias generalizadas de CGMMV, combinadas con la dificultad de desinfectar los invernaderos contaminados y la introducción de nuevos virus cada año a través de semillas contaminadas, se ha convertido grave problema para el cultivo de cucurbitáceas.

En la actualidad el CGMMV está presente en muchos países. Su difusión fue lenta entre los años 1935 y 1985, rápida entre los años 1986 y 2006 y extremadamente rápida entre los años 2007 y 2016, posiblemente al incremento en los últimos años del comercio internacional de semilla contaminada (Dombrovsky *et al.*, 2017). Hasta la fecha ha sido descrito en Arabia Saudí (Al-Shahwan y Abdalla, 1992), Australia (Tesoriero *et al.*, 2016), Canadá (Ling, 2013), China (Chen *et al.*, 2006), España (Celix *et al.*, 1996), Estados Unidos (Tian *et al.*, 2014), Grecia (Vaveri *et al.*, 2002), India (Vasudeva *et al.*, 1949), Israel (Antignus *et al.*, 1990), Japón (Inouye *et al.*, 1967), Korea (Lee *et al.*, 1990), Myanmar (Kim *et al.*, 2010), Países Bajos (Mandal *et al.*, 2008), Pakistán (Ali *et al.*, 2004), Polonia (Pospieszny *et al.*, 1997), Reino Unido (Ainsworth, 1935), Rusia (Slavokhotova *et al.*, 2007), Taiwán (Wang y Chen, 1985) y Ucrania (Budzanivska *et al.*, 2007) (Figura 4).

Por lo tanto, su distribución actualmente es mundial y es uno de los pocos virus que se han descrito en la Antártida (Polischuck *et al.*, 2007).

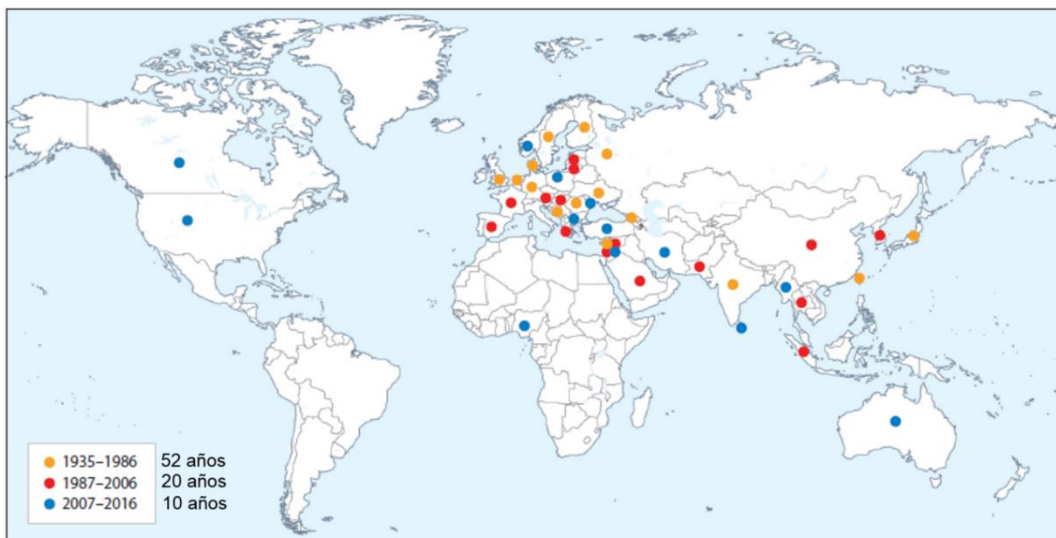


Figura 4: Distribución mundial de CGMMV [Fuente: Dombrovsky *et al.* (2017)].

1.2.2 MORFOLOGÍA DE LA PARTÍCULA VIRAL Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA.

Las partículas virales o viriones de CGMMV son varillas rígidas, de 300 nm de longitud y 18 nm de diámetro. Junto a los viriones, es frecuente encontrar otras partículas más pequeñas, de 50 nm de longitud. Las partículas virales de tamaño normal encapsidan el ARN genómico y dos moléculas de ARN sub-genómico, las partículas de menor tamaño encapsidan moléculas de

ARN mensajero que codifican para la proteína de la cápside del virus (Fukuda *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 2003).

El genoma completo del virus se encuentra en forma de ARN monocatenario de sentido positivo. Su longitud es de 6.5 kb, con cuatro pautas de lectura abierta (Open Reading Frames, ORF) o genes (Figura 5).

La ORF I y la ORF II codifican dos proteínas que se encargan de la replicación del virus; S-Rep y L-Rep respectivamente, por el contrario, la ORF III codifica para la proteína de movimiento y la ORF IV para la proteína de cubierta o de la cápside (Ugaki *et al.*, 1991).

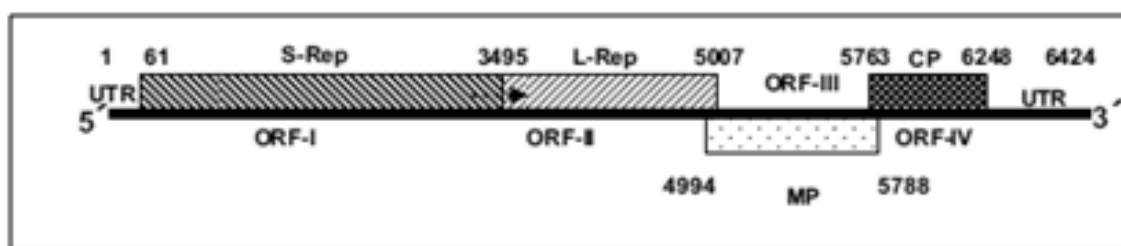


Figura 5: Organización genómica del virus CGMMV [Fuente: Mandal *et al.*, (2008)].

1.2.3 SINTOMATOLOGÍA EN PEPINO.

CGMMV es un virus que afecta a todas las cucurbitáceas y entre ellas al pepino. La sintomatología que se observa en plantas de pepino infectadas es muy característica, produciéndose un mosaico en estrella en las hojas jóvenes cuando la carga viral es muy elevada y que evoluciona a mosaico verde-claro (Figura 6a) con una distribución variable de la coloración tanto en hoja como en fruto (Figura 6b). Este virus puede producir en pepino una deformación de las hojas y del fruto, así como un mosaico más o menos intenso y un bandeado de las venas. Además se manifiesta como una reducción del crecimiento normal de las plantas (Luis-Arteaga, 1994). Los síntomas varían en función del aislado y la especie vegetal que esté infectada (Mandal *et al.*, 2008)



Figura 6: Síntomas típicos de CGMMV en pepino: en hojas (6a) y frutos con mosaico y deformación (6b).

1.2.4 FORMAS DE TRANSMISIÓN.

CGMMV es un virus muy estable, por lo que el simple contacto con plantas adyacentes durante el desarrollo normal del cultivo o con el manejo del mismo (poda o recolección), es capaz de transmitirse de unas plantas a otras (Melgarejo *et al.*, 2010). El virus se transmite por injerto, técnica muy empleada diferentes especies de cucurbitáceas como en sandía, melón y pepino (Mandal *et al.*, 2008). Otra de las formas de transmisión es a través del suelo, con el

empleo de sustratos reutilizados y contaminados. En suelos contaminados con CGMMV, el virus puede permanecer infectivo hasta 10 meses o más (Vaveri *et al.*, 2002; Dombrovsky *et al.*, 2017).

Por otro lado, este virus que puede transmitirse a través del agua de riego (Li *et al.*, 2015). En un sistema de cultivo hidropónico, si las raíces de plantas adyacentes están en contacto, la transmisión del virus puede ser de un 80% (Hollings *et al.*, 1975). En los Países Bajos, en zonas donde CGMMV está presente, se demostró que el virus se diseminaba al agua de drenaje, a partir de las raíces de plantas infectadas, infectando un elevado número de plantas tanto en invernadero como en el campo (Van Dorst, 1988). También se detectó en las aguas del río Jamuna en la India, en zonas que se situaban próximas a los campos de cultivo de cucurbitáceas (Vani y Varma, 1993).

Otro medio de transmisión del virus bastante frecuente es por la transmisión por semilla. Teniendo en cuenta diversos estudios, los porcentajes son variables, oscilando desde un 4,2-44% (Sastry, 2013) y 12,8-100% (Liu *et al.*, 2014). La transmisión del virus por semilla puede verse condicionada según el hospedante, el cultivar, la virulencia de la cepa del virus. CGMMV puede ser transmitido verticalmente, a la siguiente generación, y horizontalmente a través del polen procedente de planta infectada (Liu *et al.*, 2014).

1.2.5 MEDIDAS DE CONTROL.

CGMMV es un virus muy estable y puede permanecer infectivo durante largos periodos en los restos vegetales, en el suelo contaminado o en la cubierta o superficie de las semillas. El control de la enfermedad es muy importante para reducir su impacto tanto durante el cultivo como en los siguientes ciclos de cultivo (Reingold *et al.*, 2015b).

Para el control de virosis la mejor medida es la prevención y evitar que introduzca en nuevos terrenos, para ello se deben utilizar semillas libre de virus; evitar el trasiego de personal entre invernaderos afectados, empleo de ropa limpia, batas, guantes y botas desechables, y controlar la flora arvense dentro y fuera de los invernaderos, puesto que pueden suponer un reservorio del virus.

En el caso de detectarse el virus en una parcela, se debería evitar la diseminación a otras plantas eliminando las plantas infectadas ya que suponen el foco de infección para el resto del

cultivo. Las plantas infectadas y también las vecinas, se deben retirar al final de la jornada en bolsas herméticamente cerradas. No se debería intercambiar el personal entre distintos invernaderos, trabajar avanzando por líneas y manteniendo el sentido de avance, desinfectar los útiles de trabajo.

Después de un cultivo afectado, se deberá desinfectar bien los invernaderos, eliminando al máximo los restos vegetales, controlar la presencia de hospedantes de la flora arvense dentro y en el entorno de los invernaderos, realizar una parada en verano, utilizar ese tiempo para solarizar el suelo y rotar con cultivos no susceptibles al virus (Elorrieta Jove, 2011).

1.3 DESINFECCIÓN DE SUSTRATOS.

1.3.1 DESINFECCIÓN EN SUSTRATOS ARTIFICIALES.

El cultivo sin suelo es una técnica que evita las limitaciones de la agricultura convencional. La utilización de diferentes sustratos permite controlar un gran número de factores que afectan al cultivo y desarrollo de las plantas como puede ser el pH, la humedad, la conductividad eléctrica, la oxigenación, los nutrientes; pero no están exentos de poder contaminarse con virus, bacterias y demás patógenos.

El cultivo sin suelo incluye todas aquellas técnicas que permiten crecer las plantas fuera de su ambiente edáfico natural. El medio donde se desarrollan puede ser agua o sustrato artificial, siendo los sustratos artificiales más utilizados en las explotaciones españolas la lana de roca, arena, perlita y fibra de coco (Mazuela *et al.*, 2005; Urrestarazu, 2015).

Una de las principales ventajas del uso de sustratos artificiales, es que hay independencia entre el suelo en el que se ubican y el cultivo, pudiendo así superar condiciones edáficas y sanitarias adversas. La cantidad del inóculo del virus inicial en un cultivo sin suelo es prácticamente nula, a diferencia del cultivo en suelo, pero debido al elevado coste de los mismos así como diferentes motivos económicos, se suelen reutilizar durante 3 años seguidos, lo cual produce una alteración de sus condiciones sanitarias y de sus propiedades físicas. (Gómez Vázquez, 2008; Urrestarazu, 2008).

La reutilización de sustratos, el uso de agua de riego contaminada y la utilización de material vegetal infectado, puede producir problemas sanitarios semejantes a los encontrados en los suelos, por lo que las enfermedades en ellos detectadas, no difieren de las encontradas en

cultivos tradicionales. El control de las enfermedades patogénicas en el cultivo sin suelo tiene como estrategia fundamental evitar la entrada de los patógenos en el sistema de cultivo (Gómez Vázquez, 2008). Por ello, se han tenido que implementar tratamientos de desinfección de las mismas al igual que ya se desinfectaba el suelo en un campo de cultivo.

La desinfección mediante fumigantes y la solarización son métodos tradicionales de desinfección de suelo en campos de cultivo, mediante la elevación de la temperatura del mismo durante los meses de verano. La solarización se traduce en un aumento de la temperatura del suelo, del orden de unos 10°C respecto al suelo no solarizado. (Frápolti *et al.*, 2000)

Los fumigantes, concretamente sus sustancias activas, son cada vez menos utilizados puesto que suponen o pueden suponer un grave problema medioambiental, lo que ha conducido a la prohibición de muchas sustancias como el bromuro de metilo (Laita, 1997), o a la retirada de los permisos de ventas como es el caso del 1,3-dichloropropeno (MAGRAMA, 2017). Algunos de los más utilizados mundialmente, y utilizados desde los años 70 aproximadamente, han sido las sustancias activas como: el dazomet, producto anti fúngico que también actúa contra nematodos y plantas adventicias; Metam sodio, y metam potasio, ambos eficaces en la eliminación de nematodos y hongos (Laita, 1997; MAGRAMA, 2017).

Debido a que las sustancias activas de los productos fitosanitarios pueden suponer graves daños medioambientales, es preferible como método de desinfección del suelo, la utilización de la técnica de solarización.

La perlita es un mineral natural del grupo de las riolitas. Desde el punto de vista medioambiental es uno de los sustratos que mayor perfil tiene puesto que es un mineral natural, con solo una transformación en hornos a altas temperaturas (1000-2000 °C). Su vida útil es de unos 3 años, debido a la degradación del plástico de las mangas o sacos que lo contienen, puesto que la vida útil de la perlita es mucho mayor (Cervantes, 2015).

La perlita está compuesta principalmente por óxido de silicio (73-75%) y óxido de aluminio (11-13%), son rocas volcánicas vítreas que se han formado por enfriamiento rápido, constituyendo un material amorfo que contiene un 2-5% de agua combinada. Posee una elevada capacidad de retención de agua, hasta cinco veces su peso, su capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.) es prácticamente nula (1,5-2,5 meq/100g). Las ventajas de la utilización de perlita es que posee una buena aireación, no se descompone ni biológica, ni químicamente y mantiene un

perfil constante en la zona radicular (Beltrano y Gimenez, 2015). En la Tabla 2 se recogen sus principales propiedades físicas, dependiendo del tamaño de las partículas que la componen.

Tabla 2: Propiedades de la perlita [Fuente: (Fernández et al., 1998)]

Propiedades de la perlita			
Propiedades físicas	Tamaño de las partículas (mm de diámetro)		
	0-15 (Tipo B-6)	0-5 (Tipo B-12)	3-5 (Tipo A-13)
Densidad aparente (Kg/m ³)	50-60	105-125	100-120
Espacio poroso (%)	97,8	94	94,7
Material sólido (% volumen)	2,2	6	5,3
Aire (% volumen)	24,4	37,2	65,7
Agua fácilmente disponible (% volumen)	37,6	24,6	6,9
Agua de reserva (% volumen)	8,5	6,7	2,7
Agua difícilmente disponible (% volumen)	27,3	25,5	19,4

1.3.2 DESINFECCIÓN EN SUELO.

Antes de que hubiera una disponibilidad general de los plaguicidas, a finales de la década de 1940, la desinfección del suelo mediante técnicas de calor, vapor de agua, o agua caliente, era una práctica muy utilizada para controlar las plagas del suelo (Newhall, 1955).

La desinfección de los suelos se puede llevar a cabo mediante diferentes procesos, lo más utilizados actualmente son la solarización, la biofumigación y la biosolarización. El objetivo de la desinfección del suelo es el de eliminar la población de patógenos que habitan en el suelo y pueden causar la merma de la producción (Infoagro, 2017).

La solarización es la técnica de desinfección que consiste en el aprovechamiento de la energía solar mediante la utilización de plásticos. Consiste en cubrir el suelo húmedo, en capacidad de campo, con una lámina plástica especial durante la época del año en que la intensidad de la radiación solar es más apropiada, con el fin de incrementar la temperatura del suelo que permitan destruir los patógenos, insectos y malas hierbas (Sotrafa, 2014).

Durante la solarización del suelo, la radiación solar recibida penetra a través de la lámina plástica y se absorbe en el suelo, convirtiéndose la mayor parte de ella en calor (Tecnicoagrícola, 2013). Todos los objetos emiten radiación siempre que su temperatura

supere los 0°C. Cuanto más elevada sea la temperatura de dicho objeto, mayor cantidad de radiación (energía) emite y en longitudes de onda más cortas. El sol, cuya temperatura superficial es de 5.500-6.000°C, emite radiaciones de longitud de onda corta (Gómez de Barreda, 2016, comunicación personal). Debido a este fenómeno, la radiación solar podrá atravesar el plástico pero la radiación emitida por la tierra no será capaz de escapar de la lámina plástica, por ello la mayor parte de la radiación será retenida, alcanzándose temperaturas en este proceso que son letales para muchos organismos del suelo (Tecnicoagrícola, 2013).

Los pasos a seguir para realizar la solarización son:

- Instalación de lámina plástica transparente, de 100 galgas de espesor, con acolchado del terreno.
- Llevar el suelo a capacidad de campo; siendo la capacidad de campo el máximo contenido de agua que puede retener el suelo en condiciones de libre drenaje, y se alcanza entre 24 y 72 horas después de haberse concluido el riego (Pascual España, 2007).

No se recomienda volver a realizar riegos sucesivos una vez llevado el suelo a capacidad de campo puesto que conseguiríamos enfriar el terreno. El agua contenida en el suelo puede llegar a alcanzar los 70°C en los primeros centímetros. El tiempo mínimo para una correcta solarización es de 40-60 días. (CC. RR. Solponiente, 2015).

La biofumigación es una técnica alternativa biológica a la desinfección del suelo mediante productos químicos. Mediante ella, podemos utilizar materia orgánica así como los productos de su descomposición para el control de patógenos (Sotrafa, 2014).

La técnica consiste en la utilización de los gases liberados en la descomposición de la materia orgánica cuando está aplicada en grandes cantidades en el suelo. Como fuente de materia orgánica, suele emplearse estiércol bovino, caprino, ovino o de aves (gallinaza), así como restos vegetales de especies crucíferas. (Stapleton, 1990; Innovagri, 2014).

La biosolarización es la técnica que combina la solarización y la biofumigación. Con ella el suelo se calienta en mayor medida y el plástico permite la acumulación de los gases generados. El gran aporte de materia orgánica aumenta la actividad biológica del suelo, mejora su estructura y con ello aumenta su capacidad de retención de agua (Innovagri, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

En 2015, 2016 y 2017 se detectaron parcelas de pepino afectadas con CGMMV en diferentes explotaciones de la cooperativa Granada-La Palma SCA de Carchuna (Granada), el cual causaba graves pérdidas económicas. Debido a la reincidencia de este problema en las sucesivas campañas, y al tratarse de un virus muy estable y con gran facilidad de transmisión, el hecho de que una planta se infecte por crecer en suelo contaminado, puede ocasionar la rápida dispersión del virus al resto de plantas del cultivo.

Por todo ello, los técnicos de la cooperativa Granda-La Palma SCA propusieron estudiar diferentes alternativas para la inactivación del CGMMV en los sustratos empleados en sus instalaciones. Mediante un convenio entre la cooperativa Granada-La Palma SCA y el grupo de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia (IAM-UPV) se propuso la evaluación de los diferentes tratamientos en el suelo o en el sustrato artificial empleando las parcelas de pepino afectadas y, establecer las medidas de control oportunas. La desactivación del virus supondría la posible reutilización de los sustratos, alargando así su vida útil, reduciendo con ello el impacto ambiental generado al disminuir el volumen de residuos, así como reducir los costes de producción y por ende aumentando la rentabilidad del mismo.

Por todo ello, en este Trabajo Final de Grado se plantearon los siguientes objetivos:

1. Evaluar la efectividad de la solarización a diferentes temperaturas en mangas de perlita donde durante la campaña anterior se habían detectado plantas positivas a CGMMV.
2. Evaluar la efectividad de la solarización en suelos con y sin humedad procedentes de parcelas infectadas con CGMMV durante la campaña anterior.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 SUSTRATOS Y MATERIAL VEGETAL.

3.1.1 SUSTRATOS.

3.1.1.1 SUELO SOLARIZADO CON HUMEDAD Y EN SECO.

Para evaluar la solarización húmeda o en seco en suelos procedentes de parcelas de pepino tipo “mini” infectadas con CGMMV, se seleccionó una parcela donde durante la campaña había alta incidencia de plantas infectadas con CGMMV (Figura 7). El propietario de dicha parcela y los técnicos de la cooperativa Granada-La Palma SCA realizaron la solarización con humedad con riego por goteo bajo el plástico de solarización durante 2 meses, agosto y septiembre (Figura 8A) y se separó una bolsa con suelo contaminado que se mantuvo con plástico dentro del invernadero solarizado, pero sin humedad (Figura 8B). Durante los meses de solarización se alcanzó en el aire dentro del invernadero una temperatura de 67°C.



Figura 7: Sintomatología presentada en los invernaderos afectados durante la campaña anterior a la solarización realizada.

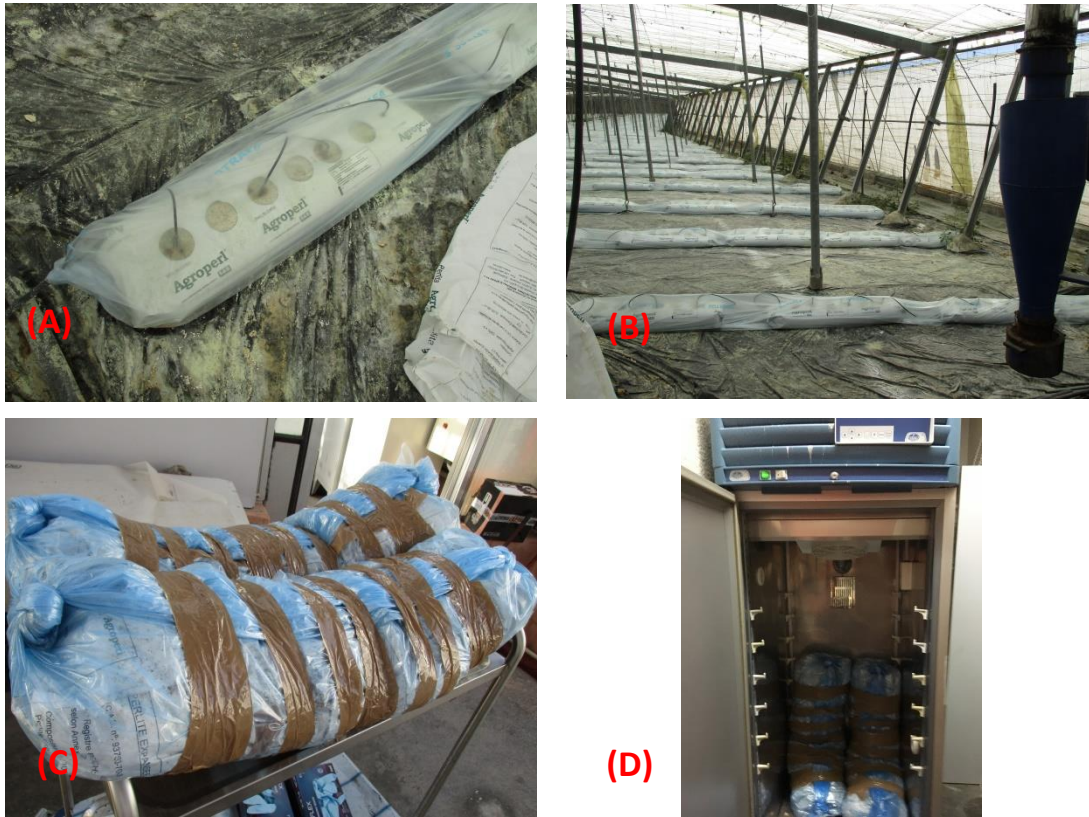


Figura 8: Suelo solarizado con humedad (A) y suelo solarizado en seco (B)

3.1.1.2 SACOS DE PERLITA.

Para los ensayos de desinfección de sacos de perlita, la cooperativa Granada-La Palma SCA envió al Laboratorio de Virología de IAM-UPV seis sacos de perlita que habían sido utilizados durante sólo un año para el cultivo de pepino “mini” y donde las plantas cultivadas en ellos durante la anterior campaña habían presentado síntomas de mosaicos muy marcados en hojas y frutos, confirmándose la presencia de CGMMV en dichas plantas mediante análisis moleculares.

De los sacos recibidos, se mantuvieron dos sacos (codificados como S2NS y S4NS) sin ningún tipo de solarización o tratamiento que actuarían como control del ensayo. Otros dos sacos (codificados como S1SH y S2SH) (Figuras 9A y B) se solarizaron 2 meses (agosto y septiembre) con humedad, mediante riego por goteo bajo el plástico apto para la solarización, y para finalizar, dos sacos (codificados como S1SS y S3SS) se introdujeron en una estufa a 45°C durante 3 meses como tratamiento por calor pero en seco (Figuras 9C y D). Esta temperatura (45°C) es menor de la que se alcanza con la solarización en campo (>50°C), pero se realizó este tratamiento para comprobar el efecto de la temperatura y la falta de humedad en la infectividad del virus.



Figuras 9: Tratamientos para la desinfección de CGMMV en sacos de perlita: solarización húmeda en invernadero (A y B) y tratamiento térmico en laboratorio (C y D).

3.1.2 MATERIAL VEGETAL.

El material vegetal empleado para el estudio de evaluación de la persistencia de CGMMV en diferentes tipos de sustratos sometidos a diferentes tratamientos de solarización, fueron semillas comerciales de pepino de la variedad “Quarto RZ” (Figura 10) procedentes de la casa comercial Rijk Zwaan Ibérica S.A. suministrados por la cooperativa Granada-La Palma S.C.A. Esta variedad es tipo cocktail o snack (pepino “mini”), con ciclos de cultivo en otoño o en primavera y que da lugar a una planta abierta de hoja pequeña, con 3 a 5 frutos por nudo de un tamaño medio de 10 cm.

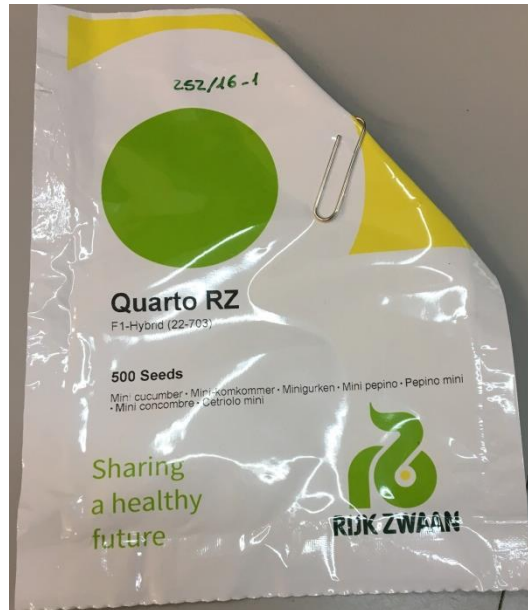


Figura 10: Semillas comerciales de la variedad "Quarto RZ" empleados en el ensayo.

Para asegurar la sanidad de la semilla empleada en el ensayo (250 semillas), se realizó un tratamiento de termoterapia a 70°C durante 72 horas. Una vez realizado este tratamiento, se llevó a cabo un ensayo de germinación con 20 semillas, para saber si la termoterapia disminuía el porcentaje de germinación de las mismas.

En el ensayo de germinación, se dispusieron las 20 semillas termotrataadas sobre un papel absorbente previamente humectado (Figura 11A), con una separación entre ellas de aproximadamente 2 cm. En otro papel absorbente se colocaron otras 20 semillas, no termotrataadas.

Una vez colocadas las semillas sobre los papeles absorbentes humectados, se enrollaron sobre sí mismos y se guardaron en pequeñas bolsas plásticas etiquetadas para que conservasen la humedad. Se mantuvieron en el fitotrón (Figura 11B) durante 72 horas a 25°C.

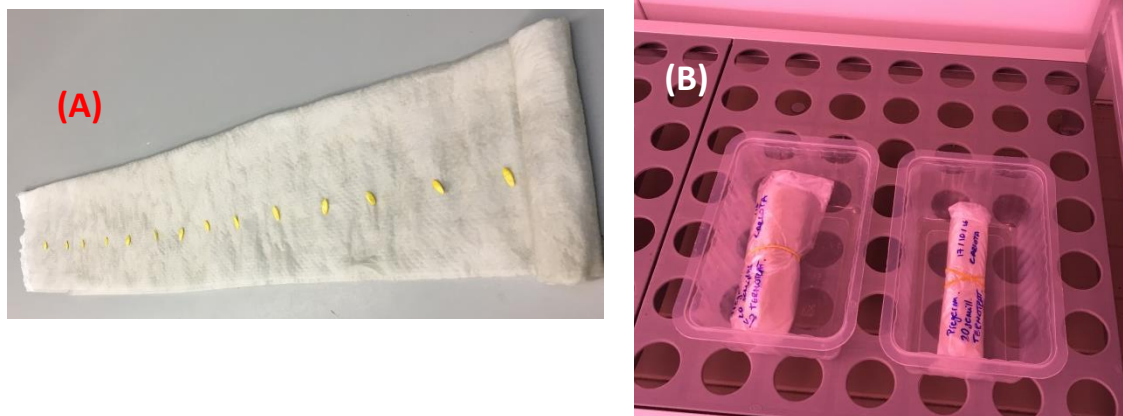


Figura 11: Preparación del ensayo de germinación: disponiendo las semillas en el papel absorbente (A) y colocando dicha preparación en el fitotrón (B).

3.2 SIEMBRA Y MONITOREO.

3.2.1 SIEMBRA.

Para evaluar la persistencia de CGMMV en los suelos solarizados con y sin humedad, se dispusieron 10 macetas por cada tipo de suelo y se sembraron 3 semillas de pepino termotrataadas en cada una de ellas, empleando un total de 60 semillas (Figura 12).



Figura 12: Siembra en maceteros de las semillas comerciales en el ensayo de evaluación de la persistencia de CGMMV en sustratos solarizados.

En los sacos de perlita se sembraron 3 semillas en cada punto de crecimiento (6 por saco), empleando un total de 108 semillas. Todas las mangas de cultivo y macetas se colocaron en el

invernadero de la Unidad de Patología Vegetal de la UPV, donde se realizaron riegos periódicos según las necesidades hídricas de las plantas.

3.2.2 MONITOREO.

Para el monitoreo del cultivo de pepino tras su siembra, se realizaban visitas periódicas (al menos una vez por semana), en las cuales aparte de regar las plantas en caso de ser necesario, se iba observando la sintomatología que presentaban las plantas (Figura 13).



Figura 13: Plantas de pepino variedad "Cuatro rz" a los 15 días de su siembra, con los cotiledones totalmente emergidos en todos los casos.

Tres meses después de su siembra, las muestras se recogieron en bolsas de plástico transparentes y con el etiquetado correspondiente. Se tomaba la tercera hoja totalmente desarrollada de cada planta y se consideraba como una muestra al conjunto de las 3 hojas de las 3 plantas que formaban cada alveolo de cada manga o las 3 hojas de las 3 plantas de cada maceta. Por tanto, se muestrearon un total de 168 plantas, agrupadas de 3 en 3, lo que hace un total de 56 muestras agrupadas.

Las 56 muestras agrupadas se almacenaron y conservaron a -18°C hasta el posterior análisis para determinar la presencia del virus en la planta.

La toma de muestras se realizó minuciosamente, cambiando de guantes cada vez que se cambiaba de saco o de bandeja de macetas, para evitar la posible transmisión del virus de forma mecánica.

3.3 DETECCIÓN DE CGMMV.

Para la detección de CGMMV en los sustratos solarizados no solarizados y solarizados con humedad (S2NS, S4NS, S1SH, S2SH, MSSH y MSCH) utilizamos la técnica serológica DAS-ELISA

así como la técnica molecular RT-PCR con cebadores específicos de CGMMV. Para la detección de CGMMV en los sustratos solarizados en seco (S1SS y S3SS) así como para las raíces de todos los sustratos artificiales, empleamos únicamente la técnica molecular RT-PCR con cebadores específicos de CGMMV .

3.3.1 DAS-ELISA

La técnica serológica DAS-ELISA (“Doble Antibody Sandwich”-“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” o ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima) está basada en la utilización de anticuerpos marcados con una enzima los cuales se quedan inmovilizados sobre un soporte. Mediante la adición de un sustrato específico, se genera un producto detectable como por ejemplo un cambio de color. Este cambio de color o viraje es cuantificable mediante un espectrofotómetro o un colorímetro.

En este ensayo se empleó el antisuero específico de CGMMV de la casa comercial Loewe Biochemical GmbH (Sauerlach, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante (ANEXO I). Para el análisis se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc GmbH, Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Alemania), incluyendo 2 repeticiones por muestra a analizar, así como controles positivos (muestra infectada con CGMMV), controles negativos (muestra de pepino sana) y el blanco para la calibración del aparato (Figura 14).

Las absorbancias se midieron a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro Titertek Multiskan Inmunoplate reader (Flow Laboratories, Finlandia) con el programa Multiskan Primary EIA V.2.1, considerando muestras positivas aquellas cuyo valor de absorbancia era igual o superior al doble de la absorbancia del control negativo de la placa.

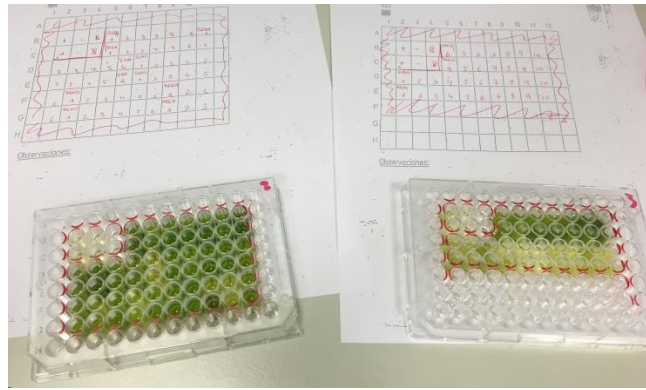


Figura 14: Análisis mediante la técnica serológica DAS-ELISA de los plantas crecidas sobre sustratos solarizados con humedad y en los sustratos no solarizados.

3.3.2 RT-PCR

Para la detección de CGMMV en las plantas crecidas en todos los sustratos y las raíces del cultivo anterior de los sacos de perlita, se empleó la técnica molecular de la transcripción reversa de la reacción de la cadena de polimerasa (“Reverse transcription- Polymerase chain reaction”, RT-PCR) con cebadores específicos para CGMMV.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular mediante la que podemos conseguir múltiples copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (DNA) teniendo uno como molde. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) es un paso previo que debemos realizar, puesto que el genoma de los virus generalmente está constituido por ácido ribonucleico (RNA) y debemos realizar primero la transcripción de la cadena complementaria de DNA que nos servirá de molde para la realización de la PCR (Rio, 2014).

Por tanto, el primer paso a realizar fue la extracción del RNA viral de todas las muestras vegetales utilizando el método de captura con sílica descrito por (MacKenzie *et al.*, 1997; ANEXO II). La RT-PCR se realizó en un solo paso empleando el kit comercial SuperScript TM II (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España) y los cebadores específicos de CGMMV descritos por Boubourakas *et al.* (2004) cuyas características se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3: Cebadores específicos de cgmmv empleados en RT-PCR para el análisis de plantas y raíces del ensayo.

Cebador	Secuencia nucleotídica 5'-3'^a	Localización en el genoma	Gen amplificado	Tamaño amplificado
CGMMV-D	TGTAGTCGAGTCTGTCGTCTCTT	5533-5555	CP	331
CGMMV-R	GGTACCTTGTGAAGCAACTAGAA	5864-5842		

^aLocalización en el genoma del aislado de CGMMV publicado en la base de datos del GenBank Número de Acceso AB015146.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 ENSAYO DE GERMINACIÓN.

Con el ensayo de germinación se observó que el porcentaje de germinación era del 100 %, tanto en las semillas termotrataadas como en las no termotrataadas (Figura 15), por lo que la termoterapia no había afectado a la capacidad germinativa de las semillas.

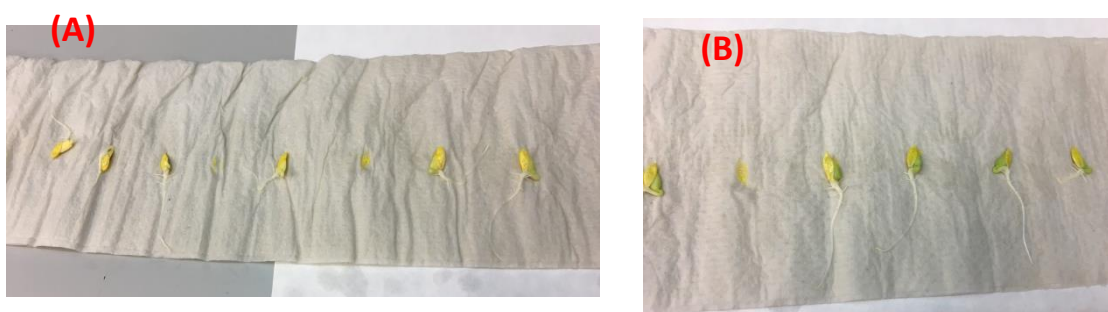


Figura 15: Ensayo de germinación realizado con (A) semillas no termotrataadas y (B) semillas termotrataadas.

4.2 SUELO SOLARIZADO CON Y SIN HUMEDAD.

Durante el monitoreo de las plantas crecidas en suelo solarizado durante 2 meses, con y sin humedad durante el ensayo, se observaron síntomas de amarilleo internervial en las hojas de plantas crecidas en macetas con suelos solarizado con humedad (Figura 16), pero no en el suelo solarizado sin humedad. También se observaron síntomas típicos de la infección de CGMMV durante el monitoreo en las plantas crecidas en las mangas.



Figura 16: Síntomas de amarilleo internerval en las plantas cultivadas sobre suelo solarizado con humedad observados el 30/01/2017.

Además, se observó que las plantas crecidas en las macetas solarizadas sin humedad no llegaron a finalizar su ciclo de cultivo, y esto puede deberse a que el suelo solarizado en seco era demasiado pedregoso como para permitir el normal crecimiento de las raíces y por tanto la captación de nutrientes del medio.

Los análisis realizados por DAS-ELISA con el antisuero específico de CGMMV fueron negativos en todos los casos a excepción una repetición de la maceta con suelo solarizado sin humedad (código MSSH-3), que dio positivo a CGMMV mediante ésta técnica (Tabla 4).

Las muestras recogidas, previa extracción de RNA, se analizaron a su vez mediante la RT-PCR, para confirmar los resultados obtenidos, ya que se trata de una técnica más sensible que la técnica DAS-ELISA. Los resultados de los análisis por RT-PCR confirman la presencia de CGMMV en un 50% de las plantas sembradas sobre suelo solarizado con humedad, así como en un 30% de las plantas sembradas sobre suelo solarizado en seco.

Tabla 4: Resultados obtenidos de los análisis de las técnicas DAS-ELISA y RT-PCR obtenidos a partir del cultivo de semillas de pepino termotratadas sobre suelo solarizado con y sin humedad.

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	MUESTRA	DAS-ELISA	RT-PCR		RESULTADOS RT-PCR
				1:1	1:10	
MSCH-1	Macetas solarizadas con humedad	1	-	-	+	5/10 POSITIVOS (50%)
MSCH-2		2	-	+	+	
MSCH-3		3	-	-	+	
MSCH-4		4	-	-	-	
MSCH-5		5	-	-	-	
MSCH-6		6	-	-	-	
MSCH-7		7	-	+	+	
MSCH-8		8	-	-	-	
MSCH-9		9	-	-	-	
MSCH-10		10	-	-	+	
MSSH-1	Macetas solarizadas sin humedad	11	-	-	-	3/10 POSITIVOS (30%)
MSSH-2		12	-	-	+	
MSSH-3		13	+	+	-	
MSSH-4		14	-	-	-	
MSSH-5		15	-	-	-	
MSSH-6		16	-	-	-	
MSSH-7		17	-	-	-	
MSSH-8		18	-	-	-	
MSSH-9		19	-	-	+	
MSSH-10		20	-	-	-	

4.3 SACOS DE PERLITA.

Para la detección de CGMMV en las plantas desarrolladas en los sacos de perlita se emplearon las técnicas de DAS-ELISA para los sacos solarizados con humedad y no solarizados (S1SH, S2SH, S2NS y S4NS) y la RT-PCR para todos los sacos, tanto solarizados con y sin humedad, no solarizados, así como para las muestras recogidas de las raíces del cultivo anterior presentes en los sacos.

En primer lugar, se recogieron raíces del cultivo anterior de todos los sacos para confirmar la presencia de CGMMV en ellas, resultando positivas las muestras tomadas de todos los sacos. Cabe detallar que aunque se detectó CGMMV en los restos de raíces de todos los sacos empleados en el ensayo, esto no implica que el virus sea infectivo, para ello deben ser positivas las plántulas emergidas de semillas sembradas posteriormente en dichos sacos.

Los análisis realizados por DAS-ELISA en muestras agrupadas de plantas de los sacos tomadas transcurridos 3 meses de la siembra, fueron negativos en todos los casos, salvo en dos de las repeticiones del saco 1 con solarización húmeda, que dieron positivo a CGMMV por esta técnica (Tabla 5).

Los resultados obtenidos de la técnica RT-PCR confirman la presencia de CGMMV en un 83% de las plantas sembradas sobre el saco 1 solarizado con humedad (S1SH), en un 33% en el saco 2 solarizado con humedad (S2SH), en un 66% en el saco 2 no solarizado (S2NS), en un 33% en el saco 4 no solarizado (S4NS) y en un 100% de plantas infectadas en los sacos 1 y 3 solarizados en seco (S1SS y S3SS respectivamente) (Tabla 5).

Durante el monitoreo de las plantas se observaron síntomas de mosaicos muy fuertes típicos de la infección con CGMMV (Figura 17) en plantas crecidas en diferentes sacos. En el saco 1 y 2 solarizados con humedad (S1SH y S2SH), en los no solarizados (S2NS y S4NS) y en el saco 1 solarizado en seco (S1SS), correspondiendo a muestras que resultaron positivas a CGMMV mediante RT-PCR con cebadores específicos del virus (Figura 18).



Figura 17: Síntomas detectados en el saco 2 no solarizado (S2NS).



Figura 18: Síntomas detectados en plantas desarrolladas en diferentes sacos.

Tabla 5: Resultados de los análisis mediante las técnicas DAS-ELISA y RT-PCR obtenidos a partir de la siembra de semillas de pepino termotratadas sobre sustrato artificial de perlita solarizado con humedad, no solarizado y solarizado en seco.

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	MUESTRA	DAS-ELISA	RT-PCR		RESULTADOS RT-PCR
				1:1	1:10	
S1SH-1	Sacos solarizados con humedad	21	-	-	-	5/6 POSITIVOS (83%)
S1SH-2		22	+	+	+	
S1SH-3		23	+	-	+	
S1SH-4		24	-	+	+	
S1SH-5		25	-	+	+	
S1SH-6		26	-	+	+	
S2SH-1	Sacos solarizados con humedad	27	-	-	-	2/6 POSITIVOS (33%)
S2SH-2		28	-	-	-	
S2SH-3		29	-	-	+	
S2SH-4		30	-	+	+	
S2SH-5		31	-	-	-	
S2SH-6		32	-	-	-	
S2NS-1	Sacos no solarizados	33	-	-	+	4/6 POSITIVOS (66%)
S2NS-2		34	-	+	-	
S2NS-3		35	-	+	-	
S2NS-4		36	-	+	+	
S2NS-5		37	-	-	-	
S2NS-6		38	-	-	-	
S4NS-1	Sacos no solarizados	39	-	-	-	2/6 POSITIVOS (33%)
S4NS-2		40	-	-	-	
S4NS-3		41	-	-	-	
S4NS-4		42	-	+	-	
S4NS-5		43	-	+	-	
S4NS-6		44	-	-	-	
S1SS-1	Sacos solarizados en seco	45		+	+	6/6 POSITIVOS (100%)
S1SS-2		46		+	+	
S1SS-3		47		+	+	
S1SS-4		48		+	+	
S1SS-5		49		+	+	
S1SS-6		50		+	+	
S3SS-1	Sacos solarizados en seco	51		+	+	6/6 POSITIVOS (100%)
S3SS-2		52		+	+	
S3SS-3		53		+	+	
S3SS-4		54		+	+	
S3SS-5		55		+	+	
S3SS-6		56		+	+	

Los resultados obtenidos en este ensayo con diferentes tratamientos contrastan con los obtenidos en las parcelas afectadas. En estas parcelas el propietario se guardó sacos del cultivo anterior que habían resultado afectados con CGMMV, y realizó un tratamiento de solarización con humedad. En esa parcela durante el cultivo de pepino realizado en la presente campaña no se han observado síntomas de enfermedad, por lo que aparentemente el tratamiento resultó efectivo. Este resultado es contrario al obtenido en nuestro ensayo, donde las plantas crecidas en sacos solarizados con humedad (S1SH y S2SS) mostraron síntomas de la enfermedad y se detectó CGMMV en 7 de las 12 muestras analizadas, lo que constituye un 58% de infección. El ensayo no dio unos resultados concluyentes porque además de no haber funcionado el tratamiento de solarización con humedad, en los sacos no tratados, que actuaban como control positivo del ensayo (donde debía detectarse CGMMV en mayor proporción), el virus estaba presente en menos muestras que en el caso de los sacos tratados con humedad (6 positivos de 12, lo que constituye un porcentaje de infección del 50%).

Las condiciones climáticas pueden favorecer o enmascarar el desarrollo de los síntomas causados por la infección viral (Gergerich y Dolja, 2006) Estas diferencias entre el ensayo con los sacos solarizados con humedad en las instalaciones de IAM-UPV y el realizado en las parcelas afectadas de Granada, podría deberse al hecho de que las condiciones ambientales en Granada no hayan favorecido el desarrollo de síntomas del virus, ya que en el caso de las plantas crecidas en ese ensayo la valoración de la efectividad del tratamiento fue únicamente mediante el monitoreo de las plantas buscando la aparición de síntomas. De todas maneras, este ensayo debería ser repetido en ambas condiciones, Valencia y Granada, para confirmar la posible efectividad del tratamiento. Además, resultados publicados indican que CGMMV no se mantiene infectivo tras el compostaje de material vegetal infectado (Avgelis y Manios, 1992), donde se alcanzan temperaturas de 72°C, lo que lleva a pensar que un tratamiento de solarización en campo, donde se pueden llegar a alcanzar temperaturas de hasta 65°C dependiendo de la profundidad (Stapleton *et al.*, 1990) puede no ser efectivo.

Por otro lado, sí puede afirmarse que el hecho de solarizar los sacos en seco a bajas temperaturas no es un tratamiento efectivo para la inactivación de CGMMV en sacos de perlita, ya que el 100% de las muestras analizadas en ellos resultaron infectadas con el virus.

Se debe tener en cuenta también, a la hora de realizar tratamientos a sustratos, el tipo de sustrato que se está empleando, ya que en un estudio realizado en el IFAPA sobre la permanencia de CGMMV en cinco tipos de sustratos, la perlita es la que mantuvo mejor la capacidad infectiva del virus (Ruiz *et al.*, 2004)

Al ser la perlita uno de los sustratos que mejor mantienen el reservorio de CGMMV, y CGMMV ser un virus muy estable, en las condiciones ambientales de Valencia parece no resultar suficientemente efectiva la solarización tanto con humectación como sin ella, no así en los ensayos en campo realizados en Granada, donde no se han registrado síntomas de CGMMV tras la solarización de los sacos de perlita.

5. CONCLUSIONES.

- Los análisis realizados a las raíces del cultivo de pepino anterior, presentes en los sacos de perlita antes de realizar el ensayo, determinaron que el CGMMV estaba presente en todas ellas.
- En los ensayos realizados en maceta con suelo solarizado con y sin humedad, las plantas emergidas presentaron un porcentaje de infección por CGMMV del 50% y 30% respectivamente, siendo más efectiva la solarización sin humedad pero sin llegar a inactivar por completo el virus.
- Ninguno de los tratamientos de solarización realizados en los sacos de perlita resultó totalmente efectivo para inactivar el virus en los restos vegetales aunque la solarización de los sacos de perlita en seco a 45°C durante 3 meses fue con el que se obtuvieron peores resultados, puesto que el porcentaje de infección de las plantas fue del 100%.
- Por todo ello, ninguno de los tratamientos de solarización evaluados ni en suelo ni en sustrato artificial, fueron efectivos para inactivar la partícula viral presente en ellos.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Ainsworth, G., 1935. Mosaic diseases of cucumber. *Annals of Applied Biology*, 22(1), 55-67.
- Ali, A., Natsuaki, T. y Okuda, S., 2004. Identification and molecular characterization of viruses infecting cucurbits in Pakistan. *Journal of Phytopathology*, 134, 152-156.
- Al-Shahwan, I. y Abdalla, O., 1992. A strain of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) from bottlegourd in Saudi Arabia. *Journal of Phytopathology*, 134, 152-156.
- Amer, M.A., 2015. Biological and molecular characterization of *Cucumber green mottle mosaic virus* affecting bottle gourd and watermelon plants in Saudi Arabia. *International Journal of Agriculture and Botany*, 17, 748-754
- Antignus, Y., Pearlsman, M., Ben-Yoseph, R. y Cohen, S., 1990. Occurrence of a variant of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Israel. *Phytoparasitica*, 80, 50-56.
- Avgelis, A. y Manios, V., 1992. Elimination of Cucumber green mottle mosaic tobamovirus by composting infected cucumber residues. *Acta horticultrae*, 302, 311-314.
- Beltrano, J. y Gimenez, D. O., 2015. Cultivo en hidroponía. Editorial: Universidad de la Plata. Bueno Aires, Argentina. 182 pp
- Bisognin, D. A., 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciencia Rural*, 32. On line: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000400028>.
- Boubourakas, I. N., Hatziloukas, E., Antignus, Y. y Katis, N. I., 2004. Etiology of leaf chlorosis and deterioration of the fruit interior of watermelon plants. *Journal of Phytopathology*, 152, 580-588.
- Budzanivska, I. G., Rudnea, T.O., Shevchenko, T. P., Boubriak, I., Polischu, V.P., 2007. Investigation of Ukrainian isolate of *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 40, 376-380.
- CC. RR. Solponiente, 2015. Solarización. [En línea] Available at: <http://elhocino-adra.blogspot.com.es/search?q=solarizaci%C3%B3n> [Último acceso: 13 noviembre 2017].
- Celix, A., Luis-Arteaga, M. y Rodriguez-Cerezo, E., 1996. First report of Cucumber green mottle mosaic tobamovirus infecting greenhouse-grown cucumber in Spain. *Plant Disease*, 80 (11), 1303.
- Cervantes, M. Á., 2015. [En línea] Available at: <https://fitosofia.blogspot.com.es/2015/04/cultivo-en-perlita.html> [Último acceso: 12 noviembre 2017].
- Chen, H-Y., Bai, J., Zhu, S-F., Zhao, W-J. y Li, M-F. 2006. Sequence analysis of the CP gene and its 3' noncoding region of a watermelon Liaoning isolate of *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Virologica Sinica*, 21, 516-518.

- Dombrovsky, A., Tran-Nguyen, L. y Jones, R., 2017. *Cucumber green mottle mosaic virus*: Rapidly Increasing Global Distribution, Etiology, Epidemiology and Management. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 231-256.. Elorrieta Jove, M. A., 2011. Virus transmitidos por contacto. *Labcolor*, 91, 25-28.
- Eroski consumer, 2011. Eroski Consumer. Hortalizas y Verduras. [En línea] Available at: <http://verduras.consumer.es/pepino/introduccion> [Último acceso: 5 noviembre 2017].
- Fernández Fernández, M.M., Aguilar Pérez, M.I., Carrique Pérez, J.R., Tortosa Domingo, J., García García, C., López Rodríguez, M. y Pérez Morales, J.M. 1998. Suelo y medio ambiente en invernaderos. Ed: Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Frápolli Daffari, E., Garijo Alba, C. y García García, E., 2000. La desinfección del suelo por energía solar (solarización), Colección Comunicaciones I+D 29/00. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. 24 pp.
- Fukuda, M., Meshi, T., Okada, Y., Otsuki, Y. y Takebe, I., 1981. Correlation between particle multiplicity and location on virion RNA of the assembly initiation site for viruses of *Tobacco mosaic virus* group. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 78, 4231-4235.
- Gergerich, R. y Dolja, V., 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. On line: DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01.
- Gómez Vázquez, J., 2008. La sanidad de los cultivos hortícolas sobre sustratos en el sur de España. Ed: Centro de Investigación y Formación Agraria de Almería (C.I.F.A.). Junta de Andalucía..
- Hollings, M., Komuro, Y. y Tochihara, H., 1975. *Cucumber green mottle mosaic virus*. Descriptions of Plant Viruses, 154. [En línea] Available at: <http://www.dpvweb.net/dpv/showadpv.php?dpvno=154>
- Hoyos Echevarría, P., 2007. Situación del injerto en horticultura en España: Especies, zonas de producción de planta, portainjertos. *Horticultura*, 199, 12-25..
- Infoagro, 2007 Infoagro. [En línea] Available at: http://www.infoagro.com/documentos/desinfeccion_suelos_agricolas.asp [Último acceso: 14 noviembre 2017].
- Innovagri, 2014. Eficacia de la biosolarización del suelo en el control de patógenos en cultivos enarenados. [En línea] Available at: <http://www.innovagri.es/hortícolas/eficacia-de-la-biosolarizacion-del-suelo-en-el-control-de-patogenos-en-cultivos-enarenados.html>. [Último acceso: 13 noviembre 2017].
- Inouye, T., Inoue, N., Asatani, M. y Mitsuata, K., 1967. Studies on *Cucumber green mottle mosaic virus* in Japan. *Nogaku Kenkyu*, 51, 175-186.
- Kim, S.M., Lee, J. M., Yim, K.O., Oh, M. H., Park, J.W. y Kim, K. H. (2003). Nucleotide sequences of two Korean isolates of *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Molecules and Cells*, 16, 407-412.

- Kim, O. K., Mitzutani, T., Natsuaki, K. T., Lee, K. W. y Soe, K. (2010). First report and genetic variability of *Cucumber green mottle mosaic virus* occurring on bottle gourd in Myanmar. *Journal of Phytopathology*, 158, 572-575.
- Laita, J., 1997. Tratamiento del suelo con Metam sodio. *Vida rural*, 57, 57-58.
- Lee, K. Y., Lee, B. C. y Park, H. C., 1990. Occurrence of *Cucumber green mottle mosaic virus* disease of watermelon in Korea. *Korean Journal of Plant Pathology*, 6, 250-255.
- Li, J. -X., Liu, S. -S. y Gu, Q. -S., 2015. Transmission Efficiency of *Cucumber green mottle mosaic virus* via Seeds, Soil, Pruning and Irrigation Water. *Journal of Phytopathology* 164, 300–309.
- Ling, K.-S., 2013. *Cucumber green mottle mosaic virus* infecting greenhouse cucumber in Canada. *Plant Disease.*, 98, 701-701.
- Liu, H. W., Luo, L. X., Li, J. Q., Liu, P. F., Chen, X. Y. y Hao, J. J. (2014). Pollen and seed transmission of *Cucumber green mottle mosaic virus* in cucumber. *Plant Pathology*, 63(1), 72-77.
- Luis-Arteaga, M., 1994. Virus del mosaico y moteado verde del pepino. *Cucumber green mottle mosaic virus*. CGMMV.. En (Díaz Ruiz, J. R., García Jiménez, J.) Enfermedades de las Cucurbitáceas en España. Monografías de la SEF 1:89.
- MacKenzie, D., McLean, M., Mukerji, S. y Green, M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcriptionpolymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81, 222-226.
- MAGRAMA, 2017. Ministerio De Agricultura Alimentación Medio Ambiente. Registro de Productos Fitosanitarios.
- Mandal, S., Mandal, B., Mohd, Q., Haq, R. y Varma, A. (2008). Properties, diagnosis and management of *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Plant Virus*, 2(1), 25-34.
- Mazuela, P., Salas, M. C. y Urrestarazu, M., 2005. Vegetable waste compost as substrate for melon. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36, 1557–1572.
- Melgarejo, P., García-Jiménez, J., Jordá, M. C., López, M. M., Andrés, M. F. y Duran-Vila, N. (2010). Patógenos de las plantas descritos en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, Spain.
- Newhall, A., 1955. Soil disinfestations of soil by heat, hot water, flooding and fumigation. *Botanical Review*, 21, 189-233.
- Pascual España, B., 2007. Riegos de gravedad y a presión. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Polischuck, V., Budzanivska, I., Shevchenko, T. y Oliynik, S., 2007. Evidence for plant viruses in the region of Argentina Islands, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 409-417.
- Pospieszny, H., Zielinska, L. y Cajza, M., 1997. New plant viruses in Poland. *Progress in Plant Protection*, 36, 244-249.

- Reingold, V., Lachman, O., Belausov, E., Koren, A., Mor, N. y Dombrov, A. 2015a. Epidemiological study of *Cucumber green mottle mosaic virus* in greenhouses enables reduction of disease damage in cucurbit production. *Annals of Applied Biology*, 168, 29-40.
- Reingold, V., Lachman, O., Blaosov, E. y Dombrosvsky, A., 2015b. Seed disinfection treatments do not sufficiently eliminate the infectivity of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) on cucurbit seeds. *Plant Pathology*, 64, 245-255.
- Rio, D. C., 2014. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Protocols 2014. 11: pbd-prot080887.
- Ruiz M.L, Simón A., García-García M.C., Pascual F. y Janssen D., 2004. Transmisión del virus del mosaico verde jaspeado del pepino en sustratos de cultivo. Almería. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera., 1-12. Formato digital (e-book) – (Área de Protección de Cultivos).
- Santamarina, M. P. y Roselló, J., 2009. Botánica Agrícola para el Medio Rural. Ed. Phytoma-España. 244 pp.
- Sastry, K. S., 2013. Seed-borne plant virus diseases. Springer Science & Business Media, India.. 343 pp..Sharma, A., Upadhyaya, P. y Tiwari, C., 1990. Phenolic contents of bottle gourd as influenced by the infection of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV).. *National Academy Science Letters*. 13, 115-116.
- Slavokhotova, A. A., Andreeva, E. N., Shijan, A. N., Odintsova, T. I., Pukhalskiji, V. A. (2007). Specifics of the coat protein gene in Russian strains of the *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Rusian Journal of Genetics*, 43, 1221- 1226.
- Sotrafa, 2014. Desinfección de suelos agrícolas mediante la utilización de plásticos especiales. [En línea] Available at: <http://sotrafa.com/documentos/Desinfeccion%20de%20suelos%20agricolas%20mediante%20la%20utilizacion%20de%20plasticos.pdf> [Último acceso: 13 noviembre 2017].
- Stapleton, J., DeVay, J. y Lear, B., 1990. Simulated and field effects of ammonia-based fertilizers and soil solarization on pathogens control, soil fertility and crop growth eds Proccedeengs. of the First International Conference on Soil Solarization, Ammam, Jordan, 19-25 February 1990. FAO, Plant Protection and Production Paper No.109. Rome, 1991.
- Stapleton, J., 1990. Physical effects of soil solarization-thermal inactivation of crop pests and pathogens and other soil changes caused by solarization. Proccedeengs. of the First International Conference on Soil Solarization, Ammam, Jordan, 19-25 February 1990. FAO, Plant Protection and Production.
- Tecnicoagricola, 2013. Tecnicoagricola. [En línea] Available at: <http://www.tecnicoagricola.es/desinfeccion-de-suelo-agricola-con-plasticos-solarizacion/> [Último acceso: 14 noviembre 2017].

- Tesoriero, L. A., Chambers, G., Srivastava, M., Smith, S., Conde, B. y Tran-Nguyen, L. T. T. (2016). First report of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Australia. *Australian Plant Disease Notes*, *11*, 1.
- Tian, T., Posis, K., Maroon-Lago, C. J., Mavrodieva, V., Haymes, S., Pitman, T. L., y Falk, B. W. (2014). First report of *Cucumber green mottle mosaic virus* on melon in the United States. *Plant Disease*, *98*(8), 1163-1163.
- Ugaki, M., Tomiyama, M., Kakutani, T., Hidaka, S., Kiguchi, T., Nagata, R. y Nishiguchi, M. (1991). The complete nucleotide sequence of *Cucumber green mottle mosaic virus* (SH strain) genomic RNA. *Journal of General Virology*, *72*(7), 1487-1495.
- Urrestarazu M., Mazuela P. C. y Martínez G. A. (2008). Effect of substrate reutilization on yield and properties of melon and tomato crops. *Journal of Plant Nutrition*, *31*(11), 2031–2043.
- Urrestarazu, 2015. Manual práctico del cultivo sin suelo e hidroponía. Ed. Mundi-Prensa. p. 278.
- Van Dorst, H., 1988. Surface water as source in the spread of *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, *36*, 291-299.
- Vani, S. y Varma, A., 1993. Properties of *Cucumber green mottle mosaic virus* isolated from water of river Jamuna. *Indian Phytopathology*, *46*, 118-122.
- Vasudeva, R., Raychaudhuri, S. y Singh, L., 1949. A new strain of Cucumis virus 2. *Indian Phytopathology*, *2*, 180-185.
- Vaveri, C., Vassilakos, N. y Bem, F., 2002. Characterization and detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Greece. *Phytoparasitica* *30*(5), 493-501.
- Velasco, L., 2015. Los virus en los cultivos hortícolas protegidos del sureste español desde una perspectiva histórica. [En línea] Available at: DOI. <http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/133293-virus-en-cultivos-hortícolas-protegidos-del-sureste-español-desde-perspectiva-histórica.html>. [Último acceso: 6 noviembre 2017].
- Wang, S. M. y Chen, M. J., 1985. A new strain of *Cucumber mottle mosaic virus* causing mosaic symptoms on bottlegourd in Taiwan, *Plant Protection Bulletin (Taiwan)*, *27*, 105-110.