

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y AGROAMBIENTAL



**“ESTUDIO DE LA GAMA DE HUÉSPEDES DEL VIRUS DEL
RIZADO DEL TOMATE DE NUEVA DELHI (*Tomato leaf curl
New Delhi virus, ToLCNDV*) EN CULTIVOS Y FLORA
ARVENSE DEL SURESTE ESPAÑOL”**

TRABAJO FIN DE GRADO

Septiembre - 2015

Autor: Bryan Pacheco Vinaroz

Tutor: Miguel Juárez Gómez

“ESTUDIO DE LA GAMA DE HUÉSPEDES DEL VIRUS DEL RIZADO DEL TOMATE DE NUEVA DELHI (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) EN CULTIVOS Y FLORA ARVENSE DEL SURESTE ESPAÑOL”

Desde la detección por primera vez del virus, *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) en 2013, se ha venido observando un paulatino incremento de los daños ocasionados por este virus en especies de cucurbitáceas cultivadas. El conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad es necesaria para el diseño de estrategias de prevención y control; para contribuir a ello, en este trabajo se ha planteado ampliar el conocimiento sobre la gama de huéspedes de ToLCNDV, centrando nuestra prospección en la flora arvense, cultivos hortícolas y en especies utilizadas en setos refugio de fauna auxiliar beneficiosa. El estudio se ha desarrollado durante la campaña 2014 muestreando parcelas de cultivos en donde la enfermedad se ha establecido. Las muestras se analizaron empleando la técnica ELISA y la Hibridación Molecular. En las plantas espontáneas analizadas se encontraron 3 nuevas especies reservorios de ToLCNDV, *Datura stramonium*, *Sonchus oleraceus* y *Ecballium elaterium*.

Palabras clave: ToLCNDV, tomate, cucurbitáceas, virus, flora arvense.

"THE HOST RANGE VIRUS TOMATO LEAF CURL NEW DELHI (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) STUDY IN CROPS AND WEEDS IN THE SOUTHEAST OF SPAIN"

Since the virus first time detection, *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) in 2013, a gradual increase in the damage caused by this virus in cucurbit species cultivated has been observed. The epidemiology knowledge of this disease is required for the design of prevention and control strategies; in order to contribute to this objective, the presented work aims to increase the knowledge of the range of ToLCNDV, focusing our prospecting on weeds, vegetable crops and species used in hedges auxiliary beneficial wildlife. The study has been developed during the 2014 campaign sampling plots of crops where the disease has been established. The samples were analyzed using the ELISA and the Molecular Hybridization. In the weeds analyzed were found 3 new species reservoirs of ToLCNDV, *Datura stramonium*, *Sonchus oleraceus* and *Ecballium elaterium*.

Keywords: ToLCNDV, tomato, cucurbit, virus, weeds.

Este Trabajo Fin de Grado ha sido realizado en el marco del Proyecto de Investigación INIA N^o: E_RTA-2013-00020-C04-02.



Gracias a Miguel por todo lo que me ha enseñado y transmitido durante la realización de este trabajo, además de por el interés y el tiempo que ha invertido en mí.

A mis amigos y familia por apoyarme durante todo mi transcurso universitario.

A todos mis profesores por todo lo impartido y transmitido.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 ANTECEDENTES	11
1.2 ToLCNDV.....	13
1.2.1 ORIGEN, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA E IMPORTANCIA	13
1.2.2 TAXONOMÍA.....	14
1.2.3 TRANSMISIÓN	17
1.2.4 SINTOMATOLOGÍA	18
1.2.4.1 CALABACÍN	18
1.2.4.2 MELÓN.....	23
1.2.4.3 CALABAZA TIPO CACAHUETE.....	25
1.2.4.4 PEPINO.....	26
1.2.5 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	27
1.2.6 MEDIDAS DE CONTROL	28
1.2.6.1 MEDIDAS DE CARÁCTER FITOSANITARIO	30
1.2.6.2 MEDIDAS DE CARÁCTER ESTRUCTURAL.....	31
1.2.6.3 MEDIDAS DE CARÁCTER HIGIÉNICO	31
1.2.6.1 MEDIDAS DE CONTROL MEDIANTE OBTENCIÓN DE CULTIVARES RESISTENTES.....	33
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAL Y MÉTODOS	38
3.1 MUESTREOS DE CAMPO	38
3.1.1 MUESTREOS DE ESPECIES ARVENSES Y CULTIVADAS PRESENTES EN LAS ZONAS DE CULTIVO DE CUCURBITÁCEAS Y EN ZONAS COLINDANTES O CERCANAS A ESTAS... 38	
3.1.2 MUESTREOS EN ESPECIES HERBÁCEAS Y AROMÁTICAS DE SETOS ESTABLECIDOS COMO RESERVORIO DE FAUNA AUXILIAR EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS..... 40	
3.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	43
3.2.1 DIAGNÓSTICO MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR (HM).....	43
3.2.2 DIAGNÓSTICO MEDIANTE ELISA.....	47

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PLANTAS ARVENSES	54
4.2 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PLANTAS CULTIVADAS	58
4.3 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PLANTAS HERBÁCEAS Y AROMÁTICAS UTILIZADAS EN SETOS REFUGIO DE FAUNA AUXILIAR.....	59
4.4 DISCUSIÓN GENERAL.....	62
5. CONCLUSIONES	66
6. BIBLIOGRAFÍA	69



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I: Distribución mundial de ToLCNDV.	13
Figura II: Tipos de Begomovirus..	14
Figura III: Organización genómica de ToLCNDV..	15
Figura IV: Órganos de <i>Bemisia tabaci</i> donde se detecta el virus y el movimiento de los begomovirus en el interior del vector.....	18
Figura V: Esquema general de la Hibridación Molecular.	46



ÍNDICE DE FOTOS

Ilustración 1: Planta de calabacín con infección temprana y síntomas de rizado y amarilleo en hojas jóvenes.....	19
Ilustración 2: Planta de calabacín con detención del crecimiento debido a una infección de ToLCNDV.....	19
Ilustración 3: Planta de calabacín con síntomas de clorosis internervial.....	20
Ilustración 4: Hoja de planta de calabacín totalmente desarrollada con clorosis internervial...	20
Ilustración 5: Hoja de planta de calabacín totalmente desarrollada con un mosaico suave y abullonamientos.	21
Ilustración 6: Planta de calabacín desarrollada en invernadero con deformación foliar hacia el haz.	21
Ilustración 7: Planta de calabacín desarrollada en campo al aire libre con deformación foliar hacia el envés.	22
Ilustración 8: Fruto de calabacín con protuberancias.....	22
Ilustración 9: Planta de melón tipo Galia con síntomas de ToLCNDV.....	23
Ilustración 10: Planta de melón tipo piel de sapo con síntomas de mosaico en hojas.	24
Ilustración 11: Planta de melón con entrenudos cortos de los tallos.....	24
Ilustración 12: Fruto de melón con brechas producidas por ToLCNDV.	25
Ilustración 13: Planta de calabaza tipo cacahuete con síntomas en hojas.	25
Ilustración 14: Planta de calabaza tipo cacahuete con entrenudos cortos de tallos.....	26
Ilustración 15: Planta de pepino con síntomas de mosaico en hojas.	26
Ilustración 16: Planta de pepino infestada con parada de crecimiento.	27
Ilustración 17: Finca con presencia de setos al fondo de la imagen.....	41
Ilustración 18: Tissue-Print, y resultado de la membrana tras el revelado.	44
Ilustración 19: Politrón, triturador de muestras.	48

Ilustración 20: Pocillos con la muestra problema.	49
Ilustración 21: Placa ELISA con pocillos con muestra positiva coloreada y espectrofotómetro Titertek Multiskan MCC/340.	51
Ilustración 22: <i>Ecballium elaterium</i> con síntomas de clorosis.	55
Ilustración 23: <i>Solanum nigrum</i> con síntomas de clorosis y acucharamiento.	56
Ilustración 24: <i>Datura stramonium</i> con síntomas de clorosis y abullonamientos.	56
Ilustración 25: <i>Sonchus oleraceus</i> con síntomas de clorosis y reducción del crecimiento.	57



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Especies arvenses muestreadas Campo de Cartagena.....	39
Tabla 2: Especies cultivadas muestreadas Campo de Cartagena.....	40
Tabla 3: Especies herbáceas muestreadas Torreblanca (IMIDA) Torre Pacheco	41
Tabla 4: Especies aromáticas muestreadas Torreblanca (IMIDA) Torre Pacheco.....	42
Tabla 5: Especies herbáceas muestreadas CIFEA (Torre Pacheco)	42
Tabla 6: Especies aromáticas muestreadas CIFEA (Torre Pacheco)	42
Tabla 7: Especies herbáceas muestreadas IMIDA La Alberca (Murcia)	43
Tabla 8: Especies aromáticas muestreadas IMIDA La Alberca (Murcia)	43
Tabla 9: Especies arvenses analizadas Campo de Cartagena.....	54
Tabla 10: Especies cultivadas analizadas Campo de Cartagena.....	58
Tabla 11: Especies herbáceas analizadas Torreblanca (IMIDA) Torre Pacheco	59
Tabla 12: Especies aromáticas analizadas Torreblanca (IMIDA) Torre Pacheco	60
Tabla 13: Especies herbáceas analizadas CIFEA (Torre Pacheco)	60
Tabla 14: Especies aromáticas analizadas CIFEA (Torre Pacheco)	60
Tabla 15: Especies herbáceas analizadas IMIDA La Alberca (Murcia).....	61
Tabla 16: Especies aromáticas analizadas IMIDA La Alberca (Murcia)	61



1. INTRODUCCIÓN.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

La horticultura intensiva genera una gran actividad económica en nuestro país. Entre las hortalizas más importantes destacan las que pertenecen a la familia de las Cucurbitáceas (melón, calabacín, sandía, pepino, calabaza), tanto por la superficie dedicada a su cultivo como por el valor económico de su producción. Solo en Andalucía y Murcia, la superficie cultivada es de 37.202 ha (MAGRAMA, 2012) y la producción total es de casi dos millones de toneladas (1.990.781 t) (MAGRAMA, 2012).

La producción intensiva de hortalizas afronta constantemente nuevos problemas, siendo uno de los principales las enfermedades producidas por virus. Las virosis inciden de forma cada vez más grave en el valor final de la producción y en la rentabilidad de los cultivos; así, en algunas zonas geográficas han llegado a convertirse en el principal factor limitante del cultivo. De particular importancia son los problemas causados por virosis emergentes. En estos casos, la identificación del patógeno supone el primer reto, la evaluación del riesgo potencial el segundo, y la puesta a punto de medidas de control de emergencia el tercero. Un ejemplo reciente de la mayor importancia se ha desarrollado en las últimas dos campañas en cultivos de cucurbitáceas del Sureste español con la introducción del virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi, *Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV.

Así, durante el año 2012, empezaron a observarse síntomas de una nueva enfermedad viral en calabacín, al aire libre y en invernadero, en la comarca de Campo de Cartagena. Estos síntomas incluían el rizado de las hojas jóvenes, la aparición de amarilleo muy intenso, detención del crecimiento de las plantas afectadas y rizadura suave en la piel del fruto joven. Durante el verano de 2013 este síndrome se extendió a otras parcelas, afectando también a cultivos tardíos de melón, causando problemas

de la mayor gravedad y generando una enorme inquietud en el sector productor de melón, agravadas por la falta de información respecto a la posible epidemiología de este virus, y el posible riesgo de ataque a otros cultivos de la familia de las solanáceas como pimiento, tomate, etc.

El grupo de Patología Vegetal del CEBAS-CSIC/UMH identificó y caracterizó parcialmente el nuevo geminivirus responsable del síndrome descrito. Se trataba de una cepa de *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), un virus estrechamente relacionado con el bien conocido virus del rizado amarillo del tomate (o virus de la cuchara) (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV). Entre el grupo de Patología Vegetal CEBAS-CSIC/UMH y técnicos del laboratorio de producción y sanidad vegetal de Almería, ToLCNDV se ha detectado en muestras de distintas especies de hortalizas, como pepino, calabaza, melón, y pimiento, además de calabacín. Desde su primera detección, la incidencia del virus se ha incrementado de forma aparentemente exponencial, llegando a afectar durante el mes de noviembre de 2013, a todos los términos municipales del poniente Almeriense, de la Comarca del Campo de Cartagena de Murcia y sur de la provincia de Alicante. La incidencia fue cercana al 100 % en las plantaciones de calabacín que estaban iniciando el cultivo y la recolección, y algo menos en plantaciones que están en plena recolección. En esas mismas fechas la situación no fue tan grave en cultivos en invernadero en Almería, donde el porcentaje de invernaderos con infección fue de aproximadamente el 20% (JUNTA DE ANDALUCIA, 2013).

La situación actual ya se puede describir como muy grave, y las previsiones no hacen sino reforzar esta visión. Atendiendo a un conjunto de parámetros que pueden servir para evaluar el riesgo epidemiológico de un patógeno, ToLCNDV debería incluirse entre los de alto o muy alto riesgo para algunos de los cultivos hortícolas.

1.2 ToLCNDV

1.2.1 ORIGEN, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA E IMPORTANCIA

Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) es el principal patógeno de tomate en la India (Varma y Malathi, 2003; Varma et al., 2011). Se describió por primera vez en 1995 en aquel país como una variante del complejo de virus causante del rizado amarillo de la hoja (Hussain et al., 2004).

Es un virus de la familia *Geminiviridae* y del género *Begomovirus*, en principio geográficamente confinado al subcontinente indio, pero que ha ido expandiéndose hacia otras zonas de Asia, como Pakistán (Hussein., 2004), Tailandia (Ito et al., 2008), Bangladesh (Maruthi et al., 2005; Fauquet et al., 2008), Indonesia (Mizutani et al., 2011) y China (Chang et al., 2010).

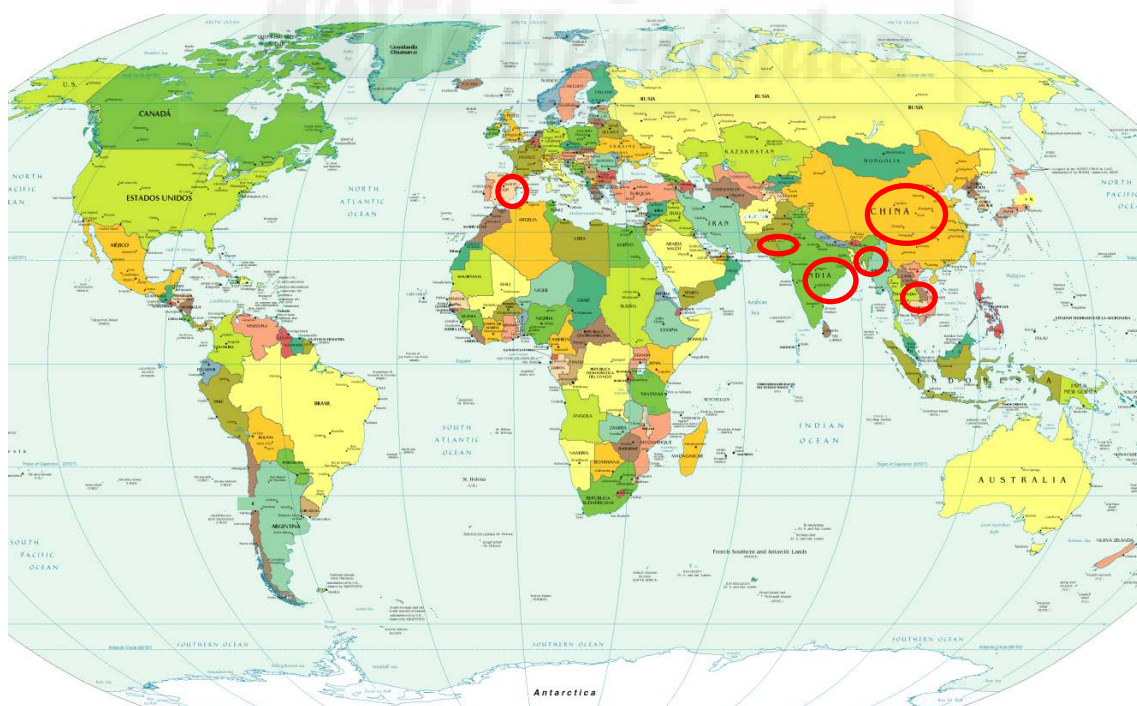


Figura I: Distribución mundial de ToLCNDV.

No solamente se ha encontrado en los principales cultivos de Solanáceas, como tomate (Padidam et al., 1995), pimiento (Hussain et al., 2004), y patata (Usharani et al., 2004), y en especies adventicias de la familia, como *Solanum nigrum*, sino también, más recientemente, en algunos cultivos de la familia de las Cucurbitáceas, como *Momordica charantia*, (Tahir et al., 2005), cultivos de los géneros *Cucumis*, como pepino o melón, *Citrullus* y *Cucurbita*, sandía y calabazas, y otros géneros *Sechium*, *Luffa*, *Lagenaria* y *Cucurbita* (Muniyappa et al., 2003; Mandal et al., 2004; Ito et al., 2008; Saha et al., 2013).

1.2.2 TAXONOMÍA

La familia *Geminiviridae* es un caso singular entre los virus vegetales. El genoma de la mayoría de los virus que afectan a nuestros cultivos está formado por ARN (ácido ribonucleico), pero sin embargo los viriones icosaédricos geminados de los geminivirus encierran un genoma compuesto por una hebra circular de ADN (ácido desoxiribonucleico) de cadena simple. Debido a este hecho muestran características únicas entre los virus vegetales, pues el ADN viral ha de migrar hasta los núcleos celulares para poder transcribirse y replicarse. Dentro de la familia se engloban 4 géneros (*Topocuvirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus* y *Begomovirus*), pero es el género *Begomovirus* el que engloba la mayoría de los virus fitopatógenos que afectan a los cultivos hortícolas.

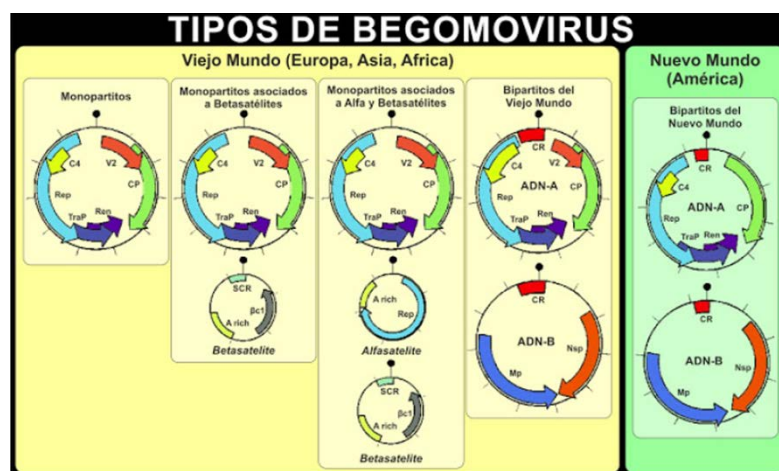


Figura II: Tipos de Begomovirus. Fuente: (Homo Agrícola, 2013)

Algunos begomovirus tienen un genoma compuesto de una sola hebra de ADN, que codifica todas las proteínas necesarias para que el virus infecte a la planta y muestre síntomas; estos begomovirus "autosuficientes" se denominan begomovirus monopartitos (los que teníamos en España son de este tipo). Sin embargo, otros begomovirus no son tan autosuficientes y para infectar a su huésped requieren la presencia de un betasatélite, que no es otra cosa que otra pequeña cadena de ADN que se encapsula por separado y es, por tanto, exterior al genoma viral; a éstos se les denomina begomovirus monopartitos asociados a betasatélites. En otros aparecen además del betasatélite, otras pequeñas hebras de ADN denominadas alfasatélites (también encapsuladas aparte en pequeños viriones) de las que aún no se tiene clara su función; son los denominados begomovirus monopartitos asociados a alfa y betasatélites (Figura II).

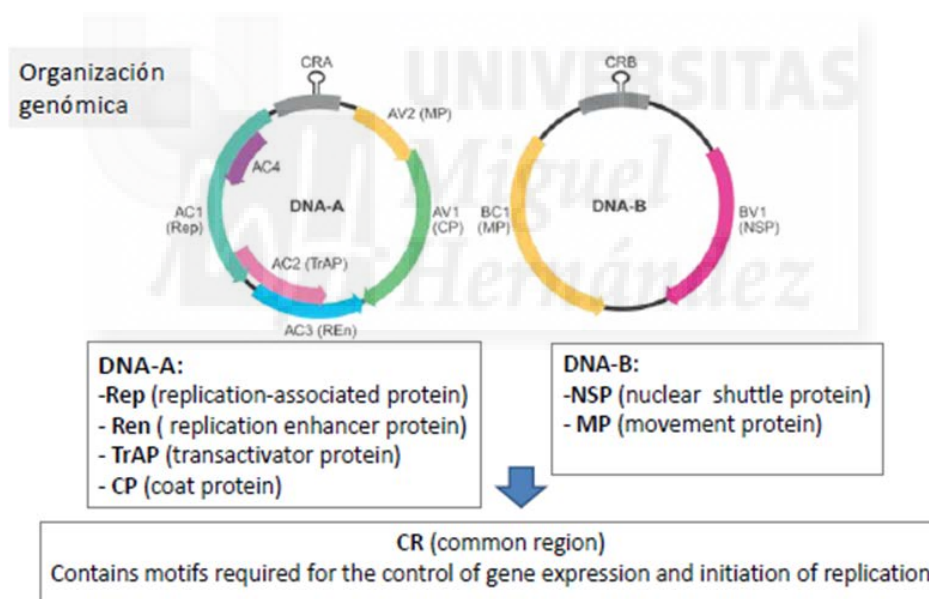


Figura III: Organización genómica de ToLCNDV. Fuente: (Dirk Janssen, 2015).

ToLCNDV tiene un genoma de DNA circular de cadena sencilla que consta de dos componentes, el DNA A y el DNA B, cada uno de 2,5 a 2,8 kb de tamaño. Los dos componentes genómicos comparten una región conservada denominada región común o región intergénica, y codifican las proteínas virales (Padidam et al., 1995).

Además de estos dos componentes genómicos, se ha demostrado que al menos algunos aislados de ToLCNDV tienen asociados DNAs satélites de cadena sencilla, circulares, de aproximadamente 1,3 kb, denominados DNA β o betasatélites. Los betasatélites dependen de los DNAs A y B para su replicación y contienen una secuencia conservada, pero por lo demás son distintos de los DNAs A y B y codifican una única proteína. Es destacable que estos betasatélites tienen propiedades importantes relacionadas con la determinación de la gravedad de síntomas y, quizá, de la gama de huéspedes (Jyothsna et al., 2013). Aparte de su relevancia epidemiológica, ToLCNDV ha sido utilizado en algunas ocasiones como modelo experimental para analizar ciertos aspectos clave de la biología de begomovirus, destacando estudios sobre la respuesta del huésped a la infección por el virus y análisis sobre la triple interacción entre DNAs A, B y beta-satélites (Jyothsna et al., 2013).

En una colaboración realizada entre el grupo de Patología Vegetal del CEBAS-CSIC/UMH y los investigadores de la Estación Experimental “La Mayora”-CSIC (Málaga), se extrajo DNA a partir de muestras de calabacín infectadas recogidas en Murcia y en Almería, que se utilizaron para la amplificación por círculo rodante del genoma completo del virus. Se seleccionaron dos muestras de Murcia (MU-8.1, MU-11.1) y una de Almería (AL-661) para clonar los DNAs A y B. Los genomas clonados exhibieron la organización típica de begomovirus bipartitos del Viejo Mundo. Las secuencias fueron alineadas con secuencias de begomovirus disponibles en las bases de datos. Las secuencias del DNA A obtenidas a partir de muestras de Murcia (2.738 nucleótidos) y de Almería (2.738 nucleótidos también) eran prácticamente iguales (> 99 % de identidad), con el mayor parecido (91,3 a 91,5 % de identidad) con un aislado indio de ToLCNDV. Las secuencias del DNA B obtenidas a partir de muestras de Murcia y Almería también eran prácticamente iguales (> 99 % de identidad de nucleótidos), y mostraron la identidad de nucleótidos más alta (83,1 a 83,3 %) con un aislado paquistaní de ToLCNDV. Por el momento, no se han detectado la presencia de betasatélites en muestras españolas, aunque este es un aspecto que todavía se ha estudiado con poca profundidad.

1.2.3 TRANSMISIÓN

Al igual que los demás begomovirus, ToLCNDV es transmitido en condiciones naturales a través de la mosca blanca del tabaco, *Bemisia tabaco*, y dicha transmisión ocurre de manera persistente y circulativa (Hull, 2004); (Navas-Castillo et al., 2011). Esto es: los estados inmaduros y adultos de *Bemisia tabaci*, cuando se alimentan de plantas enfermas pueden succionar begomovirus; así el insecto adquiere el patógeno y tras un periodo de latencia se da una circulación efectiva del virus hasta las glándulas salivares de la boca del insecto, desde donde puede transmitirlo a una planta sana en procesos de alimentación de 15 minutos. Además, el virus puede tener tiempos de persistencia en el insecto muy largos, de más de 20 días, coincidiendo con aproximadamente la duración de vida de un adulto de *Bemisia tabaci*. La eficiencia de transmisión de ToLCNDV por un adulto de *Bemisia tabaci* parece ser muy alta: recientemente se han descrito ratios de 90% de infección en *Luffa* utilizando 1 adulto de mosca blanca (Sohrab, et al, 2013), mientras que estudios realizados en IFAPA (La Mojonera) encontraron ratios de 95% de infección en calabacín (1 mosca por planta). Estos ratios son bastante mayores a los encontrados para el virus de cuchara en tomate, que van de un 40 a un 50 % (Lapidot et al., 2001). Respecto al vector *Bemisia tabaci*, conviene recordar que actualmente es considerado un complejo de especies entre las cuales hay algunas consideradas invasoras, ya que tienen un amplio rango de plantas huésped, una alta capacidad de adaptarse a cambios y pesticidas. Entre ellas están las conocidas actualmente como MEAM1 (anteriormente Biotipo B) y MED (biotipo Q). Es esta última la que ha sido asociada más con la distribución de virus tales como *Tomato yellow leaf curl sardinia virus* (TYLCSV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) o *Tomato chlorosis virus* (ToCV) en tomate, *Bean yellow disorder virus* (BYDV) en judía, y *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) y *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) en cucurbitáceas.

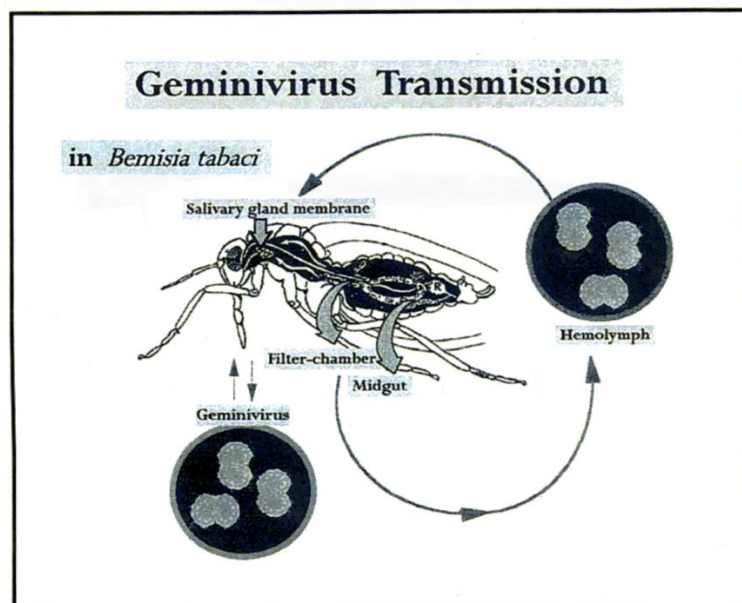


Figura IV: Órganos de *Bemisia tabaci* donde se detecta el virus y el movimiento de los begomovirus en el interior del vector.

Fuente: (Hunter et al., 1998)

Los begomovirus no se transmiten por contacto o por rozamiento entre plantas. Para evaluar el riesgo de infección durante labores de manejo del cultivo, se ha intentado transmitir el virus en plántulas de pimiento mediante rozamiento con hojas de calabacín infectado. Pero éstos y otros experimentos en este sentido no han permitido reproducir la enfermedad en las plantas inoculadas, y por tanto no se tienen indicios de que esto pudiera ocurrir en el campo. Tampoco está descrita su transmisión por semilla. Así, las fuentes de inóculo y reservorios serán las plantas infectadas, así como algunas plantas silvestres, otros cultivos y los restos de cultivo abandonados.

1.2.4 SINTOMATOLOGÍA

1.2.4.1 CALABACÍN

El calabacín, cultivo donde parece que la incidencia es mayor, parece también que es el cultivo donde muestra mayor virulencia. En ellos si la infección es temprana (entre 1 y 2 semanas de edad), aparece un fuerte rizado y amarilleo en las hojas jóvenes, lo cual puede parecer una infestación incipiente por pulgones. En este

estadio, las plantas detienen su crecimiento y la infección no deja a las plantas evolucionar, así que es imposible que la planta pueda llegar a dar frutos.



Ilustración 1: Planta de calabacín con infección temprana y síntomas de rizado y amarilleo en hojas jóvenes.



Ilustración 2: Planta de calabacín con detención del crecimiento debido a una infección de ToLCNDV.

En plantas que ya pasan a tener entre 2 y 3 semanas de edad, se producen unas clorosis y deformaciones en brotes y hojas, además de una clorosis internervial que a veces pueden evolucionar a un mosaico con abullonado.



Ilustración 3: Planta de calabacín con síntomas de clorosis internervial.

En plantas ya totalmente desarrolladas, vuelven a aparecer en una fase inicial de la infección una clorosis internervial, pasando a ser un mosaico con suave abullonado en una fase más avanzada de la infección.



Ilustración 4: Hoja de planta de calabacín totalmente desarrollada con clorosis internervial.



Ilustración 5: Hoja de planta de calabacín totalmente desarrollada con un mosaico suave y abullonamientos.

En plantas desarrolladas en invernadero, se suele dar una deformación foliar hacia el haz o “acucharamiento”. Mientras que en las plantas desarrolladas en cultivo al aire libre, la deformación foliar suele ser hacia el envés, acompañada de deformaciones varias.



Ilustración 6: Planta de calabacín desarrollada en invernadero con deformación foliar hacia el haz.



Ilustración 7: Planta de calabacín desarrollada en campo al aire libre con deformación foliar hacia el envés.

Y en los frutos de plantas desarrolladas, se produce un rizado suave de la piel, con unas suaves protuberancias en los frutos más desarrollados, o incluso deformaciones o rajados.



Ilustración 8: Fruto de calabacín con protuberancias.

1.2.4.2 MELÓN

En melones de tipo Galia, los síntomas son unas clorosis y deformaciones de las hojas, además de que los entrenudos de los tallos se forman más cortos de lo normal. También se produce una reducción del rendimiento de la planta, en mayor o menor medida dependiendo del grado de infestación.



Ilustración 9: Planta de melón tipo Galia con síntomas de ToLCNDV.

En los melones del tipo piel de sapo, los síntomas son similares, con la aparición de mosaicos con cierto abullonado en las hojas, además de clorosis y deformaciones en estas. Se producen también entrenudos cortos de los tallos y una disminución del rendimiento. Además, es posible la aparición en el fruto de unas pequeñas brechas o un pequeño rajado.



Ilustración 10: Planta de melón tipo piel de sapo con síntomas de mosaico en hojas.



Ilustración 11: Planta de melón con entrenudos cortos de los tallos.



Ilustración 12: Fruto de melón con brechas producidas por ToLCNDV.

1.2.4.3 CALABAZA TIPO CACAHUETE

En las calabazas de tipo cacahuete se producen síntomas en forma de clorosis y mosaicos jaspeados en las hojas, teniendo también el síntoma de entrenudos cortos de tallos.



Ilustración 13: Planta de calabaza tipo cacahuete con síntomas en hojas.



Ilustración 14: Planta de calabaza tipo cacañete con entrenudos cortos de tallos.

1.2.4.4 PEPINO

En pepino, los síntomas parecen más leves, y estos son mosaicos y deformaciones en hojas, acompañados de una parada del crecimiento.



Ilustración 15: Planta de pepino con síntomas de mosaico en hojas.



Ilustración 16: Planta de pepino infestada con parada de crecimiento.

1.2.5 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Existen diversas herramientas para el diagnóstico de este virus. Como la proteína de la cápsida de los begomovirus está muy conservada, los antisueros generados contra otros begomovirus suelen reconocer a este. Así, los antisueros comerciales para detectar el virus de la cuchara, para *Squash leaf curl virus* (SLCV) y para *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) detectan bien a este grupo, aunque no permiten discriminar entre ToLCNDV y otras especies de begomovirus. Recientemente la casa comercial DSMZ, comercializa un antisuero policlonal obtenido a partir de un aislado de ToLCNDV obtenido en calabacín y de origen español.

Una PCR seguida por el corte del fragmento de DNA por un enzima de restricción específico fue el primer método que dio el mejor resultado en nuestros laboratorios. Partiendo de plantas de campo con síntomas como los descritos más arriba, se prepararon unos extractos de DNA que se emplearon para hacer PCRs

utilizando cebadores genéricos para amplificar un fragmento del gen de la proteína de la cápsida de geminivirus. Se obtuvieron productos de amplificación por PCR en todos los casos, indicando que las muestras estaban infectadas por un geminivirus. Los fragmentos de DNA amplificados fueron secuenciados, y las secuencias que se obtuvieron tenían una similitud nucleotídica del 97% con secuencias de un aislado de ToLCNDV de la India que, aparentemente, está causando allí una enfermedad grave en pepino que denominan yellow leaf crumple (rizado amarillo de la hoja). La similitud nucleotídica de nuestro aislado de ToLCNDV es menor con otros aislados del virus, todos procedentes y caracterizados en India o en el oriente lejano, pero se sitúa entre el 90% y el 95%. Esta detección fue la primera que se hizo de ToLCNDV en España.

También se disponen en varios laboratorios de investigación de nuestro País de sondas frías específicas que permiten determinar la presencia de este virus mediante hibridación molecular.

1.2.6 MEDIDAS DE CONTROL

En la actualidad, el ToLCNDV supone un factor limitante del cultivo de muchas cucurbitáceas, calabacín, melón, pepino y calabazas en distintos países asiáticos (Ito et al., 2008). La reciente detección del ToLCNDV en nuestro país en cultivos de cucurbitáceas ha disparado la alerta y la necesidad de desarrollar rápidamente estrategias eficientes de control. Un mejor conocimiento de la epidemiología, rango de plantas huésped y la transmisión, proporcionará información importante para orientar a los productores sobre las prácticas culturales a utilizar.

Ya que la presencia de ToLCNDV en España es muy reciente, todavía no hay mucha experiencia en el control de este virus. Sin embargo, existe un historial extenso de virus transmitidos por mosca blanca en cultivos de invernadero, y hay mucha experiencia acumulada con diferentes estrategias de control de estos virus, de la cual

se deduce que sin duda la mejor opción para el control es mediante estrategias de control integrado del vector, *Bemisia tabaci*, y así minimizar la incidencia del virus.

Métodos únicamente basados en químicos de síntesis para el control de virus e insectos vectores eran habituales en el pasado pero llevaron a la aparición de poblaciones de vectores resistentes, y por tanto, hicieron ineficaz esta estrategia. Ha sido la creciente exigencia del mercado para hortícolas libres de residuos y la entrada en el año 2000 en el sur de España del virus de las venas amarillas del pepino, *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) también transmitido por mosca blanca, lo que ha puesto en evidencia la absoluta necesidad de un cambio radical en la forma de hacer protección de cultivos.

Como primera medida se estableció la obligación de instalar mallas anti-insectos en las ventanas laterales y cenitales para excluir la entrada del vector, así como la instalación de dobles puertas de entrada. Ya en los 90, los productores de tomate consiguieron un mejor control del virus del rizado amarillo del tomate, el virus de la cuchara, tras hermetizar sus invernaderos.

Ahora que estamos ante un virus similar al de la cuchara, pero transmitido con aún más eficiencia por la mosca blanca, evitar que los vectores entren en los invernaderos y se acerquen a los cultivos, a través de una buena hermeticidad del invernadero, se considera un factor primordial y un condicionante muy a tener en cuenta, especialmente en las plantaciones venideras de cucurbitáceas donde las condiciones climáticas incidirán en un aumento de la presencia y actividad del vector y por consiguiente, de los riesgos de transmisión de virus.

Otra de las medidas tomadas tras la dispersión del virus de las venas amarillas del pepino, redundó en aspectos de higiene en toda la actividad agrícola, tanto dentro como fuera de los invernaderos, desde antes de iniciar la siembra hasta después de finalizar los cultivos. La eliminación de potenciales focos de insectos vectores y de

virus era igualmente fundamental para conseguir un mejor control. Finalmente, la aplicación de control integrado utilizando el control biológico, a partir de 2007, significó un antes y después en el control de insectos vectores de virus en hortalizas de Almería. El uso de organismos como *Eretmocerus mundus*, *Nesidiocoris tenuis* y *Amblyseius swirskii*, y de fitosanitarios respetuosos con la fauna auxiliar, produjo un cambio radical en la incidencia de virus en la mayoría de los cultivos.

Por tanto, también en el caso de un virus como el ToLCNDV, transmitido con tanta eficiencia por la mosca blanca, el control tiene que ser efectivo y sostenible. Y sin duda se conseguirá mediante un control integrado haciendo uso de medidas fitosanitarias, estructurales e higiénicas (JUNTA DE ANDALUCÍA, 2014).

1.2.6.1 MEDIDAS DE CARÁCTER FITOSANITARIO

- Hace falta controlar las poblaciones de mosca blanca de manera que se minimice en todo momento la presencia del insecto, bien mediante un control biológico continuo eficaz, bien mediante tratamientos químicos respetuosos con auxiliares, conjuntamente con el uso de todas aquellas prácticas culturales que ayuden a reducir el vector, como el uso de trampas cromotrópicas. En caso de tratamientos químicos, hay que alternar las aplicaciones con productos de distintos grupos químicos.
- Utilizar de manera masiva las trampas cromotrópicas para seguimiento y captura del insecto vector, previo incluso, al momento de la plantación.
- Todo material vegetal procedente de semillero, ha de estar sano y libre del vector, y estar provisto de su correspondiente pasaporte fitosanitario.

1.2.6.2 MEDIDAS DE CARÁCTER ESTRUCTURAL

- La estructura del invernadero debe mantener una hermeticidad completa que impida el paso de insectos vectores.
- Las mallas instaladas en las bandas laterales y cenitales del invernadero deben tener una densidad mínima que impida la entrada del insecto vector (preferible 10 x 20 hilos/cm² o superior). Los faldones tienen que ser enterrados en bandas para evitar corrientes de aire. Es aconsejable instalar una manta térmica por el perímetro o por todo el invernadero, bien sellada al suelo y encima del tejido de alambre.
- Es imprescindible y obligatoria la colocación de una doble puerta, o puerta y malla en las entradas del invernadero y un uso correcto de las mismas.
- Se debe colocar una manta térmica sobre el cultivo libre del vector, desde el inicio hasta que agronómicamente sea recomendable retirarla.

1.2.6.3 MEDIDAS DE CARÁCTER HIGIÉNICO

- Antes de la siembra hay que eliminar todos los restos del cultivo anterior así como de las malas hierbas.
- Cuando el cultivo precedente haya tenido problemas por virus, hay que tratar la estructura, sobre todo en estructuras de palos e invernaderos viejos, y donde se cultivan repetidamente cultivos de las mismas familias botánicas. En este caso podría ser importante utilizar insecticidas específicos.
- También antes de la siembra y continuando después de la siembra, se deben colocar trampas cromotrópicas (200-300 trampas/ha). Se recomienda colocar rollos amarillos adhesivos en el perímetro y bajo los puntos de ventilación.

- Se debería vigilar directamente la presencia de mosca blanca, y vigilar por si ocurren efectos colaterales sobre organismos auxiliares como *Nesidiocoris* o *Eretmocerus*.
- Es importante proteger bien la planta durante su transporte desde el semillero. Si hay riesgo de contaminación, se debe aplicar un tratamiento sobre la bandeja con productos sistémicos y autorizados.
- La malla térmica colocada sobre las plántulas después de la siembra debe tener un ancho mínimo de 1 metro, lo que permite mantener la planta aislada durante al menos tres semanas. Lo ideal sería que fuese en forma de tunelillo, procurando enterrar bien la manta en sus bordes. Esto permite mantener el cultivo aislado durante más tiempo, de manera que la planta vegeta mejor y se producen menos riesgos fitosanitarios.
- La manta también puede entrañar algunos riesgos: puede causar una deformación de las hojas, aumentar la condensación de humedad sobre las mismas, y provocar más enfermedades. En caso de que sea necesario, hay que dar un tratamiento vía riego con productos autorizados. También se puede aplicar azufre (25-30 kg/ha) como repelente fuera del túnel, lo que genera un ambiente hostil para las plagas.
- Al retirar la manta térmica es el momento de realizar sueltas de organismos de control biológico, pero antes hay que hacer una valoración de la presencia de *Bemisia tabaci*, y/o si hay indicios (síntomas) de ToLCNDV. En caso afirmativo hay que aplicar un tratamiento específico. Se condiciona a la suelta de auxiliares el plazo de seguridad para los organismos de control biológico. Como organismos se puede utilizar *Amblyseius swirskii* en sobres (100-125 ind/cm²), a un ratio de 1 sobre/2 plantas, incluyendo refuerzos en las zonas más expuestas (ventanas, bandas, puertas, etc.)

- Una vez instalado el cultivo, si aparece el virus en forma de plantas sintomáticas, se deben arrancar y eliminar inmediatamente las que han sido afectadas por el virus desde el inicio del cultivo, mediante un embolsado y deshidratación, con entrega a un gestor autorizado de residuos vegetales. Posteriormente, según criterio técnico, y en función del virus específico y su presencia, se debe proceder a la eliminación de las plantas mediante transporte en camiones o contenedores cerrados, a los centros de tratamiento de residuos vegetales. En caso de plantas afectadas por virus transmitidos por insectos vectores se tratarán con insecticidas antes de su retirada de la parcela.
- En general, se tienen que intensificar las medidas de limpieza de restos vegetales y malas hierbas en el invernadero y alrededores, dejando más de 1 metro de perímetro limpio de malas hierbas.
- Si al finalizar el cultivo, éste está limpio, se podrá eliminar conforme a la normativa. Si está afectado por virus, hay que aplicar un tratamiento con productos respetuosos para controlar el vector y eliminar los restos vegetales correctamente.

1.2.6.1 MEDIDAS DE CONTROL MEDIANTE OBTENCIÓN DE CULTIVARES RESISTENTES

Una de las herramientas principales de cualquier estrategia de control frente virus la constituyen los cultivares resistentes. La disponibilidad de herramientas genéticas y genómicas para llevar a cabo una mejora moderna y eficiente en Cucurbitáceas se ha incrementado enormemente en los últimos años.

Dado que el calabacín ha resultado ser el cultivo que más ha sufrido por ToLCNDV, será este cultivo el que más requiera de dicha herramienta. Hasta el momento los principales problemas de virus en los cultivos de esta familia eran debido a especies de *Tobamovirus*, *Cucumovirus* y *Potyvirus* (Ferriol y Pico, 2008; Pitrat, 2008),

contra los cuales se ha identificado resistencia en distintos taxones de cada una de las especies. Por ejemplo en melón, las fuentes de resistencia fundamentalmente se encuentran en tipos exóticos de la India o Lejano oriente, pertenecientes a la subespecie *agrestis*, en calabacín (*C. pepo*) se han identificado resistencias en otras especies, cultivadas y silvestres, como *C. moschata* o *C. ecuadorensis*, y en sandía, las especies relacionadas *Citrullus colocynthis* o la variedad *citroides* de *C. lannatus* son también fuentes de genes de resistencia. Es necesario el cribado de grandes colecciones de germoplasma, incluyendo esta variabilidad que ha proporcionado resistencias a otras virosis para identificar las variantes naturales que confieren resistencia a esta nueva virosis.

Por otro lado, el calabacín también es huésped de otros virus transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, como el virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas, (CYSDV) o el virus de las venas amarillas del pepino (CVYV). Sin embargo, nunca se han valorado adecuadamente las pérdidas por estos virus, y quizás por esto no se han desarrollado y comercializado cultivares de calabacín resistentes a virus transmitidos por mosca blanca. Ahora, con la entrada de ToLCNDV en el sureste de España, cabe esperar que se inviertan recursos en la búsqueda de fuentes de resistencia y el desarrollo de nuevos cultivares resistentes a este begomovirus.



2. OBJETIVOS.

2. OBJETIVOS

Debido a la reciente aparición del virus del rizado del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) transmitido por *Bemisia tabaci*, y motivado por la incipiente actividad de este y la falta de conocimiento de su comportamiento epidemiológico en las parcelas de cultivos de cucurbitáceas en España, se ha planteado en el presente trabajo ampliar el conocimiento sobre la gama de huéspedes de ToLCNDV. Se ha centrado nuestra prospección en la flora arvensis y otros cultivos hortícolas que pueden actuar como reservorios en la zona del Sureste peninsular; además, se van a estudiar otras especies de plantas herbáceas y aromáticas que presentan interés para su utilización en la formación de setos refugio de fauna auxiliar beneficiosa para el control biológico de plagas. Esto nos permitirá conocer si algunas de estas especies presentan riesgo de actuar como reservorios de ToLCNDV.

Para contribuir a ello, en este trabajo hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1) Estudio de la presencia de ToLCNDV en especies arvenses y cultivadas presentes en las zonas de cultivo de cucurbitáceas y en zonas colindantes o cercanas a estas.
- 2) Estudio de la presencia de ToLCNDV en especies herbáceas y aromáticas de setos establecidos en parcelas de melón situadas en tres zonas de cultivo.



3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MUESTREOS DE CAMPO

La toma de muestras en campo se realizaba al azar en las parcelas seleccionadas para el muestreo, y de cada especie se elegían plantas con algún tipo de sintomatología tipo virosis (clorosis, amarilleo, mosaico, falta de desarrollo, etc.) y otras asintomáticas. Las especies de calabacín, melón, calabaza y pepino se tomaron de aquellas plantas que presentaban la sintomatología característica conocida (descrita en la introducción).

Las muestras se recogían teniendo la precaución de que posteriormente en laboratorio permitiese la correcta identificación. Se guardaban en bolsas etiquetadas y se introducían en neveras portátiles, conservándose a 4°C durante el transporte y hasta su procesado final en el laboratorio.

3.1.1 MUESTREOS DE ESPECIES ARVENSES Y CULTIVADAS PRESENTES EN LAS ZONAS DE CULTIVO DE CUCURBITÁCEAS Y EN ZONAS COLINDANTES O CERCANAS A ESTAS

El estudio de las especies arvenses se ha desarrollado muestreando durante la campaña verano-otoño de 2014 en tres parcelas de cultivo de calabacín con incidencia de ToLCNDV. Estas parcelas se eligieron al azar en tres zonas de la Comarca de Campo de Cartagena (Fuente Álamo, Pozo Estrecho y Balsicas).

Tabla 1: Especies arvenses muestreadas Campo de Cartagena

Especies arvenses	Familia	Nombre común	Nº de muestras
<i>Abutilon theophrasti</i> Medicus	<i>Malvaceae</i>	Malvisco de la India	8
<i>Malva</i> spp.	<i>Malvaceae</i>	Malva	8
<i>Amaranthus blitoides</i> S. Wats.	<i>Amaranthaceae</i>	Taramayo	18
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	<i>Amaranthaceae</i>	Amaranto	6
<i>Datura stramonium</i> L.	<i>Solanaceae</i>	Estramonio	6
<i>Cardaria draba</i> (L.) Desv.	<i>Brassicaceae</i>	Draba	9
<i>Chenopodium album</i> L.	<i>Chenopodiaceae</i>	Cenizo	12
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Margarita	6
<i>Chenopodium murale</i> L.	<i>Chenopodiaceae</i>	Salado	10
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	<i>Convolvulaceae</i>	Corregüela	3
<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.	<i>Cucurbitaceae</i>	Pepinillo del diablo	18
<i>Echium plantagineum</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Lengua de vaca	5
<i>Erodium chium</i> (L.) Willd.	<i>Geraniaceae</i>	Alfilerillo	3
<i>Heliotropium europaeum</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Heliotropio	12
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	<i>Solanaceae</i>	Gandul	14
<i>Moricandia arvensis</i> (L.) DC.	<i>Brassicaceae</i>	Moricandia	5
<i>Portulaca oleracea</i> L.	<i>Portulacaceae</i>	Verdolaga	4
<i>Senecio vulgaris</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Hierba cana	8
<i>Sinapis arvensis</i> L.	<i>Brassicaceae</i>	Mostaza silvestre	5
<i>Solanum nigrum</i> L.	<i>Solanaceae</i>	Tomatito del diablo	11
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Cerraja	16
<i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronq.	<i>Asteraceae</i>	Pinillo	7
<i>Urtica urens</i> L.	<i>Urticaceae</i>	Ortiga	6
<i>Setaria viridis</i> (L.) P. Beauv.	<i>Poaceae</i>	Serriche	3

El muestreo de las especies cultivadas se ha desarrollado durante la campaña de 2014 en 36 parcelas ubicadas en 23 localidades distribuidas a lo largo de la Comarca de Campo de Cartagena. En estos cultivos se detectó la presencia de *Bemisia tabaci*, y estaban situadas en áreas cercanas a cultivos sensibles a ToLCNDV (Calabacín, Melón y Calabaza) en donde se había determinado una incidencia (entre 10-80 %) de infección debida a ToLCNDV. Estas parcelas se eligieron al azar. Todas las muestras se han analizado mediante sondas de hibridación molecular en la modalidad de Tissue-Print.

Tabla 2: Especies cultivadas muestreadas Campo de Cartagena

Especies cultivadas	Familia	Nombre común	Nº muestras
<i>Apium graveolens</i> L.	Apiaceae	Apio	6
<i>Capsicum annum</i> L.	Solanaceae	Pimiento	36
<i>Cucurbita pepo</i> L.	Cucurbitaceae	Calabacín	48
<i>Cucurbita moschata</i> Britt	Cucurbitaceae	Calabaza	28
<i>Cucumis melo</i> L.	Cucurbitaceae	Melón	96
<i>Citrullus lunatus</i> L.	Cucurbitaceae	Sandía	43
<i>Cucumis sativus</i> L.	Cucurbitaceae	Pepino	24
<i>Lactuca sativa</i> L.	Asteraceae	Lechuga	7
<i>Phaseolus vulgare</i> L.	Leguminosae	Judía	9
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Solanaceae	Tomate	46
<i>Solanum melongena</i> L.	Solanaceae	Berenjena	37
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Solanaceae	Patata	16
<i>Vicia faba</i> L.	Fabaceae	Haba	12

3.1.2 MUESTREOS EN ESPECIES HERBÁCEAS Y AROMÁTICAS DE SETOS ESTABLECIDOS COMO RESERVORIO DE FAUNA AUXILIAR EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS.

Aprovechando nuestra colaboración en un experimento desarrollado en un Proyecto de Investigación INIA, titulado “Estrategias para el control biológico de plagas en los cultivos de melón en el sur de España” dirigido por el Dr. Juan Antonio Sánchez Sánchez en el IMIDA (Murcia), se realizaron muestreos de especies de plantas utilizadas en setos de refugio para la fauna auxiliar beneficiosa en el control de plagas de melón, y así poder averiguar si estas especies pueden comportarse como reservorios de ToLCNDV.

Estos setos estaban situados en un margen de distintas parcelas, y ubicadas en 3 zonas: en la finca de la estación experimental de Torreblanca (IMIDA) en Torre Pacheco, en la finca experimental de CIFEА (Torre Pacheco) y en la finca experimental del IMIDA en La Alberca (Murcia). En cada finca se muestrearon dos setos, uno formado por especies herbáceas y otro de especies aromáticas. Se recogieron dos

muestras por especie de planta, en cada uno de los setos. En este caso, las plantas fueron analizadas frente a ToLCNDV con antisueros comerciales de la casa DSMZ.



Ilustración 17: Finca con presencia de setos al fondo de la imagen.

A continuación se muestran en una serie de tablas las muestras recogidas.

Tabla 3: Especies herbáceas muestreadas Torreblanca (IMIDA) Torre Pacheco

Especies herbáceas	Familia	Nombre común	Nº de plantas
<i>Salvia verbenaca</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Salvia	2
<i>Silene vulgaris</i> (Moench.) Garcke	<i>Caryophyllaceae</i>	Colleja	2
<i>Borago officinalis</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Borraja	2
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Manzanilla	2
<i>Vicia sativa</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Veza	2
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Mirabeles	2
<i>Echium vulgare</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Viborera	2
<i>Solanum nigrum</i> L.	<i>Solanaceae</i>	Tomatito del diablo	2
<i>Malva</i> spp.	<i>Malvaceae</i>	Malva	2

Tabla 4: Especies aromáticas muestreadas Torreblanca (IMIDA) Torre Pacheco

Especies aromáticas	Familia	Nombre común	Nº de plantas
<i>Lavandula dentata</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Lavanda	2
<i>Lavandula stoechas</i> Lam.	<i>Lamiaceae</i>	Cantueso	2
<i>Phlomis purpurea</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Matagallos	2
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Santolina	2
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop.	<i>Fabaceae</i>	Bocha	2
<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Salvia	2
<i>Thymus mastichina</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Tomillo blanco	2
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Romero	2
<i>Ballota hirsuta</i> Benth.	<i>Lamiaceae</i>	Manrubio	2

Tabla 5: Especies herbáceas muestreadas CIFE A (Torre Pacheco)

Especies herbáceas	Familia	Nombre común	Nº de plantas
<i>Salvia verbenaca</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Salvia	2
<i>Silene vulgaris</i> (Moench.) Garcke	<i>Caryophyllaceae</i>	Colleja	2
<i>Borago officinalis</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Borraja	2
<i>Coriandrum sativum</i> L.	<i>Apiaceae</i>	Cilantro	2
<i>Vicia sativa</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Veza	2
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Mirabeles	2
<i>Echium vulgare</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Viborera	2
<i>Medicago sativa</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Alfalfa	2
<i>Melilotus sulcatus</i> Desf.	<i>Leguminosae</i>	Trébol de olor	2

Tabla 6: Especies aromáticas muestreadas CIFE A (Torre Pacheco)

Especies aromáticas	Familia	Nombre común	Nº de plantas
<i>Lavandula dentata</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Lavanda	2
<i>Lavandula stoechas</i> Lam.	<i>Lamiaceae</i>	Cantueso	2
<i>Phlomis purpurea</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Matagallos	2
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Santolina	2
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop.	<i>Fabaceae</i>	Bocha	2
<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Salvia	2
<i>Thymus mastichina</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Tomillo blanco	2
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Romero	2
<i>Ballota hirsuta</i> Benth.	<i>Lamiaceae</i>	Manrubio	2

Tabla 7: Especies herbáceas muestreadas IMIDA La Alberca (Murcia)

Especies herbáceas	Familia	Nombre común	Nº de plantas
<i>Vicia sativa</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Veza	2
<i>Silene vulgaris</i> (Moench.) Garcke	<i>Caryophyllaceae</i>	Colleja	2
<i>Borago officinalis</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Borraja	2
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Mirabeles	2
<i>Echium vulgare</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Viborera	2
<i>Medicago sativa</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Alfalfa	2
<i>Malva</i> spp.	<i>Malvaceae</i>	Malva	2

Tabla 8: Especies aromáticas muestreadas IMIDA La Alberca (Murcia)

Especies aromáticas	Familia	Nombre común	Nº de plantas
<i>Lavandula dentata</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Lavanda	2
<i>Lavandula stoechas</i> Lam.	<i>Lamiaceae</i>	Cantueso	2
<i>Phlomis purpurea</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Matagallo	2
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Santolina	2
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop.	<i>Fabaceae</i>	Bocha	2
<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Salvia	2
<i>Thymus mastichina</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Tomillo blanco	2
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Romero	2

3.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

3.2.1 DIAGNÓSTICO MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR (HM)

Después de cada muestreo, las plantas recogidas se procesaban en el laboratorio de Producción Vegetal, en la EPSO de la Universidad Miguel Hernández de Elche, lo más rápidamente posible. Dado que los agentes virales de ToLCNDV se encuentran con elevada concentración en el floema, la variante en el procesado de las muestras fue la modalidad de Tissue-Print y posteriormente se sometieron a la prueba de la Hibridación Molecular. Los virus que se encuentran en una concentración elevada en la savia permiten el uso de este sistema que es más sencillo y rápido, y no requiere una extracción compleja y laboriosa de los ácidos ribonucleicos totales como sucede para otros usos.

Preparación de las muestras para HM en la modalidad Tissue-Print:

Partiendo de cada muestra con síntomas, se prepararon improntas de secciones de tejidos efectuando un corte limpio sobre el tallo de la planta. Las cuchillas utilizadas se limpiaban con alcohol de 96º entre cada muestra, evitando así posibles contaminaciones entre ellas. Posteriormente las secciones resultantes del tallo se apoyaron en cuatro membranas de nylon independientes, quedando sobre las membranas las gotas de savia (Foto 17).

Una vez realizadas estas aplicaciones, se mantuvieron las membranas a temperatura ambiente hasta que se secaron, y posteriormente, se fijaron exponiendo las membranas a luz UV en un Cross Linker $X100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$. Siendo este paso el último antes de someterlas a la hibridación.

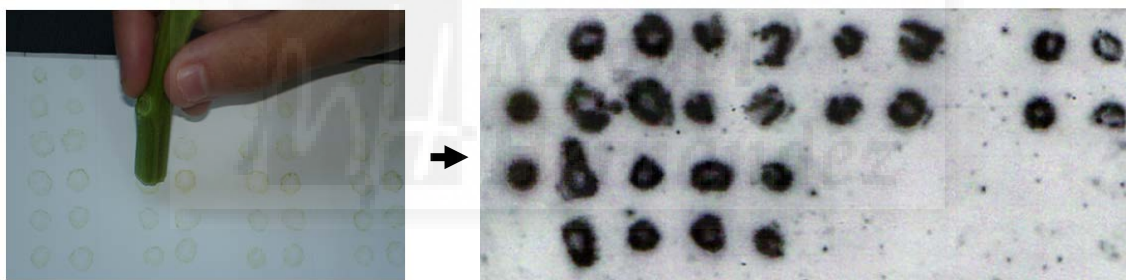


Ilustración 18: Tissue-Print, y resultado de la membrana tras el revelado.

Procesado de la membrana de nylon (HM):

La Hibridación Molecular se realizó de acuerdo al protocolo indicado por Marco *et al.* (2003) (Figura V):

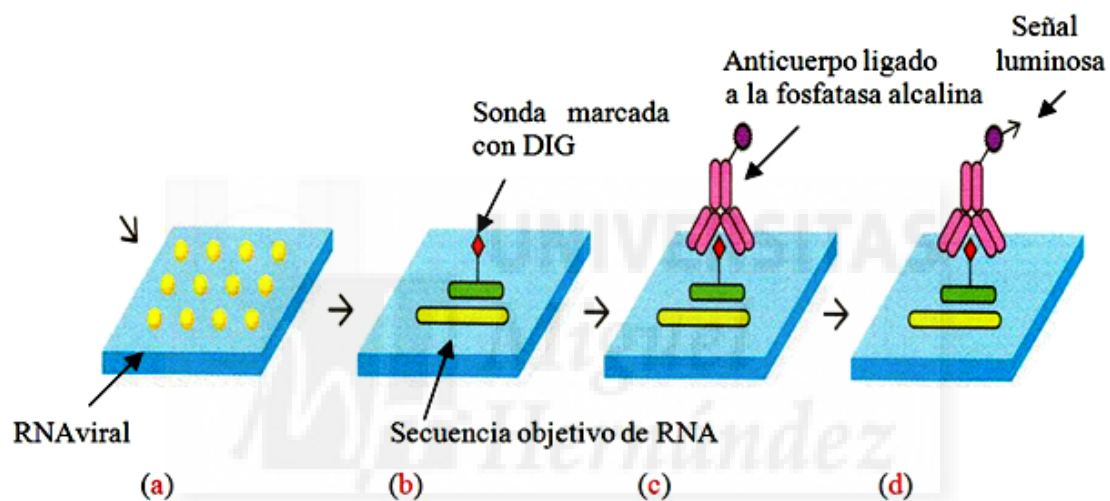
1. Para la prehibridación se empleó la solución para sondas de RNA (5XSSC, 2% Blocking reagent, 0,1% N-laurylsarcosine, 0,02% SDS, H₂O y 50%

formamida). Las membranas se prehibridaron durante 2 horas en un horno de hibridación a 68°C.

2. Pasado este tiempo, se añadió la sonda con RNA complementario a diversas regiones del genoma del virus que se pretende determinar, previamente desnaturalizada a 85-90°C durante 2-3 minutos, y se hibridaron durante toda la noche las membranas con la sonda marcada con digoxigenina (DIG).
3. Terminada la hibridación se realizaron sucesivos lavados, dos veces con una solución que contenía 2XSSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada vez, y dos veces con 0,1XSSC, 0,1% SDS a 68°C, durante 15 minutos cada vez.
4. Tras esto, las membranas se lavaron dos veces con el tampón lavado (0,1 M Ácido málico, 0,15 M NaCl, pH = 7,5 (ajustado con NaOH), 3% Tween 20) durante 5 minutos cada vez y después se incubaron 30 minutos en tampón de bloqueo (0,1 M Ácido málico, 0,15 M NaCl, pH = 7,5 (ajustado con NaOH), 1% Blocking reagent).
5. El antisuero Anti-DIG-AP, se diluyó 1:10000 en tampón de bloqueo y se incubaron las membranas en esta solución durante 30 minutos.
6. Pasado este tiempo se lavaron dos veces con el tampón de lavado durante 15 minutos cada vez.
7. Y finalmente, se equilibraron con el tampón de detección (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH = 9,5) durante 5 minutos.
8. La detección se realizó por quimioluminiscencia, para ello se incubaron las membranas durante 5 minutos en el sustrato CSPD a la dilución 1:100 en

tampón detección. El exceso de líquido se eliminó tanto como fue posible y las membranas se sellaron en una bolsa de plástico.

9. Finalmente, las membranas se expusieron a películas de autorradiografía durante distintos intervalos de tiempo. Las películas se revelaron, se lavaron con agua, se fijaron, se volvieron a lavar y se dejaron secar a temperatura ambiente.



- Se aplica el jugo de RNA viral en la membrana de nylon mediante Tissue-Print o Dot-Blot (a).
- Una vez fijo el RNA a la membrana (mediante la prehibridación), esta se cierra junto con la sonda fría marcada con digoxigenina (DIG) (1, 2 = b)*.
- Al final de la reacción de hibridación la DIG es detectada mediante un anticuerpo ligado a la fosfatasa alcalina (5 = c).
- Finalmente, tras incubar la membrana en el sustrato CSPD, éste sufre una defosforilación y produce una señal luminosa capaz de impresionar el film de auto-radiografía (8, 9 = d).

Figura V: Esquema general de la Hibridación Molecular

3.2.2 DIAGNÓSTICO MEDIANTE ELISA

Las muestras obtenidas en campo para detectar ToLCNDV procedentes de los setos refugio de fauna auxiliar se analizaron mediante serología, con el método ELISA-DAS (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay-Double Antibody Sandwich).

La técnica ELISA-DAS se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tienen actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar el anticuerpo marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte inmuno-absorbente, la reacción antígeno-anticuerpo queda inmovilizada. Tras la adición de un sustrato específico, la enzima actúa y produce un color cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

Preparación de las muestras:

Para evaluar las muestras en la prueba ELISA se preparaba un extracto de cada una de ellas, y de las plantas utilizadas como testigos positivos y negativos.

De cada una de las muestras se pesaba 0,5 g de material vegetal y se trituraban en 5 ml de tampón de extracción compuesto por PBS-tween +2 % polivinilpirrolidona. La trituración de la muestra se realizaba en bolsitas de plástico especiales mediante un politrón.



Ilustración 19: Politrón, triturador de muestras.

En la realización de todos los análisis se colocaban junto a las muestras tres tipos de testigos: El primer testigo, que actuaba como control positivo, era un extracto de planta infectada por el virus a analizar (ToLCNDV), el segundo testigo se trataba de extracto de planta sana que se empleaba como control negativo y, por último, se utilizó tampón de extracción (T.ext.= PBS-tween + 2% de polivinilpirrolidona) como tercer testigo.

Protocolo de la técnica ELISA:

Se siguió básicamente el método descrito por Clark y Adams (1977):

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar.
 - Como soporte sólido al que se inmovilizarán los anticuerpos de captura se emplean pocillos de poliestireno MaxiSorp con 96 pocillos de NUNC®.

- Se añaden 200 μl de “ γ -globulina” purificada, diluida en tampón carbonato 0,2 M, pH=9.6 llamado “buffer coating” o “tampón de tapizado”, en cada pocillo y se dejan incubar 3-4 horas a 37°C. en estufa.
- Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
 - Se extrae y se elimina la “ γ -globulina” no fijada o deficientemente fijada mediante tres lavados de los pocillos con tampón PBS pH=7,4, al que se le añade 0,05% de tween-20 (PBS-tween).
- Adición de la muestra problema, de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte.
 - Se añaden 200 μl del extracto de la muestra a analizar, y se deja la placa durante 18 horas a 4°C.

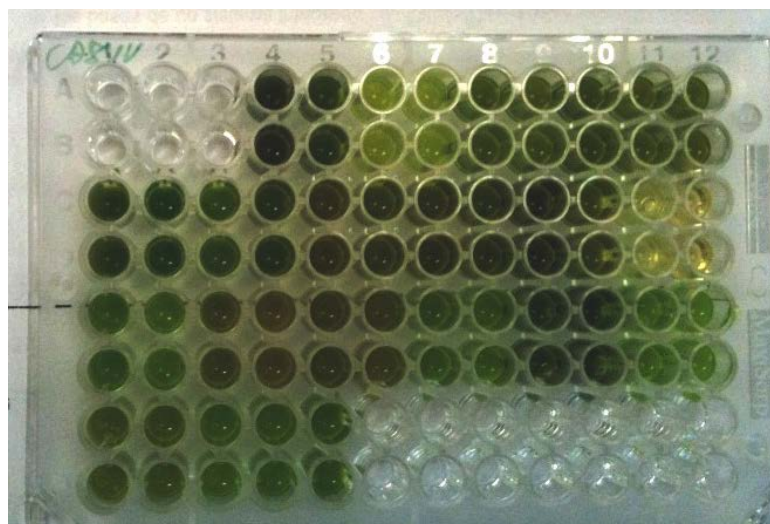


Ilustración 20: Pocillos con la muestra problema.

- Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
 - Se extraen de los pocillos las muestras y se lavan éstos tres veces con tampón de lavado (PBS-tween).

- Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte) conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos.
 - Para la detección de cada virus se utilizó su respectivo antisuero, cuya casa comercial se indica en la Tabla (V).
 - Se añaden 200 μ l por pocillo del conjugado “ γ -globulina-enzima”, diluido en PBS-tween más 2% de polivinilpirrolidona (tampón conjugado), y se incubó durante 3-4 horas en estufa a 37°C.

- Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
 - Se extrae el conjugado y se procede a realizar tres lavados como en apartados anteriores.

- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora.
 - Se añaden 200 μ l por pocillo de sustrato, constituido por una solución de 0,5 mg/ml de p-nitrofenil fosfato en tampón sustrato (pH=9,8).

- Lectura del producto final coloreado.
 - Las reacciones obtenidas en la placa se analizaron midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Titertek Multiskan MCC/340 a una longitud de onda de 405 nm. Esto se realizó a diferentes tiempos (15', 30' y 60'). Los resultados de cada muestra se consideraron como positivos cuando las medidas de la absorbancia tras su reacción con el sustrato eran superiores o iguales al doble de la absorbancia medida para los testigos sanos.



Ilustración 21: Placa ELISA con pocillos con muestra positiva coloreada y espectrofotómetro Titertek Multiskan MCC/340.

Composición de los tampones utilizados:

Tampón Recubrimiento.

- 1,59 g Na_2CO_3 + 2,93 g NaHCO_3 .
- Disolver en agua destilada y diluir a 1 l. Controlar pH (9,6).

Tampón Lavado.

- 8 g NaCl + 2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ + 1,15 Anhidrido + 0,2 g KH_2PO_4 + 0,2 g KCl + 0,5 ml Tween 20.
- Disolver en agua destilada y diluir a 1l. Controlar pH (7,2 – 7,4).

Tampón Extracción.

- 20 g Polyvinil Pirrolidona (viscosidad K10–K40), 2 g Albúmina de suero bovino, 0,1 g NaN_3 + 1 l Tampón Lavado.
- Disolver en agua destilada y diluir a 1 litro. Controlar pH (7,4).

Tampón Conjugado.

- 20 g Polyvinil Pirrolidona (viscosidad K10–K40), 2 g Albúmina de suero bovino, 0,1 g NaN_3 + 1 l. Tampón Lavado.
- Disolver en agua destilada y diluir a 1 l. Controlar pH (7,4).

Tampón Sustrato.

- 97 ml Diethanoloamino + 0,2 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$.

Solución Sustrato.

- 1 mg/ml 4- nitrofenil-fosfato en Tampón Sustrato.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PLANTAS ARVENSES

A continuación se muestran los resultados de los análisis de las especies arvenses mediante la técnica de la Hibridación Molecular, muestreadas en campo (Tabla 9).

Tabla 9: Especies arvenses analizadas Campo de Cartagena

Especies arvenses	Familia	Nombre común	Nº muestras positivas	Nº muestras
<i>Abutilon theophrasti</i> Medicus	<i>Malvaceae</i>	Malvisco de la India	0	8
<i>Malva</i> spp.	<i>Malvaceae</i>	Malva	0	8
<i>Amaranthus blitoides</i> S. Wats.	<i>Amaranthaceae</i>	Taramayo	0	18
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	<i>Amaranthaceae</i>	Amaranto	0	6
<i>Datura stramonium</i> L.	<i>Solanaceae</i>	Estramonio	4	6
<i>Cardaria draba</i> (L.) Desv.	<i>Brassicaceae</i>	Draba	0	9
<i>Chenopodium album</i> L.	<i>Chenopodiaceae</i>	Cenizo	0	12
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Margarita	0	6
<i>Chenopodium murale</i> L.	<i>Chenopodiaceae</i>	Salado	0	10
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	<i>Convolvulaceae</i>	Corregüela	0	3
<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.	<i>Cucurbitaceae</i>	Pepinillo del diablo	16	18
<i>Echium plantagineum</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Lengua de vaca	0	5
<i>Erodium chium</i> (L.) Willd.	<i>Geraniaceae</i>	Alfilerillo	0	3
<i>Heliotropium europaeum</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Heliotropio	0	12
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	<i>Solanaceae</i>	Gandul	0	14
<i>Moricandia arvensis</i> (L.) DC.	<i>Brassicaceae</i>	Moricandia	0	5
<i>Portulaca oleracea</i> L.	<i>Portulacaceae</i>	Verdolaga	0	4
<i>Senecio vulgaris</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Hierba cana	0	8
<i>Sinapis arvensis</i> L.	<i>Brassicaceae</i>	Mostaza silvestre	0	5
<i>Solanum nigrum</i> L.	<i>Solanaceae</i>	Tomatito del diablo	4	11
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Cerraja	2	16
<i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronq.	<i>Asteraceae</i>	Pinillo	0	7
<i>Urtica urens</i> L.	<i>Urticaceae</i>	Ortiga	0	6
<i>Setaria viridis</i> (L.) P. Beauv.	<i>Poaceae</i>	Serriche	0	3

Entre las especies arvenses muestreadas en campo y que resultaron positivas se encuentran: *Ecballium elaterium* (Foto 22), *Solanum nigrum* (Foto 23), *Datura estramonio* (Foto 24) y *Sonchus oleraceus* (Foto 25). De estas cuatro especies sólo *Solanum nigrum* ha sido citada como huésped de ToLCNDV en la India (Usharani et al, 2004). Las otras tres especies son muy frecuentes entre los cultivos hortícolas, al igual que el resto de especies analizadas, de ahí el interés de su estudio.



Ilustración 22: *Ecballium elaterium* con síntomas de clorosis.

Ecballium elaterium pertenece a la familia de las cucurbitáceas y por tanto cercana botánicamente a la mayoría de las especies cultivadas y sensibles a ToLCNDV. Es una planta arvense, perenne, muy vivaz y ampliamente establecida en nuestro entorno, y que probablemente puede desempeñar un papel importante como reservorio y fuente de inóculo del virus.



Ilustración 23: *Solanum nigrum* con síntomas de clorosis y acucharamiento.



Ilustración 24: *Datura stramonium* con síntomas de clorosis y abullonamientos.

Solanum nigrum y *Datura stramonium* son dos especies pertenecientes a la familia de las solanáceas, y estas plantas suelen colonizarse con facilidad por individuos de *Bemisia tabaci*. Esta preferencia o disposición para albergar tanto ToLCNDV y su vector *Bemisia tabaci* hace que sean plantas a ayuden a preservar y dispersar en los cultivos sensibles.



Ilustración 25: *Sonchus oleraceus* con síntomas de clorosis y reducción del crecimiento.

Otra especie que hemos encontrado como hospedante de ToLCNDV en condiciones naturales ha sido *Sonchus oleraceus*, 2 plantas entre 16 muestreadas. Dirk Janssen (2015) consigue transmitir *Sonchus oleraceus* ToLCNDV mediante *Bemisia tabaci* en experimentos realizados en condiciones controladas; también en los mismos experimentos consigue transmitir ToLCNDV a *Chenopodium murale*, *Sonchus oleraceus* y *Chenopodium murale* son dos especies de “malas hierbas” muy frecuentes y abundantes entre los cultivos hortícolas del entorno mediterráneo. Ambas especies, una asterácea y una quenopodiácea, respectivamente, están botánicamente alejadas a las especies hasta ahora conocidas y sensibles a ToLCNDV, las solanáceas y las cucurbitáceas. Esto pone de manifiesto que presenta capacidad infectar a huéspedes filogenéticamente distantes, y también nos pone en alerta del de la gran influencia que la flora arvense puede jugar en la epidemiología de ToLCNDV.

4.2 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PLANTAS CULTIVADAS

A continuación se presentan los resultados de los análisis mediante la técnica de la Hibridación Molecular muestreadas en diversas parcelas de cultivo de la Comarca de Campo de Cartagena (Tabla 10).

Tabla 10: Especies cultivadas analizadas Campo de Cartagena

Especies cultivadas	Familia	Nombre común	Nº muestras positivas	Nº muestras
<i>Apium graveolens</i> L.	<i>Apiaceae</i>	Apio	0	6
<i>Capsicum annum</i> L.	<i>Solanaceae</i>	Pimiento	0	36
<i>Cucurbita pepo</i> L.	<i>Cucurbitaceae</i>	Calabacín	48	48
<i>Cucurbita moschata</i> Britt	<i>Cucurbitaceae</i>	Calabaza	28	28
<i>Cucumis melo</i> L.	<i>Cucurbitaceae</i>	Melón	94	96
<i>Citrullus lunatus</i> L.	<i>Cucurbitaceae</i>	Sandía	0	43
<i>Cucumis sativus</i> L.	<i>Cucurbitaceae</i>	Pepino	24	24
<i>Lactuca sativa</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Lechuga	0	7
<i>Phaseolus vulgare</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Judía	0	9
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Solanaceae</i>	Tomate	9	46
<i>Solanum melongena</i> L.	<i>Solanaceae</i>	Berenjena	0	37
<i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Solanaceae</i>	Patata	0	16
<i>Vicia faba</i> L.	<i>Fabaceae</i>	Haba	0	12

De las especies calabacín (48), melón (96), calabaza (28) y pepino (24) casi el 100% resultaron estar infectadas por ToLCNDV. De las 43 muestras de sandía tomadas ninguna de ellas resultó estar infectada; en este caso, determinamos que 8 muestras de plantas de sandía eran procedentes de plantas injertadas en pie de calabaza, en donde este estaba infectado por el virus. Parece ser que en nuestras condiciones de cultivo ToLCNDV no es capaz de infectar a los cultivos de sandía. En otros experimentos y en condiciones controlas y mediante clones infecciosos de ToLCNDV se ha podido infectar plantas de sandía (Comunicación personal, Dirk Janssen).

De las especies cultivadas pertenecientes a la familia solanáceas, a excepción de la especie de tomate en ninguna de ellas se encontró ToLCNDV, a pesar de que en otras zonas de cultivo del ámbito mundial se ha encontrado en pimiento (Hussain et al, 2004), en berenjena (Pratap et al, 2011) y patata (Usharani et al, 2004). En nuestro caso las plantas de tomate que resultaron positivas (9 de 46), en 6 de ellas las plantas se comportaban como asintomáticas, y en los otros 3 casos se encontraron en infección mixta con TYLCV, presentando la sintomatología característica de esta virosis, enanismo, rizado con amarilleo de hoja y deformación de la hoja en “cuchara”.

En el resto de especies cultivadas analizadas como apio, judía y lechuga no se encontró ningún caso de infección a ToLCNDV.

4.3 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PLANTAS HERBÁCEAS Y AROMÁTICAS UTILIZADAS EN SETOS REFUGIO DE FAUNA AUXILIAR.

A continuación se muestran los resultados de los análisis mediante la técnica ELISA- DAS, de las especies herbáceas y aromáticas (Tablas 11-16).

Tabla 11: Especies herbáceas analizadas Torreblanca (IMIDA) Torre Pacheco

Especies herbáceas	Familia	Nombre común	Nº muestras positivas	Nº muestras
<i>Salvia verbenaca</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Salvia	0	2
<i>Silene vulgaris</i> (Moench.) Garcke	<i>Caryophyllaceae</i>	Colleja	0	2
<i>Borago officinalis</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Borraja	0	2
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Manzanilla	0	2
<i>Vicia sativa</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Veza	0	2
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Mirabeles	0	2
<i>Echium vulgare</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Viborera	0	2
<i>Solanum nigrum</i> L.	<i>Solanaceae</i>	Tomatito del diablo	0	2
<i>Malva</i> spp.	<i>Malvaceae</i>	Malva	0	2

Tabla 12: Especies aromáticas analizadas Torreblanca (IMIDA) Torre Pacheco

Especies aromáticas	Familia	Nombre común	Nº muestras positivas	Nº muestras
<i>Lavandula dentata</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Lavanda	0	2
<i>Lavandula stoechas</i> Lam.	<i>Lamiaceae</i>	Cantueso	0	2
<i>Phlomis purpurea</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Matagallo	0	2
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Santolina	0	2
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop.	<i>Fabaceae</i>	Bocha	0	2
<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Salvia	0	2
<i>Thymus mastichina</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Tomillo blanco	0	2
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Romero	0	2

Tabla 13: Especies herbáceas analizadas CIFE A (Torre Pacheco)

Especies herbáceas	Familia	Nombre común	Nº muestras positivas	Nº muestras
<i>Salvia verbenaca</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Salvia	0	2
<i>Silene vulgaris</i> (Moench.) Garcke	<i>Caryophyllaceae</i>	Colleja	0	2
<i>Borago officinalis</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Borraja	0	2
<i>Coriandrum sativum</i> L.	<i>Apiaceae</i>	Cilantro	0	2
<i>Vicia sativa</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Veza	0	2
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Mirabeles	0	2
<i>Echium vulgare</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Viborera	0	2
<i>Medicago sativa</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Alfalfa	0	2
<i>Melilotus sulcatus</i> Desf.	<i>Leguminosae</i>	Trébol de olor	0	2

Tabla 14: Especies aromáticas analizadas CIFE A (Torre Pacheco)

Especies aromáticas	Familia	Nombre común	Nº muestras positivas	Nº muestras
<i>Lavandula dentata</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Lavanda	0	2
<i>Lavandula stoechas</i> Lam.	<i>Lamiaceae</i>	Cantueso	0	2
<i>Phlomis purpurea</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Matagallo	0	2
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Santolina	0	2
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop.	<i>Fabaceae</i>	Bocha	0	2
<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Salvia	0	2
<i>Thymus mastichina</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Tomillo blanco	0	2
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Romero	0	2
<i>Ballota hirsuta</i> Benth.	<i>Lamiaceae</i>	Manrubio	0	2

Tabla 15: Especies herbáceas analizadas IMIDA La Alberca (Murcia)

Especies herbáceas	Familia	Nombre común	Nº muestras positivas	Nº muestras
<i>Vicia sativa</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Veza	0	2
<i>Silene vulgaris</i> (Moench.) Garcke	<i>Caryophyllaceae</i>	Colleja	0	2
<i>Borago officinalis</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Borraja	0	2
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Mirabeles	0	2
<i>Echium vulgare</i> L.	<i>Boraginaceae</i>	Viborera	0	2
<i>Medicago sativa</i> L.	<i>Leguminosae</i>	Alfalfa	0	2
<i>Malva</i> spp.	<i>Malvaceae</i>	Malva	0	2

Tabla 16: Especies aromáticas analizadas IMIDA La Alberca (Murcia)

Especies aromáticas	Familia	Nombre común	Nº muestras positivas	Nº muestras
<i>Lavandula dentata</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Lavanda	0	2
<i>Lavandula stoechas</i> Lam.	<i>Lamiaceae</i>	Cantueso	0	2
<i>Phlomis purpurea</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Matagallo	0	2
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Santolina	0	2
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop.	<i>Fabaceae</i>	Bocha	0	2
<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Salvia	0	2
<i>Thymus mastichina</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Tomillo blanco	0	2
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Romero	0	2

Como se observa en las tablas anteriores, en las especies de plantas procedentes de setos, tanto en las especies de herbáceas como en aromáticas, en ningún caso se detectaron plantas con infección a ToLCNDV. La utilización de estas especies en setos refugio de fauna auxiliar beneficiosa para controlar las plagas en los cultivos de melón, no presentan riesgo de crear reservorios y de favorecer a la dispersión de ToLCNDV. Del mismo modo sería interesante ser analizadas frente a otras virosis que pueden afectar a los cultivos de melón y otras cucurbitáceas como el virus del mosaico del pepino (CMV), virus del mosaico de la sandía (WMV), virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV), virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgón (CABYV), etc.

4.4 DISCUSIÓN GENERAL

Como ya hemos descrito en la introducción, ToLCNDV pertenece al género Begomovirus de la familia Geminiviridae, y tiene un genoma de DNA circular de cadena sencilla que consta de dos componentes, el DNA A y el DNA B, cada uno de aproximadamente 2,7 kp de tamaño. Además de estos dos componentes genómicos, se ha demostrado que al menos algunos aislados de ToLCNDV tienen asociados DNAs satélites de cadena sencilla, circulares, de aproximadamente 1,3 kb, denominados DNA β o betasatélites. En investigaciones acerca de estos betasatélites se ha visto que tienen propiedades importantes relacionadas con la determinación de la gravedad de síntomas y, quizá, de la gama de huéspedes (Jyothsna et al. 2013). La mutación y la recombinación se sabe que son mecanismos de generación de diversidad frecuentemente usados por geminivirus. Así, en el caso de ToLCNDV, la diversificación de cepas puede venir conferida por la mutación y recombinación de sus componentes genómicos pero, también, por la presencia o ausencia de beta-satélites y su mutación. Así pues, de este virus también es esperable una notable plasticidad genética que podría contribuir a incrementar su gama de huéspedes, o superar resistencias en otros nuevos huéspedes.

En las observaciones sobre este virus fuera de España, su gama de huéspedes parecía al principio esencialmente limitada a solanáceas, incluyendo tomate, pimiento (tipo chile), patata y berenjena, en donde causaba la enfermedad que nosotros conocemos como “cuchara”. Más adelante se observó que este virus también causaba una enfermedad responsable de graves pérdidas en cultivos de cucurbitáceas. Del mismo modo, a la gama de huéspedes inicialmente determinada hubo que añadir pepino, melón, calabaza, Luffa, y calabacín. En una publicación reciente, un grupo de investigación indio ha identificado una diferenciación de cepas según el huésped (solanáceas frente a cucurbitáceas) y también parece identificar una asociación prioritaria de tipos de betasatélites con las especies huéspedes (Jyothsna et al, 2013).

Con los estudios preliminares por parte de nuestro equipo se sugiere que los aislados españoles de ToLCNDV afectan esencialmente cucurbitáceas (calabacín, melón, pepino y calabaza). Sin embargo, con nuestro muestreo de plantas silvestres hemos determinado que otras familias pueden estar infectadas por el virus. Por tanto, la gama de huéspedes de ToLCNDV es supuestamente muy amplia, implicando la potencial existencia de fuente de inóculo abundante en el campo durante todo el año.

Las especies arvenses reservorios del virus encontradas en nuestro estudio han sido 4 entre 24 exploradas, una de ellas ya conocida en otras zonas de cultivo, *Solanum nigrum*. Sin embargo, cabe señalar el importante papel que pueden jugar estas especies reservorio como fuentes de inóculo al estar ampliamente extendidas entre la flora espontánea de nuestro entorno, solapando sus ciclos con los diferentes ciclos de cultivo de cucurbitáceas. También hemos observado, que aunque el rango de huéspedes determinado hasta ahora no es muy amplio en número de especies, sí que es muy diverso en cuanto a la distancia filogenética extendida entre las 4 familias botánicas (cucurbitáceas, solanáceas, asteráceas y quenopodiáceas).

Por consiguiente, los cultivos de cucurbitáceas en la actualidad y en el entorno mediterráneo se enfrentan a una situación de riesgo, un tanto incierta debido a esta nueva virosis, a la que de momento tenemos que enfrentarnos con los métodos clásicos de prevención y control, diseñando estrategias de control integrado en el que se compatibilicen las medidas culturales, las de control biológico y control químico. Otra vía de prevención y control que todavía está por desarrollar, incluye el manejo de cultivares genéticamente resistentes, aunque todavía no tenemos constancia de que existan variedades comerciales con estas características.

Claramente es oportuno señalar que es necesario continuar los estudios relativos a esta enfermedad inducida por ToLCNDV, con nuevos estudios de carácter epidemiológico en los que se incluyan además de la identificación de posibles nuevos hospedantes, la determinación de la posible variabilidad genética del virus en campo.

En este sentido nuestro equipo lleva iniciada una línea de investigación que partiendo de una colección de aislados que se ha obtenido en los muestreos de campo, se están analizando mediante la secuenciación completa de los DNAs A, B y beta-satélites de un conjunto representativo de aislados del virus. Se elegirá un subconjunto de muestras que se considere representativo de la potencial variabilidad presente en el conjunto total, conteniendo números equilibrados de muestras procedentes de distintas especies de huéspedes (incluyendo huéspedes de especies arvenses) y de distintos orígenes geográficos.





5. CONCLUSIONES.

5. CONCLUSIONES

Con el desarrollo de nuestros trabajos en muestreos en campo y análisis de la presencia de ToLCNDV en diversas especies de plantas, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

- Se han encontrado 4 hospedantes de ToLCNDV en plantas arvenses en las zonas de cultivo de Campo de Cartagena *Ecballium elaterium*, *Datura stramonium*, *Sonchus oleraceus* y *Solanun nigrum*.
- *Ecballium elaterium*, una planta arvense, perenne, muy vivaz y ampliamente establecida en nuestro entorno, probablemente esté desempeñando un papel predominante como reservorio y fuente de inóculo del virus.
- *Datura stramonium*, *Sonchus oleraceus* y *Solanun nigrum*, son especies que se encuentran frecuentemente colonizadas por poblaciones de *Bemisia tabaci* y pueden estar implicadas de forma importante en la persistencia y difusión de ToLCNDV en las zonas de cultivo.
- Las especies reservorios del virus encontradas, 4 de entre 24, no han sido muchas, pero su distancia filogenética es diversa distribuyéndose entre 3 familias botánicas: Cucurbitáceas, Solanáceas y Asteráceas. Esto indica que la plasticidad y el grado de adaptación de ToLCNDV a nuevos huéspedes puede ser elevado.
- Entre las especies estudiadas procedentes de setos, tanto en las especies de herbáceas como en aromáticas, en ningún caso se detectaron plantas con infección a ToLCNDV. La utilización de estas especies en setos refugio de fauna

auxiliar beneficiosa para controlar las plagas pueden contribuir a evitar la dispersión de ToLCNDV.

- Como conclusión final, consideramos que es oportuno y necesario continuar los estudios relativos a la enfermedad de las cucurbitáceas inducida por ToLCNDV, con nuevos estudios de carácter epidemiológico en los que se incluyan análisis acerca de nuevos posibles hospedantes y la posible variabilidad genética del virus.





6. BIBLIOGRAFÍA.

6. BIBLIOGRAFÍA

Blancard, D., Lecoq, H. et al. 1991. Enfermedades de las cucurbitáceas. Ed. Mundi Prensa, Madrid: 301 pp.

Chang, H.H., Ku, H.M., Tsai, W.S., Chien, R.C. and Jan, F.J. 2010. Identification and characterization of a mechanical transmissible begomovirus causing leaf curl on oriental melon. *Eur. J. Plant pathology*. 127 (2): 219-228

Clark, M.F., Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 34: 475-483

Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., Zhou, X. 2008 Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*, 153: 783-821.

Ferriol, M. and Picó, B. 2008. Pumpkin and Winter Squash. *Handbook of Plant Breeding Volume 1, Vegetables I*, pp: 317-349

Homo Agrícola. 2013. Los Begomovirus de la familia Geminiviridae <http://elhocino-adra.blogspot.com.es/2013/09/los-begomovirus-de-la-familia.html>

Hull, R. 2004. *Matthews. Plant Virol. Acad. Press.* 1001pp

Hunter, W.B., Hiebert, E., Webbs, E.S., Tsai, J.H. and Polston, J.E. 1998. Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Disease*, 82: 1147-1151.

Hussain, M., Mansoor, S., Iram, S., Zafar, Y., Briddon, R.W. 2004. First report of Tomato leaf curl New Delhi virus affecting chilli pepper in Pakistan. *Plant pathology*. 53: 794-797.

Ito, T., Sharma, P., Kittipakorn, K., Ikegami, M. 2008. Complete nucleotide sequence of a new isolate of tomato leaf curl New Delhi virus infecting cucumber, bottle gourd and muskmelon in Thailand. *Archives of Virology*. 153: 611-613.

Janssen, D. 2015. Epidemiología de Tomato Leaf Curl New Delhi virus (ToLCNDV). <http://jornadasmodeloalmeria.es/descargas/02-epidemiologia-del-tomato-leaf-curl-new-delhy-virus-tolcndv-dirk-janssen.pdf>

Juarez, M., Gonsalvez, B., Aranda, M.A. 2013. Virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV): Un nuevo virus que afecta gravemente cucurbitáceas en Almería y Murcia.

<https://cienciacebas.wordpress.com/2013/09/25/virus-del-rido-amarillo-del-tomate-de-nueva-delhi-tomato-leaf-curl-new-delhi-virus-tolcndv-un-nuevo-virus-que-afecta-gravemente-cucurbitaceas-en-almeria-y-murcia/>

JUNTA DE ANDALUCIA. 2014. Estrategias de Manejo de Cucurbitáceas para Minimizar los Daños por ToLCNDV.

http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/export/sites/default/comun/galerias/galeriaDescargas/minisites/raif/Fichas_Fitopatologicas/Estrategias_de_manejo_de_Cucurbitaceas.pdf

JUNTA DE ANDALUCÍA. 2013. <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/raif/>

Jyothsna, P., Haq, Q.M., Singh, P., Sumiya, K.V., Praveen, S., Rawat, R., Briddon, R.W., Malathi, V.G. 2013. Infection of tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), a bipartite begomovirus with beta satellites, results in enhanced level of helper virus components and antagonistic interaction between DNA B and betasatellites. *ApplMicrobiolBiotechnol.* 97: 5457-5471

Lapidot, M., Friedman, M., Pilowsky, M., Ben-Joseph, R., Ohen, S. 2001. Effect of host plant resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. *Phytopathol.* 91: 1209-1213

MAGRAMA. 2012. Anuario de Estadística.
<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/>

Mandal, B., Mandal, S., Sohrab, S.S., Pun, K.B., Varma, A. 2004. A new yellow mosaic disease of chayote in India. *Plant Pathology.* 53: 797. doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.01075.x.

Marco, C.F., Aguilar, J.M., Abad, J., Gómez-Guillamón, M., Aranda, M.A. 2003. Melon resistance to *Cucurbit yellow stunting disorder virus* is characterized by reduced virus accumulation. *Phytopathology.* 93: 844-852

Maruthi, M.N., Rekha, A.R., Cork, A., Colvin, J., Alam, S.N., Kader, K.A. 2005. First Report of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Tomato in Bangladesh. *Plant Disease.* 89: 1011

Mizutani, T., Daryono, B.S., Natsuaki, K.T. 2011. First Report of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Cucumber in Central Java, Indonesia. *Plant Disease*. 95: 1485

Muniyappa, V., Maruthi, M.N., Babiha, C.R., Colvin, J., Briddon, R.W., Rangaswamy, K.T. 2003. Characterisation of pumpkin yellow vein mosaic virus from India. *Ann Appl Bio*. 142: 323–331. doi: 10.1111/j.1744-7348.2003.tb00257.x.

Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., Sánchez-Campos, S. 2011. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 219-248

Padidam, M., Beachy, R.N., Fauquet, C.M. 1995. Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *J Gen Virol*. 76: 25-35

Pitrat, M. 2008. Melon (*Cucumis melo* L.). En: Handbook of crop breeding, vol I: Vegetables. Editado por: Prohens, J., Nuez, F. Springer, New York, USA: 283–315

Pratap, D., Kashikar, A.R., Mukherjee, S.K. 2011. Molecular characterization and infectivity of a Tomato leaf curl New Delhi virus variant associated with newly emerging yellow mosaic disease of eggplant in India. *Virology Journal* 8: 305

Saha, D.; Rajeev, S.R., Amish, K.S., Manjusha, V., Lalit, A., Anilabh D.M. 2013. Cloning and characterization of NBS-LRR encoding resistance gene candidates from Tomato Leaf Curl New Delhi Virus resistant genotype of *Luffacylindrica* Roem, *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 81: 107-117

Sohrab, S.S., Sajjad K., Anupam, V., Adel, M.A., Adeel, G.C., Ghazi, A.D., Bikash, M. 2013. Characterization of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus infecting cucurbits: Evidence for sap transmission in a host specific manner. *African Journal of Biotechnology*, August 2013 - DOI: 10.5897/AJB2013.12012

Sohrab, S.S., Sajjad, K., Anupam, V., Esam, I.A., Bikash, M., Adel, M.A., Adeel, G.C. 2013. Factors affecting sap transmission of Tomato leaf curl New Delhi begomovirus infecting sponge gourd in India *Phytoparasitica* Dec, Volume 41, Number 5: 591-592

Tahir, M., Haider, M.S. 2005. First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting bitter gourd in Pakistan. *Plant pathology*. 54: 807-812

Usharani, K.S., Surendranath, B., Paul-Khurana, S.M., Garg, I.D., Malathi, V.G. 2004. Potato leaf curl-a new disease of potato in northern India caused by a strain of Tomato leaf curl New Delhi virus. *Plant pathology*. 53: 235-236

Varma, A., Malathi, V.G. 2003. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Ann Appl Biol*. 142: 145–164

Varma, A., Mandal, B., Singh, M.K. 2011. Global emergence and spread of whitefly (*Bemisia tabaci*) transmitted geminiviruses. In: Thompson WMO, editors. *The whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) interaction with geminivirus-infected host plants. Springer. 205–292

Wisler, G.C. and Duffus, J.E. 2001. Transmission properties of whitefly-borne criniviruses and their impact on virus epidemiology. In *Virus-Insect-Plant Interactions*. Harris, K.F., Smith, O.P., and Duffus, J.E., eds. Academic Press. San Diego, CA. 293-308

Este Trabajo Fin de Grado ha sido realizado en el marco del Proyecto de Investigación INIA N°: E_RTA-2013-00020-C04-02.