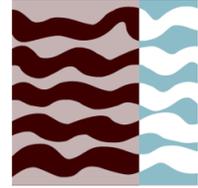




Universidad
Politécnica
de Cartagena



ETSIA
Cartagena

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

UN NUEVO VIRUS EMERGENTE

ToLCNDV



TRANSMISIÓN, SINTOMATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO

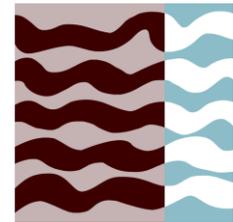
PROYECTO FINAL DE GRADO

María Del Mar Galindo Galindo

Octubre 2014



Universidad
Politécnica
de Cartagena



ETSia
Cartagena

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

UN NUEVO VIRUS EMERGENTE

VIRUS DEL RIZADO DE LA HOJA DEL TOMATE DE NUEVA DELHI
(ToLCNDV): TRANSMISIÓN, SINTOMATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

PROYECTO FINAL DE GRADO

D^a. Josefina Contreras Gallego

D^o. Cesar Petri Serrano

María del Mar Galindo Galindo

M^a del Mar Galindo (MMG)

Octubre 2014

PROYECTO FIN DE GRADO

Ref. ETSIA_IIA_PROD_VEG0014-15_PFC001.doc

TD	FECHA	DESCRIPCIÓN	ADM	REV	APR
P1	Jun-13	Introducción	MMG	JCG CPS	JCG CPS
P2	Jul-14	Objetivos	MMG	JCG CPS	JCG CPS
P3	Jul-14	Materiales y Métodos	MMG	JCG CPS	JCG CPS
P4	Sep-13	Resultados y Discusión	MMG	JCG CPS	JCG CPS
P5	Oct-13	Conclusiones	MMG	JCG CPS	JCG CPS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Josefina Contreras Gallego y a Cesar Petri Serrano por su ayuda en la orientación y supervisión de este trabajo.

Agradecer a toda mi familia por el apoyo incansable y la paciencia que han depositado en mí, y en especial a mi hermano Pablo Galindo por hacer que este proyecto se haya llevado a cabo y por cada uno de sus consejos.

De igual manera quiero agradecer a todos mis amigos y compañeros de la carrera el gran apoyo, el ánimo en cada una de sus palabras y la fuerza para seguir adelante cada día.

A Miguel, por estar apoyándome en todo este tiempo incansablemente y ayudarme a realizar este proyecto.

RESUMEN

Actualmente el gran factor limitante de los cultivos hortícolas y ornamentales a nivel mundial, son las enfermedades causadas por virus, y más aun las virosis emergentes, como es el caso del virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (Tomato Leaf Curl New Delhi Virus, ToLCNDV). Este virus causa importantes pérdidas en los países donde se encuentra, en los cultivos de cucurbitáceas que son calabacín, pepino, melón, sandía, calabaza y luffa y en solanáceas en tomate, pimiento, patata y berenjena. Este virus apareció en la región en el año 2013 y ha causado numerosas pérdidas económicas en el cultivo del calabacín en Almería y Murcia.

Es transmitido por *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889), la mosca blanca del tabaco, es una de las plagas más importantes a nivel mundial por ser vector de numerosas virosis, en donde se encuentra el nuevo virus emergente ToLCNDV. Hoy en día, no hay descrita otra forma de transmisión de este virus que no sea mediante vector.

Existen diversos métodos de diagnóstico, a través de los cuales podemos detectar la presencia de este virus. Son tres métodos los que se emplean actualmente, el Test Elisa del que se disponen antisueros capaces de reconocer ToLCNDV, mediante hibridación molecular puesto que ya hay sondas moleculares para este virus y finalmente por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) ya que se cuenta con cebadores específicos que se diseñaron a partir de la secuencia completa del ADN-A del aislado del ToLCNDV.

En este trabajo se estudia la transmisión, sintomatología y el diagnóstico del virus. En primer lugar, se realizan la transmisión con su vector, *B. tabaci* y también mecánicamente, para poder describir posteriormente los síntomas ocasionados en distintas especies de cucurbitáceas y solanáceas. Finalmente se usan y comparan las técnicas de PCR e hibridación molecular para poder corroborar si realmente estamos ante especies que son susceptibles a dicho virus.

Los resultados muestran que el principal hospedante de este virus es el calabacín, causando grandes pérdidas económicas; se cuenta con más especies de cucurbitáceas como hospedantes pero que no repercuten a nivel de producción del cultivo hasta el momento. También existen distintas especies de flora espontánea que son reservorios del nuevo virus ToLCNDV.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	El virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV)	1
1.1.	Origen, distribución geográfica e importancia	1
1.2.	Situación taxonómica y morfológica	4
1.3.	Formas de transmisión	8
1.4.	Hospedantes y sintomatología	12
1.5.	Estrategia de control	15
2.	El vector <i>Bemisia tabaci</i>	16
2.1.	Origen, distribución geográfica e importancia	16
2.2.	Clasificación taxonómica.	18
2.3.	Biotipo o/y especie	19
2.4.	Morfología, biología, etología	21
2.5.	Hospedantes y daños causados	26
2.6.	Estrategias de control	26
3.	Métodos de diagnóstico	29
3.1.	ELISA	29
3.2.	Hibridación molecular	34
3.3.	PCR	38
II.	OBJETIVOS	40
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
1.	Transmisión con vector	41
1.1.	Obtención de plántulas	41
1.2.	Obtención de las poblaciones de mosca blanca	42
1.3.	Ubicación y preparación de los ensayos	43
1.4.	Inoculación con <i>Bemisia tabaci</i>	44

2. Transmisión mecánica	47
2.1. Obtención de plántulas	47
2.2. Origen del aislado del virus	47
2.3. Preparación de los ensayos	48
2.4. Transmisión mecánica	48
3. Seguimiento del cultivo	50
4. Toma de muestras	54
5. Diagnóstico de laboratorio	58
5.1. PCR	59
5.2. Hibridación molecular	61

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 65

1. Ensayo transmisión con vector	65
2. Ensayo transmisión mecánica	76
3. Sintomatología transmisión con vector	79
3.1. Melón	79
3.2. Calabaza	86
3.3. Pepino	92
3.4. Calabacín	95
3.5. Tomate	102
3.6. Pimiento	107
3.7. Malas hierbas	109
4. Sintomatología transmisión mecánica	114
4.1. Melón	114
4.2. Calabaza	114
4.3. Pepino	115
4.4. Calabacín	116
4.5. Tomate	116
4.6. Pimiento	117
5. Diagnóstico	118

V. CONCLUSIONES 119

I. INTRODUCCIÓN

La producción intensiva de hortalizas se enfrenta a nuevos problemas con el paso del tiempo, siendo así una de las principales enfermedades que son causadas por virus. Esto hace que incida gravemente en la producción y en la rentabilidad de los cultivos. Por este motivo, en algunas zonas geográficas la virosis se ha convertido en un gran factor limitante del cultivo, y más aun las virosis emergentes que generan una enorme inquietud en el sector, agravadas por la falta de información respecto a la posible epidemiología de estos virus. En estos casos, la identificación del patógeno supone el primer paso a seguir, tomando la evaluación del riesgo potencial como el segundo y la puesta a punto de medidas de control de emergencia el tercero.

1. El virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV)

ToLCNDV se trata de una cepa de Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV), en castellano, virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi. 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).

1.1. Origen, distribución geográfica e importancia

El virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV) se describió por primera vez en 1995 como una variante del complejo de virus causante del rizado amarillo de la hoja del tomate afectando a cultivos de tomate en India entre otros países. Posteriormente, el comité internacional de taxonomía de virus lo reconoció como especie viral independiente, ya que, se hizo una secuencia del ADN de este virus para conocer exactamente los genes, una vez conocidos se compararon con el banco de datos que existe a nivel mundial. Este banco busca automáticamente qué virus es el más parecido. En la secuenciación realizada, se halló un 97% de homología con una cepa de ToLCNDV que está causando allí una enfermedad grave en pepino que denominan “yellow leaf crumple” (rizado amarillo de la hoja). (Juárez y Aranda 2013).

En India afecta a tomate y eso es lo que originalmente dio nombre al virus, aparte de presenciarse el virus en la India se ha extendido por otras regiones de Asia como Pakistán, Bangladesh, Tailandia y Taiwan, también se incluye China y el medio Oriente (Juárez y Aranda 2013).



Ilustración 1. – Distribución geográfica de ToLCNDV.

En muchos de estos países, el virus produce enfermedad en los principales cultivos de Solanáceas, como pimiento, tomate y patata y en especies espontáneas de la misma familia *Solanum nigrum*. En estos países, se ha visto también cepas de ToLCNDV afectando a cultivos de Cucurbitáceas tales como pepino, melón, sandía y calabaza (Janssen *et al.* 2014).

El que se ha detectado en España es otra variante, no es el mismo que los que ya se han descrito en Asia, por lo que se cree que el virus ha sufrido una mutación en el camino (Janssen *et al.* 2014).

En la actualidad podemos confirmar que ha llegado a España. Una hipótesis de cómo ha podido llegar el virus a España es a través de plantas de jardinería ya que no ha sido transportado en plantas hortícolas, en frutales o en semillas.

Se trata de un virus de la familia Geminiviridae y del género Begomovirus, de genoma bipartito que suele ir acompañado por beta-satélites.

La similitud nucleotídica del aislado que se tiene en España 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 ha sido la primera que se ha hecho de ToLCNDV en España (Juárez y Aranda 2013).

En otoño de 2011, se empezó a observar en determinadas plantas de calabacín que estaban infectadas por algún virus que les causaba “mosaicos” en hojas. Los análisis ELISA frente a virus de la familia *Potyviridae* y otros virus conocidos como SqMV o CGMMV dieron negativo. Un año después, una misma situación se repitió, con una incidencia variable, de entre un 2% y un 80% en al menos 12 parcelas y distribuidas por toda la Comarca de Campo de Cartagena (Juárez *et al.* 2013).

Durante el año 2013, en el Campo de Cartagena (Murcia) y de Almería (regiones como Berja, Dalías, El Ejido, Roquetas y Adra), se observaron síntomas de la nueva enfermedad viral en calabacín, en campo e invernadero. Durante ese año este síndrome se ha extendido ampliamente en los cultivos, ocasionando grandes pérdidas y provocando así una alarma en el sector agrícola. Ya no solo se vieron afectados cultivos de calabacín sino también cultivos tardíos de melón.

Desde su primera detección, la incidencia del virus en cultivos de calabacín se ha incrementado de forma aparentemente exponencial, por otra parte aparece en nuevas especies de la familia de cucurbitáceas que son susceptibles al virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi e incluyendo cierto riesgo en especies de la familia *Solanaceae*.

Hace cinco años apareció el virus de las venas amarillas (CVYV) transmitido por mosca blanca en la zona del sureste de España desde Málaga hasta Murcia y que apareció sin antecedentes en cultivos de pepino holandés. La ventaja frente a este virus fue la existencia de variedades con resistencia genética a dicho virus, con el tiempo se ha visto la presencia de otros virus en pepino, virus de la amarillez (CYSDV y CABYV), en melón (MNSV) y en sandía (WSV y WSMoV). También han ido apareciendo y desapareciendo por temporadas otros virus como CGMMV (entre otros muchos).

Pero en realidad el mayor riesgo y la mayor incertidumbre epidemiológica en cultivos de cucurbitáceas vienen por medio de la evolución de los virus ya presentes (detectados ya) y por la introducción de nuevos virus como el que presentamos en este proyecto, ToLCNDV.

En cuanto a la importancia de los virus, y por supuesto, de este también, los virus son importantes porque pueden afectar a otros microorganismos (bacteriófagos, micovirus) por lo que contribuyen al equilibrio de la naturaleza.

1.2. Situación taxonómica y morfología

ToLCNDV pertenece a la familia *Geminiviridae*, tienen genomas de ADN circular de cadena única.

Los geminivirus son virus de plantas, descritos por primera vez por Goodman en 1977 (Goodman 1977a, 1977b). De acuerdo con la clasificación de Baltimore, los geminivirus se consideran los virus de clase II y es la familia más grande conocida de los virus de ADN de cadena sencilla.

Los geminivirus comprenden una numerosa y diversa familia (*Geminiviridae*) de virus de plantas, cuyo genoma es un ADN simple banda (sb), que se duplica usando moléculas intermediarias de ADN doble banda (db) dentro de las células vegetales infectadas (Bridson y Markham, 1995). Los viriones están constituidos por un par de icosaedros y cada uno consta de 110 subunidades de proteína de cubierta, de 29-30kD cada una. Estos virus contribuyen solo con unos pocos factores para su duplicación y transcripción y son dependientes de las ADN y ARN polimerasas nucleares de la planta hospedante (Hamilton *et al.* 1983, Harrison 1985, Davies y Stanley 1989, Bisaro *et al.* 1990, Fauquet y Fargette 1990).

Los geminiviruses se clasifican en cuatro géneros, previamente denominados subgrupos, que se caracterizan por el tipo de insecto vector, las plantas hospedantes y la estructura del genoma que poseen (Rybicki 1994, Padidam *et al.* 1995).

Los géneros son:

Mastrevirus: tienen genoma monopartita y son transmitidos por cicadelas (pertenecientes a la familia Cicadellidae) o plantas monocotiledóneas. El virus del estriado del maíz (Maize streak virus, MSV) representa a este género (Bock 1974, Harrison *et al.* 1977, Rybicki y Huges 1990).

Curtovirus: poseen genoma monopartita y son transmitidos por cicadelas (pertenecientes a la familia Cicadellidae) o plantas dicotiledóneas. El virus del encrespamiento apical de la remolacha (Beat curly top virus, BCTV) es el representante de éste género (Briddon *et al.* 1989, Mumford 1974).

Topocuvirus: la transmisión de este virus se realiza mediante membranácidos. El virus que representa a este género es el virus del seudorizado del tomate.

Begomovirus: presentan genomas bipartitas ADN A y ADN B, excepto algunos aislamientos del TYLCV (Navot *et al.* 1991) y son transmitidos por la mosca blanca *B. tabaci* a plantas dicotiledóneas de manera persistente, circulativa y no propagativa. El virus representante de este género es el “Tomato yellow leaf curl virus”, TYLCV. La enfermedad del rizado amarillo del tomate fue descrita por primera vez en Israel en 1939, encontrándose actualmente distribuida por las zonas cálidas y templadas de todo el mundo. La familia Geminiviridae se compone de tres géneros, todos los cuales comparten similitudes en organización del genoma, la transmisión por insectos, y la gama de huéspedes.

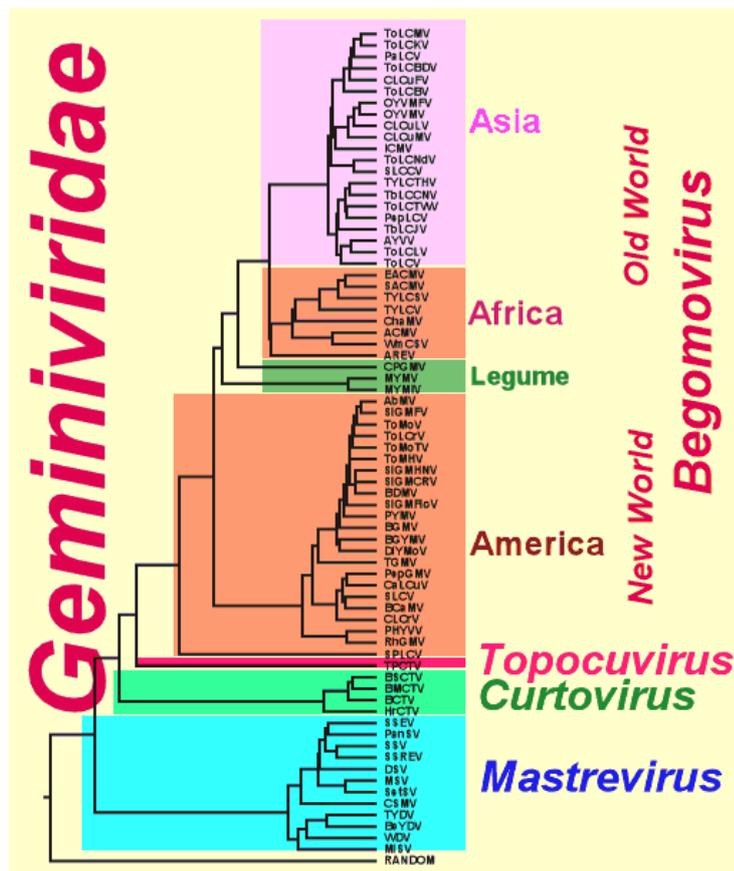


Ilustración 2. - Árbol taxonómico de virus de la familia Geminiviridae

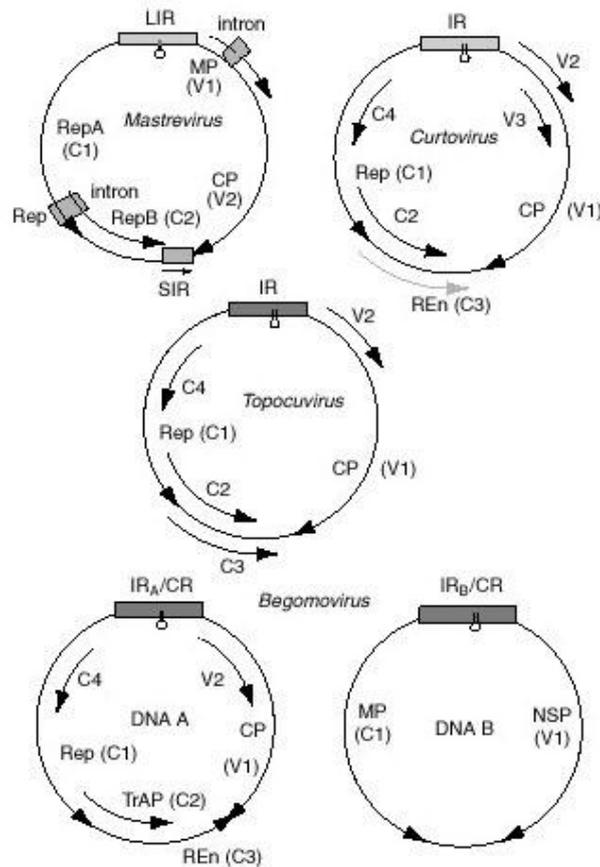


Ilustración 3. – Géneros de la familia Geminiviridae. La replicación del ADN Geminivirus sigue el modelo de "genomas simples" con complejas interacciones virus-huésped.

En el caso de los begomovirus tienen dos componentes genómicos (A y B). Los A codifica integrantes, en el c-sentido, Rep (Elmer *et al.* 1988, Eteessami *et al.* 1991), una proteína activadora de la transcripción (Sunter y Bizaro, 1991, Hartitz *et al.* 1999), Ren (Elmer *et al.* 1988) y una proteína C4, y el CP en el v-sentido. El componente B codifica proteínas implicadas en el movimiento viral intra e intercelular (BC1 y BV1, Lazarowitz 1999). La secuencia TAATATT que se encuentra en las regiones intergénicas, contiene el sitio de iniciación (\downarrow) de rodadura de la replicación del ADN del círculo.

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 tenemos por 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, es otra pequeña cadena de ADN que se encapsula por separado y es, por tanto, exterior al genoma viral, a estos se les denomina begomovirus monopartitos asociados a betasatélites, que es el caso de ToLCNDV.

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. Y por último la mayoría de los begomovirus tienen un genoma compuesto por dos hebras distintas de ADN del mismo tamaño (denominadas ADN A y ADN B) que se encapsulan en viriones distintos, ambos de idéntico tamaño y forma, hablándose entonces de begomovirus bipartitos, el ADN A codifica las proteínas implicadas en la replicación y el encapsulamiento del virus, así que es imprescindible su presencia para que se dé la infección. Como se puede ver en la siguiente imagen, se distingue entre los begomovirus bipartitos del Nuevo Mundo (América) y los del Viejo Mundo, pues estos últimos codifican una proteína más en su ADN A.

ToLCNDV es precisamente de estos últimos, es decir, un begomovirus bipartito del Viejo Mundo. Además, ToLCNDV (a pesar de ser bipartito) se encuentra asociado habitualmente a betasatélites en su zona de origen y esta asociación parece ser muy provechosa para el virus. Es destacable que los betasatélites pueden interactuar con los begomovirus (monopartitos y bipartitos), incrementando la severidad de los síntomas, aumentando la acumulación de ADN viral y viriones e incluso expandiendo el rango de huéspedes. (Juárez *et al.* 2013).

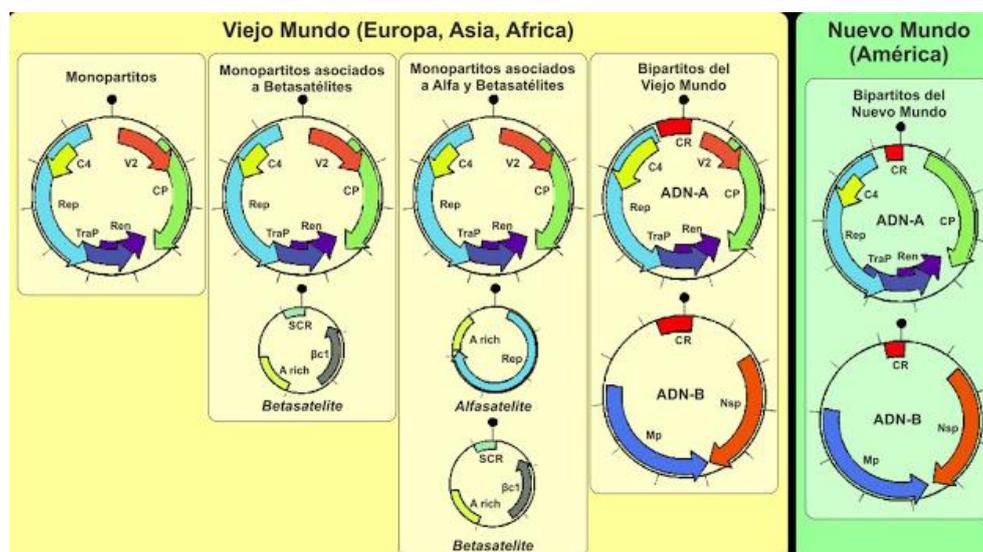


Ilustración 4. - Tipos de begomovirus clasificados según su localización.

ToLCNDV tienen asociados DNAs satélites, como ya hemos nombrado anteriormente, 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.

1.3. Formas de transmisión

Las distintas formas en que los virus son transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas es mediante propagación vegetativa, mecánicamente, por semilla, polen y biotransmisores.

Actualmente, en España no se transmite este virus por transmisión mecánica, de momento no hay ensayos que puedan confirmar esta transmisión, excepto en Taiwan, donde se ha ensayado con una especie de melón oriental, y concluyen que la transmisión mecánica transmite el virus de ToLCNDV.



Ilustración 5. - Síntomas en melón (*Cucumis melo* var. *Makuwa*) tras realizar la transmisión mecánica.

Al igual que otros begomovirus, este es transmitido por la mosca del tabaco (*Bemisia tabaci* Genn.) en condiciones naturales, de forma persistente y circulativa. Esto quiere decir que los estados inmaduros y adultos de *B. tabaci*, cuando se alimentan de plantas enfermas pueden succionar begomovirus, así el insecto adquiere el patógeno, sus viriones alcanzan el intestino del vector, penetran en sus tejidos y tras un periodo de la latencia se da una circulación efectiva del virus hasta acumularse en grandes cantidades en las glándulas salivares de la boca del insecto, desde donde puede transmitirlo a una planta sana cuando el vector va a alimentarse de esa planta y segrega saliva inyectando así los viriones en dicha planta sana. Son los llamados virus persistentes circulativos (Janssen *et al.* 2014).

Además, el virus tiene un largo tiempo de persistencia en el insecto, de más de 20 días, coincidiendo aproximadamente la duración de vida de un adulto de *B. tabaco* por lo que, a efectos prácticos, en esos casos podríamos hablar de que el insecto lo transmitirá durante toda su vida adulta.

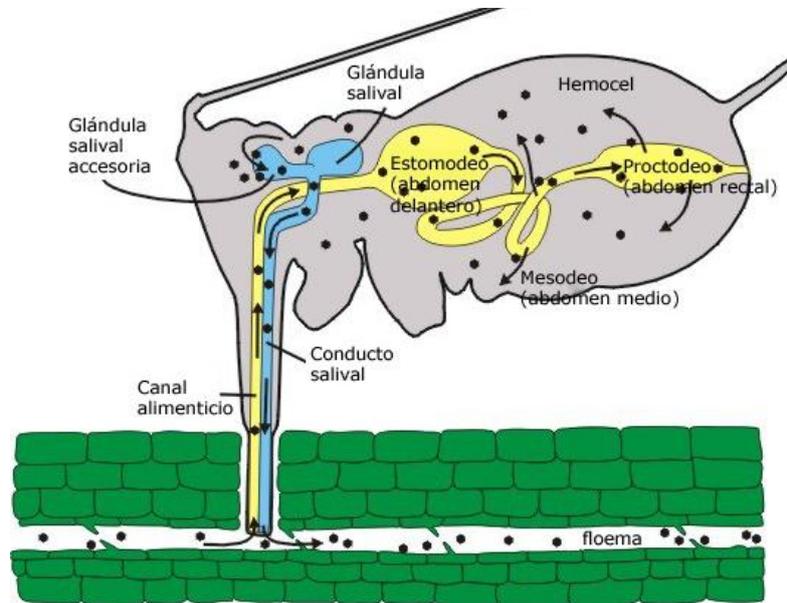


Ilustración 6. - Transmisión mediante vector.

La eficiencia de transmisión se ha demostrado que es alta, estudios preliminares del IFAPA de Almería mostraron ratios del 96% en la transmisión entre calabacines con 1 mosca blanca, y ratios del 90% de infección en *Luffa*, utilizando 1 adulto de mosca blanca. Estos ratios son bastante mayores a los encontrados para el virus de cuchara de tomate, que van de un 40 a un 50% (Janssen y Ruiz 2014).

Esto implica que las moscas pueden permanecer virulíferas desde poco tiempo después de adquirir el virus hasta que mueren. Por otra parte, se ha determinado que algunos virus de la misma familia pueden transmitirse de generación en generación de mosca, como estas glándulas se conservan durante la muda, el insecto puede infectarse en estado juvenil y transmitir la enfermedad en estado adulto aunque este aspecto se desconoce para ToLCNDV.

Tan solo se conoce el caso del melón en Taiwán al que se le transmite el virus mediante transmisión mecánica, pero actualmente en España se han llevado a cabo experimentos que no han permitido reproducir la enfermedad en las plantas inoculadas, y por tanto no tenemos indicios de que esto pudiera ocurrir en el campo.

Todos los virus pueden ser transmitidos a algunas plantas mediante inoculación mecánica, pero no todas pueden infectar y establecer infección. En teoría las partículas virales pueden ser introducidas a células vivas por este método, pero para que el virus sea capaz de ser funcional depende de una serie de condiciones como son el grado de susceptibilidad de cada célula receptora, del funcionamiento del genoma viral dentro de la célula, etc.

La transmisión mecánica se conoce como el proceso por el cual las partículas de virus son manualmente introducidas a una planta por heridas mecánicas, para facilitar la iniciación de la infección en células potencialmente infectables.

La transmisión mecánica puede ocurrir de manera natural, es decir, en campo, y de forma artificial en el laboratorio. En campo dicha transmisión puede efectuarse entre plantas bastante próximas al rozarse entre ellas con el viento, sumándole a esto que las plantas pueden ser dañadas en ciertas labores del cultivo por el hombre.

La transmisión mecánica artificial es de gran importancia a nivel experimental y se puede realizar de diferentes formas: frotis, injerto e inyecciones.

La técnica del injerto consiste en tomar una planta que se utiliza como patrón, a la cual se le hace un corte en el tallo tratando de que llegue a los tejidos vasculares, se utiliza una hoja o una pequeña rama de la planta enferma y con una navaja de rasurar se le quita la epidermis con el fin de dejar los haces vasculares descubiertos, posteriormente se introduce en el cuerpo del patrón, teniendo cuidado que los haces vasculares se pongan en contacto, para la transmisión del virus, luego se sella con parafilm o polietileno y la planta se coloca en un lugar fresco, para esperar la aparición de síntomas (Mena 2010).

La técnica de frotis es la técnica más usada artificialmente ya que presenta varias ventajas entre las que destacan de que es muy rápida y segura, facilita así mismo el estudio de los virus en ausencia de vectores, facilita el estudio de los virus *in vitro*, se pueden separar virus mediante inoculaciones mecánicas por frotis y nos da pauta para realizar estudios sobre el número de lesiones locales que se obtienen con inoculaciones mecánicas (Mena 2010)

La técnica por este medio es muy simple y la metodología básica es la siguiente:

- a) Tomar aproximadamente dos centímetros cuadrados (preferentemente hojas), con los síntomas bien marcados.
- b) Macerar en un mortero el tejido de la planta enferma y agregar solución buffer con un pH de 7.0 a 8.5
- c) Adicionar carborúndum, es un abrasivo artificial que se obtiene calentando a altas temperaturas el carbón en polvo con sílice hasta que se cristaliza en granos hexagonales. Se encuentra en polvo.
- d) Con un bastoncillo de algodón impregnado con sabia infectiva se impregna la hoja
- e) Se lava con agua para evitar el exceso
- f) Colocar la planta en un lugar fresco y fuera del alcance de los insectos

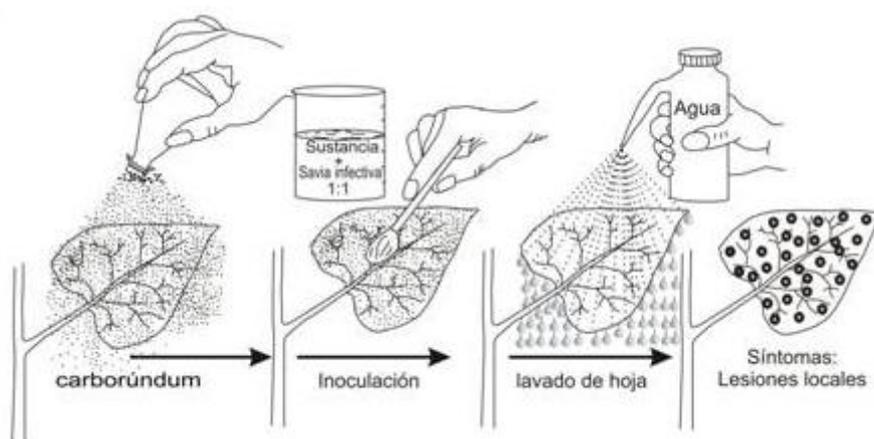


Ilustración 7. – Metodología transmisión mecánica por frotis.

Por otro lado, la técnica de inyección fue una de las que se utilizaron por primera vez para la transmisión de virus en plantas, en la actualidad solo se utiliza para transmitir algunos virus que no se transmiten por frotis.

Actualmente, en España, en el caso de los begomovirus no se transmiten por contacto o por rozamiento entre plantas, es decir, por transmisión mecánica (Janssen *et al.* 2014).

Tampoco está descrita su transmisión por semilla, por lo que las fuentes de inóculo y reservorios serán las plantas infectadas, así como algunas plantas silvestres, otros cultivos y otros cultivos abandonados (Janssen *et al.* 2014).

1.4. Hospedantes y sintomatología

Al principio, la gama de huéspedes de ToLCNDV parecía esencialmente limitada a solanáceas, incluyendo tomate, pimiento, 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. Así, a la gama de huéspedes inicialmente determinada hubo que añadir pepino, melón, calabaza, Luffa, sandía y calabacín (Juárez *et al.* 2013).

Se 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.

En cucurbitáceas encontramos el calabacín, la calabaza, melón, pepino y sandía. Todas ellas cuentan con una alta importancia agronómica en el Campo de Cartagena. Siendo el principal hospedante conocido hasta 2013 el calabacín, dándose a conocer en 2014 su susceptibilidad el melón y desconociendo el comportamiento del resto de especies.

Por otro lado en la familia de las solanáceas los hospedantes relacionados son el tomate, pimiento, y berenjena. Ambas por igual con un alto interés agronómico en el Campo de Cartagena, teniendo casos puntuales en los que se han insinuado en algunas plantas síntomas que se han relacionado con el virus, pero hasta ahora no existe ninguna confirmación oficial.

En cuanto a la sintomatología, en todas las plantas que dan positivo frente al virus tienen un cuadro sintomático común, lo que varía en cada especie es la voracidad con la que el virus se manifiesta en diferentes partes de la planta.

Es posible clasificar los síntomas, una manera común de hacerlo es en externos e internos.

Los síntomas externos son aquellos efectos visuales del daño causado por un patógeno sobre su hospedante. Este tipo de síntomas son los más importantes en la descripción de los virus en plantas y se clasifican en primarios y secundarios.

Los primarios son aquellos que se manifiestan inicialmente en la planta y resultan frecuentemente mediante inoculaciones. Los secundarios ocurren posteriormente, y se presentan en partes no inoculadas de las plantas.

En el caso de ToLCNDV los síntomas primarios son leves punteaduras en las hojas que se relacionan con las picaduras del vector acompañadas de un enroscamiento de las hojas hacia el haz o el envés y ligeros abullonamientos.

Por otra parte encontramos síntomas locales y sistémicos, donde los locales son aquellos que también se les conoce por reacciones de hipersensibilidad, son aquellos que se manifiestan en el lugar de la inoculación. Carecen de importancia a nivel de campo pero son muy importantes a nivel experimental, las plantas que se usan para obtener estos síntomas se les conoce con el nombre de plantas indicadoras (Mena 2010).

Los síntomas sistémicos son aquellos que se manifiestan lejos del punto de inoculación, es decir, por toda la planta.

Los síntomas sistémicos que se caracterizan por encontrarse en el virus ToLCNDV son:

- Mosaicos, amarillos foliares y apicales
- Clorosis internerviar, caracterizada por la decoloración de los nervios, este síntoma se aprecia con más frecuencia en la fase inicial de infección
- Enanismo o achaparramiento, las plantas infectadas se ven afectadas por una limitación en su crecimiento.
- Rizado foliar, se provocan diversas deformaciones en las hojas, deformándose hacia el haz o el envés provocando acucharamientos.
- Falta de vigor, la planta se encuentra debilitada, capaz es el virus de bajar el rendimiento de ésta e incluso llegar a la parada de crecimiento y los frutos pierden calidad.

- Filimorfismo apical, causandose la reducción de los foliolos y del área fotosintética activa
- Reducción de la superficie foliar
- Abullonamientos

La manifestación de los síntomas en las plantas se ve influenciada por algunos factores de los que se destacan, el ambiente, tipo de virus, edad de la planta y hospedante.

Dentro de las condiciones ambientales el factor más importante es la temperatura ya que influye de forma directa en la variación de los síntomas que manifiestan los virus. Otro factor ambiental que influye es la luz. En nuestro caso, estos factores influyen sobre el vector, de tal manera que si no hay altas temperaturas la población de mosca blanca no se ve aumentada y por tanto la posibilidad de transmisión del virus emergente es menor.

Estos factores ambientales y climatológicos, crean un mayor solapamiento e intensificación de los ciclos de cultivo de algunas cucurbitáceas, podrían estar relacionados con este episodio epidémico tan agresivo y con daños tan importantes en las plantaciones de calabacín.

En cuanto a la edad de la planta, de forma general cuando son más jóvenes, son más susceptibles al ataque de los virus.

Finalmente, el hospedante es un factor que está muy relacionado con la susceptibilidad y/o resistencia del hospedante al patógeno, es decir, entre más susceptible mayor grado de virulencia. En el caso de ToLCNDV, el cultivo más susceptible hasta ahora conocido capaz de producir grandes pérdidas en la producción y hacer que el fruto se desprece comercialmente es el calabacín (*Cucurbita pepo*).

Es importante destacar, que existen otros factores capaces de causar síntomas semejantes a los que son inducidos por virus, por tanto, debemos tener en cuenta estos factores a la hora de analizar nuestros resultados obtenidos.

Estos factores pueden ser, anormalidades genéticas, deficiencias nutrimentales, daño por herbicidas o pesticidas, daño por insectos o ácaros.

1.5. Estrategias de control

Las estrategias de control están limitadas pero todas se basan en lo mismo, que no haya o haya poca fuente de inóculo (plantas infectadas) y que la mosca blanca esté controlada (Juárez y Aranda 2013).

A nivel de parcela, frente a la fuente de inóculo, se debe mantener totalmente limpias, de restos de cultivos anteriores y de hierbas, las parcelas destinadas a nuevas plantaciones durante un mínimo de 2 a 3 semanas y la eliminación de las plantas virosantes.

Frente al control del vector, se deben emplear barreras físicas, en el caso de los invernaderos, emplear cerramientos y mallas. Por otra parte también es eficaz el uso de trampas adhesivas.

Otra estrategia de control es el uso de tratamientos fitosanitarios, son tratamientos orientados al uso contra mosca blanca, que no contra el propio virus. Son tratamientos sanitarios a base de productos fortificantes o sustancias que actúan estimulando las defensas naturales de la plantas, no está demostrada la eficacia contra las enfermedades producidas por virus.



Ilustración 8. - Métodos preventivos contra *B. tabaci*.

En la ilustración 8 se pueden ver dos métodos preventivos que se llevan a cabo en invernaderos para evitar la intromisión del vector. Un método es la aplicación de mallas térmicas sobre las plantas susceptibles al virus y la aplicación de azufre micronizado en dosis bajas, ya que de alguna manera ahuyenta a *B. tabaci*.

2. El vector *Bemisia tabaci*

La mosca blanca *Bemisia tabaci* (*Gennadius*) (Homoptera: Aleyrodidae) es una de las plagas más ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo donde afecta más de 600 especies de plantas cultivadas y silvestres (Morales y Anderson 2001, Oliveira *et al.* 2001, Polston y Anderson 1999).



Ilustración 9. - Adulto de *Bemisia tabaco*.

2.1. Origen, distribución geográfica e importancia

Algunos científicos sugieren que *B.tabaci* puede ser originaria de África tropical, desde donde se dispersó a Europa y Asia, y fue posteriormente introducida al Neotrópico, principalmente por transporte de material de plantas (Brown y Bird 1992, Campbell *et al.* 1996). Sin embargo, otros científicos sugieren que esta especie puede ser nativa de India o Pakistán, donde se ha encontrado la mayor diversidad de especies de sus enemigos naturales (Brown *et al.* 1995).

Bemisia tabaci, también conocida como la mosca blanca del algodón, del tabaco o de la batata, fue originalmente observada sobre la planta de tabaco en Grecia por Gennadius en el año 1889, y fue descrita como *Aleyrodes tabaci* (Gennadius, 1889).

En el Nuevo mundo fue descrita por primera vez en 1897 sobre *Ipomoea batatas* (L.) Lam. en los Estados Unidos, donde se describió como *Aleyrodes inconspicua* (Quaintance 1900, citado por Oliveira *et al.* 2001). Fueron Quaintance y Baker quienes en 1914, al describir *Bemisia* como un nuevo género utilizado como especie tipo a *Aleyrodes inconspicua*, cambia su nombre por el de *Bemisia inconspicua*.

Debido a la variación morfológica que sufre este insecto de acuerdo con el hospedero donde ha sido encontrado, se le han dado 22 nombres, los cuales hoy se consideran sinónimos de la especie *Bemisia tabaci*. Una detallada revisión de la nomenclatura que rodea el complejo de especies de *Bemisia* es presentada por Perring (2001).

La primera cita que se tiene de *Bemisia tabaci* en España es de Gómez-Menor en 1943 con “Contribución al conocimiento de los Aleyrodidos de España” (Hem., Homoptera) donde fue descrita como plaga ocasional en algunos cultivos hortícolas (Gómez-Menor 1943).

Aunque en años siguientes se encuentran referencias sobre daños en importantes cultivos como patata, judía, berenjena, tabaco y algodón (Alfaro 1953, Domínguez 1961, Izquierdo y Duran 1976).

Pero es a partir del año 1988 cuando este insecto recibe un interés creciente debido a los daños directos e indirectos que causa, estableciéndose así como plaga importante en cultivos de invernadero y al aire libre tanto de la Península como de Canarias y Baleares (Carnero *et al.* 1990, Guirao *et al.* 1997, Lacasa *et al.* 1997).

Es en ese mismo año, en 1988 cuando se cita en el “Inventario de artrópodos recogidos e identificados en Almería” por Rodríguez Rodríguez, haciendo alusión a la provincia de Almería y en Lanzarote por Carnero y Pérez Padrón en “Nuevas plagas en los cultivos canarios”. Resúmenes del III Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (SEACH).

En otoño de 1990, se presentan en las zonas costeras de Murcia elevadas poblaciones de *Bemisia tabaci* (Lacasa 1995), detectándose también en la Comunidad Valenciana (MAPA 1992).



Ilustración 10. – Distribución de *Bemisia tabaci* en la península (1988).

Es en 1992 cuando se cita en la provincia de Tenerife y en Gran Canaria por Cebrian R. en el Estudio de una nueva plaga en Canarias: “*Bemisia tabaci* Genn. (Homoptera: Aleyrodidae). Trabajo Fin de Carrera (Inéd.) Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de La Laguna.

Más tarde fue en la Gomera en 1999 donde Hernández-Suarez E. publicó “La familia Aleyrodidae y sus enemigos naturales en Canarias”. Tesis Doctoral en la Universidad de la Laguna.

B. tabaci se extiende en un amplio rango de sistemas agrícolas, desde subtropicales hasta tropicales, pero también ocurre en áreas de climas templados. Es una especie distribuida globalmente y se encuentra en todos los continentes con excepción de la Antártica (Martin *et al.* 2000, Oliveira *et al.* 2001)

2.2. Clasificación taxonómica

Según la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) en 2004, la taxonomía de *Bemisia tabaci* es:

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

División: Exopterygota

Orden: Hemiptera
Suborden: Sternorrhyncha
Superfamilia: Aleyrodoidea 21
Familia: Aleyrodidae
Subfamilia: Aleyrodinae
Género: *Bemisia*
Especie: *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889).

B. tabaci fue descrita por primera vez como *Aleurodes tabaci* en 1889 como plaga en tabaco. Fue descrita posteriormente bajo numerosos nombres.

2.3. Biotipo y/o especie

El término biotipo es usado para designar poblaciones que carecen de diferencias morfológicas, pero que poseen otras características que sirven para separarlas de otras (Claridge *et al.* 1997, citado por Perring 2001). Al respecto, se han usado diversas técnicas principalmente electroforesis de esterasas no específicas, técnicas moleculares como RAPD-PCR y análisis de genes específicos (18S rARN, 16S rADN), para estudiar 41 poblaciones de *B. tabaci*. De estas poblaciones, 24 han recibido la designación de biotipos (Perring 2001). Esas 24 especies morfológicamente indiferenciables se encuentran en un conjunto de 11 grupos de alto nivel bien definidos (De Barro *et al.* 2011).

Sin embargo, en estos estudios se han usado diversas herramientas para los análisis moleculares e interpretación de los resultados, lo cual causa dificultad para poder compararlos y dar conclusiones (Oliveira *et al.* 2001).

En 1986 se encontró una nueva forma de *B. tabaci* en plantas de poinsetia (*Euphorbia pulcherrima* Willd) mantenidas en invernaderos del estado de La Florida.

Esta nueva forma, llamada biotipo “poinsetia” o biotipo B, se introdujo al suroeste de los Estados Unidos, rápidamente reemplazando la forma original, el biotipo A. Para 1991, el biotipo B había causado multitud de pérdidas en los cultivos de California y Arizona (Anderson 2000).

Se ha demostrado que el biotipo B posee un rango más amplio de plantas hospedantes (Brown *et al.* 1995), una fecundidad mayor que la del biotipo A (Bethke *et al.* 1991), ingiere una mayor cantidad de savia del floema de las plantas durante la alimentación y consecuentemente excreta un mayor volumen de melaza que el biotipo A (Byrne y Miller 1990). Además, a diferencia del A, el biotipo B induce desórdenes fisiológicos (McAuslane *et al.* 2004).

Con base en datos experimentales biológicos, morfológicos y genéticos, utilizando poblaciones de *Bemisia de California*, (Perring *et al.* 1993 y Bellows *et al.* 1994), concluyeron que los biotipos A y B eran especies distintas denominando el biotipo B como *Bemisia argentifolii* (Bellows y Perring). Sin embargo, esta conclusión no ha sido sustanciada al mirar más ampliamente las poblaciones de *B. tabaci* del Viejo y Nuevo Mundo (Brown *et al.* 1995).

El biotipo Q se asocia más con la distribución de virus tales como Tomate 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.

Adicionalmente, estudios filogenéticos y reproductivos (Campbell *et al.* 1993) entre los dos biotipos, no soportan la existencia de dos especies. Por consiguiente, se considera que solo existe una especie, *Bemisia tabaci* (Gennadius) como un complejo de biotipos (Anderson 2000).

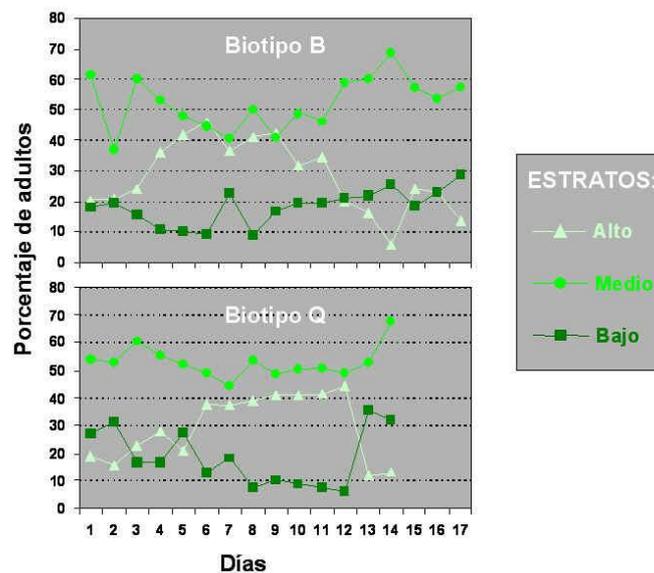


Ilustración 11. – Desarrollo diferencial de cada biotipo, nos muestra el porcentaje de adultos que se encuentra en cada estrato de las plantas conforme avanzan los días.

2.4. Morfología, biología, etología

Bemisia tabaci es un insecto de pequeño tamaño, blanco y alado. Presenta cuatro estados: huevo, larva, pupa y adulto. A su vez, el estado de larva tiene cuatro estadios que duran aproximadamente un mes: I, II, III y IV.

La morfología de los distintos estados de *Bemisia tabaci* es la siguiente:

El huevo es elíptico-asimétrico, con coloración amarillo verdosa, acaba en una prolongación llamada pedicelo, mediante la que se fija a la hoja y gracias a la que quedan verticales. Ovipositados individualmente o en grupos sobre la superficie de la hoja, raramente son puestos en círculo. Al emerger la larva, el corión del huevo permanece erecto.



Ilustración 12. - Adulto y huevos de *B. tabaci* (Fuente: Gustavo Gonsebatt, Marcela Lietti, 2006)

La larva de primer estadio, móvil o “crawler”, es la que emerge del huevo. Tiene forma elíptica, de color blanco verdoso, ventralmente plano y dorsalmente convexo. Poseen dos ojos simples de color rojo y 6 patas funcionales, sin embargo, son poco móviles, fijándose, generalmente cerca del lugar de la puesta. Cuando se fija se repliega sus patas y antenas, clava su estilete bucal y empieza a alimentarse. Una vez fijada se produce la muda, transformándose en larva de segundo estadio, para lo cual las antenas y las patas degeneran.



Ilustración 13. - Estado larvario de *B. tabaci*.

En el segundo y tercer estadio larvario las larvas están inmóviles, comienzan a manifestarse las ondulaciones que serán más apreciables en los últimos estadios larvarios. A medida que avanza el desarrollo aumenta de tamaño, a la vez que el color se vuelve más opaco y se hacen más gruesos.

El tercer estadio surge tras producirse una segunda muda. Es de mayor tamaño y de aspecto similar a la larva de segundo estadio.

Tras una tercera muda se da paso a la pupa, es de color amarillo más opaco que el adquirido en los estadios larvarios, con forma más o menos elíptica, pudiendo observarse los ojos compuestos de color rojo. El dorso se eleva en el centro, permaneciendo bajas las áreas marginales. La estructura pupal difiere dependiendo de la planta huésped. En hojas glabras las pupas no tienen alargadas las setas del dorso, sin embargo, en hojas pilosas se observan claramente siete pares. Las pupas parasitadas adquieren un color más oscuro que el normal. El adulto sale del pupario por una incisión que realiza en forma de T.

Tras el desarrollo de la pupa, el adulto emerge, es de color amarillo-azufre con dos pares de alas blancas inmaculadas. Ojos compuestos de color rojo oscuro a negros. Longitud 1 a 0,9 mm, anchura 0,32 mm, longitud de la antena 0,29 mm. El macho solo se diferencia de la hembra en la genitalia. *Bemisia tabaci* coloca sus alas en tejado contra su abdomen, con un ángulo aproximado de 45° con la superficie de la hoja. La hembra adulta generalmente es de mayor tamaño que el macho. Además se diferencia de este último en la forma del abdomen, ya que la hembra tiene una forma más o menos globosa y oval mientras que el macho tiene una forma más apuntada.



Ilustración 14. – Adulto de *B. tabaci* saliendo del estadio de pupa.



Ilustración 15. - Adultos, larvas y pupas de *B. tabaci*.

Tabla 1. - Duración del ciclo de vida de *Bemisia tabaci*.

ESTADO DE LA MOSCA BLANCA	DURACIÓN (días aproximadamente)
Huevo	7-8
Primer estado larvario	3-5
Segundo estado larvario	1-3
Tercer estado larvario	1-3
Cuarto estado larvario o pupa	5-6
Adulto	5
<u>TOTAL</u>	22-23

Existen también numerosos trabajos sobre la biología de *Bemisia* que son fundamentales para que los métodos de control sean suficientemente eficaces, pero es necesario incrementar aún más las investigaciones para determinar los parámetros del desarrollo (umbrales térmicos, constante térmica, temperatura óptima, etc.) para llegar a comprender mejor su dinámica poblacional.

En este sentido, a pesar de que la temperatura es uno de los factores limitantes en el desarrollo de cualquier organismo, es importante considerar también otros de naturaleza biótica, que puedan influir en las tasas de crecimiento de una población (Marco *et al.* 1997).

Bemisia tabaci presenta una verdadera metamorfosis, pasando por los estados de huevo, larva, pupa y adulto, que desarrolla su actividad en el envés de las hojas. La forma de reproducción es por partenogénesis arrenotóquica.

La longevidad de los adultos es muy variable dependiendo de la planta y la temperatura, existiendo, en algunos casos, una gran variabilidad para las mismas temperaturas y plantas hospedantes. Los machos tienen una longevidad que puede situarse entre 15 - 16 días a 28°C y, en el caso de las hembras entre 30-31 días a 16 °C, con la existencia de un periodo de preoviposición corto, de 2 a casi 4 días.

La fecundidad de las hembras depende de la temperatura, plantas hospedantes, variedad y estado fisiológico de la planta. Para *B. tabaci*, la fecundidad puede estar comprendida entre 2,5 y 7,1 huevos/hembra y día. Los parámetros evolutivos pueden variar según el huésped y las condiciones climáticas.

El adulto puede distinguir entre especie vegetal y variedades. Uno de los factores más importantes es el color para su selección a gran distancia. Existe una correlación positiva entre la intensidad de luz y la atracción, independientemente del sexo de los adultos.

La hembra prefiere las hojas jóvenes para ovipositar, a excepción de especies vegetales pilosas en las que se abstiene, sin embargo, parece ser que prefiere una moderada pilosidad.

Los enemigos naturales son un factor importante de regulación poblacional en los cultivos hortícolas protegidos.

El pH de la hoja tiene una relativa incidencia sobre la población, existe una atracción parcial hacia las hojas con un pH mayor, tendiendo los adultos a alimentarse sobre hojas más viejas, con un rango de pH entre 6,0 y 7,5.

En cuanto al efecto hídrico puede afectar al crecimiento y desarrollo de la planta, existiendo un mayor crecimiento poblacional en plantas con un mayor estrés hídrico.

Buena parte de las investigaciones se centran en la determinación de los umbrales térmicos inferior y superior, temperatura óptima y constante térmica, mediante observación de los tiempos de desarrollo del periodo de prepuesta y de las distintas fases del ciclo biológico a diferentes temperaturas constantes, así como a la determinación del número de generaciones en zonas de interés hortofrutícola, partiendo de los valores estimados del cero de desarrollo, de la constante térmica y de los datos climáticos (Muñiz y Nombela 2001).

El rango de temperatura para su desarrollo está entre 16°C y 34°C, estableciéndose aproximadamente en 29°C, temperaturas letales se sitúan por debajo de los 9°C y por encima de los 40°C. El umbral de temperatura para la oviposición es de 14°C. La fecundidad se reduce de manera notable al hacerlo la temperatura.

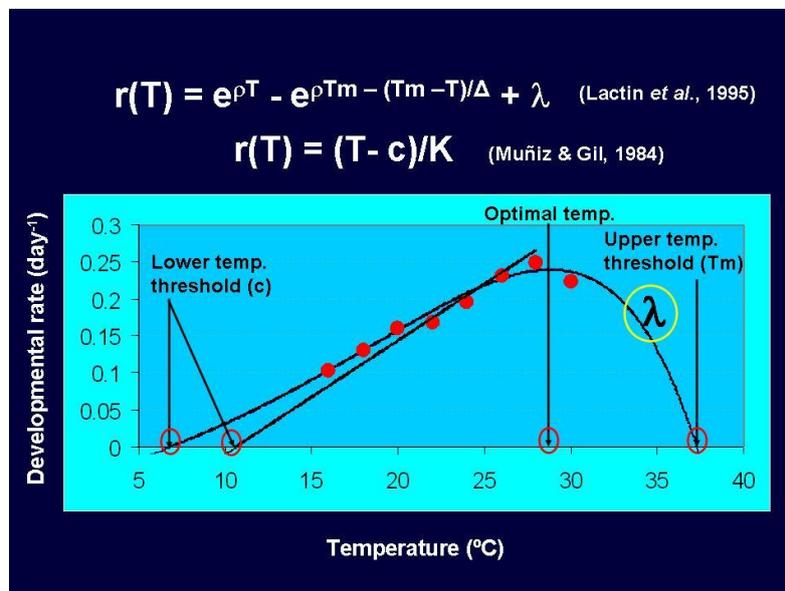


Ilustración 16. - Modelo fenológico.

2.5. Hospedantes y daños causados

Bemisia tabaci es una plaga muy polífaga. La especie de planta hospedante, su variedad y estado fisiológico, tiene un gran efecto sobre la biología y ecología, así como sobre la mortalidad de estados inmaduros, longevidad y fecundidad de adultos.

Los daños que causa se deben a diversos efectos del insecto en las plantas atacadas, como el debilitamiento de la planta por la extracción de nutrientes, problemas fisiológicos causados por el biotipo B de *B. tabaci*, por ejemplo, madurez irregular en tomate y plateado en cucurbitáceas. La excreción de sustancias azucaradas que favorecen el crecimiento de hongos con micelio negro sobre las plantas (fumagina) incluyendo especies de *Cladosporium* y *Capnodium*, los cuales cubren la parte superior de la hoja interfiriendo con los procesos de fotosíntesis, y la transmisión de begomovirus (Geminiviridae), de esta manera también afectan el rendimiento del cultivo (Cardona *et al.* 2005, Rodríguez *et al.* 1999).

Los órganos que se ven afectados pueden ser las hojas más jóvenes y tiernas ya que los adultos tienen una preferencia para la alimentación y oviposición. Esto depende de varios factores como son la edad de la hoja, estructura, especie de planta, variedad y estado fisiológico.

Tanto los adultos como los estados inmaduros se localizan preferentemente en el envés de las hojas. Con el desarrollo de la planta y de los ejemplares de la plaga, éstos van quedando en hojas de mayor edad y desarrollo. Las hembras colocan los huevos preferentemente en el envés de las hojas, aunque en algunos cultivos prefieren el haz. Los huevos se disponen a veces en forma aislada, otras veces en grupos irregulares y ocasionalmente en semicírculo.

2.6. Estrategias de control

Existen numerosos programas de control, tanto de *Bemisia* como de los virus que transmite, basados fundamentalmente en la aplicación de insecticidas y en métodos de lucha biológica (Beitia *et al.* 1997; Delgado 1997, Díez *et al.* 1997, González-Zamora 1997, Reina y Bejarano, 1997, Rodríguez 1997).

Hasta la fecha no se conocen cultivares comerciales que sean resistentes al virus. Ya que actualmente se está presenciando los primeros ataques a gran escala de ToLCNDV. El control de la enfermedad se basa en el control del vector *Bemisia tabaci*.

Hay una serie de métodos preventivos y culturales:

Para el control físico y agronómico, podemos destacar el control en el semillero, la eliminación de restos de cosecha, plantas enfermas y malas hierbas, el uso de mallas en las ventilaciones de los invernaderos, el uso de trampas cromotrópicas amarillas, mantener la hermeticidad en el invernadero, no abandonar los cultivos al final del ciclo pues hay que controlar el vector hasta el final o dejar un periodo de descanso entre cultivos en una amplia zona de cultivo puede ayudar a romper el ciclo de la mosca blanca.

En cuanto al control biológico los enemigos naturales autóctonos de esta plaga son parásitos, depredadores y enemigos naturales comercializados.

Parásitos como *Encarsia Formosa* (Gahan), *Encarsia lutea* (Masi), *Encarsia transvena* (Timberlake), *Eretmocerus mundus* (Mercet), *Encarsia perandiella* (Howard), *Encarsia adrianae* (López-Ávila), *Encarsia mineoi* (Viggiani).



Ilustración 17. - *Encarsia Formosa*, parásito de *B.tabaci*.

Depredadores como *Cyrtopeltis tenuis* (Reuter), *Macrolophus caliginosus* (Wagner).

Y enemigos naturales comercializados como *Delphastus pusillus*, *Encarsia formosa*, *Macrolophus caliginosus*, *Eretmocerus eremicus*, *Eretmocerus mundus*.



Ilustración 18. – *Delphastus pusillus* enemigo natural de *B. tabaci* que se comercializa.

Para el control químico se debe tener en cuenta ciertos aspectos:

Se realizará este control si los anteriores métodos no son efectivos, procurando utilizar materias activas que respeten la fauna auxiliar y los polinizadores, dependiendo de cuál de ellos se esté utilizando.

Hay que diferenciar el estado de la plaga y el nivel poblacional de cada estadio al que se dirige el tratamiento, ya que según esto haremos la elección del producto. Los huevos y los últimos estadios ninfales son tolerantes a la mayoría de los insecticidas, mientras que los adultos y jóvenes estadios inmaduros son más susceptibles.

En cuanto al momento de aplicación hay que tener en cuenta que si el tratamiento va dirigido contra adultos, será más conveniente realizarlo a primera hora de la mañana o en el ocaso del día, ya que estos son los momentos en los que se encuentran agrupados en las hojas de las plantas.

La técnica de aplicación será tal que se alcance bien el envés de las hojas, procurando una buena cobertura de las plantas. Para las aplicaciones en pulverización se aconseja la utilización de mojantes.

Hay que tener bien claro que no existen tratamientos para el virus.

3. Métodos de diagnóstico

Los virus en plantas causan grandes pérdidas a varios cultivos agrícolas y hortícolas de todo el mundo. Actualmente, los métodos para la detección e identificación de virus en plantas, desempeñan un papel fundamental en el manejo de enfermedades de virus (Naidu y Hughes).

Las técnicas de diagnóstico para virus se dividen en dos grandes categorías: en aquellas técnicas que relacionan las propiedades biológicas con la interacción del virus con su huésped y/o vector (por ejemplo, la sintomatología) y aquellas técnicas que se clasifican en función de las propiedades intrínsecas del propio virus (proteína de la cubierta y el ácido nucleico) (Naidu y Hughes).

Se pueden citar tres métodos relevantes:

Métodos de detección basados en la proteína de la cubierta, son ensayos de inmunoabsorción e inmunotransferencia, ligado a enzimas. En segundo lugar, técnicas basadas en ácidos nucleicos virales como por ejemplo ensayos de hibridación dot-blot y por otro lado reacciones en cadena de la polimerasa, ambos son más sensibles que otros métodos.

La disponibilidad de estos métodos de diagnóstico proporciona una mayor flexibilidad, un aumento de la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico rápido de enfermedades virales (Naidu y Hughes).

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) funcionan bien para detectar ToLCNDV. (Juarez *et al.* 2013).

3.1. ELISA

El nombre Enzyme-Liked Immunosorbent Assay, luego abreviado como ELISA, fue acuñado por los investigadores suecos Eva Engvall y Peter Perimann, los cuales describieron el procedimiento, publicado en 1971 (*Palacios 2012*).

El ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) ha sido muy popular para la detección de virus en material vegetal, vectores de insectos, semillas y propágulos vegetativos ya que se introdujo para dar lugar a la virología por Clark y Adams (1977). A diferencia de pruebas de precipitación y pruebas de aglutinación, ELISA es un inmunoensayo heterogéneo en fase sólida y por lo general realizado en placas o láminas de microtitulación compuestas de poliestireno o nitrocelulosa, entre otros materiales.

Debido a su adaptabilidad, sensibilidad, especificidad y economía en el uso de reactivos, ELISA se utiliza en una amplia gama de situaciones, especialmente a probar un gran número de muestras en un período relativamente corto de tiempo. Muchas variaciones de ELISA se han desarrollado (Clark y Bar-Joseph 1984, Cooper y Edwards 1986, Van Regenmortel y Dubs 1993) y se dividen en dos grandes categorías: procedimientos "directos" y procedimientos "indirectos" de ELISA. Se diferencian en qué complejo se trata de detectar, pero la teoría subyacente y del resultado final son los mismos (Naidu y Hughes).

Actualmente, hay antisueros comerciales para detectar virus, como por ejemplo los anticuerpos del virus de la cuchara, para *Squash leaf curl virus* (SLCV) y para *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) que reconocen ToLCNDV (Juárez *et al.* 2013).

En los procedimientos directos, se fija a la placa de microtitulación (placa de ELISA de diferentes materiales con pocillos) los antígenos, tras lavar la placa para retirar aquellos que no se han fijado y de bloquear la superficie de la placa para evitar ruido de fondo (*background*), se adiciona la solución de anticuerpos marcados (conjugados) con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Se vuelve a hacer un lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

Finalmente tras la incubación de los conjugados se adiciona reactivos de color (substrato) que hacen que se pueda identificar si la planta presenta una enfermedad viral con la determinación espectrofotométrica. Los anticuerpos de captura y detección pueden ser de una misma fuente o distinta.



Ilustración 19. - Método Directo de marcaje de anticuerpo para su uso en ELISA.

En el caso de procedimiento de ELISA indirecto, se realiza de forma similar al ELISA directo, pero en este caso el antígeno está tapizando la placa, al igual que en el método directo, y se añade un anticuerpo primario, tras el cual, y después de una etapa de lavado se incubaba con un anticuerpo secundario que es el que está marcado con la enzima.

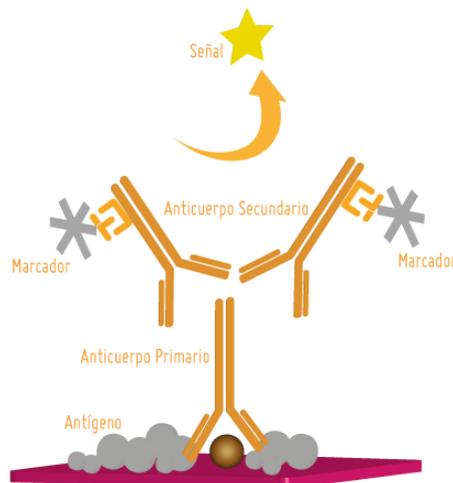


Ilustración 20. - Método Indirecto de marcaje de anticuerpo para su uso en ELISA.

Cuando el virus se intercala entre dos moléculas de anticuerpos, este método se llama “Sandwich de Doble Anticuerpo” (DAS-ELISA). En la práctica, el método DAS-ELISA es altamente específico y requiere en cada detección un anticuerpo para conjugar a una enzima (Naidu y Hughes).

En este caso la placa está tapizada con un anticuerpo. Se adiciona la muestra problema (por ejemplo, el extracto vegetal), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Finalmente se adiciona anticuerpos específicos del antígeno a detectar, conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Se le añade el sustrato para que sea capaz de actuar la enzima marcadora. En cuanto al ELISA sándwich triple la diferencia viene dada por que los segundos anticuerpos que se colocan no son marcados con la enzima, sino que luego se coloca anti-anticuerpos conjugados con la enzima que reaccionaran con los anticuerpos que se colocaron, posteriormente se lava y se coloca el sustrato específico para la enzima (Cultek S.L.U).



Ilustración 21. - Método Sandwich (tipo DAS) de marcaje de anticuerpo para su uso en ELISA.

El método de ELISA Competitivo se basa en la fijación de anticuerpos específicos al soporte anticuerpos, adicionando una concentración conocida de una mezcla de antígenos del anticuerpo utilizado en el paso anterior, marcados con una enzima y antígenos desconocidos (objeto de estudio). Al mismo tiempo, añadir únicamente antígenos del anticuerpo usado en el paso anterior, marcados con una enzima, y posteriormente lavar. Agregar un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.

Se hace una lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado de ambas pruebas y poder así comparar los resultados. Si las lecturas de ambas pruebas son iguales, el antígeno a estudio no tiene nada que ver con los anticuerpos empleados en el soporte. Si hay diferencia en las lecturas de ambos pocillos, el antígeno objeto de estudio, está relacionado con el anticuerpo empleado para tapizar el soporte y la diferencia de absorbancia o densidad óptica; es proporcional a la concentración del antígeno problema (Cultek S.L.U).

3.1.1. Métodos específicos

Para lograr el tapizado de antígenos y anticuerpos se diluye el antígeno o anticuerpo en tampón carbonato (pH 9,6) y se incuba luego durante 3h a 37°C o 16h a 4°C, también se puede incubar a 40-50°C en tampón fosfato (PBS) o en agua fisiológica tamponada pH 7,2-7,4.

En cuanto a la solución de lavado se elaborará una solución salina con Tween 20 como agente tensioactivo. De igual forma se debe conjugar la enzima, esta debe de poder unirse fácilmente a antígenos y anticuerpos, empleando un substrato cromogénico o fluorogénico conveniente. Las enzimas más utilizadas son las fosfatas alcalina, peroxidasa de rábano y β -galactosidasa (Cultek S.L.U).

3.1.2. Métodos de lectura de resultados

Hay tres métodos de lectura: colorimetría, fluorescencia y luminiscencia.

Colorimetría, en estos ensayos se obtiene un producto de reacción coloreado que absorbe luz, siendo la densidad óptica (DO) del mismo proporcional a la cantidad de producto medido. Para todos los ensayos enzimáticos, la etapa final es la adición del substrato enzimático, este es escogido por su rendimiento en la reacción enzimática. Para ensayos colorimétricos, la tasa de desarrollo de color es proporcional, dentro de un cierto rango, a la cantidad de conjugado enzimático presente.

Fluorescencia, es una variación de la colorimetría, en este un producto de reacción emite fluorescencia cuando es excitado a una determinada longitud de onda, siendo las unidades relativas de fluorescencia (fotones de luz emitidos) proporcionales a la cantidad de producto analizado. En comparación con los métodos colorimétricos, los ensayos de fluorescencia son ligeramente más sensibles y sufren a cambios de pH, temperatura, restos de detergente en el lavado y concentración iónica. Lo que lo hace más funcional es que amplía el rango de medida en cuanto al obtenido en los ensayos colorimétricos.

Luminiscencia, en este proceso la enzima actúa sobre un sustrato generando un producto capaz de emitir fotones en lugar de generar un color visible, este proceso se define como la capacidad de emitir luz por parte de una sustancia, esta puede ser mediante una reacción química (quimioluminiscencia), mediante una longitud de onda (fotoluminiscencia, que es lo mismo que fluorescencia) o mediante un producto al ser degradado (bioluminiscencia).

Para poder interpretar los resultados, se puede observar el color a simple vista, pero el ojo humano no es capaz de notar la variación de 0,1 de densidad óptica, por eso se usa el espectrofotómetro para poder así cuantificar los resultados. Es importante resaltar que las soluciones ELISA es un método de inmunodetección que se utiliza para detectar diversas patologías animales y vegetales.

3.2. Hibridación molecular

La hibridación molecular fue empleada por primera vez en plantas virosantes como herramienta de diagnóstico para detectar viroides (Owens y Diener 1981).

La hibridación se refiere al apareamiento específico que ocurre entre cadenas de ácidos nucleicos con secuencias complementarias, proceso que es análogo a la reacción antígeno-anticuerpo, pero con la diferencia de que en la hibridación en lugar de anticuerpos se emplean las llamadas sondas moleculares (molecular probe) (Mercado y Gamba 1997). Las sondas no son más que fragmentos cortos de ADN o ARN sintetizados *in vitro* y que se marcan con sustancias radiactivas fluorescentes o de otro tipo, a fin de hacer posible su posterior detección y de esta manera la identificación de la secuencia de ADN o ARN de interés (Cerezo y Madrid 1995, Mercado y Gamba 1997).

La afinidad de una hebra de ADN con su secuencia complementaria es uno de las más fuertes y de las interacciones más específicas que se encuentran en la naturaleza (Naidu y Hughes).

Se pueden destacar diferentes procedimientos de laboratorio que utilizan el principio de hibridación molecular. La diferencia existente entre ellos es el tipo de ácido nucleico utilizado, el soporte en que se lleva a cabo la hibridación y la forma de colocar los ácidos en la membrana.

La elección del método está condicionado por la naturaleza de la sonda que se vaya a emplear (Palukaitis 1984). Los métodos de hibridación molecular son: Southern blot, Northern blot, Western blot, Dot blot y slot blot.

Southern blot, es una técnica empleada para detectar secuencias específicas de ADN. Para llevar a cabo hibridaciones de este tipo, se aísla el ADN de un tejido o línea celular, luego se purifica, y se digiere con enzimas de restricción específicas. Los fragmentos generados se separan mediante electroforesis y después son transferidos a la membrana que sirve de soporte (gel de agarosa). Este proceso se lleva a cabo colocando el gel de agarosa sobre papel de filtro previamente empapado en una solución llamada de transferencia (solución salina concentrada). A continuación se sitúa la membrana sobre el gel y encima de esta una pila de papel filtro seca, y por capilaridad la solución de transferencia es atraída a la pila de papel filtro, arrastrando consigo el ADN hacia la membrana, donde queda inmovilizado conservando la misma posición relativa que ocupaba en el gel. Luego, el ADN puede ser hibridado en la membrana con una sonda marcada (Cerezo y Madrid 1995, Correa-Rotter y Gamba 1997).

Debido a que la transferencia del ADN del gel a la membrana se produce por capilaridad, con el mismo principio utilizado por años para limpiar manchas con papel secante, el proceso se conoce en inglés como blotting. Southern propuso utilizar el término blot (secado) o blotting para referirse a esta técnica y actualmente se conoce como Southern blot (Mercado y Gamba 1997).

Por otro lado, Northern blot, es conocida por ser una variante del método anterior en el que en lugar de utilizar ADN como sustrato de estudio, se emplea ARN. El protocolo que se sigue es similar al Southern blot y por analogía con éste, se le conoce como Northern blot (Cerezo y Madrid 1995).

Western blot, no es conocido por ser un método de análisis directo de los ácidos nucleicos, sino del producto de la expresión de los genes, es decir, las proteínas. (Cerezo y Madrid 1995, Mercado y Gamba 1997).

El ensayo de hibridación dot blot o spot blot es una técnica comúnmente utilizada en el diagnóstico de virus en planta (Maule *et al.* 1983, Garger *et al.* 1983, Owens y Diener 1984, Rosner *et al.* 1986, Baulcombe y Fernández-Northcote 1988, Palukaitis 1984). Son procedimientos similares al Northern con la diferencia de que el ARN o ADN no es sometido a electroforesis, sino que se sitúa directamente sobre la membrana. Este tipo de análisis requiere de un molde asociado a succión con vacío para colocar el ARN o ADN que puede producir círculos o puntos (dot blot) o hendiduras (slot blot). Este tipo de prueba es muy útil cuando se quieren estudiar gran número de muestras, pero tienen la limitante de no ofrecer información sobre el tamaño de las bandas del ARN hibridado (Correa-Rotter y Gamba 1997).

En el caso de ToLCNDV, es un virus compuesto por ADN, por lo que debe emplearse una técnica en la que se pueda trabajar con ADN.

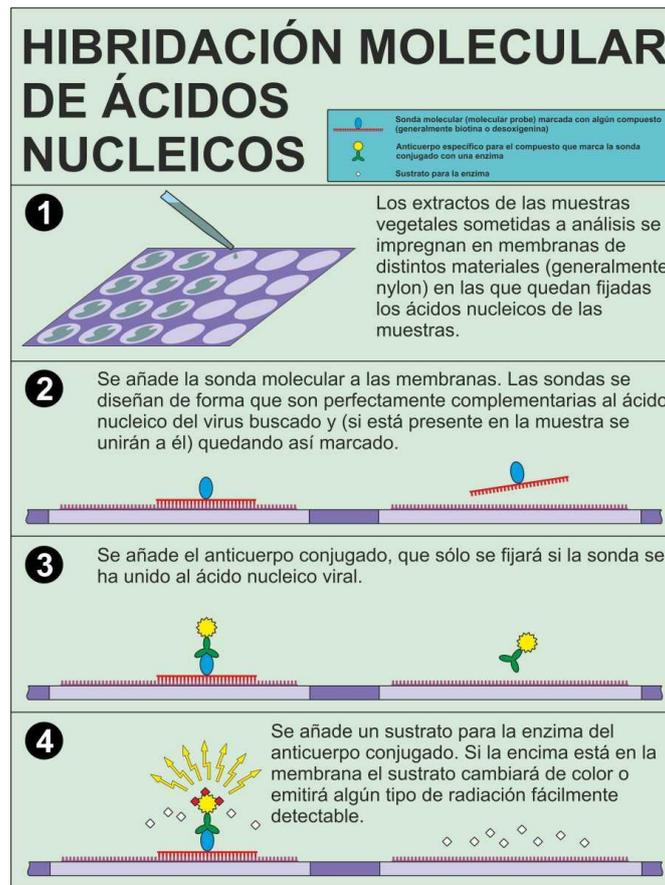


Ilustración 22. - Método de hibridación molecular, dot blot o spot blot.

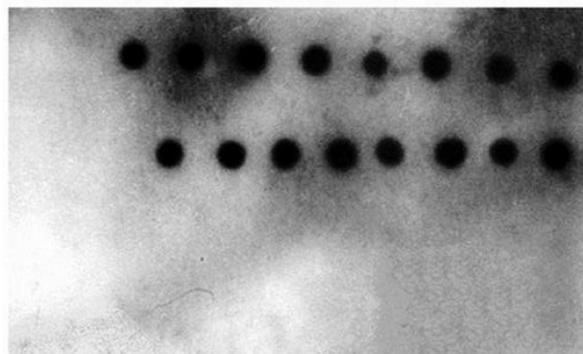


Ilustración 23. - Ejemplo de película revelada de la técnica Dot-blot.

3.3. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR como comúnmente se conoce (del inglés polymerase chain reaction) es un método enzimático de amplificación de secuencias específicas de ADN, concebido por Kary Mullis y sus colaboradores a principios de los años 80. Este método permite la síntesis *in vitro* de un fragmento de ADN de forma tal que, en cada ciclo del proceso, se duplica el número de moléculas (Bobadilla y Gamba, 1996).

El principio del PCR consiste en determinar la secuencia de interés y seleccionar pequeños segmentos de nucleótidos llamados iniciadores o cebadores, complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas que flanquean a dicha secuencia, a partir de los cuales se inicia la elongación o síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada iniciador (Cerezo y Madrid, 1995).

En esta técnica se consideran importantes los siguientes parámetros: un suministro abundante de iniciadores y de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), una fuente renovada de ADN polimerasa (enzima encargada de la síntesis de las cadenas complementarias), y los ciclos periódicos de cambios de temperatura. Estos últimos consisten en: desnaturalización del ADN a 100° C, alineamiento de los iniciadores con las secuencias de interés entre 50 y 60° C y síntesis del ADN a 72° C. Estas temperaturas pueden variar de acuerdo con las condiciones de la reacción (Bobadilla y Gamba 1996).

Cuando se comenzó a utilizar la PCR, el empleo del ADN polimerasa I de *E. coli* hacía el proceso muy tedioso, pues esta enzima perdía su función al incrementar la temperatura, lo que obligaba a agregar ADN polimerasa en cada ciclo. Con la introducción de la llamada Taq polimerasa, un ADN polimerasa aislado de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales y tiene una temperatura óptima entre 70 y 75° C, la PCR se hizo más eficiente, más accesible e incluso fue posible automatizarla (Cerezo y Madrid 1995).

El poder de la amplificación con PCR es tan alto que los más pequeños contaminantes pueden dar resultados falsos positivos, por lo que el material y las soluciones a emplear deben ser escrupulosamente controlados.

Las aplicaciones de la PCR son múltiples. Entre ellas tenemos: la amplificación de fragmentos de genes como rápida alternativa de la clonación, la modificación de fragmentos de ADN, la detección sensible de microorganismos seguido de una segura genotipificación, si se desea, el análisis de muestras arqueológicas y estudios antropológicos, la detección de mutaciones

importantes en enfermedades hereditarias, transformación maligna o tipaje de tejidos, el análisis de marcadores genéticos para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad y para el mapeo de rasgos hereditarios, el estudio de expresión de genes, entre otras (Herrera y Gamba 1996).

En la siguiente imagen se muestra la detección por PCR-RFLP de ToLCNDV llevada a cabo por Miguel A. Aranda en diversos huéspedes. Para cada huésped se usaron tres muestras. Los productos de PCR aparecen sin digerir en el gel de la derecha (a la izquierda en cada bloque) y digeridos con el enzima de restricción SphI (a la derecha en cada bloque). Dos bandas en los productos de digestión indican la identificación específica de ToLCNDV.

PCR-RFLP

```

GGGTTGTGAAGGCCCTTGTAAAGTGCAATCGTTTGAATCCCGGCA
CGATGTCCTCGCATATTGGCAAGTCATGTGTAGTATGATTTAC
TCGAGGCACCGGACTCACACATCGCGTAGGCCAAGCGATTTTGTGT
GAAATCTGTCTATGTACTGGGAAAAATATGGATGGATGAAATAT
CAAAACTAAAAATCATACTAATAGTGTATTGTTCCTTCTTGTTCG
TGACCGGCGTCCAAACCGGAACCCCTCAAGATTTGGGGAAATTTT
CAATATGTTTGATAATGAACCTAGCACAGCCACGGTGAAGAACAT
GCATCGTATCGTATCAAGTCTTACGGAAAGTGCGATGCTACTGT
                                     SphI
GACGGGAGGAACGTATGCATCAAGGGAGCAAGCATTAGTTAGGAA
GTTTGTAGGGTTAATAATTATGTTGTTTACAATCAACAAGAGGC
CGGCAAGTATGAGAATCATACTGAAAATGCATTAATGTTGTATAT
GGCGGTACA

```

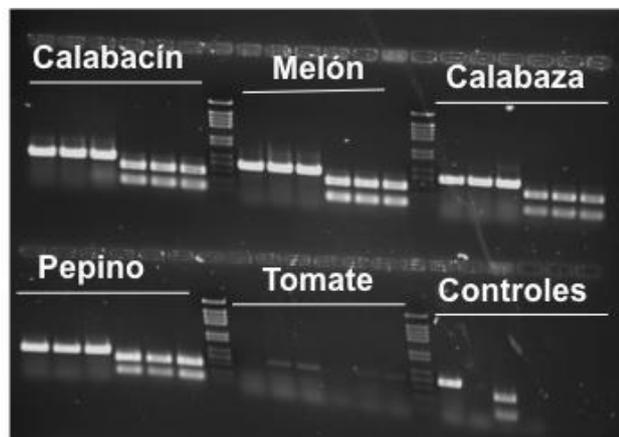


Ilustración 24. – Análisis realizados en plantas de campo con síntomas utilizando cebadores genéricos para amplificar un fragmento del gen de la proteína de la cápsida de geminivirus.

II. OBJETIVOS

Durante el verano de 2013, el virus Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV), ha producido importantes daños en las plantaciones de calabacín de la Región de Murcia. El riesgo potencial que representa la presencia de esta virosis para diferentes cultivos hortícolas de la Región de Murcia, incluyendo cucurbitáceas y solanáceas, es muy elevado.

Por lo que, el presente proyecto toma como principal objetivo ahondar en el conocimiento de la transmisión, sintomatología y el diagnóstico del ToCNDV en especies de cultivo hortícola y de plantas adventicias del Campo de Cartagena con un alto interés agronómico.

Objetivos parciales:

1-. Ver si el virus se trasmite en diversos cultivos propios de campo de Cartagena. Para ello la transmisión a través del propio vector, *Bemisia tabaci*.

En segundo lugar, realizar la transmisión de forma mecánica.

Estas transmisiones se hacen sobre especies de cucurbitáceas, como son el melón (*Cucumis melo*), la calabaza (*Cucurbita moschata*), el pepino (*Cucumis sativus*), y el calabacín (*Cucurbita pepo*). Y en solanáceas como son el pimiento (*Capsicum annuum*) y el tomate (*Solanum lycopersicum*)

2-. Describir su sintomatología. El siguiente objetivo es identificar cuáles son los distintos síntomas que muestra cada especie, destacando las diferencias en cada una de ellas, llevando un control exhaustivo de su evolución agronómica e identificar si hay casos asintomáticos.

3-. Detectarlo mediante técnicas de laboratorio. Finalmente nuestro último objetivo, es una vez realizada la transmisión, proceder a través de diferentes métodos de identificación a corroborar si realmente estamos ante especies que son susceptibles a dicho virus. Estos métodos son PCR's e hibridación molecular. Y así, poder relacionar los resultados obtenidos por estos métodos con los análisis visuales de los síntomas que muestran las plantas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Transmisión con vector

1.1. Obtención de plántulas

Dentro de toda la gama de especies hortícolas se escogen de las cucurbitáceas y solanáceas las de mayor susceptibilidad al virus.

Tabla 2. – Especies de cucurbitáceas empleadas en los ensayos, variedad y proveedor

	ESPECIES	PROVEEDOR
Cucurbitáceas	Calabacín var. Berula (semilla)	Fitó
	Calabaza (plántula)	Fitó
	Melón var. Jiménez (plántula)	Syngenta
	Pepino (plántula)	Fitó

Tabla 3. - Especies de solanáceas empleadas en los ensayos, variedad y proveedor

	ESPECIES	PROVEEDOR
Solanáceas	Pimiento var. Italiano dulce (plántula)	Nuhnems
	Tomate var. bodar (plántula)	Fito Agrícola S.L.

Se tomaron entre diez y quince plantas de cada especie para realizar los ensayos. Algunas de ellas se obtuvieron en forma de plántula y otras en semilla en función de la disponibilidad de los semilleros.

Los semilleros donde se suministraron las plántulas y las semillas fueron, Semilleros El Mirador en la pedanía El Mirador que pertenece a San Javier y Plantas Carthago en San Cayetano, pedanía del municipio de Torre-Pacheco.

1.2. Obtención de las poblaciones de mosca blanca

Las poblaciones virosantes de la mosca blanca se obtuvieron de plantaciones de calabacín que presentaban síntomas del virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi, en este caso, fueron obtenidas en la Finca Experimental de Torre Blanca.

Se recolectan con un aspirador entomológico de mano, eléctrico y otro manual cogiendo adultos directamente del envés de las hojas de aquellas plantas que más síntomas mostraban. Ambos aspiradores guardan las moscas en unos botes pequeños.



Ilustración 26. - Aspirador entomológico automático



Ilustración 25. - Aspirador entomológico manual

Finalmente se obtienen dos botes con unas 70 moscas blancas cada uno y tres botes de 60 moscas aproximadamente cada uno, haciendo un total de unas 320 moscas blancas a repartir en los tres compartimentos del invernadero donde se realiza el ensayo.

Inmediatamente, se trasladaron hasta el lugar del ensayo en un recipiente hermético sin ser expuesto a altas temperaturas para evitar la mortalidad de las moscas.

1.3. Ubicación y preparación de los ensayos

La ubicación del ensayo fue en el laboratorio de Entomología y en un módulo de un invernadero de la Finca Experimental Tomás Ferro en La Palma (Cartagena) perteneciente a la ETSIA.

El invernadero está compuesto en su interior por ocho compartimentos y doble puerta con malla anti trips, la entrada a cada uno de los compartimentos es a través de una cremallera. El invernadero dispone de una electroválvula y cuenta con 8 sectores. Cada uno de estos compartimentos tiene 4 tuberías secundarias con 10 goteros cada una de 4L/h.



Ilustración 27. - Vista del interior del invernadero, a ambos lados del pasillo central están los compartimentos.

Se diseñó la distribución de las plantas en el invernadero para poder estimar cuantas plantas serán necesarias.

Las plantas compradas en los semilleros o procedente de semilla, se mantenían en las cámaras de cultivo del laboratorio de la Finca Experimental. Las condiciones fueron 23.3 ± 2 °C y 94.5% HR, y 16:8 luz oscuridad. Las plantas procedentes de semillas se mantenían hasta tener 2 hojas verdaderas.

Se trasplantaron el 28 de Marzo de 2014 a macetas de 40 cm de diámetro. Como sustrato se empleó uno caracterizado por su contenido en carbonato cálcico (6g/L), fertilizantes NPK (1/1,5 g/L) y microelementos, con contenido en metales pesados inferior a los límites autorizados para esta clasificación, Clase A.



Ilustración 28. - Plántulas de calabaza, melón, pepino, tomate, pimiento y calabacín.

Se deja que el sustrato de los alveolos se seque y no esté con excesiva humedad para que al extraer las plántulas no se desgarren del sustrato y así facilitar la extracción. Las plantas se trasplantan cuidadosamente ya que al ser tan jóvenes son muy débiles, por lo que se debe evitar provocar alguna lesión o herida que facilite enfermedades por hongos a la planta. Se puso una planta por cada una de las macetas, haciendo esto un total de 62 macetas.

Se dispuso en el compartimento 1, 10 plantas de calabaza y 16 de melón, en el número 2, 12 de pepino y 16 plantas de calabacín, y finalmente en un último y tercer compartimento las dos especies de la familia de las solanáceas, 12 de pimiento y 12 de tomate.

En los goteros se coloca una piqueta como aparece en la imagen, poniendo una piqueta por maceta a una separación de 10 cm de la planta aproximadamente. Los goteros de la tubería que no se utilizaron, se taparon para evitar el derroche de agua y optimizar así su consumo.



Ilustración 29. - Goteros con piquetas que aportan el riego a las macetas.

Se dieron 3 riegos de 40 minutos tras la plantación y se dejaron 5 días consecutivos sin regar para que las raíces crezcan y se ramifiquen buscando el agua.

Con una sonda de humedad que mide con el sistema FDR, es decir, por reflectometría del dominio de la frecuencia, se medía la humedad para controlar cuándo se debía volver a dar el próximo riego. Cuando el porcentaje de humedad fue inferior al 40% se aportó agua.

A partir del quinto día tras la plantación, el riego se hace diario de una duración de diez minutos, donde cinco minutos se dedican al abonado que se centra en el crecimiento vegetativo de la planta.



Ilustración 30. - Sonda de humedad marcando 40%, lo cual indica que la humedad del sustrato está en su punto óptimo.



Ilustración 31. - Planta de melón a los 7 días de la plantación.

Pasados 7 días tras la plantación, las plantas estuvieron preparadas para realizar la transmisión del virus con el vector, *Bemisia tabaci*.

1.4. Inoculación con *Bemisia tabaci*

El día 3 de abril se llevó a cabo la inoculación.

Después de trasladar los botes con las moscas blancas, se dejaron abiertos en los compartimentos sobre el sustrato de las macetas, para dejar que ellas solas vayan saliendo y adaptándose al entorno.

Se optó por la alternativa de depositar en el compartimento 1 (plantas de melón y calabaza) los tres botes que contienen cada uno 60 especies de mosca blanca, hacen un total de unas 120 moscas blancas, teniendo en cuenta que hay 26 plantas dentro del compartimento se estima entre 4 – 5 moscas por planta inicialmente en la transmisión.

En el compartimento 2 (plantas de pepino y calabacín), se depositó un bote de 70 moscas blancas.

Finalmente en el compartimento 3 (plantas de tomate y pimiento), donde están las plantas que pertenecen a la familia de las Solanáceas, se depositó el último bote de 70 especies de *Bemisia tabaci*.

Se revisaron las plantas y en todas ellas se veía, como mínimo, una o dos moscas blancas en el envés de las hojas de las plantas.



Ilustración 32. - *Bemisia tabaci* en el envés de una hoja de Cucurbitaceas.

2. Transmisión mecánica

2.1. Obtención de plántulas

Para realizar la transmisión mecánica se dispone de 4 plantas de cada una de las especies, calabaza, calabacín, melón, tomate y pimiento obtenidas del semillero de Plantas Carthago en San Cayetano pedanía del municipio de Torre-Pacheco, Murcia.

De las cuatro plantas, una se deja como control para comparar los efectos de los síntomas con las demás plantas y al resto se les realiza la transmisión mecánica.

2.2. Origen del aislado del virus

La realización de la transmisión mecánica se llevó a cabo con las plantas del ensayo de la transmisión del virus mediante vector, y que habían dado positivo por los métodos de hibridación molecular y PCR's, frente al virus del rizado de la hoja de tomate de Nueva Delhi.

Se emplean hojas de melón para las cucurbitáceas en las que se realiza la transmisión mecánica y hojas de tomate para las solanáceas.

2.3. Preparación de los ensayos

Una vez obtenidas las plantas del semillero, se trasplanta una a cada maceta. De cada especie se eligen 4 plantas, en tres plantas se realiza la transmisión mecánica y la restante, se deja como control.

Las plantas se pusieron en bandejas, de manera que cada bandeja contenía 4 plantas de dos especies.

Cada maceta inoculada se etiqueta con la fecha y el nombre del cultivo; el control se marca como tal para evitar confusiones. De igual manera se etiquetan las bandejas con el nombre del ensayo y la fecha en la que se realiza.



Ilustración 33. – Bandejas con las plántulas trasplantadas en macetas.

2.4. Transmisión mecánica

La metodología a seguir en la transmisión mecánica es una pequeña variante del método frotis:

a) Tomar aproximadamente dos ó tres hojas de melón y de tomate, con los síntomas bien marcados.

- b) Macerar en un mortero el tejido de la planta enferma y agregar unas gotas de agua.
- c) Rasgar y lesionar con cuidado una o dos hojas de cada planta.
- d) Con un bastoncillo de algodón impregnado con savia infectiva se impregna la solución obtenida de hojas de melón en las cucurbitáceas, y la solución obtenida de las hojas de tomate sobre las solanáceas.
- e) Se lava con agua para evitar el exceso.
- f) Colocar la planta en un lugar fresco y fuera del alcance de los insectos.



Ilustración 34. - Bandejas con las plantas de inoculación mecánica del virus ToLCNDV.



Ilustración 35. – Cámara donde se conservan las plantas para su posterior transmisión mecánica.

Una vez hecha la transmisión mecánica, se mantuvieron en una cámara 13 días a 23,3°C, y 94,5% de H.R.

Después de trece días, se pusieron en jaulas con las mallas y se colocaron en el invernadero hasta terminar el ensayo. Se colocan en la zona B (ver anexo I) del invernadero quedando lo más aisladas posibles de las poblaciones de *B. tabaci*.

Las jaulas que se emplean para el ensayo, se montan utilizando bandejas de polipropileno negras (57 cm de largo, 42 cm de fondo y 9 cm de alto), a las que se le fija mediante bridas una estructura de malla plástica. Las medidas de la jaula una vez montada son 52 cm de alto, 57 cm de largo y 42 cm de fondo. Sobre esta estructura se coloca una funda de malla anti-trips realizada a medida, dotada de una gran cremallera que se utiliza para la introducción y extracción del material vegetal. La estructura de la malla se coloca a su vez sobre otra bandeja negra cuya función es sujetar la tela y evitar la salida de los individuos.



Ilustración 36. - Jaulas donde se encuentran las plantas inoculadas por transmisión mecánica.

3. Seguimiento del cultivo

El seguimiento de los cultivos se realizó como mínimo dos visitas semanales para revisar cualquier incidencia o anomalía en las plantas y realizar instantáneas con una cámara fotográfica.

Cuando aparecían síntomas anómalos, sospechosos de ser provocados por *Bemisia tabaci*, se recogieron muestras de las distintas especies en pequeñas bolsas de plástico, donde se marca el contenido de la muestra y la fecha para poder identificarlas.

En caso de que aparezcan síntomas de alguna plaga o enfermedad se realizan fumigaciones con productos específicos intentando no matar al vector y evitar confundir la sintomatología.

Por la presencia de oidiopsis en el ensayo de la transmisión con vector, en calabaza, melón y pimiento, se aplicó como medida curativa de choque un fungicida sistémico, Bayfidan, a base de 31,2% de triadimenol como materia activa, suministrado por Bayer. Se empleó una dosis al 0,04% (40 cc/100L de agua) pulverizando todas las plantas que estaban infectadas. La fumigación se realizó el 10 de Abril y 30 de Junio.

Tabla 4. Características del fungicida empleado

NOMBRE DEL GRUPO	SUBGRUPO QUÍMICO O MATERIA ACTIVA REPRESENTATIVA	NOMBRE COMERCIAL	MATERIA ACTIVA Con registro en España	CASA COMERCIAL
Fungicidas DMI (De Methylation Inhibitors) (IBS, inhibidores de la biosíntesis de esteroides: Clase I).	Triazole	BAYFIDAN 312 SC	Triadimenol 31,2%	Bayer CropScience

Para el ensayo de transmisión mecánica, se aplicó Couraze con una dosis de 2 mL/L siendo su materia activa imidacloprid con actividad insecticida por vía sistémica y residual, para atacar contra el pulgón. La fumigación se realizó el 18 de Junio.

Tabla 5. – Características del insecticida empleado

GRUPO PRINCIPAL	SUBGRUPO QUÍMICO O MATERIA ACTIVA REPRESENTATIVA		NOMBRE COMERCIAL	MATERIA ACTIVA Con registro en España	CASA COMERCIAL
Agonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina.	4A	Neonicotinoides	COURAZE 70WG	Imidacloprid 70%	Bayer CropScience

En ambos ensayos, las plantas se fueron entutorando conforme iban creciendo. En cucurbitáceas, para una mejor visualización de la planta en vertical. Lo mismo ocurre con las solanáceas, se entutora para facilitar su crecimiento en vertical y así mejorar el análisis de sus síntomas. Para el caso de las plantas empleadas en el ensayo de la transmisión mecánica se facilita que las plantas en las que se ha realizado la transmisión no se rocen o lo hagan en la menor medida posible con la planta control.

Se hizo con una caña de 1,20 m de altura, para las plantas más altas, y de 20 cm para las más pequeñas, esta caña se une al tallo principal con ayuda de una brida de nylon.



Ilustración 37. - Plantas de tomate entutoradas. Ensayo transmisión con vector.

Si algún cultivo se extiende demasiado en un compartimento de manera que imposibilita su visualización de forma efectiva, se traslada a otro compartimento teniendo en cuenta que en todos los casos, en el envés de las hojas se encuentren moscas blancas.

Antes de que lleguen a la senescencia, y las plantas terminen de secarse por completo, se aprovecha para meter nuevas plantas para volver a transmitir el virus mediante *Bemisia tabaci*. Así, el 2 de Junio se introdujeron en el compartimento 1, tres nuevas plantas de melón, calabaza, pepino y calabacín, y en el compartimento 3, tres plantas nuevas de tomate y pimiento.

Las nuevas plantas procedían como las primeras, del mismo semillero y fueron trasplantadas a macetas con sustrato.

Para evitar que las muestras del ensayo por transmisión con vector que se llevaron a analizar tuvieran moscas blancas, se aisló una planta de tomate en otro compartimento, y se fumigó con Oberón a una dosis de 0.05% (50 cc/100L de agua) contra *Bemisia tabaci*. Se pulverizó la planta de tomate y la flora espontánea que se encontraba en ese mismo compartimento.

En cuanto al riego del ensayo de la transmisión mecánica, estas plantas se riegan cada cuatro días aproximadamente, dependiendo de las condiciones en las que se encontraba el sustrato. En la cámara el sustrato se mantiene más húmedo debido a las condiciones de ésta, por lo que el riego era menos frecuente, pero en cambio, una vez colocadas las jaulas con las plantas en el invernadero el riego se realiza de forma más frecuente.

En este ensayo, las plantas no se abonan, ya que no nos interesa dejar que las plantas crezcan mucho, debido al espacio limitado en el que se encuentran por motivos de aislamiento, para que no entren en contacto en ningún momento con el vector transmisor del virus, *Bemisia tabaci*.

4. Toma de muestras

Cuando aparecían síntomas anómalos, sospechosos de ser provocados por *Bemisia tabaci*, se recogieron muestras de las distintas especies en pequeñas bolsas de plástico.

Se llevaron a cabo los siguientes muestreos:

1º Muestreo, el 5 de Mayo de 2014

2º Muestreo, el 26 de Mayo de 2014

3º Muestreo, 23 de Junio de 2014

4º Muestreo, 2 de Julio de 2014

5º Muestreo, 23 de Septiembre de 2014

Trascurridos 32 días de la inoculación con *B. tabaci* empezaron a verse claros síntomas, por lo que se cogieron las siguientes muestras el día 5 de Mayo:

Tabla 6. – Muestras del 1º muestreo

<u>NÚMERO DE MUESTRAS</u>	<u>ESPECIE</u>
2	Melón
2	Calabaza
3	Pepino
2	Calabacín
2	Pimiento
2	Tomate

Cada muestra contenía 3 - 4 hojas de una misma planta. Se introducían en una bolsa donde se rotulaba la fecha y la especie a la que pertenecía.

El 26 de Mayo volvieron a cogerse el mismo número de muestras que el día 5 de Mayo para repetir los análisis de detección.

Se deja que evolucionen los síntomas, y el 23 de Junio se volvió a coger nuevas muestras. Se tomó por separado distintas muestra de la planta de tomate que se había tratado contra mosca blanca. De esa misma planta de tomate se tomó muestra de hojas en el ápice con síntomas y sin síntomas.

También se cogieron muestras de las especies de malas hierbas que iban creciendo en los distintos compartimentos del invernadero. Además se repitió la toma de muestra de las plantas que habían sido inoculadas con el vector el 3 de Abril y de las plantas que se introdujeron nuevas a los compartimentos el 2 de Junio. Puesto que las plantas de pepino, calabacín y calabaza se habían secado, sólo se pudo tomar una muestra de las nuevas plantas que se habían introducido después.

Tabla 7. – Muestras del 2º muestreo

<u>ESPECIE</u>
Tomate tratado en el ápice sin síntomas
Tomate tratado en el ápice con síntomas
Tomate “nueva”
Tomate “vieja”
Pimiento “nuevo”
Melón “vieja”
<i>Amaranthus retroflexus</i>
<i>Chenopodium álbum L.</i>
Calabaza “nueva”
Pepino “nueva”
Melón “nueva”
Calabacín “nueva”

Después de 20 días tras realizar la transmisión mecánica se volvieron a tomar muestras el 23 de Junio de 2014. En el ensayo de trasmisión mecánica se tomó una muestra de la maceta control de cada especie y una muestra con una hoja de cada planta de las 3 restantes a las que se les realizó en ensayo

Tabla 8. - Muestras del 3º muestreo

<u>ESPECIE</u>
Control tomate
T. mecánica tomate
Control pimiento
T. mecánica pimiento
Control melón
T. mecánica melón
Control calabacín
T. mecánica calabacín
Control calabaza
T. mecánica calabaza
Control pepino
T. mecánica pepino

Se volvieron a coger muestras el 2 de Julio para guardarlas y tener reserva para futuros análisis.

Tabla 9. - Muestras del 4º muestreo

<u>ESPECIE</u>
Control tomate
T. mecánica tomate
Control pimiento
T. mecánica pimiento
Control melón
T. mecánica melón
Control calabacín
T. mecánica calabacín
Control calabaza

T. mecánica calabaza
Control pepino
T. mecánica pepino
Tomate tratado en el ápice sin síntomas
Tomate tratado en el ápice con síntomas
Tomate "nueva"
Tomate "vieja"
Pimiento "nuevo"
Tomate tratado en el ápice sin síntomas
Tomate tratado en el ápice con síntomas
Tomate "nueva"

Además, el día 23 de Septiembre se tomaron muestras de las malas hierbas de una explotación de brócoli del campo de Cartagena, situada en el Paraje Dolores de Pacheco. Dicha explotación se encontraba a 200 metros de cultivos de calabacín, que según el técnico responsable habían tenido virus ToLCNDV.

Cada muestra que se tomó en este quinto muestreo contenía diferentes hojas de varias plantas de la misma especie, para aumentar las posibilidades de que en algún análisis obtengamos positivos frente al virus.

Tabla 10. - Muestras del 5º muestreo

<u>Nº DE MUESTRAS</u>	<u>ESPECIE</u>
1	<i>Chenopodium álbum L.</i>
2	<i>Solanum nigrum L.</i>
1	<i>Taraxacum officinalis</i>
1	<i>Malva sylvestris</i>

Por último, se cogieron 2 muestras de esa misma finca con cultivo de calabacín al aire libre el 23 de Septiembre.

En la siguiente imagen aparece rotulada de rojo la parcela con cultivos de calabacín, y rotulado de amarillo la parcela con cultivos de brócoli que tenía malas hierbas de las cuales se tomaron muestras.



Ilustración 38. - Ubicación de las explotaciones de brócoli (amarillo) y calabacín (rojo).

Todas las especies han sido sometidas a la técnica de diagnóstico PCR, en cambio, en función de los resultados obtenidos por PCR, en caso de ser dudosos, se corroboró con otra técnica de detección, en este caso, hibridación molecular.

5. Diagnóstico de laboratorio

Las muestras fueron analizadas mediante distintos métodos para corroborar si poseían el nuevo virus emergente ToLCNDV.

Al principio las muestras se analizaron en el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) en Murcia, con métodos de hibridación molecular y PCRs.

Posteriormente, se pusieron a punto las técnicas de diagnóstico en el Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) de la UPCT.

Una vez llegan las muestras al laboratorio, el material vegetal se conserva a -80°C . Para las pruebas moleculares de detección (PCR e hibridación molecular), se realizaron extracciones de ADN total a partir de 50 mg de peso fresco de hoja siguiendo el procedimiento descrito por Dellaporta *et al.*, (1983).

5.1. PCR

El procedimiento de protocolo de PCR de extracción CTAB descrito por Dellaporta *et al.* (1983) se lleva a cabo de la siguiente manera:

Los cebadores específicos se diseñaron a partir de la secuencia completa del ADN-A del aislado del ToLCNDV 8.1 descrito en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (Número de referencia: KF749224.1) (Juarez *et al.* 2014). La secuencia de los primers diseñados es: ToLCNDV Fwd: 5'-GGTTGTGAAGGCCCTTGTA-3'; ToLCNDV rev: 5'-ATACGTTCTCCCGTCACAG-3'.

1. Pesar 0.06 g. De hoja joven sin pedúnculo, (procurar no coger síntomas ni hoja seca). Meter cada muestra en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Sin autoclavar.
2. Añadir 0.6 mL de Tampón de extracción CTAB.
3. Homogeneizar las muestras
4. Incubar las muestras en el termoblock a 66°C aprox. durante 10 minutos.
5. Añadir 600 μL . de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y agitar hasta que emulsione.
6. Centrifugar a 13000 rpm. a RT. A temperatura ambiente, durante 10 min.
7. Extraer la fase acuosa (la que contiene el ADN) en nuevos eppendorf autoclavados con cuidado de no arrastrar restos vegetales ni cloroformo.
8. Añadir a cada muestra (nuevos eppendorf con la parte acuosa) al menos la misma cantidad de isopropanol (a -20°C) que de fase acuosa obtenida, homogeneizamos y dejamos reposar a -20°C para que precipite.
9. Centrifugar a 13000 rpm. 15 minutos a 4°C .
10. Eliminamos el isopropanol, quedándose abajo el pellet de ADN (llevar cuidado que no se desprenda).
11. Añadir 500 μL . de etanol al 70% (a -20°C)

12. Centrifugar de nuevo a 13000 rpm durante 15 min a 4°C.
13. Eliminar el etanol y dejamos secar el pellet al aire.
14. Tras media hora resuspender con 50 µL de agua biodestilada esteril y se mete al congelador (-20°C)
15. Se hacen diluciones para obtener una muestra de cada uno con la misma concentración.
16. Homogeneizar
17. Volvemos a hacer diluciones (1 µL de muestra (ADN) y 9 µL de agua)
18. Homogeneizar
19. Preparar la mezcla para realizar la PCR e introducirla en el Termociclador. Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 25 µL con el contenido que aparece en la tabla (Bioline Reagents Limited, London, UK).

Tabla 11. – Contenido de las muestras

	Cantidad para una muestra, µL	Cantidad para 10 muestras, µL
Agua	18,875	188,75
Buffer	2,5	25
MgCl₂	1	10
dNTps (nucleótidos)	0,5	5
F2 (primer)	0,5	5
R1 (primer)	0,5	5
Taq	0,125	1,25
DNA	1	

20. Se colocan las muestras dentro de una gradilla en el Termociclador. Las condiciones de reacción fueron 1 ciclo de 1 minuto a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C y 30 segundos a 72°C y, por último, una extensión de 7 minutos a 72°C.
21. Se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), y se tiñen las muestras con bromuro de etídio.
22. Se detectó el ADN bajo luz ultravioleta.

5.2. Hibridación molecular

El protocolo básico que se siguió para la prueba de dot blot, por Dellaporta *et al.* (1983), es el siguiente:

1. Primero tiene lugar la pre-hibridación, donde la membrana de nylon se corta al tamaño necesario. Se emplean 500 ng de ADN desnaturalizado, se fijan con luz ultravioleta a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche GmbH, Mannheim, Germany). Esta membrana se deja secar durante 2 min, fijarla exponiéndola a la luz UV/Crooslinker (E: 1200).
2. Se sintetiza una sonda marcada con digoxigenina específica para la región de la proteína de la cápside del virus mediante una reacción de PCR con los cebadores específicos que se diseñaron a partir de la secuencia completa del ADN-A del aislado del ToLCNDV 8.1 descrito en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (Número de referencia: KF749224.1) (Juarez *et al.*, 2014).
3. La membrana se introduce en un tubo de hibridación en solución 5x SSC (solución prehibridación). Se coloca en el horno de hibridación a una temperatura de 68°C durante 2-3 horas.
4. Antes de hibridar, se desnaturaliza la sonda en un baño a 85-90° durante 15 minutos y se pone en hielo.
5. Proceso de hibridación, la membrana se deja hibridar a 68°C durante toda una noche (entre 16 y 24 horas).
6. Se recupera y se guarda la sonda a -20°C
7. Se atempera el fijador revelador
8. Se lava la membrana dos veces (5 minutos c/u) a 23°C con 2x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrato de sodio), 0,1 % (w/v) sodio dodecyl sulfato (SDS)
9. Lavar dos veces con Sol. 2 (0.1X SSC más 0,1% SDS) a 68°C (durante 15 min c/u).
10. Se lava la membrana en Tampón de lavado a RT, durante 5 minutos
11. Se incuba en Tampón II a RT, durante 30 minutos
12. Antes de diluir centrifugar el anticuerpo 5 minutos a 13000 rpm a 4°C.
13. Incubar en el conjugado Anti-DIG-AP (B&M) diluido 1:10000 en Tampon II. Exponer la membrana lo menos posible a la luz durante 30 min.
14. Lavar la membrana en Tampón de lavado a RT durante 15 min

15. Repetir el paso anterior
16. Equilibrar la membrana en 5-7 ml de Tampón III a RT durante 5 minutos.
17. Incubar la membrana en sustrato quimio-luminiscente CDP-Star (Roche GmbH, Mannheim, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.
18. Recuperar y guardar el sustrato a 4°C. Este puede reutilizarse de 3 a 4 veces, siempre y cuando no hayan transcurrido más de 3 o 4 semanas.
19. Secar la membrana con bolsas de plástico tanto como sea posible sin dejar que se seque completamente.
20. Envolver la membrana en una bolsa de plástico y colocarla en el casete. En cámara oscura (luz roja) colocar encima de la membrana una película de auto radiografía. Exponer a RT (opcional 37°C) durante aproximadamente una hora.
21. Revelar la película en la cámara oscura (con revelador, agua y fijador)

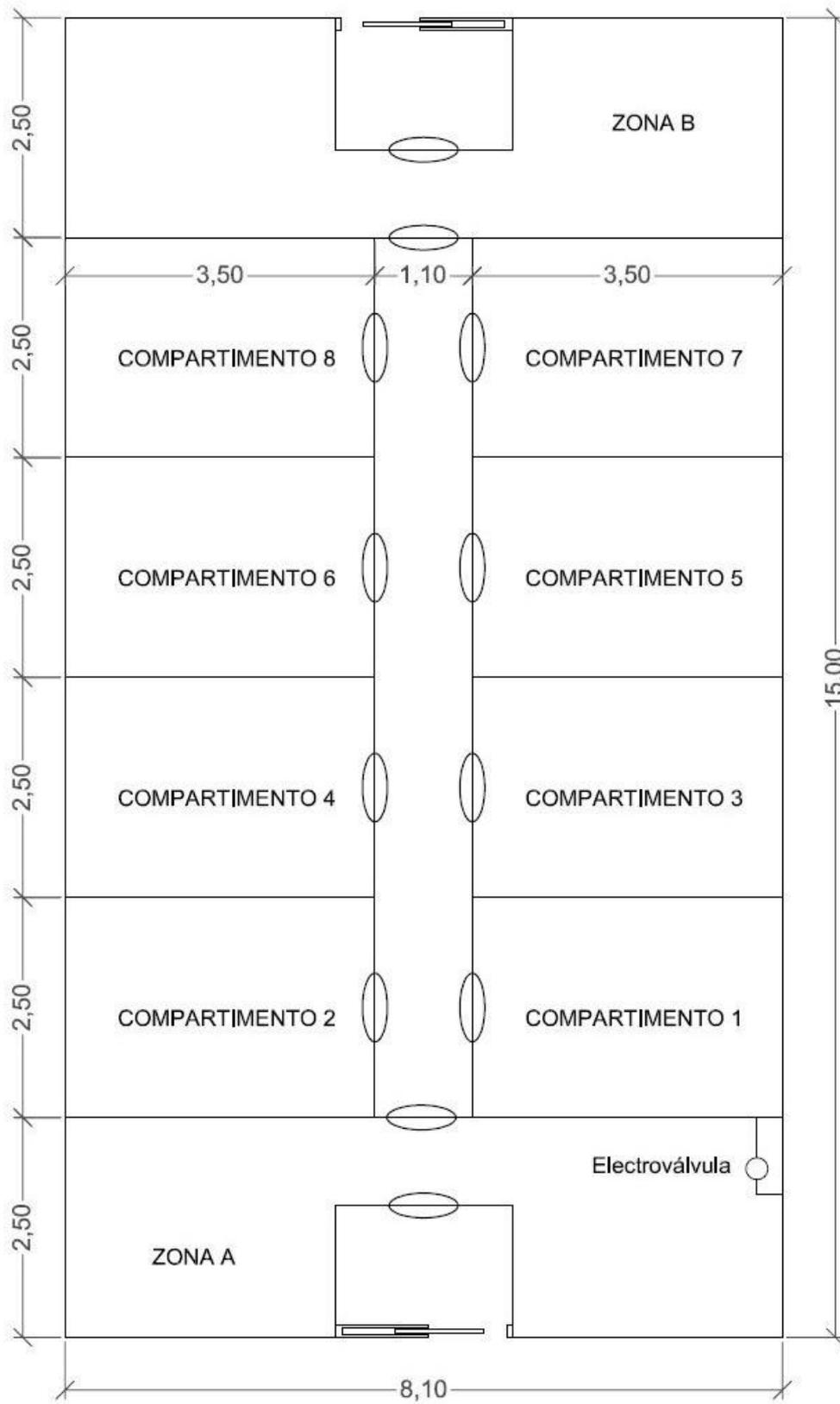


Ilustración 39. – Croquis general del invernadero donde se realizaron los ensayos

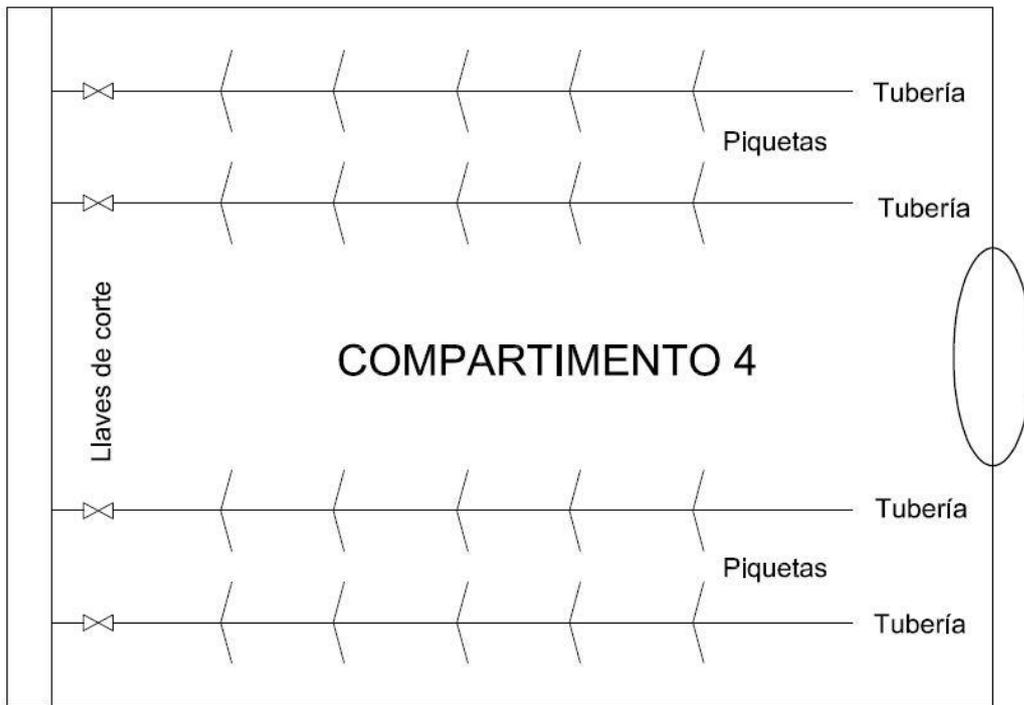


Ilustración 40. – Croquis de un compartimento aislado del invernadero donde se realizaron los ensayos

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Ensayo transmisión por vector

El 14 de Abril, trece días después de la inoculación se comienzan a visualizar síntomas en las plantas que se pueden comenzar a relacionar con el posible virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi.

Se comienzan a ver síntomas en plantas de calabaza, melón y tomate, aún poco notables, pero distinguibles de plantas que son asintomáticas. Se puede apreciar punteaduras amarillas, un leve abullonado de las hojas y amarilleamientos, causa que pueda ser por varios motivos y entre todos ellos está el ser los síntomas primarios del nuevo virus emergente.

Podemos citar varios motivos que pueden ser la causa de dichos síntomas primarios, uno de ellos por estrés hídrico en algún momento puntual, sucede cuando la demanda de agua es más grande que la cantidad disponible durante un periodo de tiempo determinado. En cada visita se ha examinado la textura del sustrato de las macetas para asegurar que el riego está siendo óptimo para la planta, pero aun así debemos contemplar esta posibilidad. Un síntoma característico es el amarilleamiento y un secado ascendente de la planta en general, por lo que puede causar confusión los síntomas que se aprecian.

Otro motivo es la intervención de algún otro vector en la plantación, a pesar de tener malla anti-trips es inevitable que al entrar a los compartimentos pueda introducirse otro insecto, o por la propia malla está comprobado que pueden pasar trips en un 98% de las ocasiones y crear picaduras en las hojas.

Un tercer motivo también relevante a tener en cuenta es el nitrógeno, en el caso de falta de nitrógeno se produce el *amarillamiento* de las hojas y su posterior caída.

Se pueden confundir los síntomas incluso con el virus del rizado amarillo de tomate (TYLCV), conocido como “virus de la cuchara” en lugar del virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi. El virus del rizado amarillo de tomate (TYLCV), también se transmite a través de *Bemisia tabaci*. Las plantas infectadas por virus de la cuchara se muestran con una talla

notablemente reducida, con las yemas apicales y axilares duras. Las hojas se presentan enrolladas, pequeñas y coriáceas, con el limbo más o menos amarillento.

Otros virus con alta incidencia en cucurbitáceas que se encuentran en el sudeste español son virus del amarilleo de las cucurbitáceas en melón CYSDV y virus de la vena amarilla del pepino CVYV, que existe la posibilidad de que puedan ser alguno de ellos.

A parte de poder confundirse con estos virus, existe la posibilidad de que estemos ante plantas que presenten infecciones mixtas, lo cual quiere decir que tengan dos, tres o más de tres virus, la proporción de que se produzcan estos casos es bastante alta, sobrepasando el 60% como se muestra en la siguiente tabla. Las propiedades que presentan las plantas son distintas a los virus por separado.

Tabla 12. Muestreos en el Campo de Cartagena (2003-2004). Infecciones mixtas.

Infección ^a	Muestras infectadas (% del total de las muestras infectadas) ^b		
	Melón	Calabacín	TOTAL
Doble	299 (46,3)	82 (46,6)	381 (46,5)
CABYV-CYSDV	117 (18,1)	-	117 (14,2)
CABYV-WMV	98 (15,2)	-	98 (11,9)
CABYV-BPYV	52 (8,0)	42 (23,9)	94 (11,4)
CABYV-CVYV	-	29 (16,5)	29 (3,5)
Triple	105 (16,3)	17 (9,7)	122 (14,8)
BPYV-CABYV-CYSDV	99 (15,3)	4 (2,3)	103 (12,5)
Más de tres	22 (3,4)	-	22 (2,7)
PRSV-ZYMV-MNSV-WMV-CABYV	2 (0,3)	-	2 (0,2)
PRSV-ZYMV-MNSV- WMV-CABYV-CVYV	4 (0,6)	-	4 (0,5)
PRSV-ZYMV-MNSV-CMV-WMV-CABYV- CVYV	2 (0,3)	-	2 (0,2)
Total	426 (65,9)	99 (56,2)	525 (63,9)

Para poder descartar todas las alternativas que se presentan y poder decantarnos y afirmar que las plantas son portadoras del virus. Se realizaron dos métodos de análisis en una serie de muestras que se han ido cogiendo de las plantas inoculadas a lo largo del ensayo.

A los trece días se vieron los primeros síntomas de forma tenue en la mayoría de las plantas que se intuían los síntomas. Se dejaron avanzar los síntomas veinte días más para que se hiciesen más evidentes y notables y tomar así muestras de dichas plantas y detectar la posible presencia de virus ToLCNDV. La única especie que no manifestaba síntomas era el calabacín. Cada muestra correspondía a una planta diferente.

Estos primeros análisis fueron realizados por el IMIDA, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 13. - Resultados de muestras enviadas al IMIDA del 1º y 2º muestreo

Análisis IMIDA		
Fecha de recogida de la muestra	05/05/2014	26/05/2014
Método de detección	HIBRIDACIÓN MOLECULAR	PCR
Melón 1	+	+
Melón 2	+	+
Calabaza 1	+	+
Calabaza 2	+	+
Pepino 1	Duda	-
Pepino 2	Duda	-
Pepino 3	Duda	+
Calabacín 1	-	-
Calabacín 2	-	-
Pimiento 1	-	-
Pimiento 2	-	-
Tomate 1	Duda	+
Tomate 2	Duda	+

Las primeras muestras fueron sometidas a hibridación molecular. En el caso del pepino y del tomate todos los análisis dieron resultados dudosos, por lo que no se puede afirmar ningún resultado concreto para esas muestras. En cambio, el melón y la calabaza dieron positivo y el pimiento negativo con esta técnica.

Las muestras del 2ª muestreo se analizaron mediante otro método de detección, PCR, para contrastar los resultados anteriores.

Con el método de detección de PCR, una muestra de pepino resultó ser positiva, al igual que las dos muestras de tomate. Como era el primer caso de resultado positivo al virus en tomate, se pensó que podía tratarse de un falso positivo. Posiblemente por la presencia de ADN procedente de alguna mosca en las muestras se produjo una contaminación en el material vegetal analizado, a pesar de que se revisó que las muestras estuvieran exentas de mosca blanca.

Es curioso obtener positivos en tomate, ya que el tomate es una especie en la que en nuestras condiciones, aún no está descrita como hospedante del virus, al igual que en ninguna solanácea.

Para asegurarnos, se continuó cogiendo muestras, cada una de ellas de una sola planta y analizándolas. En los próximos casos, los análisis de detección fueron llevados a cabo en el IBV.

Tabla 14. Resultados de análisis del IBV del 2º muestreo

Análisis IBV		
Fecha de recogida de la muestra	26/05/2014	26/05/2014
Método de detección	PCR	HIBRIDACIÓN MOLECULAR
Melón 1	+	
Melón 2	+	
Calabaza 1	+	
Calabaza 2	+	+
Pepino 1	-	-
Pepino 2	+	+
Pepino 3	+	+
Calabacín 1	-	-
Calabacín 2	-	-
Pimiento 1	-	-
Pimiento 2	-	-
Tomate 1	+	
Tomate 2	+	

El calabacín seguía sin mostrar síntomas, y los resultados de análisis daban negativo al virus por los dos métodos ensayados. El pimiento, otra solanácea que no se ha descrito como hospedante del virus, se podía tomar como control negativo ya que en todos los análisis realizados al pimiento hasta ahora, nunca ha habido dudas sobre sus resultados, ni con PCR ni con hibridación molecular.

El tomate volvió a salir positivo y en pepino dos muestras de tres resultaron positivas con la técnica de PCR. Al obtener en un caso positivo y en otro negativo en pepino, se volvió a repetir el análisis de las muestras, tomando como control positivo la calabaza y como control negativo el pimiento y usando en este caso la hibridación molecular. Los resultados positivos por hibridación molecular de las dos plantas de pepino confirmaron la presencia de ToLCNDV.

La Tabla 10 muestra los resultados de los análisis realizados de las muestras de los 3º y 4º muestreo.

Tabla 15. – Resultados análisis del IBV del 3º y 4º muestreo

Análisis IBV				
Fecha de recogida de la muestra	23/06/2014	23/06/2014	02/07/2014	02/07/2014
Método de detección	PCR	HIBRIDACIÓN MOLECULAR	PCR	HIBRIDACIÓN MOLECULAR
Tomate tratado en el ápice sin síntomas	+		-	-
Tomate tratado en el ápice con síntomas	-		+	+
Tomate nueva transmisión vector	-		-	-
Tomate vieja	+		-	-
Pimiento nuevo, dentro de tomate	+	-	-	
Melón vieja	+			
<i>Amaranthus retroflexus</i>	+	-		
<i>Chenopodium álbum L.</i>	+	+		
Calabaza nueva	+			
Pepino nueva	+			
Melón nueva	+			
Calabacino nueva	+			
Calabacín vieja	+			

A continuación se puede ver en la Ilustración 34, la película revelada tras hacer análisis a distintas muestras para poder detectar el virus ToLCNDV.

En cada cuadro de la cuadrícula se depositó 1µL de ADN de la muestra con una concentración de 500 ng/µL. El sustrato quimio-luminiscente CDP-Star hace que se pueda identificar que muestras poseen el virus.

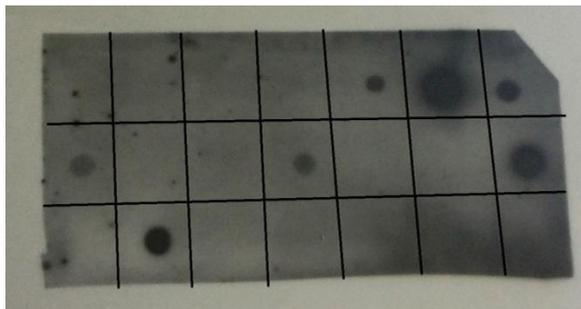


Ilustración 41. - Resultados Dot- blot

En la siguiente imagen podemos ver la plantilla que muestra la cuadrícula de la película revelada con cada una de las muestras que se analizaron.

Muestras 26/05/14 →	1 calabacín	2 Calabacín	3 Pimiento	4 Pepino	5 Pepino	12 calabaza	6 pepino
Muestras 23/06/14 →	10 Calabaza T. mecánica	17 Pimiento "nuevo"	19 Amaranthus	20 Chenopodium	Nada	Nada	Positivo (DNA-A)
Muestras 02/07/14 →	13 Tomate sin mosca	14 Tomate con sint.	15 Tomate "nueva"	16 Tomate "vieja"	Nada	nada	

Ilustración 42. - Tabla con las muestras que se analizaron y aparecen reflejadas en la película revelada de la Ilustración 34.

En este caso, la muestra que se tomó de la planta de calabacín tenía claros síntomas relacionados con ToLCNDV.

En una primera PCR realizada, se vio que el pimiento dio positivo, lo que hace sospechar que sea falsos positivos o que se hayan podido contaminar las muestras. Para corroborar los resultados se realizó hibridación molecular y efectivamente resultó negativo frente al virus, pero no podemos descartar por completo la ausencia de virus puesto que puede tratarse de una planta distinta.

En el caso de las malas hierbas se confirma por ambas técnicas que *Chenopodium álbum L.* es portador del virus.

En una segunda PCR realizada se centró tan solo en las muestras del ensayo que se hizo en tomate tratado contra mosca blanca para poder esclarecer resultados. De esa misma planta de tomate se tomó muestra de hojas en el ápice con síntomas y sin síntomas. Las pruebas dieron negativas para tomate tratado en el ápice sin síntomas, tomate “nueva” y de tomate “vieja” por los dos métodos de diagnóstico. Sin embargo la planta de tomate tratado en el ápice con síntomas dio positivo por ambas técnicas. Estos resultados hacen pensar que el tomate pueda ser un hospedante del virus, aún cuando, no se ha encontrado ninguna cita de ello en nuestras condiciones. Sin embargo la sintomatología que pudimos asociar al virus (Ver “Sintomatología transmisión con vector” en el apartado IV. Resultados y Discusión) no afecta a la producción de la planta de tomate. Por tanto, es probable que la planta del tomate sea un reservorio del virus.

Se realizaron análisis a especies espontáneas próximas a cultivos de calabacín, en las cuales se apreciaba presencia de mosca blanca junto con dos muestras de calabacín tomadas de los cultivos al aire libre para cerciorarnos de que había una alta posibilidad de que las moscas blancas que se encontraban en la flora espontánea fuesen virosantes.

Tabla 16. - Resultados análisis del IBV del 5º muestreo

		Análisis IBV	
		Fecha de recogida de la muestra	23/09/2014
Nº de muestra	Método de detección	23/09/2014	23/09/2014
		1º PCR	1º HIBRIDACIÓN MOLECULAR
1	<i>Chenopodium álbum L.</i>	-	-
2	<i>Solanum nigrum L.</i>	-	-
3	<i>Taraxacum officinalis</i>	+	+
4	<i>Solanum nigrum L.</i>	-	-
5	<i>Malva sylvestris</i>	+	+
6	Calabacín	+	+
7	Calabacín	+	+

En primer lugar, se realizó con mismo material vegetal una PCR e hibridación molecular.

A continuación, observamos los resultados de la primera PCR realizada, donde las marcas negras hacen referencia a que hay presencia de ADN virosante en las muestras analizadas. Se usó como marcador estándar de pesos moleculares el Ready-Load 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). El tamaño del amplicón es de 375 pb para ToLCNDV.

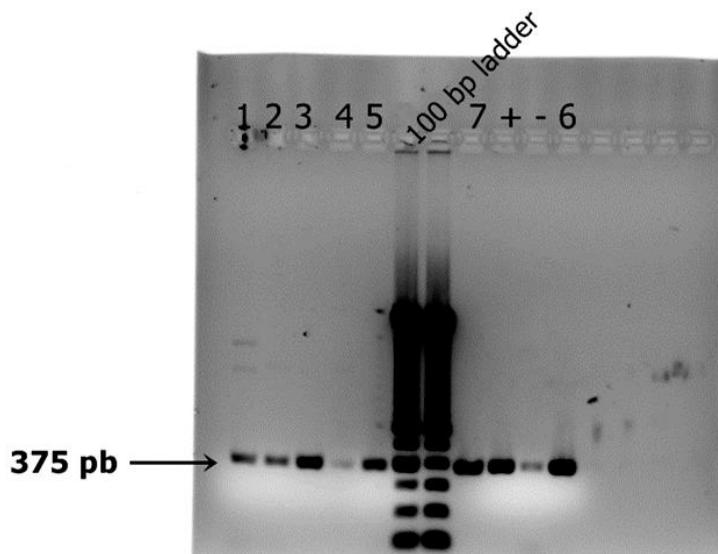


Ilustración 43. – Resultados del quinto muestreo en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Marcador molecular estándar Low Mass Ladder (Invitrogen)

En este primer análisis resultó claramente positivas las especies de las muestras 3 y 5 que corresponden con *Taraxacum officinalis* y *Malva sylvestris*, dando también positivo ambas muestras de calabacín del cultivo al aire libre.

Las muestras 1 y 2, *Chenopodium álbum L.* y *Solanum nigrum L.* resultan dudosas, puesto que en el control negativo aparece una leve marca que nos puede indicar que se haya contaminado la muestra negativa.

Para esclarecer estas dudas, se corrobora con otro método para comparar así los resultados que se obtengan.

En esta imagen aparecen los resultados por el método de hibridación molecular, Dot-blot, de las mismas muestras que se analizaron por PCR, del 5º muestreo.

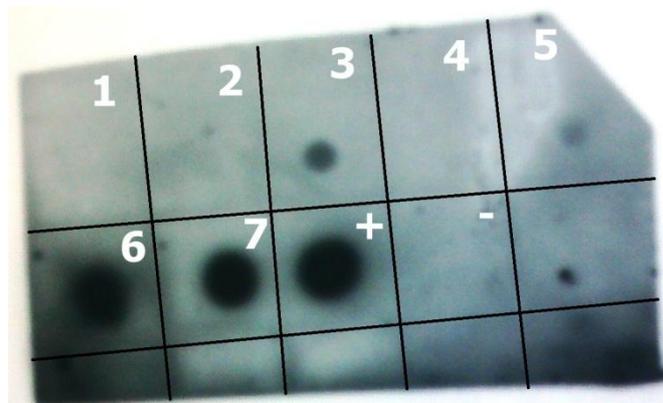


Ilustración 44. – Resultados sobre la película revelada mediante la técnica Dot- blot del quinto muestreo

En esta película revelada del quinto muestreo, podemos ver en la cuadrícula que dentro de cada uno de los cuadros donde haya una marca negra coloreada es el ADN virosante que ha reaccionado con el substrato luminiscente y nos facilita identificar que esas muestras poseen el virus ToLCNDV.

Tomando como referencia los controles, podemos ver como el positivo y el negativo han salido correctamente.

Son claramente positivas las muestras 6 y 7 que corresponden al calabacín. Las muestras 3 y 5 son también positivas al virus, estas especies son, *Taraxacum officinalis* y *Malva sylvestris*. Efectivamente podemos confirmar la presencia de virus en estas especies ya que coincide el resultado en ambas técnicas

Es importante destacar que en ambos métodos se empleaba la misma cantidad de ADN por lo tanto, en hibridación molecular podemos notar la diferencia en la cantidad de ADN virosante que se encuentra en las muestras de calabacín con respecto a las especies de malas hierbas que han dado positivo frente al virus.

Podemos decir que la transmisión mediante vector ha sido eficaz puesto que se han visto especies susceptibles a las cuales se ha transmitido el virus.

En resumen, podemos recopilar que las especies hospedantes que se han analizado mediante PCR e hibridación molecular que han dado positivas frente al virus y que muestran síntomas en su parte vegetativa son, calabacín, melón, calabaza, pepino y tomate en el ensayo de transmisión mediante vector.

Por otra parte aquellas especies que se han analizado con ausencia de síntomas o una presencia muy leve de éstos y han resultado positivas frente al virus son *Chenopodium álbum* L, *Taraxacum officinalis* y *Malva sylvestris*.

2. Ensayo transmisión mecánica

Después de realizar la transmisión mecánica, a los 7 días comienzan a verse indicios de posibles síntomas en las plantas, y transcurridos 15 días para que se puedan manifestar completamente estos síntomas y transmitirse el virus se mandaron a analizar muestras de cada una de las especies.

Hay plantas que presentan supuestos síntomas del virus. La presencia del pulgón puede haber sido la causa de que las hojas se encuentren abullonadas, ya que en las plantas control también se aprecian los mismos síntomas.

En este ensayo no todas las plantas han manifestado síntomas frente a la posible reacción de la transmisión mecánica, los síntomas se han apreciado en tomate, pimiento, calabaza y melón.

A continuación en la Tabla 17 se muestran los resultados que se han obtenido en los análisis y no se podemos afirmar que este virus se transmite mecánicamente, al menos, hasta el momento.

Tabla 17. - Resultados análisis del IBV

Análisis IBV			
Fecha de recogida de la muestra	23/06/2014	26/05/2014	02/07/2014
Método de detección	1º PCR	HIBRIDACIÓN MOLECULAR	2º PCR
Control tomate	+		-
Mecánica tomate	-		-
Control pimiento	-		-
Mecánica pimiento	-		-
Control melón	-		-
Mecánica melón	-		-
Control calabacín	-		-
Mecánica calabacín	-		-
Control calabaza	-		-
Mecánica calabaza	+	+	-
Control pepino	-		-
Mecánica pepino	-		-

La muestra de control en tomate dio positivo en la primera PCR realizada, lo que da que pensar que puede ser un falso positivo, o que alguna mosca blanca halla infectado a la planta. Igual ocurre con el ensayo en calabaza, en este caso tanto en PCR como con hibridación resultó positivo frente al virus, pero una tercera prueba por PCR negó la existencia de ToLCNDV en las plantas de calabaza transmitidas mecánicamente.

No podemos afirmar que existe otro método de transmisión frente al nuevo virus emergente puesto que para ello deberíamos de realizar más análisis y repetir los ensayos para poder afirmar tal hipótesis, pero no podemos descartarla.

Existe la posibilidad de que estemos frente al virus transmitido de forma mecánica, como en las muestras se introducían varias hojas de distintas plantas, entonces puede que el resultado negativo de la segunda PCR realizada coincida con una planta que efectivamente está ausente de virus y en cambio los dos primeros análisis sean de una planta que si porte el virus.

Un artículo afirma que se transmite por transmisión mecánica ToLCNDV a varias plantas de melón oriental pero aún no está descrito en España ningún caso afirmativo sobre la transmisión mecánica de este virus.

Si observamos la película revelada con el resultado de la calabaza en el ensayo se aprecia claramente que se ha transmitido el virus de forma mecánica, por tanto, queda abierta una nueva línea de investigación para este virus.

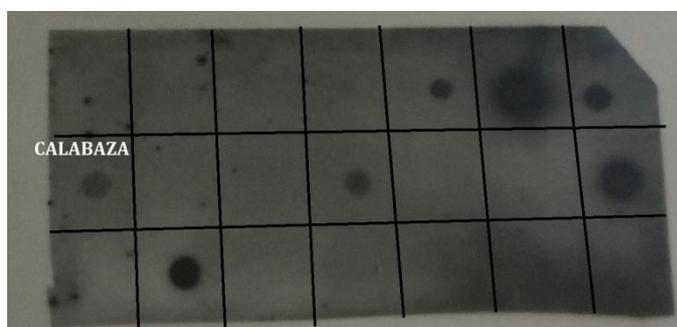


Ilustración 45. - Película revelada del método Dot-blot donde aparece la muestra de calabaza en el ensayo por transmisión mecánica

Finalmente, podemos decir que la transmisión mecánica resultó dudosa ya que en los análisis la calabaza da positivo tanto con PCR como con hibridación molecular, y en un tercer análisis resultó negativo frente al virus.

Aunque en tomate dio positivo, la muestra pertenecía al control, entonces si podemos suponer que se trata de un falso positivo.

3. Sintomatología transmisión con vector

3.1. Melón (*Cucumis melo*)

A partir de la primera detección en 2012 en el cultivo de calabacín, se han recogido, recibido y analizado en laboratorios del CEBAS (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura) numerosas muestras de melón. Sí se han detectado muestras de melón infectadas por este virus a partir de 2013.

Los síntomas se aprecian en 10 plantas de las 16 que había en el compartimento 1. Finalmente de las 16 plantas de melón 14 de ellas terminaron siendo sintomáticas.

Desde un principio los síntomas se hacen visibles en las 10 plantas, en unas más acentuadas que otras, pero capaces de diferenciarse con plantas asintomáticas. Los primeros síntomas que se pueden apreciar son ligeros acucharamientos de las hojas adultas hacia el envés y leves mosaicos amarillos en hojas adultas. Sin embargo, estos síntomas pueden coincidir con desordenes agronómicos como por ejemplo, por fluctuaciones de temperaturas, por los aportes de ciertos componentes en el abono o deficiencias de algún nutriente.



Ilustración 46. - Primeros síntomas en melón, acucharamientos y mosaicos amarillos

Las hojas se aprecian caídas debido a que en una primera fase se tornan débiles a causa de las picaduras que produce *B.tabaci*.

En cada una de las especies hospedantes podemos ver connotaciones diferentes, pero el inicio el mismo en todas, en sus hojas aparecen débiles punteaduras amarillas que se van haciendo más notables con el paso del tiempo, las cuales son las picaduras del vector *Bemisia tabaci*.

Tras dejar avanzar los síntomas para que se acentúen, no se ven afectados los brotes jóvenes, aparentemente no se aprecian abullonados ni acucharamientos en ellos. No se detecta enanismo en brotes apicales.



Ilustración 47. - Brote joven de una planta de melón ausente de síntomas

Conforme avanzan el crecimiento vegetativo de las plantas se acentúan los síntomas y se aprecia como las plantas avanzan hacia la senescencia de manera más rápida que las plantas que no se ven afectadas por *Bemisia tabaci*.

Los ligeros acucharamientos de las hojas adultas que empezaron de forma tenue a definirse pasan a distinguirse con gran facilidad de hojas asintomáticas. Las hojas que presentan estas deformaciones lo hacen hacia el envés de la hoja endureciéndose estas quedando bastante rígidas.

Poco a poco se acentúan los mosaicos iniciales de las hojas, y cada vez aumenta el número de hojas con síntomas en cada planta. En todo momento se aprecia altas poblaciones de *Bemisia tabaci* en el envés de las hojas de todas las plantas presentes en el compartimento.

La acción de los síntomas evoluciona haciendo que la planta no pueda evolucionar como el resto y viéndose un enanismo evidente en las plantas, provocando así una retención del crecimiento y por tanto la planta se debilita conduciéndose de manera más veloz hacia la senescencia.

La planta de la ilustración 37 es la planta con los síntomas más evidentes, por ello esta planta junto con otra más fueron las seleccionadas para tomar muestras de ellas para los análisis.

En esta planta en particular es donde se visualiza mejor el avance de los síntomas, por lo que en la foto se aprecia fácilmente como una de las hojas adultas evoluciona el abullonamiento hacia el envés de la hoja en una sola semana.



Ilustración 48. Primeros indicios de posible planta de melón con el virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi.

Las hojas adultas que mostraron los primeros síntomas, terminan por estar prácticamente amarillas por completo, traduciéndose esto en severos mosaicos amarillos, provocando así la ausencia de clorofila en las hojas y la imposibilitación de crear clorofila, junto con clorosis internervial. Este síntoma puede ser causado por clorosis férrica o la falta de hierro en la planta, provocados por un exceso de humedad o aumento de riego en el caso de no estar frente al virus ToLCNDV.



Ilustración 49. - Hoja completamente amarilla de una planta de melón

Aquí se aprecia el avance de los síntomas, por lo que en la foto se aprecia fácilmente como una de las hojas adultas evoluciona el abullonamiento hacia el envés de la hoja en una sola semana.



Ilustración 50. – Evolución de los síntomas en una misma planta de melón

En cuanto al melón, presenta pequeñas fisuras en la piel por todo el fruto. Fisuras que se muestran irregulares, con poca profundidad. A parte de estas fisuras el tacto es ligeramente rugoso y la piel no esta tensa. Este fruto debido a las lesiones que presenta, se torna despreciable comercialmente, por lo que provoca un grave problema en la producción de melón frente a este virus.



Ilustración 51. - Melón procedente de una planta sintomática

Se puede decir que la infección tiene un carácter uniforme en toda la planta. Poco a poco van evolucionando los síntomas por igual en toda la planta.

En el caso del melón es una transmisión que se encuentra en el ojo de mira ya que los efectos en calabacín han ocasionado grandes repercusiones en los cultivos.



Ilustración 52. – Hojas de melón con síntomas relacionados con ToLCNDV



Ilustración 53. - Hoja de una planta de melón asintomática

Tras dejar avanzar los síntomas para que se acentúen, y visto su evolución, como ya se ha nombrado anteriormente la sintomatología podemos relacionarla junto con los resultados que se han obtenido tras los distintos métodos de detección del virus ToLCNDV.

Se pueden discutir diversos aspectos, en las plantas de melón los análisis han dado positivo tanto en las primeras plantas que se plantaron como en la repetición que se realizó. Dando positivos para el método de hibridación molecular como para PCRs.

Los mosaicos en las hojas pueden ser un síntoma relacionado con la falta de riego en las plantas, pero podemos descartar esta posibilidad frente a los resultados obtenidos con las técnicas experimentales, ya que son positivos frente a la presencia del virus, e incluso de manera visual vemos que en las plantas asintomáticas no hay presencia de amarilleamientos. Debido a que el riego y las condiciones son por igual en todas las plantas, estos amarilleamientos solo están en las plantas sintomáticas las cuales poseen el virus ToLCNDV y puede confirmarse que el amarilleamiento es un síntoma de dicho virus.

En la segunda plantación realizada, los síntomas se repitieron en las tres plantas de la misma forma que en la plantación principal que se ha realizado. Y de la misma manera los análisis resultaron positivos frente al virus emergente.



Ilustración 54. - Planta de melón con los primeros síntomas relacionados con ToLCNDV, leve mosaico, rizado de la hoja y abullonados.

Estamos frente a una especie susceptible al virus ToLCNDV, los síntomas se manifiestan en todo su desarrollo foliar, y los frutos se aprecian rasgados lo que impediría una correcta producción del fruto y por tanto una pérdida de productividad para los agricultores.

En la actualidad, tras la campaña de melón de 2013 ha sido muy fácil encontrar plantas con síntomas de ToLCNDV en este cultivo, pero en una cantidad insignificante, una planta afectada por cada hectárea plantada aproximadamente.

La baja incidencia de este virus puede tener varios motivos, por un lado debido a que las medidas de hermeticidad se están implementando correctamente para prevenirlo, empleando estrategias de control integrado, y así minimizar incidencia de ToLCNDV. Por otro lado, cabe pensar que por alguna razón genética la planta de melón es atacada con mucha menos voracidad con respecto a la planta de calabacín.

3.2. Calabaza (*Cucurbita moschata*)

Otro cultivo del que se han recogido, recibido y analizado en laboratorios del CEBAS (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura) numerosas muestras es la calabaza. Varias muestras de las analizadas, han detectado ser infectadas por este virus.

En el cultivo de calabaza los síntomas se han apreciado en un principio en tres plantas de las diez que había en total, y finalmente han sido cuatro plantas las que han presentado sintomatología.

Los síntomas que se aprecian en las cuatro plantas coinciden en que comienzan perjudicando a los brotes jóvenes, quedando las hojas adultas asintomáticas, lo cual marca la principal diferencia con el cultivo del melón, en el lugar que se manifiesta el virus, ya que todos los brotes jóvenes son asintomáticos.

Las hojas jóvenes se rizan y se acucharan, hacia el envés y hacia el haz, normalmente los brotes jóvenes se acucharan hacía el haz, y las hojas adultas hacia el envés. Se muestra un intenso amarilleamiento destacable en los brotes jóvenes y mosaicos amarillos. Las hojas afectadas se encuentran achaparradas, con pérdida de vigor y un engrosamiento de tejidos. Las hojas que manifiestan los síntomas en el inicio se tornan rígidas.



Ilustración 55. - Evolución de los síntomas en calabaza

En la siguiente imagen se aprecian los brotes hóvenes, donde se ve una produccion masiva de estos, viendose amarillos y con los tallos engrosados, los nervios de la hojas tambien se tornan levemente amarillos. Estos brotes no evolucionaron más, quedandose así el brote sin desarrollarse.



Ilustración 56. - Brotes jóvenes de calabaza

Conforme avanzan los días se hacen notar los síntomas y se aprecia como las plantas avanzan hacia la senescencia de manera más rápida que las plantas que no se ven afectadas por *Bemisia tabaci*.

Las hojas adultas comienzan a manifestar leves síntomas como punteaduras amarillas y pequeños abullonados mientras los brotes jóvenes avanzan de manera veloz hacia la senescencia destacando así un enanismo en el meristemo apical muy agresivo.

Las plantas adultas a diferencia de las plantas jóvenes no se tornan rígidas tras mostrar los síntomas característicos.

La vida de las plantas asintomáticas se acorta rápidamente, provocando una parada del crecimiento.

En esta siguiente imagen vemos la comparativa entre una planta sintomática y asintomática.



Ilustración 57. - Comparativa de planta asintomática (izquierda) frente a una planta sintomática (derecha).

En esta planta asintomática se aprecia perfectamente como las hojas no presentan acucharamientos y los brotes están intactos. Nos sirve para poder comparar unas plantas con otras y evidenciar los claros síntomas en esta especie. Algo a destacar es que al tener las plantas entutoradas se ve claramente el enanismo que presentan las plantas infectadas que manifiestan síntomas, notándose la reducción de crecimiento vegetativo en la planta sintomática.

En el caso de la calabaza, la planta ha sido incapaz de pasar el estadio vegetativo y llegar a la producción del fruto, debido a la voracidad con la que actúan los síntomas que apuntan a ser el nuevo virus emergente ToLCNDV.

En el desarrollo de una planta de calabaza virosante, destacamos el amarilleamiento de las hojas, leves rizados en los bordes y fuertes abullonados en los brotes jóvenes tanto al envés como hacia el haz de las hojas.

En esta imagen se puede apreciar síntomas relacionados con ToLCNDV.

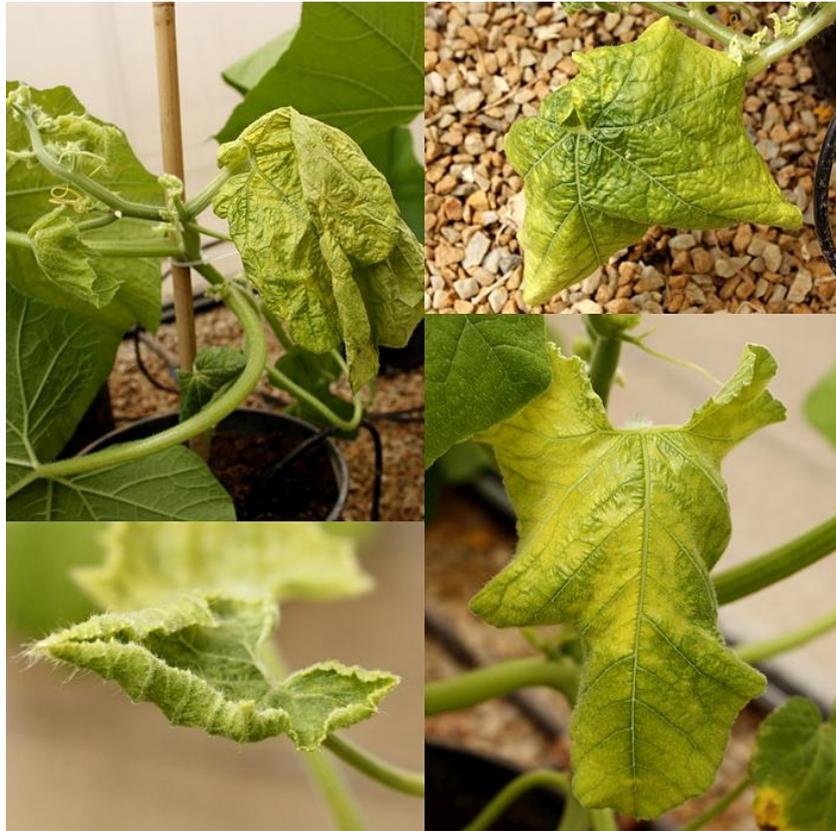


Ilustración 58. - Síntomas en plantas de calabaza



Ilustración 59. - Tallos de una planta sintomática de calabaza

En todas las plantas sintomáticas, los tallos sufren un engrosamiento notable que hace que se produzcan fisuras a lo largo de él, de igual manera se producen abullonados en el tallo.

Esta imagen muestra los primeros indicios de síntomas en hojas adultas de calabaza, una vez que los brotes jóvenes están senescentes, las hojas adultas empiezan a manifestar amarilleamientos, punteaduras por la acción de *Bemisia tabaci* y leves abullonados. El amarilleamiento puede deberse como consecuencia de que la planta se está debilitando por ser afectada en los brotes jóvenes por el virus que le transmite *B. tabaci*.



Ilustración 60. - Hojas adultas de calabaza con indicios de síntomas característicos de ToLCNDV

Haciendo una comparativa, el virus se propaga de forma veloz, y menos uniforme que en melón. Por tanto, el cultivo de la calabaza y el melón, el virus ataca con diferente voracidad, siendo mayor en el caso de la calabaza, donde las hojas jóvenes se ven muy agredidas por el virus, viéndose afectado el crecimiento de la planta.

En la calabaza se ve un mayor engrosamiento de tejidos en comparación con el melón, debido a la reacción de las plantas frente a dicho virus y de esta misma forma se destaca más en calabaza el enanismo que se manifiesta en las plantas sintomáticas. El mayor grado de enanismo podemos decir que es debido a que los brotes jóvenes son atacados con gran velocidad en estadios tempranos, por lo que limita mucho el crecimiento progresivo de estas plantas y se hace más notable el enanismo.

Una apreciación importante a destacar es que en calabaza las hojas que se ven afectadas son los brotes jóvenes, a diferencia del melón que presenta los síntomas en las hojas adultas, quedando los brotes jóvenes asintomáticos.

Otra diferencia con el cultivo del melón, se aprecia que el virus se manifiesta en un mayor porcentaje de plantas en melón que en calabaza. Haciendo así que el virus coja más relevancia en el cultivo de melón según los análisis obtenidos.

Como se ha nombrado anteriormente podrían haber otros motivos que relacionen los síntomas con deficiencia de agua, con aportes de abono o por la presencia de otros insectos, pero al ver la evolución de la planta y hacerse más evidentes los síntomas descritos coinciden con el perfil del virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi. Por otra parte, no ha habido ningún resultado negativo en los análisis para este cultivo.

Pasados 15 días desde que se comenzaron a ver los posibles síntomas se comenzaron a ver en hojas de calabaza pequeños círculos con micelio blanco, posiblemente sea la presencia de alguna especie de oídio. Pero no se trató con fungicida ya que solo se vieron pequeñas muestras aisladas, en caso de aumentar la superficie de micelio en las plantas se trataría con Byfidan aplicado anteriormente en pimiento.

Todas las cucurbitáceas son susceptibles a esta enfermedad, la cual puede afectar las hojas, pecíolos, y tallos. Los síntomas causados por este hongo comienzan en el envés de las hojas más viejas como pequeñas manchas blancas, pero en este caso ha sido en el haz de la hoja, por ello hay dudas de si es o no oídio.

El hongo que causa el añublo polvoriento es un parásito obligado, lo que significa que solamente puede completar su ciclo de vida en las plantas que infecta. No se necesita agua para que se inicie la infección pero la presencia de ésta aumenta la severidad de los síntomas.

Aparte de la aparición de un posible hongo en plantas de calabaza, los síntomas van evolucionando en las especies.

La aparición de este hongo coincidió en las plantas que presentaban síntomas del nuevo virus emergente del rizado de la hoja de tomate de Nueva Delhi, puede explicarse porque la planta

se encuentra más debilitada que el resto de plantas y el hongo la ataca por ser una presa más fácil.

Al igual que ocurría con el cultivo del melón, en la calabaza los resultados resultan positivos frente al virus en ambos métodos. Por otra parte, en la segunda plantación que se realizó para seguir teniendo plantas sintomáticas, estas dieron positivas.

A nivel de laboratorio podemos determinar que la calabaza es un hospedante susceptible al nuevo virus emergente, provocando reducciones de producción frente a los síntomas vistos en el ensayo realizado.

En el caso de la calabaza han sido menos las plantas infectadas por virus con respecto al cultivo del melón, pero la voracidad con la que ha atacado es mayor.

3.3. Pepino (*Cucumis sativus*)

En España a nivel de campo hay muy pocos casos confirmados sobre pepino, tan solo en plantas puntuales, pero en la Indica ToLCNDV si ha causado una grave enfermedad denominada *yellow leaf crumple* (rizado amarillo de la hoja).

Son 6 las presuntas plantas que se ven afectas por *Bemisia tabaci* de las diez plantas que se cultivaron.

La notable diferencia en este cultivo, se aprecia en que ha tardado más tiempo en apreciarse síntomas. Se empiezan a manifestar tras 8 días después de que aparezcan en calabaza y melón.



Ilustración 61. - Plantas de pepino asintomáticas

Esta imagen muestra las plantas de pepino asintomáticas el día 17 de Abril, en esta misma fecha ya se veían claros síntomas severos en melón y calabaza relacionados con ToLCNDV.

El síntoma que más se aprecia en el comienzo son mosaicos amarillos en las hojas adultas, estos mosaicos no comienzan de forma leve acentuándose cada vez más, sino que en comparación con los demás cultivos, los mosaicos se tornan bastante agresivos desde el comienzo y viéndose leves abullonamientos en las mismas.



Ilustración 62. – Mosaicos verde claro - amarillo en hojas de pepino

Se destacan en hojas adultas, quedando los brotes jóvenes asintomáticos, haciendo así que la planta pueda seguir teniendo un crecimiento apical.

Los frutos han seguido creciendo sin manifestarse ningún síntoma. Se conservan asintomáticos tanto en plantas con síntomas como aquellas plantas que no presentan síntomas.



Ilustración 63. - Frutos de una planta sintomática de pepino

Otra premisa que nos lleva a descartar la presencia del virus en este cultivo es que sus frutos no presentan ningún síntoma, y en las plantas que aparentan ser sintomáticas la producción de esta hortaliza se produce en la misma cantidad que las plantas que son asintomáticas. Por tanto, no supone un problema para la producción.



Ilustración 64. - Mosaicos en hojas de pepino.

En esta ilustración vemos como hay diferencia entre los cultivos de pepino con respecto al melón y la calabaza. Los abullonados en las hojas son tan leves, que podemos observar que la caída de la hoja es por su propio peso y que se vuelve débil frente a las picaduras de *Bemisia tabaci*.

En la segunda plantación realizada, los síntomas no se repitieron en las tres plantas de la misma forma que en la plantación principal que se ha realizado.

Pero por otro lado podemos plantear que estamos frente a una planta que actúa como reservorio para el virus, manifiesta síntomas foliares pero no los manifiesta en frutos.

En los análisis visuales se ha descartado la presencia de pulgones, por lo que se descarta que sean síntomas de otros virus transmitidos por ellos como puede ser Virus de las venas amarillas del pepino, cucumber vein yellowing virus (CVYV).

La mosca blanca provoca picaduras en la planta, y vemos de manera visual la manifestación de ciertos síntomas causados por las picaduras de *Bemisia tabaci*.

Por otro lado en los análisis realizados, tanto por PCR como por el método de hibridación se obtuvo dos positivos de tres muestras, y en otra PCR que se realizó sobre muestras de las plantas de la segunda plantación salió positivo. Estos resultados causan una verdadera incertidumbre, y grandes sospechas que nos acercan a clasificar esta planta como reservorio del virus.

Comparando los síntomas que se causan en melón o en calabaza con los del pepino hay claras diferencias. En pepino no se producen claras deformaciones hacia el envés o hacia el haz de las hojas, por otro lado las hojas tampoco se vuelven más rígidas una vez que manifiestan los síntomas, sino que tan solo las hojas se muestran caídas y más débiles lo cual es debido a las picaduras que provoca *B.tabaci* provocando así también mosaicos de color verde claro y amarillos.

Lo más importante a destacar es que los frutos no presentan ningún síntoma asociado a ToLCNDV como aparece en el calabacín, la piel de todos los pepinos se presentaba lisa y libre de abullonamientos.

Hay análisis que dan positivos frente al virus, pero analizando los síntomas vistos, podemos afirmar que existe la posibilidad de que el pepino sea una planta que actúa como reservorio del virus, posee el virus pero no manifiesta ningún síntoma.

En el caso afirmativo de estar frente a una planta que es reservorio del virus, se debe tener muy en cuenta ya que una vez que una de estas plantas tenga en su material genético ADN virosante, otras moscas blancas que no sean víricas pueden serlo si succionan de esta planta al alimentarse, e ir posteriormente a huéspedes y propagar de esta manera el virus.

3.4. Calabacín (*Cucurbita pepo*)

En mayo de 2013 se confirmó la presencia del virus del rizado de la hoja de Nueva Delhi por el grupo de investigadores del CEBAS, en colaboración con investigadores de la UMH secuenciándose DNAs A y B de aislados españoles del virus.

En el caso del calabacín, estamos frente al cultivo del que ha partido el virus en España, este ha sido el más susceptible hasta ahora conocido, produciendo graves problemas a los productores agrícolas, causando así enormes pérdidas de producción.

En el presente proyecto, de las doce plantas cultivadas de calabacín, tan solo una dio síntomas semejantes al virus del rizado del tomate de Nueva Delhi.

En las segundas plantaciones, las tres plantas de calabacín, presentaron síntomas del virus.

La planta de calabacín muestra al principio unas punteaduras visibles en el haz y en el envés de las hojas que corresponde con las picaduras de mosca blanca.

Amarilleamientos en las hojas que se tornan deformadas es una de los principales síntomas que se comienzan a ver en la planta. Las hojas evolucionan presentando rizados en los bordes. Como se aprecia en la siguiente imagen, había presencia de poblaciones de mosca blanca sobre las hojas de calabacín.



Ilustración 65. – Hoja de una planta de calabacín sintomática

Los síntomas aparecen en un comienzo en los brotes más jóvenes, las hojas se abullonan notablemente, los brotes más jóvenes se amarillean y se producen deformaciones. En las hojas más adultas se aprecia mejor el rizado foliar.



Ilustración 66. - Planta de calabacín sintomática

Los síntomas se manifiestan también en hojas adultas conforme van viéndose afectados los brotes jóvenes, deformando por completo las hojas y evolucionando los amarilleamientos foliares.

La planta pierde vigor, y se le aprecia notablemente debilitada, el virus en ella presente no la deja evolucionar.

En el caso del calabacín, los síntomas evolucionan de un día a otro con mayor velocidad que en otras especies. Y su voracidad es mayor que en el resto de las especies. En cuestión de horas las hojas se tornan deformadas hacia el haz o el envés, con abullonados y rizados.

En todo el ensayo no se ha apreciado en un principio leves síntomas, sino síntomas en un estadio más avanzado.

Se destaca en este cultivo el filimorfismo foliar, es decir, la reducción del limbo foliar.



Ilustración 67. Hoja de calabacín donde se aprecia el filimorfismo y mosaico amarillo

Conforme se ven afectados los brotes jóvenes, las hojas adultas manifiestan síntomas, y a partir de ahí la planta sufre un achaparramiento quedándose más enana que una planta sana de calabacín. Se intensifican los rizados de las hojas, los amarillos foliares se unifican por todas las hojas quedando la planta con un color verde-amarillento.

Al no ser eficaz la transmisión en calabacín, se optó por visitar una explotación con cultivos de calabacín que empezó a verse afectada por la mosca blanca.



Ilustración 68. Evolución planta de calabacín en campo

El día 21 de Septiembre de 2014, el 60% de la finca estaba afectado por la mosca blanca, y transcurridos 7 días el 100% de la explotación tenía síntomas estrechamente relacionados con ToLCNDV.



Ilustración 69. - Planta de calabacín asintomática (21 de Septiembre).



Ilustración 70. – Planta de calabacín sintomática (28 de Septiembre).

Aquí se muestra en detalle una hoja con síntomas estrechamente relacionados con ToLCNDV.



Ilustración 72. – Detalle de una hoja de calabacín que muestra deformaciones abullonaos y amarilleamiento.

Haciéndose cada vez más notables los síntomas, la planta se debilita, pero es capaz de producir frutos. Estos frutos presentan un rizado suave de la piel con suaves protuberancias en los frutos más desarrollados, alguno de ellos también presentan deformaciones, que impide que se puedan comercializar en el mercado.



Ilustración 73. Planta de calabacín produciendo el fruto

En la siguiente imagen se muestra la diferencia entre un calabacín asintomático frente a un fruto de una planta con el virus ToLCNDV que se desprecia comercialmente.



Ilustración 74. – Diferencia entre un fruto de una planta con virus ToLCNDV (abajo) y un fruto de una planta sin el virus ToLCNDV (arriba)

La planta sintomática avanza de manera más veloz a la senescencia, acostándose así la vida de la planta.

El virus se caracteriza en el calabacín por transmitirse de manera uniforme y sobre todo de manifestarse en un alto porcentaje de plantas.

Se desconoce la escasa presencia de plantas sintomáticas de este cultivo en el ensayo. Los análisis visuales que se hacían frecuentemente corroboran la presencia de entre tres y cuatro moscas blancas (*Bemisia tabaci*) por planta. Por ello, se observó cultivos de calabacín al aire libre, para poder identificar mejor la evolución de los síntomas, detectar el virus y ver su incidencia.

Al igual que ha sucedido en calabaza y melón, en calabacín también se detectaron síntomas de oídiosis.

Los dos análisis hechos mediante PCRs han resultado positivos frente al virus en el cultivo del calabacín, tanto en la primera planta que se plantó y presentó síntomas, como en las plantas de la segunda plantación que también presentaban sintomáticas.

Es un cultivo que no cabe duda que sea el cultivo principal que presenta la mayor susceptibilidad frente al nuevo virus emergente.

Tras el ensayo en la Finca Experimental Tomás Ferro, se analizaron muestras de plantas de calabacín de la explotación del Campo de Cartagena para contrastar los resultados y cercinarnos de que el ensayo en el invernadero se ha visto influenciado por otros factores que no han dejado mostrar en calabacín la voracidad y la alta incidencia de *B. tabaci* en este cultivo.

3.5. Tomate (*Solanum lycopersicum*)

A partir de las primeras detecciones con calabacín y melón, también se han recogido muestras en tomate y pimiento, para el caso del tomate aun no se han descrito casos positivos del virus ToLCNDV a diferencia del melón por ejemplo, que es una transmisión esperada ya que en casos anteriores se ha visto en otras experimentaciones.

Existen otros virus transmitidos por *Bemisia tabaci* que podrían confundirnos debido a la semejanza de los síntomas, como por ejemplo Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), virus del rizado amarillo del tomate. En las muestras analizadas, frente a ToLCNDV daban negativo, pero positivo frente a este virus.



Ilustración 75. - Planta de tomate con síntomas del virus del rizado amarillo del tomate

Ensayar en tomate ha sido porque en algunas otras partes del mundo se conocen variantes de ToLCNDV que afectan gravemente al tomate, pimiento y berenjena debido a la gran variabilidad genética, lo que le aporta a este virus una gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones y especies vegetales, y así, un incremento de su potencial de riesgo. Sobre todo en plantas de tomate ya que fue en la India donde se detectó como principal huésped.

En el presente proyecto, la sintomatología se manifiesta en las 12 plantas, la totalidad de plantas que se cultivaron. No hay una sola planta que quede asintomática.

Antes de manifestarse síntomas más notorios, como en todas las especies se pueden ver las punteaduras amarillas que se corresponde con las picaduras de *Bemisia tabaci*. Las hojas muestran pequeñas áreas coloreadas de amarillo en el haz de las hojas.



Ilustración 76. - Leves punteaduras amarillas en hojas de tomate.

Se puede apreciar como a media altura conforme se asciende hasta los ápices de la planta las hojas se ven más enroscadas y con ligeros abullonamientos, así como se empezó a detectar que las plantas estaban comenzando a manifestar ciertos síntomas, que se dieron al igual que en pepino, días más tarde que en calabaza y melón. Se aprecia en la imagen como la planta a media altura conforme se asciende, las hojas están caídas.



Ilustración 77. Detalle de una planta sintomática de tomate

Las puntas de las hojas se curvan hacia adentro enroscándose como anteriormente se ha nombrado, tanto la punta, como la hoja en sí. Por tanto, se debilitan los peciolo de las hojas.



Ilustración 78. - Hojas de plantas de tomate sintomáticas, con leves abullonamientos y enroscadas.

Al localizarse en la parte media alta, podemos decir que en el caso del tomate todas las plantas presentan al principio en sus brotes más jóvenes pequeños abullonamientos y leve enrollamiento de las hojas.

La aparición de los síntomas en estas zonas significa que los brotes jóvenes son los que son más susceptibles al supuesto ataque del virus y presentan sus hojas un mayor enrollamiento.

Los abullonamientos y enrollamientos se van acusando con el tiempo, y cada vez avanzan más hacia las partes bajas de las plantas. En la parte baja de la planta las hojas presentan leves abullonamientos, pero no se ve la misma voracidad que en el resto de la planta.

Las hojas terminan enrollándose por completo y conforme transcurre el tiempo las hojas se enroscan más, evolucionando los síntomas también en la parte baja de las plantas y afectando por completo a prácticamente todas las hojas unas en mayor medida que en otras.

Los tallos presentan un polvillo amarillo con un aroma ácido el cual puede ser exudado por la planta, en respuesta a su ataque por parte de *B. tabaci*.

Aparte del enrollamiento de las hojas, los tallos de los brotes jóvenes comienzan a curvarse, ya que la planta pierde vigor. En las hojas más adultas el síntoma que predomina es el enrollamiento de la hoja, también se aprecian pequeños bultos en las hojas como si se les hubiese dado un pellizco, creándose como unas burbujas que sobresaltan en el haz. Los nervios también se abultan en la hoja, haciendo que sobresalgan.



Ilustración 79. – Enrollamiento de una hoja sintomática

No se muestran mosaicos definidos, ni deformaciones hacia el haz o el envés de la hoja. Las hojas que se curvan se muestran debilitadas a diferencia que en los cultivos de calabaza y melón que aquellas hojas que presentan síntomas se tornan un poco más rígidas.

El caso del tomate se asemeja en parte con el caso de la especie del pepino.

Por otra parte los frutos comienzan a desarrollarse pero no se aprecia ningún síntoma anómalo o que pueda relacionarse con el virus.

Conociendo el caso del calabacín, su síntoma predominante es la piel rugosa, en los tomates se ha analizado los frutos, llegando a la conclusión de que no presentan síntomas que se asemejen.

Lo que se destaca en ellos es la presencia de manchas oscuras blandas en la parte inferior de los frutos, posiblemente estemos frente a podredumbre apical del fruto (*Blossom-end rot*).

La aparición de esta fisiopatía está relacionada con niveles deficientes de calcio en el fruto. El estrés hídrico y la salinidad influyen también directamente en su aparición. Comienza por la zona de la cicatriz pistilar como una mancha circular necrótica que puede alcanzar hasta el diámetro de todo el fruto.



Ilustración 80. –Frutos de tomate en plantas sintomáticas

En los análisis la hibridación molecular y las primeras PCR's dieron positivas, excepto en la última PCR que tan solo dio positivo la planta de tomate que fue tratada contra mosca blanca, que se aisló y las hojas presentaban síntomas.

Estos resultados son dudosos y nos pueden llevar a pensar que es necesario asegurar los resultados con otro método de análisis.

Para afirmar si efectivamente las plantas de tomate son susceptibles al virus, como ya hemos comentado anteriormente, se aislaron dos plantas de tomate en otro compartimento libre de mosca blanca, a estas plantas se les quitó la mayor cantidad de moscas blancas y posteriormente fueron tratadas contra *Bemisia tabaci*.

Este ensayo se realizó para comprobar si en los análisis obteníamos positivos en tomate por confusión de las picaduras de la mosca blanca que hacen que en los métodos de diagnóstico pueda llevar a confusión y aparezcan falsos positivos.

Los resultados del primer análisis con PCR dieron siempre positivo en las hojas sintomáticas y en las asintomáticas. Excepto en la última PCR que tan solo dio positivo en las hojas sintomáticas, dando negativo en los brotes que no aparentaban síntomas y por tanto no hay picaduras de mosca blanca.

Pero podemos estar frente a otro caso de reservorio de virus al igual que ocurría con el pepino. Ya que no incide, los síntomas sobre los frutos, y en la parte vegetal hay diferencia entre los síntomas principales del virus.

3.6. Pimiento (*Capsicum annum*)

El pimiento es otro cultivo de la familia de Solanáceas. En Indonesia se ha descrito este virus afectando a *Cucumis sativus* (T. Mizutani et al., 2011) y en Pakistan en pimiento (M. Hussain. et al., 2000).

En un principio, las hojas en su mayoría las adultas muestran leves punteaduras amarillas, en los brotes más jóvenes se amarillean los nervios y se forman pequeños abullonamientos acompañados de deformaciones en las hojas jóvenes. Se puede apreciar también amarilleamientos en los brotes más jóvenes. Estos síntomas son causados por las picaduras que les proporciona el vector, *Bemisia tabaci*.



Ilustración 81. – Punteaduras en planta de pimiento



Ilustración 82. - Abullonados en planta de pimiento

Conforme evoluciona la planta, va desarrollándose, los síntomas van desapareciendo, y haciéndose menos notables cada vez, quedando tan solo leves amarilleamientos en los brotes más jóvenes. Las plantas producen sus frutos sin ninguna anomalía y todo a pesar de ser la especie que mas mosca blanca posee en su vegetación.

Los análisis han dado negativo mediante todos los métodos que se han realizado (PCRs e hibridación molecular). Tras el seguimiento visual de las plantas no se ven síntomas que puedan relacionarse con el virus del rizado del tomate de Nueva Delhi.

Se pueden relacionar los síntomas con las picaduras del vector, pero es sorprendente que la planta se regenere y evolucione sin seguir manifestando los síntomas, es posible que sea una planta con una alta resistencia a este virus emergente por cualidades en su secuencia genética a diferencia de las otras especies.

Durante las visitas al invernadero se detectó en plantas de pimiento síntomas de oídiosis, una enfermedad producida por un hongo. Fue tratado de igual manera que en calabacín y melón.

3.7. Flora espontánea

La flora espontanea que ha brotado en los compartimentos, no ha mostrado en ningún momento síntomas tan agresivos como los que se muestran en los cultivos hortícolas.

En un primer momento, las muestras tomadas de mala hierba en uno de los compartimentos del invernadero donde se realizó la transmisión mediante el vector fueron analizadas. Siendo estas:

- *Amaranthus retroflexus*
- *Chenopodium álbum L.*

Mediante el método de diagnostico de la Cadena de Reacción de la Polimerasa, *Chenopodium álbum L.* dio positivo frente al virus, ToLCNDV.

Por ello más tarde se tomaron muestras de más malas hierbas entre ellas también de *Chenopodium álbum* L. A pesar de no encontrarse en cultivos de calabacín, la distancia que las separa de plantas de calabacín es de 200 metros, distancia que sin problemas pueden recorrerla *B. tabaci*.

En ninguna de ellas se aprecian síntomas característicos del virus ToLCNDV, tan solo en algunas plantas ligeras deformaciones.

Las especies que se analizaron fueron:

- *Chenopodium álbum* L.



- *Solanum nigrum* L.



➤ *Taraxacum officinalis*



➤ *Malva sylvestris*



Tras los análisis realizados tanto de PCR como de hibridación molecular se puede concluir que *Chenopodium álbum* L, *Taraxacum officinalis* y *Malva sylvestris* son especies que dan positivo frente al virus.

Se puede determinar que estamos frente a una flora espontánea que podría actuar como reservorio del virus, donde *Bemisia tabaci* deposita el virus y posteriormente moscas no virosantes lo adquieren y luego pican en otros cultivos provocando la transmisión del mismo.

Por esto es imprescindible eliminar las plantas virosadas ya que como hemos nombrado anteriormente pueden actuar como reservorios del virus. Para evitar estas fuentes de inóculo, es fundamental realizar una rápida y adecuada eliminación de las plantas en las que pudiera ir detectándose síntomas de la enfermedad.

En la siguiente Tabla aparece toda la sintomatología que se asocia a ToLCNDV, y podemos ver que síntoma está presente en cada una de las especies empleadas en el ensayo.

Tabla 18. – Síntomas para cada cultivo

SINTOMATOLOGÍA	<u>Calabacín</u>	<u>Melón</u>	<u>Calabaza</u>	<u>Pepino</u>	<u>Tomate</u>	<u>Pimiento</u>
<i>Rizado foliar</i>						
<i>Filimorfismo apical</i>						
<i>Amarillos foliares (mosaicos)</i>						
<i>clorosis internervial</i>						
<i>Abullonamientos</i>						
<i>Deformación foliar hacia el haz</i>						
<i>Deformación foliar hacia el envés</i>						
<i>Frutos con síntomas</i>						
<i>Falta de vigor, planta debilitada</i>						
<i>Bajo rendimiento</i>						
<i>Parada de crecimiento</i>						

4. Sintomatología transmisión mecánica

4.1. Melón (*Cucumis melo*)

El melón en este ensayo ha sido una de las especies que ha manifestado síntomas parecidos a los del virus ToLCNDV, pero tras los análisis visuales hemos podido comprobar que es una de las especies que poseía pulgones, por lo que una razón por la cual mostrara indicios de síntomas de dicho virus, es por la posible transmisión de algún otro virus por parte de pulgones o tan solo ser respuesta de las picaduras de éstos.

En el control del melón también se aprecian los mismos síntomas

En la siguiente imagen aparece una hoja con los bordes curvados, a diferencia de los abullonados que se producen con ToLCNDV, las hojas no se tornan rígidas. Lo que nos muestra otro motivo para descartar la presencia de dicho virus.



Ilustración 83. – Planta de melón con indicios de síntomas

4.2. Calabaza (*Cucurbita moschata*)

En el caso de la calabaza fue donde más acentuados se vieron los síntomas, y donde más población de pulgón se visualizó.

Los análisis dieron positivo a la muestra de transmisión mecánica en la calabaza en dos ocasiones, por lo que hay sospechas de la posible transmisión del virus de forma mecánica.

Los síntomas mostrados fueron en todas las muestras incluyendo en la muestra control. Los síntomas no se asemejan por completo a los conocidos en el virus ToLCNDV, ya que estos se asemejan a pequeños pellizcos en las hojas adultas, y arrugas en los nervios como se muestra en la siguiente imagen.



Ilustración 84. – Síntomas que se aprecian en hojas de calabaza tras realizar la transmisión mecánica

4.3. Pepino (*Cucumis sativus*)

En el cultivo del pepino no se mostraron síntomas que se diferenciaron del control, o síntomas que indicaran en indicio del virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Dehli o de otro virus.

Se apreció una pequeña población de pulgones en una de las plantas, pero aun así los resultados salieron en ambas ocasiones negativos para este cultivo frente a ToLCNDV.

4.4. Calabacín (*Cucurbita pepo*)

En el calabacín se muestran síntomas que se asemejan a los vistos anteriormente en ensayo de melón con la transmisión mecánica, se aprecian hojas muy débiles con los bordes doblados pero que no lo hacen de manera rígida como cuando se aprecia en plantas por transmisión del virus mediante el vector.

Estas curvaturas aparecen de manera mucho más débil que en el cultivo del melón, y en las revisiones visuales no se ha apreciado presencia de pulgones en estas plantas. A pesar de no haber visto presencia de pulgones, por la proximidad de estos en otras plantas, no podemos descartar que sea provocado por pulgones.



Ilustración 85. – Planta de calabacín con supuestos síntomas

4.5. Tomate (*Solanum lycopersicum*)

En el caso del tomate se ven en algunas hojas como se comienzan a enroscar, es el cultivo donde sus síntomas visualmente se asemejan ligeramente los síntomas que se producen tras la transmisión mecánica.

Los análisis han resultado en primer lugar positivos para el tomate, en estos cultivos no se visualizó presencia de pulgones, pero aun así pueden haber migrado a estas plantas debido a su proximidad.

Las hojas se pliegan hacia el haz, y se aprecian pellizcos en las hojas de la misma manera que aparecen en las plantas de calabaza, pero no se enroscan de la misma forma que ocurre cuando se transmite el virus a través de *Bemisia tabaci*, tal motivo junto con el segundo análisis que resultó ser negativo al virus, puede evidenciar la ausencia de dicho virus.



Ilustración 86. – Hojas de tomate con supuestos síntomas

4.6. Pimiento (*Capsicum annuum*)

En el caso del pimiento las hojas se tornan arrugadas, tanto las muestras en las que se realizó el ensayo y en la planta control.

En el caso del pimiento en ninguno de los dos análisis realizados resultó positivo frente al virus.

5. Diagnóstico

En el ensayo se trabajó con las dos técnicas ya mencionadas, PCR e hibridación molecular. Ambas técnicas son eficaces pero el motivo por el cual se debían repetir los análisis es por la problemática de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ya que produce en ocasiones falsos positivos. Por ello, se tomó los resultados de esta técnica de modo orientativo, y se terminan confirmando o no con la técnica de hibridación molecular.

Un aspecto a tener en cuenta es que en algunas muestras iban hojas sintomáticas de distintas plantas que presentaban síntomas, lo cual quiere decir que en cada análisis realizado podría darse la posibilidad de que se tratara de una planta diferente pero si de la misma especie. Se tomaron varias hojas de diferentes plantas para aumentar la posibilidad de que en los análisis saliesen resultados positivos, ya que en el ensayo se pusieron alrededor de 75 plantas y por motivos de material era difícil realizar tantos ensayos de detección.

V. CONCLUSIONES

Tras la realización de distintos métodos de análisis, como son, hibridación molecular y PCR, se deduce que el método más fiable para detectar el virus es por hibridación molecular.

Después de la evaluación de los distintos métodos de análisis para detectar el virus y de los síntomas manifestados en cada una de las especies, mediante la transmisión con el vector, *Bemisia tabaci*, se deduce que el cultivo de calabacín es el hospedante principal para este nuevo virus emergente. En un segundo plano quedan como hospedantes la calabaza y el melón con una incidencia menor con respecto al calabacín. Se hace evidente como la voracidad con la que ataca el virus al calabacín es mucho mayor con respecto a los demás hospedantes.

Por otra parte, según los resultados podemos llegar a la conclusión de que las especies de pepino y tomate actúan frente al virus como reservorios y de este mismo modo ciertas especies de malas hierbas como son, *Chenopodium álbum L.*, *Taraxacum officinalis* y *Malva sylvestris*.

Por tanto, se hace imprescindible las medidas preventivas para este virus, puesto que evitar la existencia de reservorios haría disminuir la incidencia del virus en el número de hospedantes.

Mediante el método Frotis, llegamos a la conclusión de que existe la posibilidad de que especies de calabaza sean susceptibles al virus por transmisión mecánica. De esta misma manera, se abre una vía de investigación dentro de las cucurbitáceas para confirmar si podemos estar frente a un nuevo método de transmisión para ToLCNDV.

Finalmente, este proyecto queda abierto para futuras investigaciones, ya que los ensayos llevados a cabo son a nivel de laboratorio y deben extrapolarse con más ensayos a nivel de campo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

ARTÍCULOS

- Alfaro, A. 1995. Aspecto fitopatológico del cultivo algodonero en Aragón. Bol. Patol. Veg. Ent. Agríc. 20: 145-166
- Anderson, P.K. 2000. La mosca blanca vectora: *Bemisia tabaci* (Genn.). En: El Mosaico Dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina. F. J. Morales (ed.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia. p. 107-127.
- Arnó, J.; Gabarra, R.; Liu, T.X.; Simmons, A.M.; Gerling, D. 2010. Natural enemies of *Bemisia tabaci*: predators and parasitoids, pp. 385-421. En P.A. Stansly & S.E. Naranjo (eds.) *Bemisia: Bionomics and management of a global pest*. Springer Science.
- Avilla, J.; Albajes, R.; Alomar, O.; Castane, C. y Gabarra, R. 2004. Biological control of whiteflies in protected vegetable crops, pp. 171-184. En: R.G. Van Oriesche, K.M Heinz y M.P. Parella (editores) *Biocontrol in protected culture*. Ball Publishing, Batavia, Illinois, EE UU.
- Azofeifa-Delgado, A. 2003. Usos de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. ISSN: 1021-7444.
- Beitia, F.; Carnero, A.; Hernández-Suárez, E.; Onillón, J. C. y Guirao, P., 1997. Posibilidades de control biológico de *Bemisia tabaci*: Situación en Canarias. En: El virus del rizado amarillo (Hoja en cuchara) del tomate (TYLCV) y su vector *Bemisia tabaci*. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia. 81-85.
- Bellows J.; Perring, T. M.; Gill, R. J.; Headrick, D. H. 1994. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 87: 195-206.
- Bethke, J.A.; Paine, T.D.; Nuessly, G.S. 1991. Comparative biology, morpho-metrics and development of two popula-tions of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton and poinsettia. *Annals of the Entomological Society of America* 84: 407-411.

- Bisaro, D.M.; Sunter, G.; Revington, G.N.; Brought, C.L.; Hormuzdi, G.G.; Hartitz, M. 1990. Molecular genetics of tomato golden mosaic virus replication: Progress toward defining gene functions, transcription units and the origin of DNA replication. In Pirone, T.P.; Shawm J.G. Ed. Viral genes and plant pathogenesis. New York, Springer-Verlag. p 89-105.
- Bock, K.R. 1974. Maize streak virus. In: CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 133, New England. Commonwealth Mycology Institute. 4p.
- Briddon, R.W.; Watts, J.; Markam, P.G.; Stanley, J. 1989. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology* 172:628-633.
- Brown, J.K.; Bird, J. 1992. Whitefly transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76(3):220-225.
- Brown, J.K.; Frohlich, D.R.; Rosell, R.C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whitefly: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Annual Review of Entomology* 40: 511-534.
- Byrne, D.; Bellows, T.; Parrella, M. 1990. Whiteflies in agricultural systems. In: Gerling, D. (ed.), *Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management*. New Castle, U.K. Atheneum. P. 227-251.
- Byrne, D.; Miller, W.B. 1990. Carbo-hydrate and amino acid composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. *Journal of Insect Physiology* 36: 433-439.
- Campbell, B.C.; Stephen-Campbell, J.D.; Gill, R. 1995. Origin and radiation of whiteflies: an initial molecular phylogenetics assessment. In: Gerling, D., Mayer, R.T. (eds.), *Bemisia: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. Intercept, UK, p. 29-52.
- Cardona, C.; Rodriguez, I.; Bueno, J.M.; Tapia, X. 2005. Biología y manejo de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* en habichuela y frijol.
- Carnero, A.; Montesdeoca, M.; Perez, F.; Silverio, A.; Rodriguez, P. 1990. Presencia de *Bemisia tabaci* (Genn.) en cultivos comerciales de hortalizas y ornamentales en la isla de Tenerife (Islas Canarias). *Cuadernos de Fitopatología*, 4º. Trimestre 25: 176-180.

- Castañé, C.; Arnó, J.; Beitia, F.; Gabarra, R. 2008. Control biológico de moscas blancas, pp. 239-253. En J.A. Jacas y A. Urbaneja (eds.) Control biológico de plagas agrícolas, M.V. Phytoma España, S.L., Valencia, España.
- Cuéllar, M.E.; Morales F.J. 2006. La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) como plaga y vectora de virus en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista de Entomología* 32(1): 1-9.
- De Barro, P.J.; Liu S.S.; Boykin, L.M.; Dinsdale, A.B. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56, 1-19.
- Delgado, A.M. 1997. El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) en la región de Murcia: Aspectos generales para su control. En: El virus del rizado amarillo (Hoja en cuchara) del tomate (TYLCV) y su vector *Bemisia tabaco*. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia 67-73.
- Díez, M.J.; Picó, B.; Nuez, F. 1997. Mejora genética para la resistencia al TYLCV. En: El virus de la hoja en cuchara del tomate y su vector, *Bemisia tabaci*. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia. 91-98
- Domínguez García-Tejero, F. 1961. Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. Ed. Dossat. 929 pp.
- Elmer, J.S.; Brand, L.; Sunter, G.; Gardiner, W.E.; Bisaro, N.M.; Rogers, S.G. 1988. Genetic analysis of *tomato golden mosaic virus*. II The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Research* 16:7046-7060.
- Fauquet, C.; Fargette, D. 1990. African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology, and control. *Plant Disease* 74:404-411
- Gabarra, R.; Arnó, J.; Riudavets, J. (2008). Tomate, pp. 410-422. En J.A. Jacas y A. Urbaneja (eds.) Control biológico de plagas agrícolas, M.V. Phytoma España, S.L., Valencia, España.
- Gómez-Menor, J. 1943. Contribución al conocimiento de los Aleyrodidos de España. (Hem. Homoptera). *Eos* 19: 173-209.
- Gonsebatt, G.; Lietti, M. 2005. Presencia de *Bemisia tabaci* en el Cinturón Hortícola de Rosario: primeros registros.

- González-Zamora, J.E. 1997. Posibilidades de control biológico de *Bemisia tabaci*: Situación en Almería. En: *El virus de la hoja en cuchara del tomate y su vector, Bemisia tabaci*, Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia 75-79.
- Goytia, M.E. 2007. Transmisión natural por pulgones de potyvirus: ensayos de interferencia aplicados al control de virosis. M^a Elisa Goytia Pasquín, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. ISBN: 978-84-669-3093-2.
- Guirao, P.; Beitia, F.; Cenis, J.L. 1997. Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* 87:587-593.
- Hamilton, W.D.O.; Bisaro, D.M.; Coutts, R.H.A.; Buck, K.W. 1983. Demonstration of the bipartite nature of genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucleic Acids Research* 11:7387-7396.
- Harrison, B.D. 1985. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23:55-82.
- Harrison, B.D.; Barker, H.; Bock, K.R.; Guthrie, E.J.; Meredith, G.; Atkinson, M. 1977. Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature* 270:760-762.
- Ho-Hsiung, C.; Rui-Che, C.; Wen S.T.; Fuh-Jyh, J. 2007. Molecular and biological characterization of a mechanically transmissible Tomato leaf curl New Delhi virusinfecting oriental melon plants. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 40227, Taiwan.
- Izquierdo, A.; Durán, M. 1967. Enfermedades y parásitos del tabaco en España. *Bol. Patol. Veg. Ent. Agric.* 30:155-214.
- Juárez, M.; Gosálvez, B.; Aranda M. 2013. Virus del rizado amarillo del tomate de Nueva Delhi (Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV): Un nuevo virus que afecta gravemente cucurbitáceas en Almería y Murcia.

- Lacasa, A.; Sanchez, J.A.; Gutiérrez, L.; Contreras, J.; Guirao, P.; Ros, C.; Molina, J.; Lorca, M.; Hita, I. 1997. Dinámica poblacional de *Bemisia tabaco* (Gennadius) y evolución de la incidencia del TYLCV en cultivos de tomate de Murcia. En: El virus del rizado amarillo (Hoja en cuchara) del tomate (TYLCV) y su vector *Bemisia tabaci*. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia. 35-46
- Marco, V.; Taberner, A.; Castañera, P. 1997. Development and survival of immature *Aubeonymus mariafrancisca* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Ann Entomol. Soc. Amer.*, 90(2):169-176.
- Martin, J.H.; Mifsud, D.; Rapisarda, C. 2000. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and Mediterranean basin. *Bulletin of Entomological Research* 90: 407-448.
- Martínez, B.; Everth, E.; Walther, A.; Guerrero, G.; Acosta, A. 2012. Presence of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and Begomovirus, associated with tomato crops *Solanum lycopersicum* L. 30(3).
- Mcauslane, H.J.; Cheng, J.; Carle, R.B.; Schmalstig, J. 2004. Influence of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) infestation and squash silverleaf disorder on zucchini seedling growth. *Journal of Economical Entomology* 97(3): 1096-1105.
- Morales, F.J.; Anderson, P.K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses. *Archives of Virology* 146:415-441.
- Mumford, D.L. 1974. Purification of beat curly top virus. *Phytopathology* 64:136-139.
- Muñiz, M. 2000. Desarrollo del biotipo B de *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Homoptera: Aleyrodidae) en tres variedades de pimiento a temperaturas constantes. *Bol. San. Veg. Plagas*, 26: 605-618.
- Muñiz, M.; Nombela, G.; Gómez, A.; Alonso, D. 2008. Effects of SB Plant invigorator on *Bemisia tabaci* development on tomato plants. Abstract En: **Journal of Insect Science** 8(4): 34-35.
- Navot, N.; Pichersky, E.; Zeidan, M.; Zamir, D.; Czosnek, H. 1991. Tomato yellow leaf curl virus: A whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* 185:151-161.

- Nombela, G.; Beitia, F.; Muñiz, M. 2001. A differential interaction study of *Bemisia tabaci* Q-biotype on commercial tomato varieties bearing or not bearing the Mi resistance gene, and comparative host responses with the B-biotype. *Entomol. Exp. Appl.* 98(3): 339-344
- Oliveira, M.R.V.; Henneberry T.J.; Anderson, P. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *B. tabaci*. *Crop Protection* 20: 709-723
- Padidam, M.; Beachy, R.N.; y Fauquet, C.M. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76:249-263.
- Perring, T. M. 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection* 20: 725-737.
- Perring, T.; Cooper, A.D.; Rodríguez, R.J.; Farrar, R.J.; Bellows, C.A. 1993. Identification of whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* 259: 74-77.
- Polston, J.E.; Anderson, P.K. 1999. Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por mosca blanca en tomate en el Hemisferio Occidental. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 53:24-42
- Reina, J.; Bejarano, E.R. 1997: Perspectivas en la obtención de resistencia transgénica para TYLCV. En: *El virus de la hoja en cuchara del tomate y su vector, Bemisia tabaci*. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia 87-89.
- Rodriguez, I. 1999. Diagnóstico de la problemática de moscas blancas como plagas agrícolas en el Valle del Cauca y determinación de niveles de resistencia a insecticidas de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.
- Rodriguez, M.D. 1997. Incidencia de *B.tabaci* en un sistema de protección integrada: Experiencia en Almería. En: *El virus de la hoja en la cuchara del tomate y su vectot, Bemisia tabaci*. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia. 71-79.
- Rybicki, E.P.; Huges, F.L. 1990. Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminiviruses of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. *Journal of General Virology* 71:2519-2526.

- Rybicky, E.P. 1994. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of geminiviridae. Archives of Virology 139:49-77.
- Sunter, G.; Hartitz, M.D.; Hormuzdi, S.G.; Brough, C.L.; Bisaro D.M. 1990. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus. ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. Virology 179:69-77.
- Zuñiga-Vega, C.; Ramírez, P. 2002. Los geminivirus, patógenos de importancia mundial.) No. 64 p. 25 - 33.

TESIS DOCTORALES

- Fernández, M.E. 2013. Tesis doctoral Resistencia a insecticidas en *Bemisia tabaci* (*Gennadius*): nivel de resistencia, resistencias cruzadas y mecanismos implicados. Departamento producción vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena
- Monci, F. 2004. Tesis doctoral Búsqueda de estrategias de control frente a los begomovirus que afectan a tomate y a judías verdes. Universidad de Córdoba.

LEGISLACIÓN

Boletín oficial de la Región de Murcia, nº 36. Pág. 5841. 2014

REVISTAS

Almería en verde, COEXPHAL-FAECA, nº 116, Enero 2014.

Juárez, M.; Aranda, M.A. 2013. Virus de cucurbitáceas en el sudeste español: viejos conocidos y nuevas amenazas, como el virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV) Phytoma España nº. 251 (agosto/septiembre) pp 31-36 Blog cienciacebas.

Janssen, D.; Ruiz, L. 2014. ToLCNDV: un nuevo virus de cucurbitáceas en España transmitido por mosca blanca. Departamento de Virología, IFAPA, *La Mojonera. Departamento de Fitopatología*. LABCOLOR, COEXPHAL

BUSQUEDA ONLINE

Historia e historia de los virus en cucurbitáceas. Página web <http://tomatecherry.es/>

<http://elhocino-adra.blogspot.com.es/2013/09/los-begomovirus-de-la-familia.htm>

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

<http://www.juntadeandalucia.es/> - Virus del Rizado de Nueva Delhi (ToLCNDV) bajo invernadero en Almería.

<http://www.abiopep.com/> - Presencia del virus del rizado de la hoja del tomate nueva Delhi en Murcia

<http://www.imida.es/> - Control de virosis en calabacín y otras cucurbitáceas

<http://www.ica.csic.es/>

http://www.bayercropscience.es/BCSWeb/www/BCS_ES_Internet.nsf/id/ES_Bayfidan_312_SC?open&ccm=200010

<http://www.saepi.ual.es/saepi/tomate/moscablanca/docs/mbbemisias.htm>

OTRAS

Mena, J.D. 2010. Virus Fitopatógenos. Departamento de Protección Vegetal. Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte. Universidad Autónoma de Sinaloa.