



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**OBTENCIÓN DE UNA SONDA DE ARN PARA EL DIAGNÓSTICO DEL
VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PepMV) MEDIANTE
HIBRIDACIÓN MOLECULAR. SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE LA
VIROSIS EN CULTIVOS DE TOMATE DE LA REGIÓN DE MURCIA.**

María Dolores Hernández Gallardo

Septiembre, 2009

OBTENCION DE UNA SONDA DE ARN PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PepMV) MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR. SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE LA VIROSIS EN CULTIVOS DE TOMATE DE LA REGIÓN DE MURCIA.

Trabajo presentado por:

María Dolores Hernández Gallardo

Para optar al título de Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de
Cartagena

Trabajo realizado bajo la dirección del doctor:

José Luis Cenis Anadón en el Departamento de Biotecnología del Instituto Murciano
de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (IMIDA)

M^a Dolores Hernández Gallardo

V^oB^o

El director

La directora

Dr. José Luis Cenis Anadón

Dra. Dina Cifuentes Romo

Cartagena, Septiembre 2009

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me ayudaron y acompañaron en la realización de este trabajo.

A mis directores de proyecto Dr. José Luis Cenis del IMIDA y Dra. Dina Cifuentes de la UPCT, que además de haberme enseñado y ayudado con este trabajo y durante mis años de estudiante y becaria, me han impulsado profesionalmente.

Al Dr. Alfredo Lacasa por su inestimable ayuda en la parte de los muestreos de campo y el análisis de los datos, así como a su equipo, María del Mar, Nuria, Marta y María Angeles.

Al IMIDA por la beca de formación que me ha permitido realizar el proyecto.

Al Dr. Miguel A. Aranda, por darme la oportunidad de hacer una estancia en el laboratorio de virología de La Mayora en Málaga, por dedicar parte de su tiempo a ayudarme con una parte de este trabajo, dándome a conocer algunas de las técnicas moleculares para el estudio de los virus.

A Paco Aguilar, que me dedicó buena parte de su tiempo para enseñarme algunas técnicas necesarias para la obtención de la sonda, y al resto del equipo del laboratorio de virología de La Mayora, Cristina, Marisa, Juan, Victoria, Rocío y Paco Monci, por hacerme sentir como en casa y prestarme su ayuda cuando fue necesario.

A la Dra. Josefina Contreras, Dr. Pablo Bielza y a su equipo de la Universidad Politécnica de Cartagena que trabajaban en el proyecto del colapso del tomate cuando se hicieron los muestreos, que me acompañaron e hicieron más agradable el trabajo de campo.

A mis compañeras de laboratorio, Belén Simón y Celia Martínez, de las que he aprendido mucho, me han ayudado en todo lo posible y más, y porque su

profesionalidad y amistad hicieron que mis 3 años de becaria en el IMIDA pasaran volando.

A mis amigos y compañeros de piso que me hicieron pasar momentos inolvidables, Lucía, Carlos, Silvia, Jose, Conchi, María José, Susana, Sonia, Amparo, Toni, Lolo, Salud, Diego, Andrew y, especialmente a Claudia, Juanfran, y a Lola y Mari Carmen, las últimas supervivientes.

A David Moreno, el mejor amigo que alguien pueda tener, por estar siempre ahí.

A mis compañeros y jefes en Seminis, a Francisco Solvas por animarme repetidamente a darle fin a este trabajo; a Germán Anastasio por darme información sobre el cultivo del tomate y ayudarme con el inglés; a Branko Lovic, mi primer jefe en la empresa, por creer en mí, por todo lo que aprendí de su experiencia en patología y por su constante apoyo para que continuara escribiendo este trabajo; a François Bertrand por ofrecerme su ayuda y darme ánimos para seguir; a Leonardo Velasco por su interés y apoyo; y especialmente, a Julia Muñoz, una gran colega y amiga.

A mi familia por su paciencia y constante apoyo en todo lo que emprendo.

Comienza haciendo lo que es necesario, después lo que es posible y de repente estarás haciendo lo imposible.

S. Francisco de Asís

RESUMEN

El Virus del Mosaico del Pepino Dulce (PepMV) detectado en Europa en 1999, está causando importantes daños en las principales zonas productoras de tomate del Sureste Español. Se transmite mecánicamente de forma eficiente, lo que ha promovido su rápida expansión. Es por esto que, tras su aparición en la Región en el año 2000, se hizo preciso un método de diagnóstico rápido y eficaz. La técnica hibridación molecular ha sido puesta a punto para el seguimiento de la virosis en los cultivos de tomate de la Región.

El primer objetivo fue la obtención de una sonda de ARN específica para su detección. El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de virología del CSIC de la Estación Experimental La Mayora, en Málaga, bajo la dirección del Dr. M. A. Aranda. A partir del ARN de plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con un aislado de PepMV, conseguimos amplificar un fragmento del ADN viral de unos 600 nucleótidos, mediante la técnica Transcripción Inversa-PCR (RT-PCR) y usando cebadores específicos. Los cebadores fueron diseñados sobre la única secuencia parcial del PepMV, de 584 nucleótidos, publicada hasta el año 2001. Este fragmento fue ligado al plásmido pGEM-T y clonado en *Escherichia coli*. A partir del fragmento clonado se desarrolló la sonda de ARN mediante una digestión con la enzima de restricción ECO RI y posterior transcripción con la enzima *SP6 RNA polimerase*. El marcaje de la sonda para su detección radiográfica se realizó en la reacción de transcripción usando UTPs marcados con digoxigenina.

Una vez desarrollada la sonda, se puso a punto la técnica de hibridación molecular para el diagnóstico del virus y fue llevado a cabo un seguimiento de la enfermedad en cultivos de tomate de la Región. Este trabajo fue realizado en el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (IMIDA), en La Alberca (Murcia), bajo la dirección del Dr. J. L. Cenis Anadón. Durante las campañas de verano 2001 y otoño-invierno 2001/02, se prospectaron varios cultivos de tomate, al aire libre, bajo malla y bajo invernadero, en diferentes zonas costeras del término municipal de Mazarrón y Lorca con características productivas diferentes. Los seguimientos se realizaron cada dos semanas desde el comienzo del cultivo hasta que éste se dio por concluido, tomando muestras al azar en cada parcela, mediante la impresión de peciolo sobre una membrana de nylon positivamente cargada, *in situ*, para su análisis en laboratorio por el método de hibridación molecular. Se vio que en los cultivos de verano (2001), tanto al aire libre como bajo malla, la enfermedad no aparecía hasta los meses de septiembre y octubre, con una incidencia que no superó en la mayoría de las parcelas el 35%. En la campaña de otoño-invierno 2001/02, las primeras manifestaciones del virus se dieron en los meses de noviembre y diciembre, al principio del cultivo, con un 5-65% de plantas afectadas según parcelas. La enfermedad se extendió a lo largo del ciclo de cultivo rápidamente, hasta afectar a todo el invernadero en los meses de

abril y mayo. Se analizaron separadamente plantas injertadas y no injertadas, resultando que el virus aparecía entre 15 y 20 días antes en las injertadas, que además alcanzan el 100% de infección antes que las plantas sin injertar. También fueron analizadas diferentes especies de malas hierbas asociadas al cultivo, encontrándose el virus en *Amaranthus blitoides*, *Conyza bonariensis*, *Chenopodium album*, *Cyperus rotundus*, *Sisymbrium irio*, *Malva parviflora* y *Solanum nigrum*. Estas especies no están descritas en la bibliografía como hospedantes de PepMV, por lo que serían necesarios análisis con técnicas más sensibles para confirmar estos resultados.

ABSTRACT

Pepino mosaic virus was detected in Europe in 1999 and it is causing important damages in the tomato-growing areas of the southeastern Spain. It is efficiently mechanically transmitted, which has favored its rapid expansion. After its detection in Murcia in 2000, it was necessary to develop a method to evaluate the virus incidence in the tomato crops.

The first objective of this project was to obtain an RNA probe that was specific for the detection of this virus. It was carried out in the virology laboratory of the CSIC, 'Estación Experimental La Mayora', in Málaga, under the direction of Dr. M.A. Aranda. *Nicotiana benthamiana* plants were inoculated with a PepMV isolate from Murcia, and RNA was isolated from them. Using this RNA and specific primers, a cDNA containing about 600 nt was generated by RT-PCR. The primers were designed based on the unique PepMV partial sequence of 584 nt available in 2001. This cDNA was cloned in *Escherichia coli* using the plasmid pGEM-T as vector. An RNA probe was synthesized from the clone after it was digested with the restriction enzyme *ECO RI* and transcribed using the SP6 RNA polymerase. The probe was labeled using UTPs labeled with digoxigenin.

After obtaining the probe, the molecular hybridization technique was optimized for the diagnostic of PepMV and a study of the disease in several tomato crops in Murcia was carried out. This work was done at the IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario) in Murcia, under the direction of Dr. J.L. Cenis. During the summer cycle in 2001 and autumn-winter cycle in 2001/2002, several tomato crops grown in open field and under net and plastic greenhouses, were prospected in different coastal areas of Mazarrón and Lorca with different production characteristics. Samplings were done every 2 weeks from the beginning to the end of the crop cycle. The samples were randomly collected and the petioles were cut and impressed in situ in a nylon membrane positively charged. Then, samples were analyzed by molecular hybridization in the lab. In the summer plantings, the disease appeared in September and October, with an incidence lower than 35% in most of the crops. In the autumn plantings, the virus appeared in November and December, at the beginning of the cultures, with a 5-65% of affected plants. The disease expansion was very fast and a 100% level of infection was found in April and May. Grafted and no grafted plants were analyzed separately and it was observed that PepMV appeared 15 to 20 days before in the grafted plants which reached a 100% level of infection faster than no grafted plants. Some weeds species associated to these crops were also analyzed and the virus was found in *Amaranthus blitoides*, *Conyza bonariensis*, *Chenopodium album*, *Cyperus rotundus*, *Sisymbrium irio*, *Malva parviflora* y *Solanum nigrum*. But most of these species are not described as PepMV hosts in the literature, so these results must be confirmed by other more sensitive analysis.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	1
1.1. EL CULTIVO DEL TOMATE: IMPORTANCIA ECONÓMICA	2
1.2. EL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE	4
1.2.1. Origen y distribución geográfica	4
1.2.2. Situación taxonómica, morfología y organización del genoma	5
1.2.2.1. Organización genómica de PepMV	7
1.2.2.2. Estructura genética de las poblaciones de PepMV	9
1.2.3. Forma de transmisión	11
1.2.4. Hospedantes y sintomatología	12
1.2.5. Estrategias de control	17
1.2.5.1. Medidas preventivas	17
1.2.5.2. Resistencia genética al PepMV	19
1.3. TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE VIRUS	20
1.3.1. Técnicas clásicas	20
1.3.1.1. Observación de síntomas en campo	20
1.3.1.2. Estudio de las inclusiones celulares	21
1.3.1.3. Observación de partículas virales al microscopio electrónico	22
1.3.1.4. Ensayos de infectividad en diversos huéspedes.	23
1.3.2. Técnicas serológicas	26
1.3.2.1. Técnicas de aglutinación	26
1.3.2.2. Técnicas de neutralización de la infectividad	27
1.3.2.3. Técnicas de precipitación	27
1.3.2.4. Técnicas inmunolectroforéticas	27
1.3.2.5. Técnicas que utilizan conjugados y fases sólidas	28
1.3.2.6. Técnicas mixtas o conjuntas	29
1.3.3. Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales	29
1.3.3.1. Análisis de ARN bicatenario	30
1.3.3.2. Detección mediante hibridaciones moleculares.	31
1.3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
2. OBJETIVOS	34
3. METODOLOGÍA	37
3.1. SÍNTESIS DE UNA SONDA DE ARN PARA LA DETECCIÓN DE PepMV	38

3.1.1.	Multiplicación del virus en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> mediante inoculación mecánica	38
3.1.1.1.	Aislados de PepMV	38
3.1.1.2.	Preparación del inóculo	38
3.1.1.3.	Inoculación de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
3.1.2.	Extracción de ARN de las plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas	39
3.1.2.1.	Material vegetal	39
3.1.2.2.	Extracción de ARN	39
3.1.2.3.	Comprobación y cuantificación del ARN aislado mediante electroforesis en gel de agarosa	40
3.1.3.	Obtención de ADN complementario al ARN viral mediante RT-PCR	41
3.1.3.1.	Fragmento de ARN viral objetivo	41
3.1.3.2.	Diseño de cebadores específicos	42
3.1.3.3.	Transcripción Inversa-PCR (RT-PCR)	43
3.1.3.4.	Comprobación de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.	45
3.1.3.5.	Purificación de ADN de un gel de agarosa	46
3.1.4.	Clonación del ADNc	47
3.1.4.1.	Ligación del ADNc a un plásmido	47
3.1.4.2.	Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> por electroporación	47
3.1.4.3.	Selección de células transformantes	48
3.1.5.	Preparación de plásmidos: midi-preps	49
3.1.5.1.	Cultivo para midi-prep	49
3.1.5.2.	Midi-preps	49
3.1.5.3.	Cuantificación en gel de agarosa	51
3.1.6.	Liberación del ADNc inserto del plásmido	52
3.1.6.1.	Digestión de la midi-prep	52
3.1.6.2.	Comprobación de la digestión: electroforesis en gel de agarosa	52
3.1.7.	Determinación de la orientación del ADNc en el plásmido mediante PCR	52
3.1.7.1.	PCR del ADN plasmídico procedente de la midi-prep	52
3.1.7.2.	Comprobación de la PCR: electroforesis en gel de agarosa	54
3.1.8.	Linearización del ADN plasmídico	55
3.1.8.1.	Digestión de la midi-prep	55
3.1.8.2.	Comprobación de la digestión: electroforesis en gel de agarosa	56
3.1.8.3.	Limpieza y precipitación del ADN linearizado	56
3.1.8.3.1.	Extracción fenólica	56

3.1.8.3.2.	Extracción con cloroformo	56
3.1.8.3.3.	Precipitación etanólica	56
3.1.8.4.	Cuantificación del ADN linearizado: electroforesis en gel de agarosa	56
3.1.9.	Conservación de colonias transformantes en glicerol	57
3.1.10.	Síntesis y marcaje de la sonda de ARN de PepMV	58
3.1.10.1.	Transcripción fría o in vitro	58
3.1.10.2.	Comprobación de la transcripción fría o in vitro	59
3.1.10.3.	Transcripción con UTP marcados con digoxigenina	59
3.1.10.4.	Precipitación de la sonda marcada	60
3.1.11.	Cuantificación de la sonda	61
3.1.11.1.	Preparación de una membrana con diluciones de la sonda	61
3.1.11.2.	Detección quimio-luminescente	62
3.2.	HIBRIDACIÓN MOLECULAR	63
3.2.1.	Preparación de las muestras	63
3.2.1.1.	Membrana de condiciones	63
3.2.1.2.	Preparación de una membrana de muestras	64
3.2.2.	Prehibridación de las membranas	64
3.2.3.	Hibridación de las membranas con la sonda de PepMV	65
3.2.4.	Lavados post-hibridación	65
3.2.5.	Detección quimioluminescente	65
3.3.	SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DEL PepMV EN CULTIVOS DE TOMATE DE LA REGIÓN	65
3.3.1.	Parcelas	66
3.3.1.1.	Ciclo de verano 2001	66
3.3.1.2.	Ciclo de otoño-invierno 2001-2002	66
3.3.2.	Muestreos	67
3.3.2.1.	Ciclo de verano 2001	67
3.3.2.2.	Ciclo de otoño-invierno 2001-2002	68
3.3.3.	Preparación de las muestras	68
3.3.4.	Análisis de las muestras	68
4.	RESULTADOS	69
4.1.	SÍNTESIS DE UNA SONDA DE ARN PARA EL DIAGNÓSTICO DE PepMV	70
4.2.	HIBRIDACIÓN MOLECULAR	71
4.3.	SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE PepMV EN CULTIVOS DE TOMATE DE LA REGIÓN	71

4.3.1.	Ciclo de verano 2001	71
4.3.1.1.	Parcelas de seguimiento	71
4.3.1.2.	Prospecciones	74
4.3.1.3.	Análisis de las malas hierbas asociadas a los cultivos	76
4.3.2.	Ciclo de otoño-invierno 2001-2002	78
4.3.2.1.	Invernadero 1	78
4.3.2.2.	Invernadero 2	78
4.3.2.3.	Invernadero 3	78
4.3.2.4.	Invernaderos experimentales 4 y 5	79
4.3.2.5.	Invernadero 6	81
4.3.2.6.	Invernadero 7	81
4.3.2.7.	Invernadero 8	82
4.3.2.8.	Invernadero 9	82
4.3.2.9.	Análisis de las malas hierbas asociadas a los cultivos	85
5.	CONCLUSIONES	86
6.	BIBLIOGRAFÍA	87
7.	ANEJOS	94
	Anejo 1	95
	Anejo 2	96

1. ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1. EL CULTIVO DEL TOMATE: IMPORTANCIA ECONÓMICA

El tomate es el cultivo hortícola con mayor producción a nivel mundial, con 126.246.708 toneladas (<http://faostat.fao.org>, 2007). A ello contribuyen casi todos los países de clima tropical y templado, siendo sólo diez de éstos los que acumulan más del 65% de la producción mundial (tabla 1.1). Según datos del año 2007, China es el principal país productor de tomates del mundo alcanzando las 33.645.000 toneladas, ocupando España el octavo lugar con una producción de 3.615.000 toneladas, lo que supone el 2,86% del total mundial.

País	Producción tomates (t)
China	33.645.000
Estados Unidos	11.500.000
Turquía	9.919.673
India	8.585.800
Egipto	7.550.000
Italia	6.025.613
Irán	5.000.000
España	3.615.000
Brasil	3.364.438
México	2.900.000

Tabla 1.1. Principales países productores de tomate. Fuente: <http://faostat.fao.org>, 2007.

En la UE la producción alcanza las 157.640.070 toneladas, siendo España el segundo país productor tras Italia.

La producción ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, debido principalmente, a la mejora en las técnicas de cultivo (paso del cultivo al aire libre a invernadero), concentración de la producción en las zonas más adecuadas para el cultivo y al empleo de variedades mejoradas con las que se consigue un mayor rendimiento.

Como consecuencia de los aumentos en el rendimiento del cultivo, ha habido un incremento en la cantidad final de tomate en los distintos mercados productores. Para poder absorber estos volúmenes se han producido una serie de cambios en la demanda final del producto: aumento de la diversidad (aspecto exterior e interior), desarrollo de nuevas variedades (tipos ramillete y tipos cereza o “Cherry”), mejora y variedad en el producto procesado (salsas, jugos, purés, pastas, concentrado, tomate al natural, pelado, triturado, en polvo, ...), apertura de nuevos mercados de exportación (Este de Europa, Rusia, Estados Unidos, Canadá, etc.)

Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)				Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
	Secano	Regadío		Total	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
GALICIA	45	376	880	1.301	–	25.000	62.557	64.450
P. DE ASTURIAS	20	24	26	70	14.000	25.000	70.000	2.700
CANTABRIA	79	–	15	94	16.000	–	80.000	2.464
PAÍS VASCO	80	140	70	290	12.413	26.251	49.214	8.113
NAVARRA	–	1.776	48	1.824	–	61.272	94.110	113.336
LA RIOJA	–	218	15	233	–	60.000	84.000	14.340
ARAGÓN	–	1.776	2	1.778	–	69.977	170.000	124.619
CATALUÑA	75	1.770	205	2.050	6.413	37.954	80.825	84.229
BALEARES	30	121	79	230	8.500	45.500	60.000	10.501
CASTILLA Y LEÓN	6	278	52	336	8.250	36.771	67.896	13.802
MADRID	–	43	–	43	–	45.000	–	1.935
CASTILLA-LA MANCHA	8	2.260	60	2.328	5.063	54.627	54.000	126.737
C. VALENCIANA	86	585	761	1.432	16.343	46.655	104.701	108.377
R. DE MURCIA	–	799	3.440	4.239	–	52.000	82.000	323.628
EXTREMADURA	–	19.600	1	19.601	–	62.735	220.000	1.229.826
ANDALUCÍA	77	6.160	12.126	18.363	8.674	53.969	85.888	1.374.595
CANARIAS	12	98	2.368	2.478	40.000	63.820	80.306	196.900
ESPAÑA	518	36.024	20.148	56.690	11.422	58.442	83.846	3.800.552

Tabla 1.2. Análisis por Comunidades Autónomas de superficie, rendimiento y producción de tomate, 2006. Fuente: <http://www.mapa.es>, Anuario de Estadística Agroalimentaria, 2007.

A nivel nacional, el tomate es uno de los principales cultivos hortícolas, ya que representa el 43% de la producción total (MAPA, 2007). El 55% de la producción de

tomate es destinado para consumo en fresco y las principales zonas productoras son Almería, Murcia y Alicante. El 45% restante es destinado para la transformación y su producción se concentra en Extremadura y en las Islas Canarias. En la tabla 1.2 se recogen datos del año 2006 relativos a superficie, rendimiento y producción por Comunidades autónomas (MAPA, 2007).

Para adaptarse a las exigencias de los países importadores, se ha extendido al máximo el calendario de producción. Disponemos de 12 meses de tomate al año, lo que satisface las necesidades nacionales y hace que España sea uno de los países de mayor exportación del producto, tanto en fresco como procesado.

1.2. EL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE

1.2.1. Origen y distribución geográfica

El virus del mosaico del pepino dulce fue encontrado por primera vez en 1974 en el valle del Cañete en Perú y descrito por Jones et al. (1980), afectando a plantas de pepino dulce (*Solanum muricatum*).

A principios de 1999 se cita su presencia en algunos invernaderos de tomate en Holanda, mostrando una identidad de secuencia con el aislado original de Perú del 93% para la región del genoma que codifica para la polimerasa viral (Van der Vlugt et al., 2000). Ese mismo año se detectó en otros invernaderos de tomate del sur del Reino Unido, Alemania y Francia (Soler et al, 2000).

En España fue encontrado a principios del 2000 en varios invernaderos de tomate de Alicante, Murcia, Almería y Canarias (Jordá et al., 2001). En febrero y marzo de ese año se cita su presencia en invernaderos de tomate del sureste de Italia, en Sardinia (Roggero et al., 2001). A finales del 2000 se detectó en Canadá y Estados Unidos, afectando a invernaderos comerciales de tomate en el sureste de Ontario durante el invierno del 2000 (French et al., 2001).

Posteriormente, según datos de la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), fue detectado en Finlandia, Noruega, Polonia y Suecia en 2001, Bulgaria, Hungría, Eslovaquia y Suiza en 2004, y Austria en 2007. En Norte América está presente en varios estados de USA (Arizona, California, Oklahoma,

Texas). Y en Sudamérica está presente en Chile y Perú. También se ha citado su presencia en China (Zhang et al., 2003). En la figura 1.1 se muestra un mapa con la distribución geográfica del virus a nivel mundial en el año 2005.

Actualmente, en la Región de Murcia se encuentra presente en las principales zonas productoras de tomate: Mazarrón, Lorca y Águilas, produciendo graves daños en los cultivos de tomate protegidos y al aire libre.

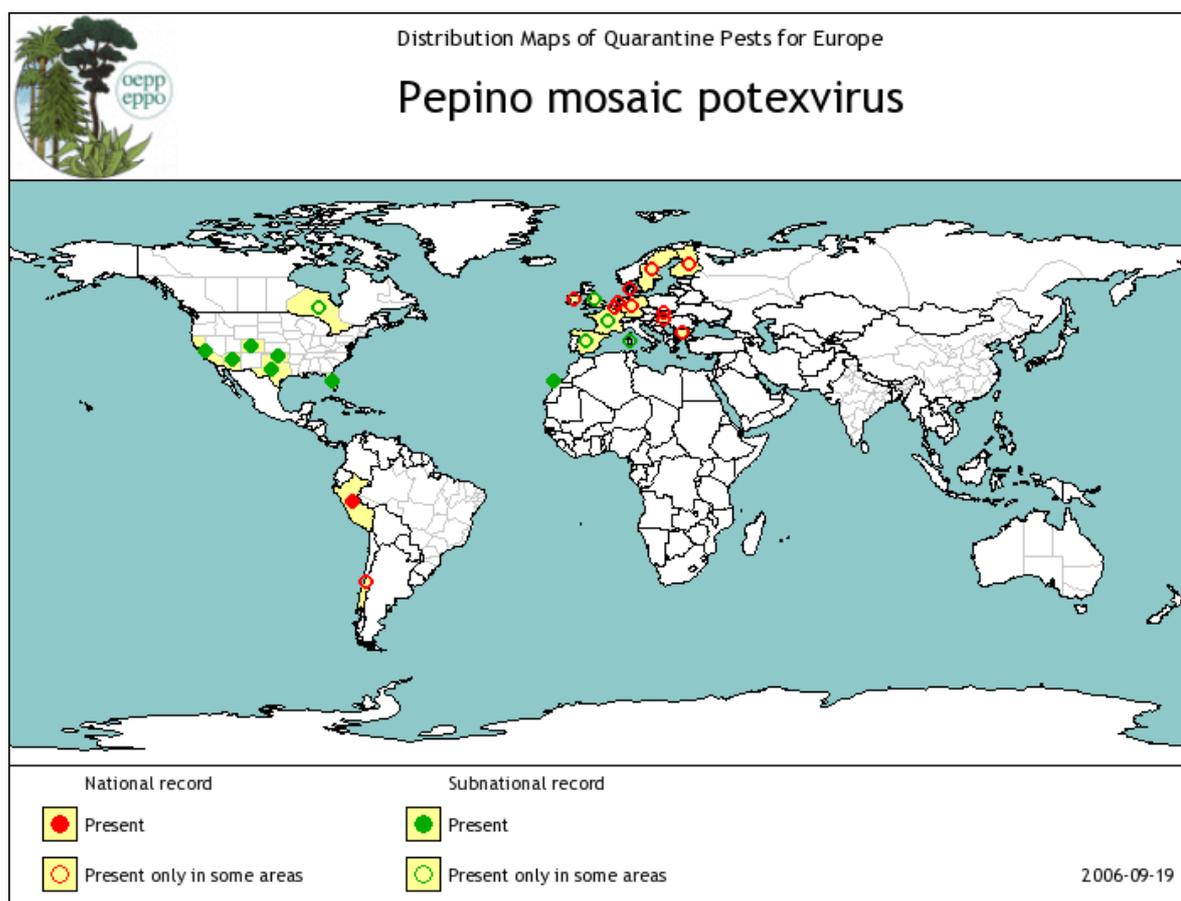


Figura 1.1. Distribución geográfica del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV).

Fuente: EPPO, 2005.

1.2.2. Situación taxonómica, morfología y organización del genoma

Jones et al. (1980) encontraron en las plantas de pepino dulce afectadas por PepMV partículas filamentosas de una longitud de 508 nm y 11 nm de diámetro con un canal interior de 3,4 nm de diámetro, y vieron que estaba relacionado con otros virus del género potexvirus, narcissus mosaic y cactus X. Fue considerado, tanto por la morfología de partícula como por su modo de transmisión, como miembro del género *Potexvirus*.

El género *Potexvirus* comprende al menos 30 especies virales, de las cuales el Potato Virus X (PVX) es el miembro tipo. Se caracterizan por presentar partículas filamentosas, flexuosas, con una longitud de 470 a 580 nm, un diámetro de unos 14 nm y un canal central de unos 3 nm (figura 1.2). Cada una de estas partículas, de naturaleza helicoidal, consisten en 1000 a 1500 subunidades de una única clase de proteína de la cápsida de peso molecular comprendido entre 21 a 29 kDa que envuelven una única cadena positiva de ARN genómico de un tamaño que oscila entre 5845 y 7057 nucleótidos (nt). (Abouhaidar et al., 1999).

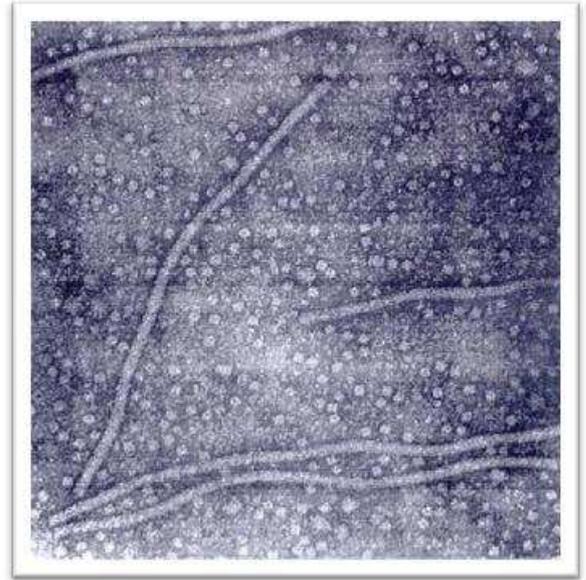


Figura 1.2. Partículas virales características del género *Potexvirus*. Fuente: ICTVdB.

El genoma monopartito de los *Potexvirus* consiste en una única cadena positiva de ARN genómico con una estructura metilada o CAP en el extremo 5' (m^7GpppG) y poliadenilado en el extremo 3' (Abouhaidar et al., 1999).

En general, los *Potexvirus* presentan 5 marcos de lectura abierta (ORF) o genes en su estructura genómica. La ORF 1, es la más grande, y codifica una proteína que contiene tres dominios que guardan homología con secuencias conservadas de metiltransferasa, helicasas con capacidad de unión a nucleótidos y ARN polimerasas dependientes de ARN. Las ORFs 2, 3 y 4 se encuentran débilmente solapadas y se conocen como bloque triple de genes (*triple gene block*). Los productos proteicos de estas ORFs son necesarios para la infectividad del ARN viral en planta, pero no indispensables en la infección de protoplastos, y se cree que están involucrados en el movimiento célula a célula de los *Potexvirus*. La ORF 5 codifica para la proteína de la cápsida. Cabe destacar que el Narcissus Mosaic Virus (NMV) presenta 6 ORF. La sexta ORF, no presente en el genoma del PVX codifica para una proteína de 10 kDa de función no conocida. (Soler et al., 2000a).

El genoma de los *Potexvirus* se cree que es funcionalmente monocistrónico y sólo la ORF 1 puede ser traducida directamente del ARN genómico. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que la proteína de la cápsida del PVX puede ser expresada in vivo a partir de un mensajero dicistrónico. En plantas infectadas por *Potexvirus* pueden producirse tres fragmentos subgenómicos de longitud 900, 1400 y 2100 pb respectivamente. Estos fragmentos subgenómicos presentan estructura CAP y cadena poliadenilada al igual que el ARN genómico. Cada uno de los extremos 5' de estos ARN subgenómicos corresponden con regiones internas genómicas y los extremos 3' son coterminales con el ARN genómico. Resultados obtenidos in vitro sugieren que la proteína de 30 kDa (ORF 2) del PVX se expresa como único producto del fragmento subgenómico de 2100 pb, las de 12 y 8 kDa (ORF 3 y 4) del fragmento de 1400 pb que parece ser funcionalmente dicistrónico. La proteína de la cápsida se produce a partir del fragmento de 900 pb. En el caso del PepMV no se conoce el sistema de expresión genómica pero probablemente sea similar al del resto de *Potexvirus*. (Soler et al., 2000a).

Van der Vlugt et al. (2000) secuenciaron parcialmente la región que codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN (ORF 1) de un aislado original del virus en plantas de pepino dulce (GeneBank, nº accesión AJ270991) y de un aislado holandés de tomate (GeneBank, nº accesión AJ270992) encontrando un 93% de homología entre ellos.

1.2.2.1. Organización genómica de PepMV

La estructura genómica del virus del mosaico del pepino dulce fue reportada por primera vez en 2002, por Aguilar et al., que determinaron la secuencia nucleotídica completa de un aislado español del virus (PepMV-Sp13) procedente de la Región de Murcia (GeneBank, nº accesión AF484251).

Estudiando la estructura del extremo 3' del ARN genómico, concluyeron que el PepMV contenía una cola poliadenilada. La secuencia completa de dicho aislado comprende 6410 nucleótidos (nt), excluyendo la cola poli(A) en el extremo 3', y contiene 5 marcos de lectura abierta (ORFs) flanqueados por dos regiones no traducidas (UTRs) (figura 1.3).

La región 5'UTR consiste en 86 nt hasta el primer codón AUG. El extremo 5' comienza con la secuencia 5'-GAAAACAAAA-3', la secuencia del promotor putativo encontrado en todos los *Potexvirus*. La región 3'UTR consiste en 63 nucleótidos aguas debajo del codón de terminación de la ORF 5, seguido de la cola poli(A).

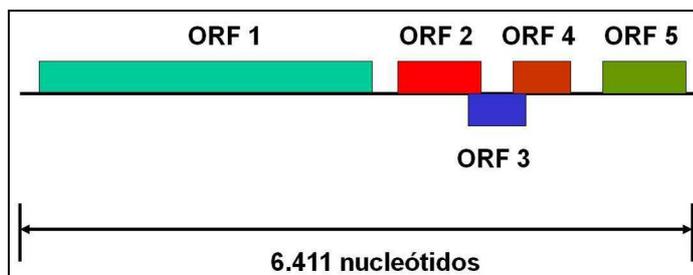


Figura 1.3. Organización genómica del PepMV.

La ORF 1 (nt 87-4406) codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de 1439 aminoácidos de longitud (164 kDa). La RdRp contiene un motivo metiltransferasa, un motivo con capacidad de unión a nucleótidos o *NTP-binding* (motivo GSK), y un motivo polimerasa (motivo GDD). Las ORFs 2, 3 y 4 se solapan parcialmente y están en marcos de lectura diferentes. Su organización se asemeja a la que caracteriza a los miembros de los *Potexvirus* formando el triple bloque de genes (TGB). La ORF 2 (nt 4432-5136) codifica un péptido de 234 aminoácidos (26kDa) que contiene un motivo *NTP-binding*. La ORF 3 (nt 5117-5488) codifica un péptido de 123 aminoácidos (14kDa), y la ORF 4 (nt 5340-5594) codifica un péptido de 84 aminoácidos (9 kDa). Finalmente, la ORF 5 (nt 5633-6346) codifica la proteína de la cápsida de PepMV, de 237 aminoácidos (25 kDa).

Así, el genoma del aislado PepMV-Sp13 es similar a la de otros miembros de los *Potexvirus*. De hecho, la secuencia obtenida de dicho aislado mostraba una homología significativa con otros *Potexvirus*. La mayor homología se correspondía a Narcissus mosaic virus y Cymbidium mosaic virus. La conservación de diferentes regiones genómicas sigue un patrón similar en varias combinaciones PepMV/*Potexvirus*. Las ORFs 5 y 1 parecen ser las más conservadas, mientras que las ORFs 2, 3 y 4 (TGB) parecen ser las menos conservadas.

1.2.2.2. Estructura genética de las poblaciones de PepMV

Mumford y Metcalfe (2001) secuenciaron una porción de 3599 nt del ARN genómico de un aislado inglés del virus procedente de plantas de tomate (GeneBank, nº accesión AF340024). La región incluía el extremo 3' de la ARN polimerasa, el triple bloque de genes, la proteína de la cápsida y la región 3'UTR. Comparando este aislado con otros aislados europeos de tomate y uno de pepino dulce procedente de Perú, encontraron un 99% de homología entre los europeos de tomate y entre un 96-97% con el aislado peruano de pepino.

Aguilar et al. (2002) estudiaron la homología del aislado español PepMV-Sp13 con el inglés, parcialmente secuenciado por Mumford y Metcalfe (2001), y vieron que difería sólo en 27 nucleótidos. A nivel de aminoácidos, la similitud entre ambos aislados era muy alta, encontrando 4 sustituciones de aminoácidos en TGB3, 5 en TGB1 y 2 en RdRp. TGB2 y los genes de la proteína de la cápsida fueron idénticos. Secuenciaron los genes de la proteína de la cápsida de otros aislados europeos procedentes de tomate y sus secuencias fueron 99-100% idénticas entre ellas y también a PepMV-Sp13 y al aislado inglés. Estos datos sugirieron que las poblaciones europeas de PepMV eran genéticamente homogéneas. La comparación de los aislados europeos, incluyendo el aislado español, con un aislado peruano procedente de pepino dulce resultó en un 96% de homología.

La comparación entre diferentes aislados de tomate procedentes de varias regiones del mundo (Alemania, Holanda, Reino Unido, Arizona y Texas en USA, Austria, Murcia e Islas Canarias en España, Bretaña en Francia, Bélgica, Ucrania y Canadá), y el aislado original de Perú procedente de pepino dulce, también fue estudiada por Verhoeven et al. (2003). Los resultados mostraron que los aislados de tomate diferían claramente del aislado de pepino dulce, tanto en sintomatología como en secuencia nucleotídica, mientras que las diferencias de los aislados de tomate entre sí eran menores. Esto les llevó a concluir que los aislados de PepMV procedentes de plantas de tomate deberían ser considerados como una raza diferente. Además, la alta similitud entre ellos sugirió la existencia de una fuente común de infección para la epidemia reciente.

Generalmente, los aislados de PepMV que han sido identificados en los cultivos europeos de tomate tienen una similitud bastante alta (un 99% de identidad nucleotídica), y difieren del aislado peruano (95% identidad nucleotídica). En consecuencia, estos aislados fueron agrupados en el llamado “genotipo tomate”, mientras que el aislado peruano representa el “genotipo peruano” (LP). Para distinguir el genotipo tomate original de los nuevos genotipos de PepMV identificados en tomate, se le suele denominar “genotipo europeo” (EU). (Hanssen et al., 2007).

Además, recientemente se han identificado tres genotipos de PepMV significativamente diferentes, dos proceden de plantas de tomate infectadas de USA, y son los “genotipo US1” y “genotipo US2”, y otro procedente de un aislado de semillas de tomate infectadas en Chile, llamado “genotipo CH2”. (Hanssen et al., 2007).

Los genotipos US1 y US2 comparten un 86% de similitud entre sus secuencias nucleotídicas y solamente del 72 al 82% con los aislados europeos de tomate (EU). Los aislados del genotipo CH2 comparten un 91% de identidad nucleotídica con los del US2. (Ling y Scott, 2007).

En Europa se han encontrado los genotipos EU, LP y US2, siendo el EU el más frecuente. En Bélgica, Hansenn et al. (2007) encontraron además el genotipo CH2, ocurriendo con más frecuencia en infecciones mixtas con el genotipo EU. No se ha encontrado una correlación entre la expresión de síntomas de PepMV y los diferentes genotipos, pero Hanssen et al. (2007) observaron una mayor severidad de síntomas en plantas de tomate con infecciones mixtas que en plantas infectadas con un solo genotipo.

En España prevalece el genotipo o raza europea de tomate (más de un 80% de la población de PepMV). Se encontraron aislados de este genotipo en Murcia antes de la primera epidemia en 2000 y también en Canarias. Se detectaron otros dos genotipos en Murcia en el año 2004, el genotipo peruano o LP y el US2. La detección del genotipo LP en Canarias en 2000 sugiere una introducción independiente del virus en las Islas Canarias y en la península española. Los

aislados de los genotipos LP y US2 siempre se encontraron en infecciones mixtas con el genotipo EU. (Pagán et al., 2006).

1.2.3. Forma de transmisión

El PepMV se trasmite mecánicamente con una alta eficiencia, extendiéndose en campo más rápidamente que el virus del mosaico del tomate (ToMV), e incluso que el virus X de la patata (PVX). Jones et al. (1980) comprobaron que la efectividad en la transmisión mecánica era menor cuando la planta fuente utilizada era pepino dulce que cuando era *Nicotiana glutinosa*. Se transmite al tocar las plantas con las manos contaminadas, durante el empleo de utensilios infestados y hasta con la misma ropa (Soler et al., 2000a).

Lacasa et al. (2001) estudiaron la diseminación del virus en las labores de desbroto y entutorado, poniendo de manifiesto la gran facilidad con que se transmite el PepMV en los cultivos durante la manipulación de plantas, así como por el contacto directo entre ellas. El contacto entre plantas sanas e infectadas durante las labores de cultivo es suficiente para transmitir el virus de una planta sana a seis plantas de la misma fila de cultivo (Córdoba-Sellés et al., 2007). Durante un tiempo permanece el virus activo en los restos de plantas contaminadas, siendo ésta una vía de nuevas contaminaciones (Lacasa et al., 2003).

La transmisión de PepMV por semilla se reportó por primera vez en 2007 por Córdoba-Sellés et al., detectando el virus en al menos el 25% de las semillas testadas y un 2% en la progenie procedente del mismo lote de semillas. La desinfección de las semillas infectadas mediante tratamientos a altas temperaturas no resulta totalmente eficaz afectando en gran medida a la germinación, sin embargo la inmersión de las semillas en una solución al 10% de trisodio fosfato durante 3 horas es suficiente para eliminar el virus sin una grave incidencia en la germinación (Córdoba-Sellés et al., 2007).

No se tiene constancia de la transmisión de este virus por insectos que habitualmente transmiten otras virosis en tomate. Se ha puesto de manifiesto la implicación de los abejorros (*Bombus terrestris* y *B. canariensis*), usados como polinizadores, en la dispersión del virus por acción mecánica en los cultivos de

invernadero, al dañar las flores o transportando polen infectado (Lacasa et al., 2003; Shipp et al., 2008).

El material vegetal se presenta, en principio, como la principal vía de dispersión en la virosis a larga distancia para cultivos como el tomate. Las plantas procedentes de semilleros contaminados constituirían la fuente inmediata de diseminación en los cultivos (Lacasa et al., 2001).

1.2.4. Hospedantes y sintomatología

En Perú, donde la virosis fue encontrada en 1974 afectando al pepino dulce (*Solanum muricatum*) como único hospedante natural (Jones et al., 1980), se encontraron posteriormente infecciones naturales en especies silvestres de *Lycopersicon* (*L. chilense*, *L. chmielewskii*, *L. parviflorum* y *L. peruvianum*) así como en cultivos de tomate (*L. esculentum*) y pepino dulce (Soler et al., 2002).

Dentro del rango de hospedantes determinado en inoculaciones en laboratorio, se incluyen bastantes especies de solanáceas entre las que se encuentran el tomate y las silvestres relacionadas (*L. esculentum* var. *cerasiforme*, *L. chesmanii*, *L. parviflorum*, *L. pennelli* y *L. pimpinellifolium*). *L. chilense* y *L. peruvianum* han mostrado síntomas dependiendo del origen del material vegetal. Se conocen 37 especies hospedantes del PepMV pertenecientes a la familia *Solanaceae*, afectando a géneros tan diversos como *Capsicum*, *Datura*, *Lycopersicon*, *Nicandra*, *Nicotiana*, *Physalis* y *Solanum*. También son hospedantes *Cucumis sativus* de la familia *Cucurbitaceae* y *Tetragonia expansa* de la familia *Tetragoniaceae*. (Soler et al., 2000a).

Las plantas de berenjena (*Solanum melongena*) y de patata (*S. tuberosum*) también resultaron infectadas sistémicamente al ser inoculadas con un aislado de PepMV del Reino Unido, aunque no todos los cultivares de patata parecen ser susceptibles a los aislados europeos. Se ha reportado que el pimiento dulce (*Capsicum annuum*) no es hospedante del virus (Spence et al., 2006).

En España se han encontrado otros huéspedes alternativos al tomate, que pueden actuar como reservorio del virus: *Bassia scoparia*, *Calystegia sepium*,

Chenopodium murale, *Convolvulus althaeoides*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza albida*, *Coronopus* sp., *Diplotaxis eruroides*, *Echium creticum*, *E. humile*, *Heliotropium europaeum*, *Moricandia arvensis*, *Onopordum* sp., *Piptatherum multiflorum*, *Plantago afra*, *Rumex* sp., *Sisymbrium irio*, *Sonchus tenerrimus* y *Taraxacum vulgare* (Córdoba et al., 2004).

El virus del mosaico del pepino manifiesta una amplia variedad de síntomas dependiendo en gran medida de las condiciones ambientales (Jordá et al., 2000), de la especie considerada e incluso de la variedad dentro de la misma especie.

En Perú, Jones et al. (1980) describen un mosaico amarillo en hojas jóvenes de pepino dulce y un ligero mosaico o infección asintomática en varias especies silvestres de patata, así como síntomas sistémicos severos de necrosis en otros cultivos de esta especie. Mientras en *Datura* spp. se observan mosaicos severos y manchas necróticas que pueden afectar a la totalidad de la planta, en *Lycopersicon* spp. se produce una infección sistémica asintomática o con síntomas débiles, como también ocurre en especies del género *Capsicum*, *Physalis* y varias de *Solanum*. En otros casos como en *Cucumis sativus* y *Tetragonia expansa*, de familias botánicas diferentes, el virus solo consigue infectar las hojas inoculadas sin producir síntoma alguno de la enfermedad. (Soler et al., 2000a).

El síntoma más común en las plantas de tomate afectadas en Holanda e Inglaterra es la aparición de mosaicos amarillentos en las hojas (Soler et al., 2000a). Según la EPPO (2008), en los cultivos de tomate en Holanda, las plantas afectadas muestran punteados amarillentos en hojas (figura 1.4), suave clorosis internervial, pequeñas malformaciones del limbo foliar en algunos casos, y los frutos muestran a veces decoloraciones. Solo un 5% de los agricultores reportaron pérdidas de menos del 5%. En Inglaterra, los síntomas son más severos mostrando las plantas afectadas deformación de hojas, abullonados, clorosis y reducción del crecimiento, extendiéndose la enfermedad rápidamente en campo y causando pérdidas importantes.



Figura 1.4. Punteados cloróticos, y mosaicos en hojas de plantas de tomate afectadas por PepMV.

Fuente: Seminis Vegetable Seeds.

En el sureste español, las plantas infectadas con PepMV muestran síntomas solamente de otoño a primavera. Los síntomas pueden desaparecer o atenuarse cuando las temperaturas empiezan a ser cálidas al final de la primavera, lo que sugiere que la expresión de los síntomas depende extremadamente de la temperatura y las condiciones de luz (Jordá et al, 2000; Pagán et al., 2006). La infección está asociada a una amplia variedad de síntomas foliares de diferente intensidad, incluyendo ligeros y fuertes mosaicos, amarillos y punteaduras cloróticas en las hojas (figura 1.4), distorsión de hojas, apuntamiento de folíolos, abullonado del limbo foliar, fuerte rizado internervial y estrías longitudinales de color verde más claro en tallos, peciolo, pedúnculo y sépalos de frutos (Jordá et al., 2000; Soler et al., 2000a; Pagán et al., 2006).

El síntoma más frecuente y característico de la enfermedad causada por el PepMV en el cultivo del tomate en el sureste español es el “jaspeado” o “manchado” del fruto (figura 1.5). Los frutos afectados manifiestan decoloraciones como resultado de una distribución irregular del licopeno, dando lugar a un tomate de

coloración rojo-naranja de inferior calidad visual y no comercializable (Soler et al., 2000a; Hansen et al., 2007).



Figura 1.5. Jaspeado en fruto de tomate afectado por PepMV. Fuente: Lacasa et al., 2000.

En las plantaciones de la Región de Murcia, el abullonado (figura 1.6) y un tenue mosaico amarillo en el limbo de las hojas jóvenes son los síntomas más extendidos, presentándose a lo largo de todo el año.

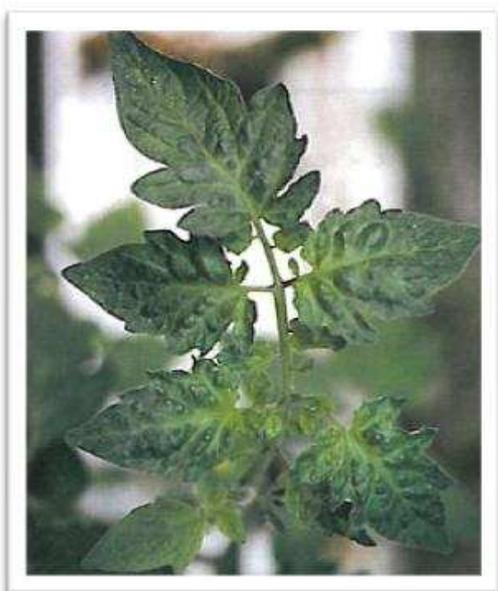


Figura 1.6. Abullonado del limbo foliar. Fuente: Lacasa et al., 2001.

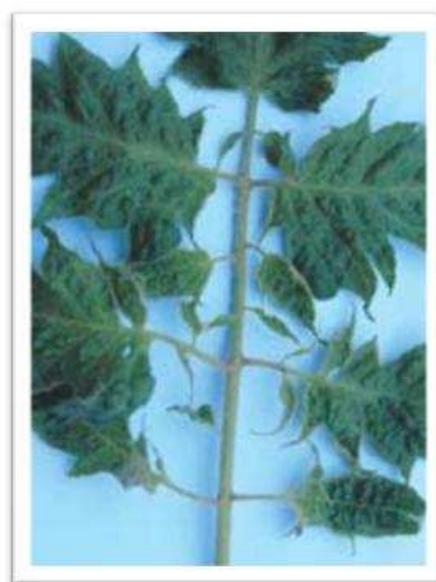


Figura 1.7. Filimorfismo acusado en hojas de tomate. Fuente: Lacasa y Jordá, 2002.

En plantas jóvenes las afecciones más agresivas comportan, además, el apuntado de los folíolos, que pueden llegar al filimorfismo (figura 1.7). Esta última manifestación puede ser confundida con las alteraciones producidas por el virus del mosaico del pepino (Cucumber Mosaic Virus, CMV) o por la aplicación de dosis

elevadas de hormona. El desarrollo de las plantas jóvenes se reduce, aunque luego se recuperen y se diluyan los síntomas en las plantas adultas, pudiendo llegar a perder uno o varios frutos en los primeros racimos. En primavera y en plantas desarrolladas, se pueden presentar intensos mosaicos amarillos en las hojas maduras, con distribución irregular y tonalidades doradas. En ocasiones, los amarillos son menos intensos y se distribuyen en las zonas intermedias o formando bandas paralelas a las nervaduras, que toman tonalidades plateadas. En estas plantas aparecen bandas longitudinales claras en el tallo, en los peciolo y en los sépalos (figura 1.8). En los periodos frescos o que siguen a días con falta de luminosidad, se presentan “jaspeados” en los frutos, siendo éste el síntoma con mayores repercusiones comerciales. En los frutos de los primeros racimos es frecuente encontrar amplias zonas de color verde-marrón o rojo menos intenso, que contrasta con las partes correctamente coloreadas. Con el tiempo, las zonas con estos síntomas llegan a alcanzar el color rojo intenso, hasta homogeneizarse la coloración en toda la superficie del fruto. (Lacasa et al., 2003).

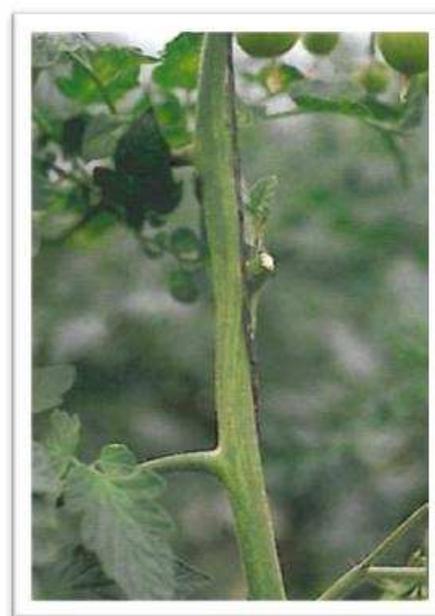


Figura 1.8. Estría longitudinal verde pálido en el tallo. Fuente: Lacasa et al., 2000.

El virus del mosaico del pepino se ha visto asociado a otras enfermedades del tomate. El colapso del tomate, de etiología desconocida, produce un marchitamiento progresivo de la planta hasta que finalmente se seca y muere (figura 1.9), y aparece solamente en plantas infectadas por PepMV (Soler-Aleixandre et al., 2005). En la primavera de 2001, apareció una enfermedad en los cultivos de tomate llamada “torrao” o “cribado” debido a los síntomas que producía (figura 1.10), pequeñas lesiones cloróticas junto a la nervadura principal de las hojas jóvenes que posteriormente se necrosaban y se desprendían dando lugar a un pequeño cribado (Jordá et al., 2003). Las plantas de tomate afectadas por esta enfermedad,

producida por el Tomato Torrado Virus (ToTV) (Verbeek, et al., 2007), se encontraban normalmente infectadas por PepMV, y aunque se necesitan más estudios, parece ser que estos dos virus interactúan causando graves daños en los cultivos de tomate (EPPO, 2008).



Figura 1.9. Planta de tomate colapsada.
Fuente: Contreras et al, 2003.



Figura 1.10. Síntomas de "torrao" en planta de tomate. Fuente: Seminis Vegetable Seeds.

1.2.5. Estrategias de control

El control de enfermedades producidas por virus plantea una problemática diferente a la de otros agentes patógenos, ya que contra virus no se dispone de métodos directos de control. La mayoría de las medidas que se adoptan son indirectas, orientadas a disminuir las fuentes de infección tanto dentro como fuera del cultivo, limitar la dispersión del virus o reducir los efectos de la infección sobre el rendimiento de la planta. La única excepción se podría dar en aquellos casos en los que existen, o se han incorporado, resistencias en las plantas cultivadas (Moriones y Luis, 2000).

1.2.5.1. Medidas preventivas

Tras la aparición del PepMV en los países europeos, la Comisión de las Comunidades Europeas autorizó a los países miembros a adoptar precauciones y medidas temporales contra la introducción y propagación de la virosis. Para ello, quedó establecido que las plantas destinadas a plantación, originarias de países terceros, deben ser inspeccionadas para detectar la presencia del virus; de igual

forma, debe garantizarse la sanidad de los plantones producidos en viveros autorizados (Lacasa et al., 2000).

Para minimizar el riesgo de transmisión en las semillas estas deben tenerse recomendada que sean tratadas con trisodio fosfato al 10% durante 3 horas, o bien sometidas a altas temperaturas, si bien esto último reduce en gran medida la germinación (Córdoba-Sellés et al., 2007).

En la manipulación de las plantas conviene utilizar sustancias inhibidoras o destructoras de las partículas virales para mojar las herramientas y los guantes que cubren las manos, tales como la leche en polvo con el 3,5% de proteínas (Lacasa et al., 2000), fosfato trisódico y, otros compuestos de amonio cuaternario y aldehídos glutáricos (Lacasa et al., 2001). Al final de cada fila es conveniente cambiar los guantes como medida preventiva. Dado que el virus puede transmitirse con el roce de los vestidos, se recomienda utilizar protecciones desechables o ropas de fácil sustitución.

Cuando se detecta una planta con síntomas, ésta y las que se encuentran alrededor (que están en contacto con ella), deben ser cuidadosamente arrancadas, sacadas del invernadero y destruidas de forma controlada. Se deben observar las plantas próximas en los días siguientes para adoptar las mismas medidas si aparece otra planta afectada (Lacasa, 2000).

Ante la posibilidad de que en la plantación haya alguna planta contaminada sin que se adviertan los síntomas, conviene realizar las operaciones de las prácticas culturales habituales siempre en la misma dirección, en el mismo sentido y en el mismo orden. En este caso, si se detecta la presencia de una planta contaminada, tras arrancarla con cuidado, se procederá a realizar las manipulaciones en sentido contrario de lo que se venía haciendo, de forma que las plantas próximas a la infectada se manipulen en último lugar. De esta manera se consigue parar la diseminación de la enfermedad en las labores de entutorado y desbrotado (Lacasa et al., 2001).

Es recomendable no pasar colonias de abejorros de unos invernaderos a otros, cuando se sospeche o se tenga constancia de la presencia del virus en una plantación, dada la posibilidad de diseminación del virus en el cuerpo del insecto al posarse sobre las hojas a descansar o a recoger el polen en las escopas de las patas (Lacasa et al., 2003).

Al finalizar el cultivo deben eliminarse todos los restos; es importante arrancar las raíces de las plantas afectadas cuando el cultivo se realiza en suelo (Lacasa et al., 2000). Es conveniente dejar unas 6 semanas las parcelas sin cultivo, manteniéndolas limpias de malas de hierbas, tanto dentro como en su periferia.

Antes de la nueva plantación se recomienda realizar una correcta desinfección de las estructuras e instalaciones que han estado en contacto con plantas infectadas con desinfectantes (fosfato trisódico al 3% o peroxisulfato de potasio) o vapor de agua (Lacasa et al., 2000).

1.2.5.2. Resistencia genética al PepMV

La alta eficiencia en la transmisión mecánica de este virus hace que la mejora genética sea la solución a largo plazo más efectiva para el control de esta enfermedad (Soler et al., 2000b).

No existen en la actualidad cultivares de tomate resistentes a PepMV y hay muy poca información publicada sobre el estudio de esta resistencia.

Ling y Scott (2007) estudiaron la resistencia al virus de varias accesiones de *Solanum lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. chilense* y *S. habrochaites*, y encontraron todas las accesiones de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* totalmente susceptibles al virus, dos accesiones de *S. peruvianum* (LA107 y LA1305) y dos de *S. chilense* (LA1971 y LA2748) con una resistencia moderada y una accesión de *S. habrochaites* (LA1731) cuya progenie resultó resistente tanto a los aislados de PepMV tipo US como a los europeos.

Soler-Aleixandre et al. (2007) encontraron accesiones de *S. ochranthum* Dunal y *S. pseudocapsicum* resistentes a PepMV. Estudiaron también accesiones de

S. chilense y *S. peruvianum* obteniendo una infección sistémica variable, y concluyen que dado que el uso de las dos primeras especies está muy limitado debido a que no se pueden cruzar sexualmente con el tomate cultivado, *S. chilense* y *S. peruvianum* son las especies más prometedoras en la búsqueda de resistencia a PepMV.

1.3. TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE VIRUS

De forma general las técnicas de diagnóstico de virus se pueden asociar en tres grupos: técnicas clásicas, basadas en la observación del virus o de sus efectos directos en la planta afectada o en otros huéspedes; detección serológica de la proteína capsídica u otras proteínas codificadas por el genoma del virus; y detección de ácidos nucleicos específicos del virus (Moreno Gómez, 2000).

1.3.1. Técnicas clásicas

En este grupo se incluyen: la observación de síntomas en campo, estudio de las inclusiones celulares, observación de partículas virales al microscopio electrónico y ensayos de infectividad en diversos huéspedes (Moreno Gómez, 2000).

1.3.1.1. Observación de síntomas en campo

Es una etapa necesaria y altamente orientativa para establecer la etiología de una nueva enfermedad. Es necesario realizar observaciones cuidadosas sobre las características del crecimiento de las plantas en la zona, diferencias de aspecto entre plantas, las condiciones del suelo, pautas en la distribución espacial de los síntomas, condiciones ambientales, susceptibilidad relativa y reacciones específicas de distintas especies y/o cultivares, posibles vectores y fuentes de inóculo, así como requerir información sobre las prácticas culturales utilizadas y la aparición del problema en cultivos anteriores.

Los síntomas causados por virus son muy variados y pueden afectar a la totalidad de la planta o a algunos órganos específicos. Con un buen conocimiento del cultivo y alguna experiencia sobre las características y problemas de éste en la zona es posible emitir un diagnóstico certero sobre la presencia de un determinado virus. En efecto, muchas enfermedades causadas única o principalmente por un virus muestran algún síntoma que es específico de ese virus. Sin embargo, la

presencia de infecciones mixtas, de nuevas razas del virus, o de condiciones ambientales que puedan enmascarar o modificar el síntoma o síntomas específicos, pueden inducir a un diagnóstico erróneo, así como la introducción de nuevos cultivares con diferente sensibilidad al virus y/o susceptibles a otros virus.

En el caso del PepMV, las condiciones ambientales suelen enmascarar o atenuar los síntomas haciendo muy difícil su diagnóstico mediante observación visual.

1.3.1.2. Estudio de las inclusiones celulares

Además de los síntomas macroscópicos, los virus también producen distintos efectos citopáticos observables al microscopio óptico, o la acumulación o desaparición de sustancias, que a veces son la causa de dichos síntomas. Las alteraciones citopáticas más estudiadas son las inclusiones celulares, que consisten en corpúsculos microscópicos localizados en el citoplasma o en el núcleo que se diferencian de otras estructuras celulares. Según la estructura que presentan al microscopio óptico, las inclusiones pueden ser cristalinas, formadas por partículas virales, o amorfas, formadas por partículas virales, productos de origen viral y elementos citoplasmáticos, que aparecen como una excrecencia del citoplasma que se introduce en la vacuola central de la célula. No obstante, esta estructura puede cambiar a lo largo del desarrollo de la enfermedad.

La estructura y proceso de formación de las inclusiones inducidas por distintos virus suele ser una característica específica del virus con escasa influencia del huésped. La distribución de las inclusiones en los distintos tejidos es así mismo una indicación de la distribución del virus en la planta. Sin embargo, mientras algunos virus dan lugar a inclusiones muy peculiares y diferenciadas, en otros casos las inclusiones tienen escaso valor diagnóstico por ser de estructura y forma similar las producidas por diversos virus, incluso hay virus que no forman inclusiones y en la descripción de muchas virosis no se han efectuado estudios histopatológicos.

En general, las inclusiones producidas por 9 grupos de virus se consideran suficientemente diferenciadas para permitir un diagnóstico de infección a nivel de grupo.

Aunque en la mayoría de los casos no es posible un diagnóstico específico en base a la presencia de inclusiones, su estudio combinado con otras técnicas como la observación de partículas al microscopio electrónico o los síntomas inducidos en varios huéspedes, pueden permitir un diagnóstico fiable del virus o al menos restringir la gama de posibles virus implicados y facilitar un diagnóstico posterior con técnicas más específicas como la serología.

En el caso de PepMV, Jordá et al. (2000) sometieron plantas de tomate infectadas a un proceso de inclusión en resina Spurr, de baja viscosidad, y tras su corte con el ultramicrotomo observaron con facilidad, cuerpos de inclusión bandeados, formados por masas de partículas virales en el citoplasma del parénquima del mesófilo de la hoja (figura 1.11).



Figura 1.11. Inclusiones celulares bandeadas del PepMV en plantas de tomate infectadas.

Fuente: Lacasa y Jordá, 2002.

Jones et al. (1980) describen inclusiones de PepMV bandeadas o en forma de remolino o espiral.

1.3.1.3. Observación de partículas virales al microscopio electrónico

La elevada capacidad de resolución del microscopio electrónico (0,2-0,4 nm) ha hecho del mismo un instrumento imprescindible para el estudio de los virus. Desde el punto de vista del diagnóstico, las aplicaciones más comunes son la observación de partículas virales en extractos brutos o parcialmente purificados y el estudio de partículas e inclusiones en secciones ultrafinas de los tejidos enfermos.

Cuando la concentración del virus en los tejidos infectados es suficientemente alta, las partículas virales pueden ser fácilmente observadas en extractos brutos o clarificados de dichos tejidos, o sumergiendo durante unos instantes una sección reciente de hoja o brote infectados en una gota de agua y colocando a continuación sobre ésta una rejilla de microscopía electrónica (método "dip"). En estos casos, la

observación del tamaño y morfología de las partículas, en combinación con los síntomas observados, puede proporcionar un diagnóstico adecuado o al menos estrechar el abanico de posibles virus implicados en la enfermedad. En general, los virus con partículas filamentosas son más fácilmente identificables en extractos brutos o clarificados que los virus con partículas esféricas, ya que éstos pueden confundirse con distintos orgánulos celulares o partículas contaminantes de la preparación, sobre todo si la concentración de virus no es muy alta.

Además de la concentración del virus en los tejidos infectados, el diagnóstico mediante la observación directa de extractos al microscopio electrónico tiene una limitación adicional. Si la planta está infectada por dos o más virus de morfología similar, o por virus de distinta morfología que se distribuyen irregularmente o que alcanzan concentraciones muy diferentes, la simple observación de un extracto puede conducir a un diagnóstico erróneo. La utilización de anticuerpos específicos en combinación con la observación al microscopio electrónico permite frecuentemente subsanar las limitaciones anteriores. En el caso de PepMV, dado la similitud de forma y tamaño de sus partículas con las de otros miembros de los potexvirus, como el Potato Virus X o el Potato Aucuba mosaic, también asociados al tomate, la simple observación al microscopio electrónico podría llevar a una confusión en la determinación (Jordá et al., 2000).

1.3.1.4. Ensayos de infectividad en diversos huéspedes.

La infectividad es una propiedad fundamental de los virus que es normalmente utilizada para la caracterización e identificación de estos patógenos. Los virus que pueden infectar una misma planta es probable que tengan otros huéspedes en común, sin embargo, cada uno de ellos será capaz de infectar una combinación única de especies. Esta especificidad de la gama de huéspedes y de los síntomas que en ellos causa cada virus ha sido tradicionalmente utilizada para el diagnóstico de virosis.

En los últimos años, los conocimientos sobre el genoma y estrategia de replicación de los virus han aumentado considerablemente y gran parte de los virus conocidos han podido clasificarse en familias y grupos. Esta información ha permitido desarrollar nuevas técnicas rápidas y sensibles para la detección de los

mismos en plantas infectadas; sin embargo, la gama de huéspedes y los síntomas producidos en cada uno de ellos en condiciones controladas siguen siendo claves para la identificación inequívoca de los virus y la discriminación entre distintos aislados de los mismos.

En términos prácticos, la gama de huéspedes de un virus es el conjunto de especies que el virus puede infectar e invadir, al menos parcialmente, cuando son inoculadas en condiciones de laboratorio. Para comprobar la ausencia de virus en las plantas que permanezcan asintomáticas tras la inoculación se pueden inocular a partir de estas plantas, especies conocidas como productoras de síntomas específicos, especialmente aquellas que dan lugar a la rápida aparición de lesiones locales características, o bien se pueden hacer pruebas de laboratorio si se conocen las características morfológicas, citopatogénicas, serológicas o del genoma del virus.

Los procedimientos más comunes de inoculación son:

a) Inoculación por injerto: Es el método de elección para el diagnóstico de numerosas virosis de plantas leñosas. Consiste en injertar un trozo de tejido enfermo en plantas indicadoras de cultivares sensibles que producen síntomas característicos. En huéspedes herbáceos, es más común utilizar como inóculo un brote cuyo extremo se corta en doble bisel y se inserta en cuña lateral o terminal sobre el tallo de la planta indicadora.

b) Inoculación por cuscuta: Las especies del género *Cuscuta*, familia *Convolvulaceae*, son plantas parásitas carentes de hojas y clorofila, que al contacto con una planta huésped tienden a emitir unos haustorios que se introducen en los tejidos vasculares del huésped. Sus tallos en forma de zarcillos forman así una auténtica red entre distintas partes de la planta parasitada o entre plantas distintas. Hay unas 20 especies distintas de cuscuta que se usan como puente biológico para transmitir virus entre plantas diferentes, siendo *C. campestris* y *C. subinclusa* las de uso más generalizado. La transmisión de virus por cuscuta se utiliza principalmente para ampliar la gama de huéspedes de un virus que no se transmiten mecánicamente o por vectores, ya que permite conectar los tejidos de especies vegetales que incompatibles por injerto. En particular, puede ser una vía adecuada

para transmitir virus de plantas leñosas a especies herbáceas, generalmente más adecuadas para la purificación de virus o para posterior transmisión mecánica. Las principales limitaciones de este tipo de transmisión se deben a que es un método relativamente lento y que requiere atención y precauciones para su utilización en el invernadero; además, algunos virus son transmitidos por algunas especies de cuscuta, pero no por otras, lo que puede prolongar aún más los ensayos de transmisión. También el hecho de que la cuscuta sea huésped de varios virus, entre ellos el mosaico latente de la cuscuta, que se transmite por semilla y que causa síntomas en otras especies de plantas, puede inducir a confusión.

c) Inoculación por vectores: Muchos virus de plantas pueden ser transmitidos por vectores, que son, en general, fitófagos de tamaño reducido capaces de alimentarse en células vegetales sin causar necrosis en las células colindantes. Ello les da la posibilidad de adquirir partículas virales junto con los fluidos celulares e introducirlas en otras células al alimentarse en un huésped sano. La mayoría de los vectores de virus de plantas son insectos, pero también hay algunos transmitidos por ácaros eriófidios, nematodos y hongos. En general, cada virus puede ser transmitido por una o por unas pocas especies del mismo grupo taxonómico. La inoculación por vectores suele utilizarse para transmitir virus que no se transmiten mecánicamente, especialmente cuando dicha transmisión ha de efectuarse entre plantas difíciles de injertar o incompatibles para el injerto. En ocasiones, la transmisión por un determinado vector puede tener valor diagnóstico, al menos a nivel de grupo. Una utilidad adicional de este tipo de transmisión en el diagnóstico de virosis es la separación de virus a partir de plantas con infecciones mixtas.

d) Agroinoculación: El ADN genómico, o la copia de ADN del genoma de algunos virus, han podido ser insertados en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Cuando se produce la infección por *Agrobacterium* y el plásmido Ti con su inserto es introducido en la planta huésped, el genoma puede ser escindido del plásmido y dar lugar a una infección sistémica. Mediante este procedimiento, denominado agroinoculación, han podido transmitirse virus de al menos tres grupos: pararetrovirus, geminivirus y tobamovirus. Aunque la agroinoculación no es utilizable como método rutinario de diagnóstico, ofrece una vía alternativa para inocular

plantas con virus que no son transmisibles mecánicamente o para inoculaciones experimentales con genomas de ARN de gran tamaño, que son difíciles de efectuar con ARN purificado o con transcritos obtenidos *in vitro*.

e) Inoculación mecánica: La inoculación mecánica consiste en poner manualmente en contacto el virus con células vegetales en las que se han producido microheridas en la pared celular para dejar la membrana plasmática accesible al virus en algunos puntos. Las microheridas son habitualmente producidas utilizando abrasivos como el carburo de silicio o carborundo, polvo de diatomeas o celita, óxido de aluminio o alúmina, o bien silicato de magnesio, que se espolvorean sobre la superficie de la planta a inocular o se aplican mezclados con la solución de inóculo. El inóculo consiste normalmente en un extracto bruto que se prepara homogeneizando tejido infectado de virus con un disolvente adecuado (normalmente un tampón y algunos aditivos) en mortero o con un homogeneizador mecánico. Esta solución de inóculo se aplica sobre las hojas o cotiledones de la planta receptora utilizando el dedo, una espátula, un cepillo de pelo duro, una gamuza o una bola de algodón. Un procedimiento alternativo consiste en aplicar la solución de inóculo conteniendo el abrasivo con un pulverizador de aire a presión. El éxito de la inoculación dependerá de múltiples factores relacionados tanto con el inóculo (concentración del virus, distribución del virus en los tejidos de la planta infectada, homogeneización del inóculo, tampón de preparación y aditivos) como con la planta receptora (características de la epidermis, tipo de órgano inoculado, condiciones fisiológicas en el momento de la inoculación, tratamientos post-inoculación).

1.3.2. Técnicas serológicas

Las técnicas serológicas utilizadas para virus de plantas, se pueden clasificar según su fundamento, en: técnicas de aglutinación, técnicas de neutralización de la infectividad, técnicas de precipitación, técnicas inmunoeléctroforéticas, técnicas que utilizan conjugados y fases sólidas, y técnicas mixtas o conjuntas (Cambra et al., 2000).

1.3.2.1. Técnicas de aglutinación

Son las técnicas más sencillas pues consisten en poner en contacto una solución que contiene anticuerpos con el extracto de un vegetal infectado. Se

producirán aglutinados de antígenos-anticuerpos que podrán ser visualizados con ayuda de una lupa binocular.

En estas técnicas se incluyen la aglutinación de cloroplastos, microaglutinación bajo aceite, aglutinación en tubo (prueba del anillo) y coaglutinación o PALLAS (Protein A latex linked assay).

Las técnicas de aglutinación tienen el grave inconveniente de estar sometidas a fenómenos de equivalencia y zona y por tanto, requerir el uso de diferentes concentraciones de anticuerpos frente a la solución de antígeno. Son técnicas no cuantitativas, que emplean gran cantidad de anticuerpos y que hoy día no son apenas utilizadas a pesar de su buena sensibilidad.

1.3.2.2. Técnicas de neutralización de la infectividad

Han sido empleadas para comparar aislados de virus y estudiar la transmisibilidad de virus persistentes. Si se incuba una solución viral con anticuerpos, la reacción antígeno-anticuerpo es capaz de bloquear la infectividad cuando se realiza posteriormente una inoculación mecánica o cuando los vectores, alimentados artificialmente con la mezcla, son empleados en transmisiones experimentales. No son técnicas muy usuales y se utilizan para casos y modelos muy concretos.

1.3.2.3. Técnicas de precipitación

Se basan en la propiedad de los antígenos de migrar en un medio gelosado. La reacción antígeno-anticuerpo sucede en el medio solidificado con agar o agarosa, al encontrarse los antígenos con los anticuerpos en equivalencia. Sus dos modalidades más importantes son la inmunodifusión doble o de Ouchterlony y la inmunodifusión radial o de Mancini.

1.3.2.4. Técnicas inmunolectroforéticas

Suponen una mejora de las técnicas de precipitación pues utilizan las propiedades para acelerar la migración y de diferente migración electroforética de las proteínas, para mejorar la visión y lectura de las líneas de precipitación que se producen al reaccionar posteriormente con anticuerpos. Las técnicas

inmunolectroforéticas se realizan en dos fases seguidas: separación electroforética de los antígenos en un medio geloso y posterior reacción serológica (por inmunodifusión) de las proteínas separadas.

Entre estas técnicas se encuentran: la inmunolectroforesis sencilla, la inmunolectroforesis bidimensional, doble, “rocosa” o de Laurell, y la inmunoosmoforesis o inmunolectroforesis contracorriente.

1.3.2.5. Técnicas que utilizan conjugados y fases sólidas

Son las técnicas serológicas más sensibles para la detección de antígenos en material vegetal. La inmensa mayoría de técnicas serológicas utilizadas en la actualidad emplean anticuerpos marcados cuya preparación se realiza con inmunoglobulinas purificadas.

Se han descrito cuatro tipos de métodos que utilizan anticuerpos conjugados: directo (D), indirecto (I), doble sándwich de anticuerpos (DAS) y doble sándwich de anticuerpos indirecto (DASI) y sus variantes en función del marcado y por tanto del revelado final.

Los métodos directos son aquellos en los que sobre el antígeno insolubilizado en el inmunoadsorbente, se fijan anticuerpos marcados. El inconveniente es la necesidad de marcar todos los anticuerpos específicos. La ventaja es su sencillez y rapidez una vez se dispone del conjugado.

Los métodos indirectos se han desarrollado para paliar los problemas del método directo y poder utilizar anticuerpos específicos del antígeno de interés sin conjugar.

Dentro de estas técnicas se encuentran las siguientes:

a) Inmunofluorescencia (IF): Usa anticuerpos marcados con productos fluorescentes y la lectura se realiza con un microscopio dotado de epi iluminación ultravioleta. La variante indirecta es la más empleada. Posee la ventaja de su reducido coste comparada con la microscopía electrónica y su buena sensibilidad.

b) Radioinmunoensayo (RIA): Utiliza radioisótopos como marcadores. La lectura se efectúa por medida de la radiactividad desprendida por el isótopo en un medio ácido o por medida directa con un contador de centello sobre el soporte sólido o inmunoabsorbente utilizado. Posee una sensibilidad similar a la técnica ELISA pero implica los riesgos del uso de productos radiactivos y los conjugados empleados son inestables. Por esto, no ha sido muy empleada.

c) Técnicas inmunoenzimáticas o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Son las técnicas más comúnmente utilizadas. Utilizan conjugados realizados con enzimas. La variante más utilizada es la de doble sandwich en placas de poliestireno y con conjugados de fosfatasa alcalina. Este procedimiento emplea dos capas de anticuerpos, la primera, unida a la superficie de los pocillos de la placa de poliestireno se emplea para atrapar las partículas virales del extracto de la planta infectada, y después una segunda capa de anticuerpos conjugados a la enzima se usa para marcar el virus. Finalmente se añade un substrato que cambiará de color por interacción con la enzima conjugada. El cambio de color se puede cuantificar mediante la medida de la absorbancia de longitud de onda conocida que pasa a través de cada pocillo de la placa (Langham, 2003). Una variante de estas técnicas, no muy aplicadas en Patología Vegetal, se encuentra en las técnicas inmunoenzimofluorescentes (ELFA) que utilizan substratos fluorescentes.

1.3.2.6. Técnicas mixtas o conjuntas

Entre estas técnicas encontramos: la inmunoelectromicroscopía (IEM o SSEM), que combina el alto poder de resolución de la microscopía electrónica, con la especificidad que confiere el uso de anticuerpos; la inmunoelectrotransferencia (IET), que combina el poder de resolución de mezclas proteicas que poseen las técnicas electroforéticas en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), con la especificidad de la serología; la inmunocaptura-PCR y la inmuno-magneto reacción, que usa anticuerpos marcados con hierro.

1.3.3. Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales

Las técnicas que detectan los ácidos nucleicos virales (análisis de ARNs bicatenarios, hibridaciones moleculares y la reacción en cadena de la polimerasa o

PCR) son un complemento a las técnicas serológicas, ya que detectan distintas partes del virus que éstas. Mientras la serología está basada en la detección de epítomos de la proteína de la cápsida viral, cuyo gen representa una pequeña parte de la información genética del virus, las sondas utilizadas en las hibridaciones moleculares pueden representar a diversas partes del genoma o a éste completo. Además, con estas técnicas ha sido posible el diagnóstico de satélites y viroides, que al carecer de proteínas estructurales propias, son indetectables por técnicas serológicas (Blas et al., 2000).

1.3.3.1. Análisis de ARN bicatenario

Los virus vegetales cuyo genoma consta de una cadena de ARN de sentido positivo o negativo, aproximadamente el 95% de los virus vegetales, producen una cadena de ARN complementaria a la genómica durante su ciclo replicativo. Esas dos cadenas de ARN pueden anillarse formando una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) denominada forma replicativa del virus. También existen virus vegetales cuyo genoma está constituido por moléculas de ARNbc. Cuando una planta está infectada por uno de estos virus, es posible aislar el ARNbc de las células infectadas. Dado que el ARNbc no es un constituyente normal de las células vegetales, la presencia de estas moléculas en extractos vegetales es un indicador de infección vírica.

Este método presenta algunos inconvenientes en algunos casos de virus que producen ARNbc a concentraciones bajas, como el virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV), necesitando gran cantidad de tejido para conseguir aislarlo. También existen casos en los que es difícil o imposible el aislamiento de estos ácidos nucleicos, como ocurre con el virus del bronceado del tomate (TSWV). Además, a veces complica el diagnóstico la presencia de ARNbc en plantas aparentemente sanas, como sucede en ciertas variedades de judía, pimiento, cebada y arroz, que poseen ARNbc de alto peso molecular no asociados a partículas víricas.

La mayor ventaja de esta técnica reside en que permite detectar la presencia del virus en general sin necesidad de utilizar reactivos específicos para cada virus. Es útil cuando se sospecha que un virus es responsable de una enfermedad pero se

desconoce qué virus puede ser éste, pues permite descartar posibles patógenos y detecta la presencia de infecciones mixtas y de patógenos subvirales como satélites. Una vez determinada la presencia de virus, se puede proceder a la identificación específica por análisis de los tamaños del ARNbc o por otros métodos más específicos como ELISA, hibridación o PCR.

1.3.3.2. Detección mediante hibridaciones moleculares.

La detección de virus por hibridación molecular se realiza mediante la unión del ácido nucleico del genoma viral con moléculas de ácido nucleico complementarias (sonda), que han sido marcadas con un isótopo radiactivo u otra molécula no radiactiva (biotina, digoxigenina, quimioluminiscencia, etc) que permite detectar su hibridación. En primer lugar se inmoviliza el ADN o ARN de la muestra desnaturalizado sobre un soporte o filtro, de forma que se impide la autohibridación, que puede ocurrir en medio líquido. A continuación se introduce el filtro en una solución con sondas de ácidos nucleicos complementarias y marcadas. Tras la hibridación, es necesario lavar los filtros para eliminar los productos que no han reaccionado. Los híbridos muestra-sonda se detectan por autorradiografía o por métodos enzimoimmunoquímicos.

A pesar de la dificultad que presenta la necesidad de disponer de sondas específicas para cada virus, la técnica ofrece ventajas considerables como puede ser su sensibilidad, lo que es útil para virus limitados al floema o infectando árboles o en la detección de virus en su insecto vector.

1.3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Básicamente consiste en producir múltiples copias de un segmento determinado de ADN. El proceso de amplificación del ADN se lleva a cabo a través de dos pequeños fragmentos de ADN o cebadores, de secuencia complementaria a la de los extremos del fragmento que se desea amplificar. En una reacción típica, se calienta a 92-95°C para desnaturalizar el ADNbc en dos cadenas sencillas, a continuación la reacción se enfría a 37-60°C para anillar los cebadores a las cadenas de ADN y, finalmente, la reacción se calienta a 72°C, la temperatura óptima de reacción de las ADN polimerasas termoestables para extender las cadenas a partir de los cebadores y producir dos copias de las cadenas originales. Estos ciclos

de temperatura se llevan a cabo 25-40 veces. Dado que los productos de extensión son a su vez complementarios a los cebadores, en cada ciclo se duplica la cantidad de ADN sintetizada en el ciclo anterior, de modo que hay una amplificación exponencial del fragmento.

Una de las mayores ventajas de esta técnica es su alta sensibilidad, si bien debido a ello se deben extremar las precauciones para evitar contaminaciones en las muestras que den lugar a anillamientos inespecíficos de los cebadores.

Existen múltiples variantes de la PCR convencional, algunas de las más utilizadas en la detección e identificación de virus son:

- RT-PCR: Para virus cuyo genoma es ARN, se realiza previamente una transcripción inversa (TI) del genoma viral para obtener un ADN complementario (ADNc) y después éste se amplifica mediante PCR, en un proceso denominado TI-PCR o más conocido por sus siglas en inglés como RT-PCR (Blas et al., 2000).
- AFLP: Siglas en inglés de Amplified Fragment Length Polymorphism. Consiste en la combinación de los métodos de PCR y análisis de fragmentos de restricción, con el fin de detectar polimorfismos debidos a modificaciones en la secuencia de ADN que comprende los sitios de corte de las enzimas de restricción. Este cambio se percibe como un patrón diferente, en número y tamaño, de bandas generadas (www.pcrlinks.com).
- Multiplex PCR: Variante de la técnica de PCR donde se emplean dos o más pares de cebadores en un único tubo, con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN (www.pcrlinks.com).
- PCR anidada o nested-PCR: Variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores o cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. Primero se realiza una reacción con los iniciadores externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Después,

- con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica (www.pcrlinks.com).
- PCR-ELISA: Combinación de las técnicas de PCR y ELISA, que permite detectar e identificar diferentes dianas en las muestras analizadas, así como testar gran cantidad de muestras. Permite identificar productos de PCR generados con el mismo par de cebadores y que contienen diferencias en sus secuencias. Ofrece una alternativa más económica a la PCR en tiempo real (www.pcrlinks.com).
 - PCR-RFLP: Siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism. Esta técnica que radica en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR. Si dos amplicones presentan una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos (www.pcrlinks.com). Martínez-Culebras et al. (2002) proponen un ensayo de RT-PCR-RFLP como un método fácil de detectar e identificar nuevos aislados de PepMV (www.pcrlinks.com).
 - PCR-SSCP: Siglas en inglés de Polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. Es un proceso donde los productos de PCR son desnaturalizados en cadenas simples de ADN, luego renaturalizados para favorecer los apareamientos intracatenarios y finalmente analizados en un gel de poliacrilamida. Con esto, la estructura de cada hebra de ADN de un amplicón adoptará una conformación dada, dependiente de la secuencia nucleotídica, que afectará su migración en el gel. Así dos productos de PCR con diferencias puntuales en su secuencias presentaran distintos patrones electroforéticos de los fragmentos de ADN monocatenarios (www.pcrlinks.com).
 - Real-Time PCR (PCR en Tiempo Real): Se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR que se acumulan durante el proceso de amplificación.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La sintomatología que produce el virus del mosaico del pepino dulce es muy variable y fuertemente dependiente de los factores medioambientales, dificultando el seguimiento de la enfermedad mediante inspección visual de las plantas infectadas. Es por esto que tras su aparición en los cultivos de tomate de la Región de Murcia en 2000, se hizo necesaria una herramienta de diagnóstico rápido y eficaz del virus que permitiera evaluar su incidencia en las principales zonas productoras. La hibridación molecular ha sido ampliamente utilizada como método de diagnóstico de virus, y se han puesto a punto técnicas de impronta de secciones de tejidos de plantas que hacen que este método sea adecuado para dicho propósito.

Así pues, los objetivos perseguidos en este trabajo son los siguientes:

1. Proporcionar un método de detección de PepMV basado en la hibridación molecular. Para ello se propusieron los siguientes objetivos parciales:

1.1. Obtención de una sonda de ARN específica para la detección de PepMV mediante la técnica de hibridación molecular. Este objetivo se llevó a cabo en el laboratorio de virología del centro del CSIC, Estación Experimental La Mayora, en Málaga, bajo la dirección del Dr. Miguel Angel Aranda, durante el mes de mayo de 2001.

1.2. Puesta a punto de la técnica de hibridación molecular para el diagnóstico de PepMV. Se desarrolló en el laboratorio de biotecnología del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (IMIDA) de la Alberca (Murcia), bajo la dirección del Dr. José Luis Cenis Anadón.

2. Evaluación de la incidencia de la virosis en las principales zonas productoras de tomate de la Región de Murcia (Mazarrón y Lorca) en cultivos bajo invernadero y al aire libre, durante dos ciclos de cultivo consecutivos, verano de 2001 y otoño-invierno de 2001 a 2002. Para ello se plantearon los siguientes objetivos parciales:

2.1. Localización de diferentes parcelas de cultivo de tomate afectadas por la enfermedad.

2.2. Muestreos periódicos de las parcelas.

2.3. Diagnóstico de las muestras mediante hibridación molecular. Se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología del IMIDA, bajo la dirección del Dr. J.L. Cenis.

3. METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1. SÍNTESIS DE UNA SONDA DE ARN PARA LA DETECCIÓN DE PepMV

3.1.1. Multiplicación del virus en plantas de *Nicotiana benthamiana* mediante inoculación mecánica

3.1.1.1. *Aislados de PepMV*

Se utilizaron dos aislados diferentes del virus, procedentes de plantas sintomáticas de tomate de cultivos de la Región de Murcia, que mostraban deformación del limbo foliar, clorosis y mosaicos:

- Aislado 99/13, proporcionado por el laboratorio de virología de la Estación Experimental La Mayora (CSIC, Málaga) y procedente de plantas de tomate de Mazarrón.
- Aislado Suetos, procedente de plantas sintomáticas de tomate de un invernadero de Lorca, cosechado en el año 2001.

3.1.1.2. *Preparación del inóculo*

Se añadieron en un pocillo de cerámica 2,5 g de material vegetal liofilizado con cada aislado del virus, una pizca de carbón activo y 10 mL de 0,1 M tampón fosfato-K a pH 7,2 (1,4M K₂HPO₄, 3,5M KH₂PO₄). Con ayuda de una mano de mortero se trituró todo hasta obtener una mezcla homogénea.

3.1.1.3. *Inoculación de plantas de *Nicotiana benthamiana**

Como plantas huésped se utilizaron 6 plantas de *N. benthamiana* en macetas; dos de ellas fueron inoculadas con el aislado 99/13, dos con el aislado Suetos y otras dos se inocularon sólo con el tampón fosfato-K como controles negativos.

Antes de inocular, se espolvorearon las plantas con un poco de carborundo, que al ser un producto abrasivo, crea pequeñas heridas sobre las hojas facilitando así la penetración de las partículas virales en las células vegetales. Se inocularon hojas jóvenes totalmente extendidas de la forma siguiente: con una mano colocamos un trozo de papel filtro doble bajo la hoja, y con la otra mano extendemos el inóculo

pasando el dedo suavemente sobre la hoja dos veces, usando un dedil de látex previamente mojado en el pocillo con el inóculo. Pasados unos minutos se lavaron las plantas inoculadas con agua y se mantuvieron bajo invernadero. Las plantas control, inoculadas sólo con tampón, fueron las primeras en ser inoculadas, y continuamos con las demás, cambiando el dedil entre aislados y lavándonos bien las manos con jabón, para evitar contaminaciones.

3.1.2. Extracción de ARN de las plantas de *N. benthamiana* inoculadas

3.1.2.1. Material vegetal

Se utilizaron como muestras, hojas jóvenes de las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con los dos aislados del virus que después de 10 días mostraban mosaicos, clorosis y deformaciones. Como muestras control negativo se usaron hojas jóvenes asintomáticas de las plantas de *N. benthamiana* inoculadas sólo con tampón y hojas jóvenes de una planta sana. Cada muestra se etiquetó usando la notación que se cita a continuación:

PEP1: *N. benthamiana* inoculada con aislado 99/13

PEP2: *N. benthamiana* inoculada con aislado Suetos

Nb1: *N. benthamiana* inoculada sólo con tampón

Nb2: *N. benthamiana* sana

3.1.2.2. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN total del virus seguimos el protocolo descrito en el manual del producto TRI-reagent (SIGMA Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Se introdujeron 0,1 g de lámina foliar en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, y tras congelar por inmersión en N₂ líquido se trituró con la ayuda de un émbolo de plástico estéril (Treff, Degersheim, Suiza, distribuido por Technograma, Madrid), procurando que la muestra no llegase a descongelarse. Al tejido finamente molido se le añadió 1 mL de TRI-reagent y el tubo se agitó fuertemente durante 1 min en vórtex. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 5 min, se centrifugaron los tubos a 14000 rpm y a 4°C, durante 15 min. Se recogió el sobrenadante y se añadieron 500 µl de isopropanol, mezclando bien. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min y el ARN se precipitó por centrifugación a 14000 rpm y 4°C, durante 10 min. El precipitado se lavó con etanol al 75%, se secó al aire y se resuspendió en

50 μ L de agua bidestilada estéril. Los extractos obtenidos se conservaron a -20°C hasta su utilización.

3.1.2.3. Comprobación y cuantificación del ARN aislado mediante electroforesis en gel de agarosa

Siguiendo los protocolos descritos por Sambrook et al. (1989), se preparó un gel de agarosa al 1% (Ultra Pure DNA Grade Agarose, Biorad) en tampón 1X TAE (4,84 g/l Tris Base, Roche; 1,14mL/L ácido acético glacial; 1mM EDTA pH 8,0). Se calentó la solución de agarosa en microondas hasta que empezó a hervir, agitando suavemente hasta obtener una solución clara y transparente. Se dejó enfriar la solución hasta unos 55°C en un baño de agua.

Se sellaron con cinta adhesiva los extremos de una cubeta para electroforesis horizontal y se colocó un peine en la parte superior como molde para la formación de pocillos en el gel (figura 3.1). Se vertió la solución de agarosa en la cubeta, colocada sobre una superficie horizontal, hasta alcanzar una altura de 0,5 mm, y se dejó enfriar durante unos 30 min hasta que se solidificó. Entonces, se retiró la cinta adhesiva de los extremos y se sacó el peine en vertical con cuidado para no romper los pocillos. La cubeta con el gel se introdujeron en el tanque de electroforesis, el cual se llenó con tampón 1X TAE hasta cubrir ligeramente el gel de agarosa.

En cada uno de los pocillos se cargaron con una micropipeta alícuotas de $1\mu\text{L}$ de cada una de las muestras de ARN junto con 2 μL de tampón de carga (40% sacarosa, 0,05% azul de bromofenol) y 7 μL de agua bidestilada estéril. Para la cuantificación se usó como control, el ARN de un carmovirus de concentración conocida al que también se le añadió 2 μL de tampón de carga y agua bidestilada estéril hasta un volumen final de 10 μL .

Tras cerrar la cubierta del tanque se colocaron los electrodos y se conectó la fuente de alimentación, sometiendo el gel de agarosa con las muestras a electroforesis a 5 V/cm durante 1 a 2 horas.

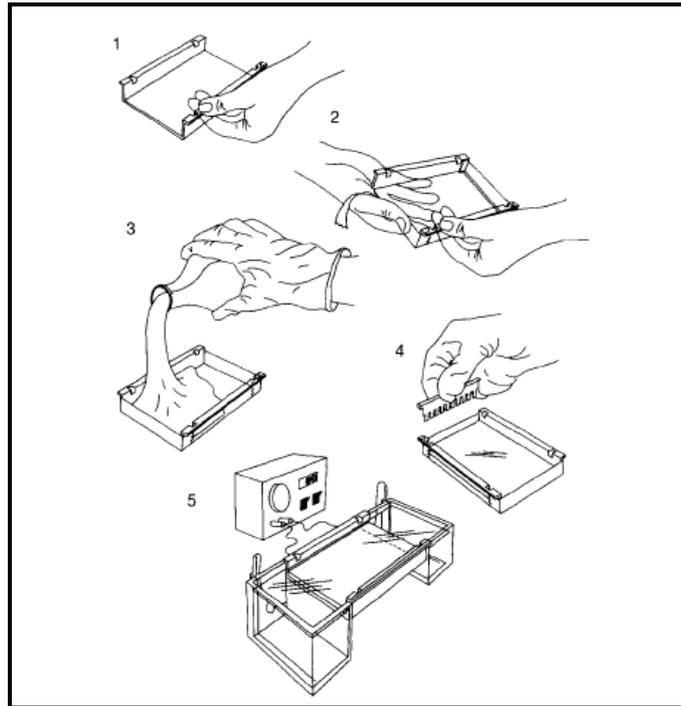


Figura 3.1. Preparación de un gel de agarosa en cubeta horizontal para electroforesis. Fuente: Sambrook et al., 1989.

Posteriormente, se pasó el gel a un recipiente para su tinción con una solución de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio en TAE 1X, y se sometió a agitación suave durante 20 min. Tras la tinción se visualizó el gel en un transiluminador de luz UV y se fotografió con un sistema digital de captura de imagen, a través del programa informático Ksd1d.

La cuantificación del ARN extraído se realizó de forma aproximada por comparación visual de la intensidad de las bandas obtenidas con las del ARN control de concentración conocida.

3.1.3. Obtención de ADN complementario al ARN viral mediante RT-PCR

3.1.3.1. Fragmento de ARN viral objetivo

Para la obtención de la sonda se eligió como fragmento del ARN de PepMV, el único de secuencia disponible en las bases de datos, publicado por van der Vlugt et al. (2000), y que contenía 584 nucleótidos. En el anejo 1 se detalla la secuencia, cuyo número de acceso en GeneBank es AJ270991.

3.1.3.2. *Diseño de cebadores específicos*

Se diseñaron dos oligonucleótidos específicos para obtener un ADN complementario (ADNc) al fragmento de 584 nt del ARN viral, teniendo en cuenta las siguientes premisas:

1. Los tres últimos nucleótidos no deben ser complementarios de los tres primeros, pues se unirían formando un bucle.
2. Es preferible que el primer y último nucleótido sean G o C, pues forman un enlace triple y, por tanto, más fuerte que A y T, que se unen mediante enlace doble.
3. El número de nucleótidos que forman el cebador debe estar entre 18 y 40, normalmente entre 20 y 25.
4. El número de G+C debe ser superior al 50% del total de nucleótidos.
5. Se debe elegir como primer nucleótido el primero de un codón.
6. No deben existir muchas repeticiones consecutivas del mismo nucleótido, si es inevitable, es preferible que sean G o C.
7. El cebador 5'-3' es idéntico a la secuencia del virus, y el cebador 3'-5' es complementario a la misma.
8. Se debe tener en cuenta que los nucleótidos de una secuencia se leen de tres en tres (cada tres nucleótidos forman un codón que codifica un aminoácido), en tres marcos de lectura posibles (a, b, c), según se empiece el primer codón por el primer nucleótido, el segundo o el tercero, respectivamente. El marco de lectura correcto es aquel que no da paradas en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Los oligonucleótidos específicos diseñados fueron: MA172, complementario a la secuencia publicada del fragmento del ARN viral (5'-

GCATGGCCCCGTCTTGTGATTG-3') y MA 173 idéntico a dicha secuencia (5'-CAGCAAGCCAAGGATGAAACGC-3'). Tanto MA172 como MA173 están en una región del genoma que codifica la supuesta ARN polimerasa dependiente de ARN del virus. Ambos oligonucleótidos se diseñaron para que generaran ADNcs solapantes en una región de unos 600 nucleótidos; es decir, MA172 está localizado unos 600 nucleótidos aguas abajo de la secuencia correspondiente a MA173 (figura 3.2).

3.1.3.3. Transcripción Inversa-PCR (RT-PCR)

Se utilizó como molde el extracto de ARN de la muestra PEP1 y como control negativo el extracto de la muestra Nb2.

La síntesis y obtención del ADNc se realizó en dos pasos, siguiendo las instrucciones del fabricante de la enzima transcriptasa reversa *SuperScript RNase H RT* (Gibco BRL, Life Technologies).

Se generaron dos ADNcs, uno desde el extremo 3' poliadenilado al 5' utilizando un oligo-dT (ADNc 1), y otro desde el extremo 3' del fragmento de ARN viral conocido utilizando el cebador MA172 (ADNc 2) (figura 3.2). La secuencia del oligo-dT utilizado es la siguiente: 5' - CCCTCTAGATATCTCGAGTCGACd(T)₁₇ - 3'.

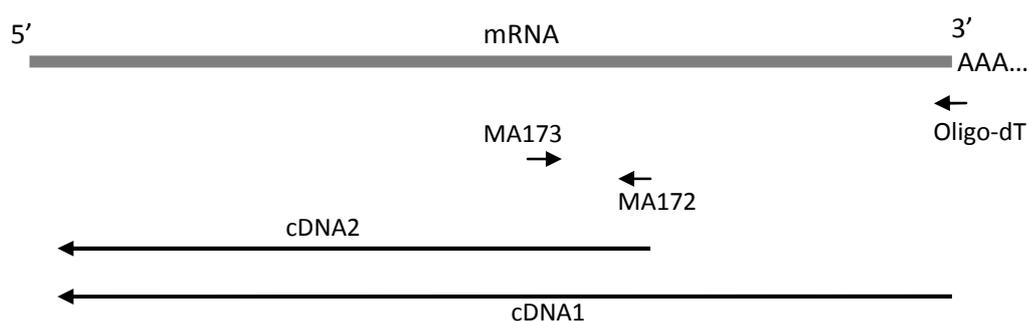


Figura 3.2. Esquema representativo de la síntesis de ADNcs complementarios al ARNm de PepMV y situación de los oligonucleótidos, MA172, MA173 y oligo-dT, utilizados.

Se tomaron 11 μ L de cada uno de los extractos de ARN (0,55 μ g de ARNm) y se añadieron 0,5 μ g de oligonucleótido liofilizado para obtener un volumen final de 11 μ L. La mezcla se incubó a 70°C durante 10 min y después se pasó a hielo.

Seguidamente se añadieron 2 μL de DTT 100 mM (Gibco BRL, Life Technologies), 1 μL de dNTPs 10mM (Promega Corp., Madison, WI, USA) y 4 μL de 5X First Strand Buffer (Gibco BRL, Life Technologies). La mezcla se calentó a 37°C durante 2 min, y se añadió 1 μL de transcriptasa reversa 200 U/ μL (SuperScript Rnase H⁻ RT, Gibco BRL, Life Technologies), incubándose finalmente durante 1 h y 30 min a 37°C. Los ADNcs generados se guardaron a -20°C hasta su amplificación mediante PCR y fueron etiquetados tal y como se indica a continuación:

ADNc1+: ADNc1 complementario al ARNm de PEP1, sintetizado con oligo-dT

ADNc1-: ADNc1 complementario al ARNm de Nb2, sintetizado con oligo-dT

ADNc2+: ADNc 2 complementario al ARNm de PEP1, sintetizado con MA172

ADNc2-: ADNc 2 complementario al ARNm de Nb2, sintetizado con MA172

Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación por PCR de los ADNcs con el objeto de obtener tres fragmentos de ADN, dos de unos 600 nt usando como molde tanto el ADNc1 como el ADNc2 con el par de cebadores MA172/173 y uno mayor usando como molde el ADNc 1 y el par de cebadores MA173/oligo-dT (figura 3.3).

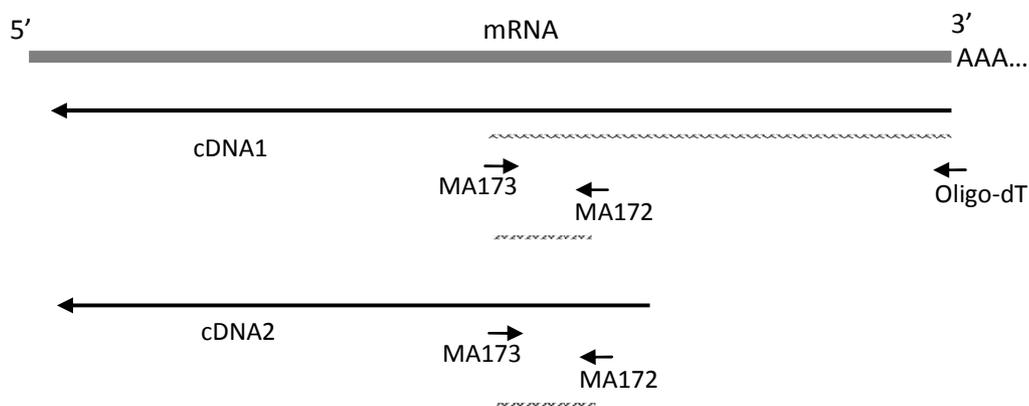


Figura 3.3. Esquema representativo de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR

La reacción PCR se realizó en 50 μL de mezcla de reacción, en tubos Eppendorf de 200 μL . Como ADN molde se usaron 5 μL y 0,5 μL de cada uno de los ADNcs obtenidos en la transcripción inversa, a los que se añadieron el resto de reactivos cuya concentración final en la reacción fue la siguiente: 1X tampón de polimerasa Taq (Bioline, Londres, UK), 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs (Promega

Corp., Madison, WI, USA), 2 ng/ μ L de cada par de oligonucleótidos y 5U de polimerasa Taq (Biotaq, BIOLINE). Además se incluyó un tubo como control negativo, al que se adicionaron todos los componentes excepto ADN. La amplificación se realizó en un termociclador modelo Gene Amp PCR System 9700 (PE Corp., Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) y consistió en un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido de treinta y cinco ciclos consistentes en una desnaturalización a 94°C durante 30 s, anillamiento de los oligonucleótidos a 45°C durante 30 s y polimerización del ADN a 72°C durante 1 min, y finalmente, un ciclo de polimerización a 72°C durante 7 min. En la tabla 3.1 se muestra el diseño del experimento.

Cebadores	MA172 / MA173									Oligo-dT / MA173				
	ADNc1+		ADNc1-		ADNc2+		ADNc2-		Control-	ADNc1+		ADNc1-		Control-
Nº tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
sdH ₂ O	34,5	39,0	34,5	39,0	34,5	39,0	34,5	39,0	39,5	34,5	39,0	34,5	39,0	39,5
10Xtampón	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
50mM MgCl ₂	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1 μ g/ μ L cebador 3'	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1 μ g/ μ L cebador 5'	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10mM dNTPs	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5U/ μ l Taq polimerasa	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
ADNc	5,0	0,5	5,0	0,5	5,0	0,5	5,0	0,5	0,0	5,0	0,5	5,0	0,5	0,0
Volumen total	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabla 3.1. Volumen de los reactivos (en microlitros) empleados en la reacción PCR para la amplificación de dos fragmentos de ADN complementarios al ARN de PepMV.

3.1.3.4. Comprobación de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

A 10 μ L de cada uno de los productos de la PCR se añadieron 2 μ L de tampón de carga y se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se sometieron a electroforesis. La amplificación dio lugar a fragmentos de ADN únicos y de aproximadamente 3,5 kbp (con el par oligo-dT/MA173) y 600 pb (con el par MA172/MA173).

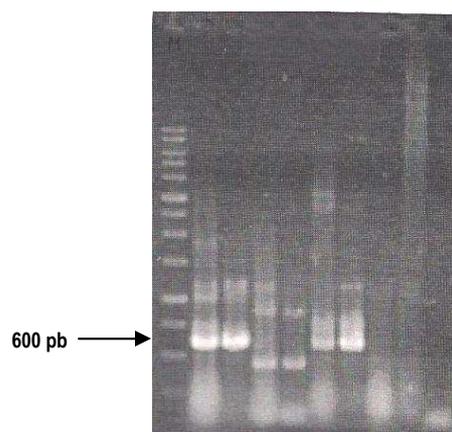


Figura 3.4. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se observan los fragmentos de unos 600 pb obtenidos por PCR con los cebadores MA172 y MA173.

3.1.3.5. Purificación de ADN de un gel de agarosa

El ADNc de 600 nt obtenido por RT-PCR se purificó por extracción de un gel preparativo de agarosa al 1% que se había sometido a electroforesis. La extracción se realizó utilizando una columna Ultrafree-DA (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). El procedimiento empleado fue el siguiente: se cargaron en un gel de agarosa al 1%, 40 μ L de los ADNc amplificados (muestras núm. 1, 2, 5, 6) y 6 μ L de tampón de carga. Se realizó una electroforesis de 5 V/cm durante 1-2 horas en tampón TAE 1X, y tras la tinción del gel en una solución de 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio en TAE 1X durante 20 min en agitación suave, se visualizó en un transiluminador de luz UV a baja longitud de onda.

Una vez identificadas las bandas esperadas se recortaron del gel y se introdujeron en la parte superior de la columna Ultrafree-DA (figura 3.5). Tras una centrifugación a 5000 rpm durante 10 min, la agarosa quedó retenida por una membrana en la parte superior de los tubos, que fue desechada, recogiendo el ADN en la parte inferior.

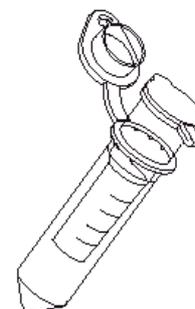


Figura 3.5. Columna Ultrafree-DA (Millipore) para recuperación de ADN de un gel de agarosa.

Para eliminar posibles restos de sustancias liposolubles se realizó un lavado del ADN purificado del gel con fenol y cloroformo isoamílico (24:1). Se añadió a cada

tubo un volumen de fenol saturado en tris, y se centrifugaron durante 5 min a 14000 rpm. A la fase acuosa se le añadió 1/2 volumen de fenol saturado en tris y 1/2 volumen de cloroformo isoamílico (24:1). La mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. A la fase acuosa se le adicionó 1/4 volumen de etanol 100% frío y 1/10 volumen de acetato de sodio 3M y se incubó la mezcla a -20°C durante 20 min. El precipitado obtenido después de centrifugar a 14000 rpm durante 10 min, se secó al aire y se resuspendió en 20 µL de agua. El ADNc purificado fue cuantificado realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1%, usando un marcador de peso molecular y controles de cantidad de ADN conocida.

3.1.4. Clonación del ADNc

3.1.4.1. Ligación del ADNc a un plásmido

El ADNc purificado se sometió a una reacción estándar de ligación utilizando el kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, USA). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron a un Eppendorf los siguientes reactivos: T4 ADN Ligase 1X Buffer, 3 U de T4 ADN Ligase, 50 ng de pGEM-T Easy Vector, 20-60 ng ADNc purificado, completando con agua bidestilada estéril hasta un volumen final de 10 µL. La mezcla se incubó a 4°C durante 18 horas. Después de la incubación se realizó una precipitación de la mezcla añadiendo 40 µL de agua bidestilada estéril y 500 µL de N-butanol. Tras centrifugación a 14000 rpm, a 4°C, durante 10 min, el precipitado obtenido fue secado al aire y se resuspendió en 4 µL de agua bidestilada estéril. Se almacenó a -20°C hasta su utilización.

3.1.4.2. Transformación de células de *Escherichia coli* por electroporación

Se añadieron 40 µL de células competentes, DH5α, de *E. coli* a 2 µL de reacción de ligación. La mezcla se incubó a 0°C durante 1 min y se traspasó a una cubeta de electroporación de 2 cm (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) preenfriada en hielo. Se dio un pulso con electroporador (Bio-Rad; Hércules, CA, USA) durante 4 milisegundos en las siguientes condiciones: resistencia 200 Ω, capacitancia 25 µF, voltaje 2,5 kV. Tras el pulso se añadieron 960 µL de medio de cultivo 2X YT pH 7,0 (1,6% bacto tryptona, 1% extracto de levadura, 0,5% NaCl), mezclándose cuidadosamente con la pipeta. La mezcla se traspasó a un tubo Eppendorf y se incubó a 37°C durante 1 hora a 200 rpm, en un incubador agitador Innova modelo 4000 (New Brunswick Scientific).

3.1.4.3. Selección de células transformantes

Tras la incubación, se sembraron tres volúmenes de cada muestra: 5 μ L, 50 μ L, 250 μ L, y se incubaron a 37°C en estufa durante 18 horas. La siembra se hizo en placas Petri con 20 mL de medio de cultivo sólido LB pH 7,0 (1% bacto tryptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, 1,5% bactoagar), al que se añadieron 2 μ g de ampicilina (antibiótico al que el plásmido pGEM-T Easy Vector es resistente), 4 μ L de 2% IPTG (SIGMA) y 40 μ L de 20% X-gal (SIGMA).

Del cultivo, se obtuvieron colonias de células no transformantes teñidas de azul, y colonias transformantes no teñidas. Se seleccionaron ocho colonias transformantes aisladas de cada placa, marcándolas por debajo de la placa con un número.

Se prepararon dos placas Petri por cada ocho colonias, con 20 mL de medio LB, 2 μ g de ampicilina, 4 μ L de 2% IPTG y 40 μ L de 20% X-gal, y se marcaron con un rotulador por la parte inferior dividiéndolas en cuadrantes. Trabajando bajo una cabina de flujo laminar, se flameó un asa de siembra, y tras esperar unos segundos a que se enfriara, se tocó con el extremo del asa una colonia transformante, no teñida. Después se extendieron las bacterias sobre uno de los cuadrantes de la nueva placa, pasando el extremo del asa en forma de zigzag, tal y como se muestra en la figura siguiente. Una vez sembradas las placas se incubaron en estufa a 37°C durante 18h.

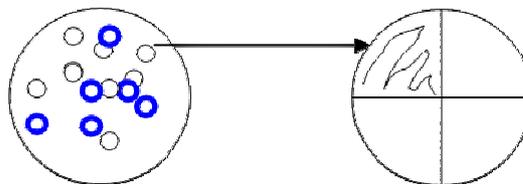


Figura 3.6. Esquema representativo de la siembra de colonias transformantes de *E.coli* en placa Petri.

3.1.5. Preparación de plásmidos: midi-preps

3.1.5.1. Cultivo para midi-prep

Se tomaron colonias aisladas de células transformantes del cultivo anterior y se sembraron en tubos de ensayo con 2 mL de medio líquido 2X YT al que se añadieron 2 μ g de ampicilina. Al mismo tiempo, se sembró una réplica de cada colonia en placas Petri con 20 mL de medio sólido LB, 2 μ g de ampicilina, 4 μ L de 2% IPTG y 40 μ L de 20% X-gal. Los tubos con el medio de cultivo líquido se incubaron en agitación a 37°C, a 200 rpm, durante 18 horas, en un incubador agitador Innova 4000. Las placas Petri con las colonias réplica se incubaron en estufa a 37°C, durante 18 horas, y posteriormente se guardaron a 4°C.

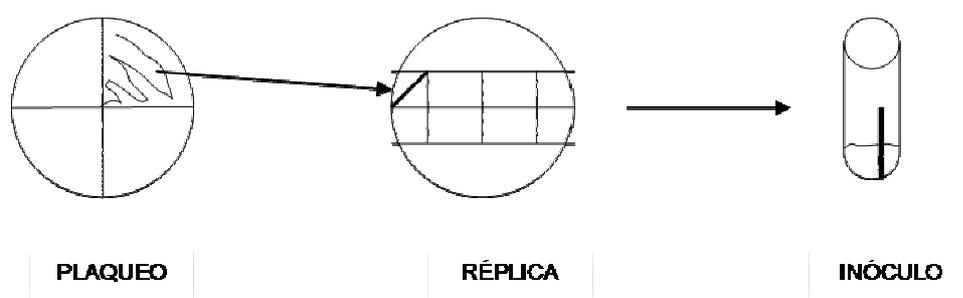


Figura 3.7. Esquema del proceso de producción de inóculo para la preparación de plásmidos a partir de colonias transformantes de *E. coli*.

3.1.5.2. Midi-preps

Para la preparación de plásmidos se usó el plasmid midi kit (100) de QIAGEN, que contenía: columnas QIAGEN-tip 100 (tubos con filtro de resina), Buffer P1, Buffer P2, Buffer P3, Buffer QBT, Buffer QC, Buffer QF, 100 mg/mL RNase A. Se siguieron las instrucciones del fabricante.

Trabajando bajo cabina de flujo laminar, del cultivo anterior se seleccionó el tubo con más cantidad de inóculo, y se diluyó en medio selectivo. En un matraz de 100 mL se añadieron 50 μ L del cultivo inicial, 25 mL de medio 2X YT y 25 μ L de 100 μ g/mL ampicilina. La mezcla se incubó a 37°C durante 12-16 horas a 200 rpm en el incubador agitador.

Se pasó el contenido del matraz a un tubo. Se cosecharon las células bacterianas por centrifugación a 6000 g durante 15 min a 4°C. Es importante la eliminación de todo el sobrenadante, por lo que tras volcar el tubo, se inclinó dejando el precipitado o *pellet* en la parte superior y con ayuda de una pipeta Pasteur se recogió todo el líquido. El precipitado cosechado se puede conservar a -20°C.

El precipitado bacteriano se resuspendió en 4 mL de buffer P1, utilizando un vórtex para evitar que quedasen grumos celulares. Luego se añadieron 4 mL de buffer P2 y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo entre cuatro y seis veces. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Después se añadieron 4 mL de buffer P3, preenfriado para favorecer la precipitación, se mezcló suavemente invirtiendo el tubo entre cuatro y seis veces, y se incubó en hielo durante 15 a 20 min. Transcurrido ese tiempo se mezcló de nuevo y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante con el ADN plasmídico, se recogió rápidamente.

Antes de que terminase la centrifugación, se equilibró una columna Qiagen-tip, añadiendo 4 mL de buffer QBT y se dejó que se vaciase por gravedad. Después se preparó la columna con una gasa sobre la que se vertió rápidamente el sobrenadante, antes de que comenzara a nublarse debido a la precipitación tardía de las proteínas. Una vez que el sobrenadante entró en la resina por gravedad, se lavó la columna con 10 mL de buffer QC, dos veces. El ADN retenido en la resina se eluyó con 5 mL de buffer QF, recogiendo la elución en un tubo Corex de 30 mL.

Para la precipitación del ADN, se añadió al tubo 3,5 mL de isopropanol y se mezcló bien. Tras incubar en hielo durante 5-10 min se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó con cuidado y el precipitado se lavó con 2 mL de 70 % etanol, volviendo a centrifugar durante 15 min a 10000 rpm. Nuevamente se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y el precipitado se dejó secar al aire durante 5-10 min. Una vez seco, se resuspendió en 400 µL de agua bidestilada estéril lavando bien las paredes del tubo y se pasó a un tubo Eppendorf.

Se volvió a precipitar añadiendo 2,5 volúmenes (900 μL) de 100% etanol frío y 40 μL de 3M acetato potásico. Se incubó durante 15-20 min a -20°C y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4°C . Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 800 μL de 70% etanol frío, centrifugando a 14000 rpm durante 10 min a 4°C . El precipitado se dejó secar al aire y se resuspendió en 100 μL de agua bidestilada estéril.

3.1.5.3. Cuantificación en gel de agarosa

La cuantificación se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en 1X TAE, tal y como se describe en el apartado 3.1.2.3. En el primer pocillo del gel se cargó 1 μL del marcador de peso molecular lambda, precalentado durante 10 min a 65°C , con 5 μL de agua bidestilada estéril y 1 μL de tampón de carga. En el pocillo número 2, se cargó 1 μL del ADN plasmídico de la midi-prep con 8 μL de agua bidestilada estéril y 1 μL de tampón de carga. En el pocillo número 3, se cargó 1 μL de una dilución 1/10 del ADN plasmídico, 8 μL de agua bidestilada estéril y 1 μL de tampón de carga. La cuantificación se realizó de forma estimada por comparación de intensidad de brillo de las bandas del marcador de peso molecular y del ADN plasmídico (figura 3.8).

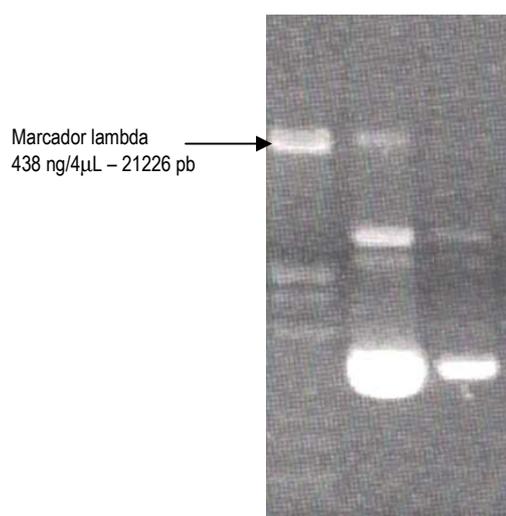


Figura 3.8. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa el resultado de la midi-prep. El carril 1 corresponde al marcador lambda, el carril 2 al ADN plasmídico resultante de la midi-prep y el 3 a una dilución 1:10 del mismo. Se estimó la concentración del ADN del plásmido en 250ng/ μL por comparación con la primera banda del marcador.

3.1.6. Liberación del ADNc inserto del plásmido

3.1.6.1. Digestión de la midi-prep

El objetivo de la digestión es liberar el ADNc inserto del plásmido. Para ello, se buscó una enzima que cortase en los dos sitios de restricción del plásmido pGEM-T Easy Vector, comprobando que no cortara el ADNc. La enzima seleccionada fue ECO RI (Boehringer Mannheim). El número de unidades de enzima necesarias se estimó en función de la cantidad de ADN a digerir. La digestión se realizó en un volumen final de 20 μ L, utilizando 300 ng de ADN procedente de la midi-prep, 15 U de ECO RI y 2 μ L de 10X Buffer H (Boehringer Mannheim). La mezcla se incubó en estufa a 37°C, durante un mínimo de 2 horas. Como control se realizó también la digestión del plásmido pBSK sin inserto.

3.1.6.2. Comprobación de la digestión: electroforesis en gel de agarosa

Una vez realizada la digestión se comprobó la liberación del inserto del plásmido mediante una electroforesis del ADN digerido en gel de agarosa al 1% en tampón 1X TAE.

3.1.7. Determinación de la orientación del ADNc en el plásmido mediante PCR

3.1.7.1. PCR del ADN plasmídico procedente de la midi-prep

Para la orientación del ADN inserto se utilizaron en la reacción PCR dos cebadores universales, de secuencias complementarias a la del plásmido a ambos lados del lugar de inserción (MA24 de secuencia 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' y, MA25 de secuencia 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') y los dos cebadores internos (MA172, MA173), que amplifican el ADNc inserto.

Se hicieron 4 combinaciones de cebadores, cada uno de los universales con cada uno de los internos, de modo que las combinaciones que amplificasen el fragmento de ADN esperado nos darían la orientación del inserto en el plásmido (figura 3.9).

La reacción PCR se realizó en 25 μ L de mezcla de reacción, en tubos Eppendorf de 200 μ L. Se usaron aproximadamente 25 ng de ADN plasmídico procedente de la midi-prep (1 μ L), a los que se añadieron el resto de reactivos cuya concentración final en la reacción fue la siguiente: 1X tampón de polimerasa Taq

(Bioline, Londres, UK), 1,5mM MgCl₂, 200μM dNTPs (Promega Corp., Madison, WI, USA), 2 ng/μL de cada par de cebadores y 5U de polimerasa Taq (Biotaq, BIOLINE). Además se incluyó un tubo como control negativo por cada pareja de cebadores, al que se adicionaron todos los componentes excepto ADN. La reacción se realizó en un termociclador modelo Gene Amp PCR System 9700 (PE Corp., Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 5 min, veinte ciclos consistentes en una desnaturalización a 94°C durante 30 s seguida del anillamiento de los cebadores a 50°C durante 30 s y de la polimerización del ADN a 72°C durante 30 s, y un ciclo final de polimerización a 72°C durante 7 min.

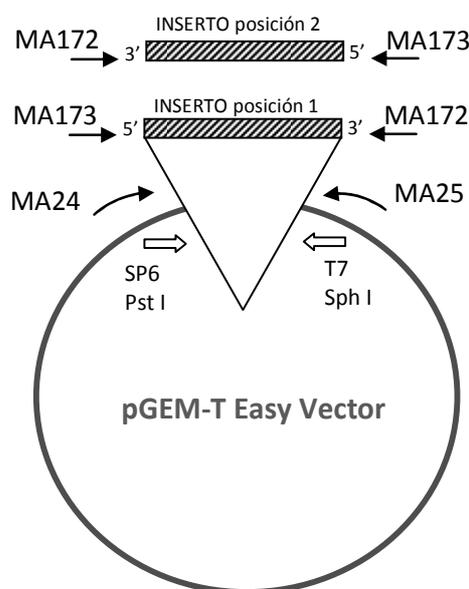


Figura 3.9. Representación esquemática de las posibles posiciones del inserto de ADNc en el plásmido pGEM-T Easy Vector.

En la tabla 3.2 se muestra un esquema con los reactivos, muestras y volúmenes empleadas en la amplificación.

Número tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Combinación de cebadores	MA25 MA172	MA25 MA173	MA24 MA172	MA24 MA173	MA25 MA172	MA25 MA173	MA24 MA172	MA24 MA173
sddH ₂ O	17	17	17	17	18	18	18	18
10Xtampón	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
50mM MgCl ₂	1	1	1	1	1	1	1	1
0,1 µg/µL cebador 1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
0,1 µg/µL cebador 2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
10mM dNTPs	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
5 U/µL Taq polimerasa	1	1	1	1	1	1	1	1
ADN plasmídico	1	1	1	1	0	0	0	0
Volumen total	25	25	25	25	25	25	25	25

Tabla 3.2. Volumen, en microlitros, de los reactivos empleados en la reacción PCR para la orientación del ADN inserto en el plásmido pGEM-T Easy Vector

3.1.7.2. Comprobación de la PCR: electroforesis en gel de agarosa

La comprobación de la PCR se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en 1X TAE. En el primer pocillo, se cargaron 5 µL del marcador de peso molecular 1Kb (Promega), junto con 5 µL de agua bidestilada estéril y 1 µL de tampón de carga. A continuación, en los pocillos siguientes se cargaron alícuotas de 10 µL cada uno de los productos de la PCR a las que se añadió previamente 1 µL de tampón de carga.

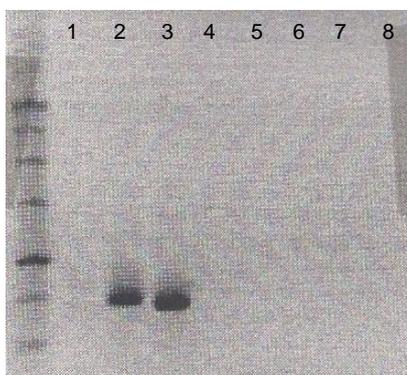


Figura 3.10. Gel de agarosa al 1% en el que se observa la amplificación del fragmento de unos 600 pb con los pares de cebadores MA25/MA173 y MA24/MA17, dando la orientación del inserto en el plásmido.

3.1.8. Linearización del ADN plasmídico

3.1.8.1. Digestión de la midi-prep

Conocida la orientación del inserto en el plásmido (posición 1, figura 3.9), se buscaron enzimas de restricción que cortasen en el lugar de inserción del mismo y que no cortasen el ADNc inserto, con el objetivo de linearizarlo. Se seleccionó la enzima Sph I (Pharmacia) para cortar en el extremo 5', y además la enzima Pst I (Roche) para cortar en 3', con el fin de preparar también una *antisonda* que se pudiera utilizar como control positivo en las hibridaciones.

La reacción de digestión se realizó en un volumen final de 100 μ L, utilizando 10 μ g de ADN plasmídico procedente de la midi-prep, 50 U de enzima de restricción y 10X tampón de la enzima correspondiente (10X OPA PLUS buffer para Sph I, y 10X buffer H para Spt I). En la tabla siguiente se muestra un esquema de los volúmenes, y reactivos utilizados.

Número del tubo	1	2
Preparación de:	Sonda	Antisonda
sddH ₂ O	71	81
10X OPA PLUS buffer	20	-
10 U/μL Sph I	5	-
10X buffer H	-	10
10 U/μL Pst I	-	5
ADN plasmídico	4	4
Volumen total	100	100

Tabla 3.3. Volumen, en microlitros, de los reactivos empleados en la reacción de digestión del ADN plasmídico procedente de la midi-prep.

Los tubos con la mezcla de reacción se incubaron en estufa a 37°C durante 5 horas. Después se añadieron a cada tubo 50 U más de la enzima correspondiente, mezclando bien con la pipeta, y se volvieron a colocar los tubos en la estufa a 37°C durante 12 a 16 h.

3.1.8.2. Comprobación de la digestión: electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón 1X TAE de las muestras digeridas, cargando en cada pocillo 5 μL de la digestión, 1 μL de tampón de carga y 4 μL de agua bidestilada. En el último pocillo se cargaron 5 μL del marcador de peso molecular 1kb, junto con 1 μL de tampón de carga y 4 μL de agua bidestilada.

3.1.8.3. Limpieza y precipitación del ADN linearizado

3.1.8.3.1. Extracción fenólica

Se añadieron 50 μL de fenol-tris y 50 μL de cloroformo isoamílico (24:1) al ADN linearizado en la digestión. Se agitó la mezcla en un vórtex y después se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se recogió la fase acuosa en un tubo Eppendorf nuevo, sin apurar demasiado para no arrastrar parte de la fase orgánica. Se añadieron 100 μL de agua bidestilada estéril a la fase orgánica, se mezcló bien en el vórtex y se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante 5 min. Se recogió la fase acuosa y se mezcló con la recogida anteriormente, obteniéndose un volumen total de unos 180 μL .

3.1.8.3.2. Extracción con cloroformo

Al volumen recogido en la fase anterior, se añadieron 180 μL de cloroformo puro, se mezcló bien en vórtex y se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm. Se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo, resultando un volumen de unos 115 μL .

3.1.8.3.3. Precipitación etanólica

Al volumen recogido en la etapa anterior se añadió 1/10 de volumen de 3M acetato sódico pH 5,5, y 2,5 volúmenes de 100% etanol frío. La mezcla se incubó a -20°C durante toda la noche. Después se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4°C . El precipitado se dejó secar al aire y posteriormente se resuspendió en 40 μL de agua bidestilada estéril.

3.1.8.4. Cuantificación del ADN linearizado: electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 1X TAE para la cuantificación aproximada del ADN linearizado por comparación con el ADN

plasmídico de cantidad conocida.

En el primer pocillo se cargaron 5 μL de marcador 1 kb, 1 μL de tampón de carga y 4 μL de agua bidestilada estéril. En el segundo pocillo se cargaron 2 μL del ADN linearizado con Sph I limpio, 1 μL de tampón de carga y 7 μL de agua bidestilada estéril. En el tercer pocillo se cargaron 2 μL del ADN linearizado con Pst I limpio, 1 μL de tampón de carga y 7 μL de agua bidestilada estéril. En el pocillo número 4 se cargó 1 μL de tampón de carga y 9 μL de una dilución 1:100 del ADN del plásmido sin digerir, ya cuantificado, lo que suponía unos 200 ng.

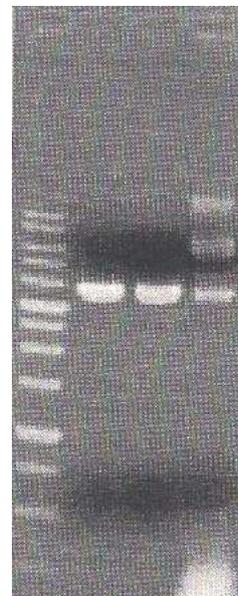


Figura 3.11. Gel de agarosa al 1% donde se muestra el ADN linearizado con Sph I y Pst I en los carriles 1 y 2, respectivamente, y el ADN plasmídico en el carril 3.

3.1.9. Conservación de colonias transformantes en glicerol

Dado que las colonias se pueden conservar en glicerol a -20°C , o mejor a -80°C durante varios años, se siguió el procedimiento siguiente para la constitución de un stock. Se cogió la placa réplica del cultivo para midi-prep con la colonia transformante número 2 (apartado 3.1.51). Trabajando bajo la cabina de flujo laminar, se preparó un tubo de ensayo con 3 mL de medio líquido 2X YT y 3 μL de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina. Con un palillo estéril tomamos la colonia transformante 2 y, a continuación, se introdujo el palillo en el tubo con el medio y el antibiótico. Una vez cerrado el tubo, se incubó a 37°C , a 200 rpm, durante 16 horas, en el incubador agitador (Innova 4000).

Trabajando bajo la cabina de flujo, se añadieron a un tubo Eppendorf 500 μL del cultivo saturado y 500 μL de glicerol puro estéril, mezclando bien con la pipeta.

Se prepararon dos tubos, uno para conservar a -20°C , y otro a -80°C . Se etiquetaron como: *Pep0,5glic*.

3.1.10. Síntesis y marcaje de la sonda de ARN de PepMV

3.1.10.1. Transcripción fría o *in vitro*

Antes de realizar la transcripción y marcaje de la sonda, se realizó una transcripción fría, es decir, sin marcaje. El objetivo fue comprobar el buen funcionamiento de la transcripción.

Para preparar la sonda de ARN, obteniendo un ARN complementario al ARN viral, se utilizaron 500 ng del ADN linearizado con Sph I y 42,9 U de la enzima SP6 ARN polimerasa (Pharmacia). Para la preparación de la *antisonda*, con el mismo ARN que el del virus, se utilizaron 500 ng del ADN linearizado con Pst I y 15 U de la enzima T7 ARN polimerasa (Promega).

La reacción se realizó en un volumen final de 20 μL . Los reactivos, y volúmenes utilizados se detallan en la tabla 3.4.

	Sonda	Antisonda
Número tubo	1	2
ADN linearizado con Sph I	4	-
ADN linearizado con Pst I	-	4
2,5 mM rNTPs	4	4
5X Buffer Transcriptase T7	4	4
429000 U/mL SP6 RNA polimerase	1	-
15 U/ μL T7 RNA polimerase	-	1
30 U/ μL RNAGuard-Rnase Inhibitor	0,5	0,5
0,1 M DTT (Gibco)	2	2
sddH ₂ O	4,5	4,5
Volumen total	20	20

Tabla 3.4. Volumen, en microlitros, de los reactivos empleados en la reacción de transcripción fría del ADN linearizado.

Los tubos se incubaron a 37°C durante 30 min en un baño de agua. Después se añadieron 0,5 µL de la enzima correspondiente a cada tubo (SP6 al tubo 1, y T7 al tubo 2), y se incubaron de nuevo a 37°C durante 45 min. A continuación se añadió a cada tubo 1 µL de 10 U/µL DNasa – RNase free (Boehringer), y se incubaron a 37°C en el baño durante 30 min. Pasado ese tiempo, se pasaron rápidamente a hielo para parar la reacción.

El ARN obtenido a partir del ADN linearizado con Pst I se conservó a –20°C para poder utilizarlo como control positivo en las hibridaciones, pues es similar al ARN viral.

3.1.10.2. Comprobación de la transcripción fría o *in vitro*

La comprobación de la transcripción se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en 1X TAE. Se cargó en el primer pocillo 1 µL del ARN viral de un carmovirus como control, junto con 1 µL de tampón de carga y 8 µL de agua bidestilada estéril. En los pocillos 2 y 3 se cargaron 5 µL de la transcripción con SP6 y T7, respectivamente, junto con 1 µL de tampón de carga y 4 µL de agua bidestilada estéril. En el pocillo 4, se cargó 1 µL de ADN linearizado con Sph I, junto con 1 µL de tampón de carga y 8 µL de agua bidestilada estéril.



Figura 3.12. Gel de agarosa al 1% donde se muestra en el carril 1 ARN viral, en los carriles 2 y 3 el resultado de la transcripción con SP6 y T7, respectivamente, y en el carril 4 el ADN linearizado.

3.1.10.3. Transcripción con UTP marcados con digoxigenina

En primer lugar, se preparó una mezcla de 20 µL de 2,5mM rNTP marcados con digoxigenina, añadiendo a un tubo Eppendorf, 5 µL de 10mM rATP (Promega),

5 μL de 10mM rCTP (Promega), 5 μL de 10mM rGTP (Promega), 3 μL de 10mM rUTP (Promega) y 2 5 μL de digoxigenin-11-UTP (Boehringer).

A continuación se preparó la mezcla de reacción de la transcripción de la misma manera que para la transcripción pero usando los rNTPs marcados, y en un volumen final de 100 μL . En este caso solo se transcribió y marcó el ADN linearizado con Sph I para la producción de sonda y se utilizaron 2,5 μg . Los volúmenes y reactivos utilizados se detallan en la tabla siguiente:

ADN linearizado con Sph I	20
2,5 mM rNTPs marcados con digoxigenina	20
5X Buffer Transcriptase T7 (Promega)	20
429000 U/mL SP6 RNA polimerase	5
30 U/ μl RNAGuard-Rnase Inhibitor (Pharmacia)	1,5
0,1 M DTT (Gibco)	10
sddH ₂ O	23,5
Volumen total	100

Tabla 3.5. Volumen, en microlitros, de los reactivos utilizados en la transcripción y marcaje del ADN linearizado con Sph I.

El tubo con la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min en un baño de agua. Después se añadieron 2,5 μL de la enzima SP6 ARN polimerasa, y se incubó de nuevo a 37°C durante 45 min. A continuación se le añadieron 5 μL de 10 U/ μl DNasa – RNase free (Boehringer), y se incubó a 37°C en el baño durante 30 min. Pasado ese tiempo, se pasó rápidamente a hielo para parar la reacción.

3.1.10.4. Precipitación de la sonda marcada

Se añadieron al ARN transcrito y marcado, 4 μL de 0,5M EDTA pH 8, 5 μl de 8M LiCl y 300 μL de 100% etanol frío. Se mezcló todo bien y se incubó a –20°C durante 3 h. A continuación, se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min, a 4°C. El precipitado se dejó secar al aire y después se resuspendió en 50 μL de agua

bidestilada estéril y 50 μL de formamida. La sonda así preparada se puede conservar a -20°C o -80°C durante varios años.

3.1.11. Cuantificación de la sonda

3.1.11.1. Preparación de una membrana con diluciones de la sonda

Se hicieron cinco diluciones seriadas de la sonda marcada. Se tomaron 5 tubos Eppendorf y se añadieron al primero, 8 μL de agua bidestilada estéril y 2 μL de sonda marcada, obteniendo la dilución 1:5. Al resto de tubos se añadieron 18 μL de agua bidestilada estéril, y al tubo número 2 se le añadieron 2 μL de la dilución 1:5, obteniendo la dilución 1:50; al tubo número 3 se le añadieron 2 μL de la dilución 1:50, y así sucesivamente hasta obtener la dilución 1:50000.

Se cortó un trozo de membrana de nylon cargada positivamente (Roche Diagnostic GmbH, Germany), y se marcó en ella una cuadrícula de 2 filas y 5 columnas. En la segunda fila se añadió a cada cuadro 1 μL de cada una de las diluciones de la sonda marcada. En la primera fila se añadió 1 μL de las diluciones seriadas de un control de ARN marcado (Roche) de concentración 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$. El esquema de la membrana se representa en la tabla siguiente.

	A	B	C	D	E
1	ARN control 1:5	ARN control 1:50	ARN control 1:500	ARN control 1:5000	ARN control 1:50000
2	Sonda 1:5	Sonda 1:50	Sonda 1:500	Sonda 1:5000	Sonda 1:50000

Tabla 3.6. Esquema de la membrana para la comprobación del marcaje y cuantificación de la sonda

Una vez que se secó la membrana, se fijaron los ácidos nucleicos mediante exposición a luz ultravioleta. Para ello se introdujo la membrana en un *crosslinker* y se sometió a una energía inicial de $700 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ que va disminuyendo durante 30 segundos hasta hacerse cero.

Las membranas así fijadas pueden conservarse indefinidamente a temperatura ambiente.

3.1.11.2. Detección quimio-luminescente

El procedimiento se basa en el protocolo descrito en el manual del DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (Roche).

La membrana se colocó en una bandeja con ayuda de unas pinzas y se cubrió con solución I (0,1M ácido maleico, 0,15M NaCl, pH 7), incubándose durante 1 min en agitación. Después, se eliminó la solución I y se añadió a la bandeja solución de lavado (0,3% Tween 20 en solución I), incubándose durante 5 min en agitación. Se eliminó la solución de lavado y nuevamente se incubó durante 1 min en solución I. A continuación, se eliminó la solución I y se añadió solución II (1% Blocking Reagent de Roche, en solución I) hasta cubrir la membrana, incubándose durante 30 min.

Antes de que terminase la incubación en solución II, se preparó una solución de anticuerpo Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments (Roche) en solución II en la proporción 1:20.000. El tubo que contenía el anticuerpo se centrifugó previamente a 5000 rpm durante 2 min.

Se eliminó la solución II de la bandeja y se añadió la solución con el anticuerpo, incubándose en agitación suave durante otros 30 min. Después se lavó la membrana cubriéndola con solución de lavado e incubándola durante 15 min en agitación dos veces. Seguidamente, se eliminó la solución de lavado y se realizó un nuevo lavado con solución I durante 1 min. Por último, se realizó el equilibrado de la membrana en solución III (0,1M Tris-HCl pH 9,5, 0,1M NaCl) en agitación, durante un mínimo de 5 min.

Se preparó la solución con el sustrato quimioluminescente CSPD (Roche) en solución III, en la proporción 1:100.

Se pasó la membrana a una funda de plástico y se le añadió la solución con el sustrato quimioluminescente a razón de 10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de membrana, distribuyéndolo uniformemente. Se incubó durante 5 min en oscuridad y después se retiró el exceso de sustrato pasando suavemente un papel sobre el plástico.

En una habitación oscura con luz roja, se introdujo la membrana en una carpeta o *cassette* (Sigma Aldrich), sobre ella se colocó una película autorradiográfica (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia), se cerró el *cassette* y se puso algo de peso encima para asegurar un buen contacto entre la membrana y la película. Pasados 15 min se reveló la película en la habitación oscura bajo luz roja. Para el revelado, se colocó la película en una bandeja y se cubrió con líquido revelador (Film Developer T-MAX, Kodak), y se agitó unos segundos hasta ver aparecer las señales. Después, se pasó la película a otra bandeja con agua y seguidamente a una tercera bandeja con líquido fijador (Rapid Fixer, Ilford), donde se incubó durante 3 min en agitación suave. Finalmente, se lavó la película con agua destilada y se dejó secar.

3.2. HIBRIDACIÓN MOLECULAR

La hibridación molecular de las membranas se realizó siguiendo el protocolo descrito en el manual del DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (Roche), con algunas modificaciones.

3.2.1. Preparación de las muestras

Para comprobar la especificidad de la sonda se prepararon dos membranas, una con extractos de ácidos nucleicos (membrana de condiciones) y otra con improntas de tejidos de plantas de tomate y de *N. benthamiana* con y sin síntomas de PepMV.

3.2.1.1. Membrana de condiciones

Se cortó un trozo de membrana de nylon cargada positivamente (Roche Diagnostic GmbH, Germany), y se marcó en ella una cuadrícula de 4 filas y 7 columnas. En cada fila se añadió en cada cuadro 1 μ L de 5 diluciones seriadas 1:10 del extracto de ARN total de las muestra PEP 1, PEP 2, ADN plasmídico con el inserto de PepMV, y el transcrito frío (sin marcar), respectivamente. En la última columna se añadió 1 μ L de ARN total de Nb2 y, Nb1, como controles negativos. El esquema de la membrana se representa en la tabla siguiente.

	1	2	3	4	5	6	7
A	ARN PEP 1	ARN PEP 1 1:10	ARN PEP 1 1:100	ARN PEP 1 1:1000	ARN PEP 1 1:10000		1 μ L ARN Nb 2
B	ARN PEP 2	ARN PEP 2 1:10	ARN PEP 2 1:100	ARN PEP 2 1:1000	ARN PEP 2 1:10000		1 μ L ARN Nb 2
C	ADN Plásmido	ADN Plásmido 1:10	ADN Plásmido 1:100	ADN Plásmido 1:1000	ADN Plásmido 1:10000		1 μ L ARN Nb 1
D	Tránsito frío	Tránsito frío 1:10	Tránsito frío 1:100	Tránsito frío 1:1000	Tránsito frío 1:10000		

Tabla 3.7. Esquema de la membrana de condiciones para la comprobar la especificidad de la sonda

Una vez que se secó la membrana, se fijaron los ácidos nucleicos mediante exposición a luz ultravioleta en un *crosslinker* durante 30 segundos.

3.2.1.2. Preparación de una membrana de muestras

Se cortó un trozo de membrana de nylon cargada positivamente, y se marcó en ella una cuadrícula de 2 filas y 5 columnas. En cada cuadro se realizaron improntas de peciolo: 4 muestras de tomate con síntomas de PepMV, una muestra de *N. benthamiana* con PepMV, una de tomate sin PepMV y otra de *N. benthamiana* sana. Además se usó como control positivo 1 μ L de tránsito frío y una dilución 1:100 del mismo, y como control negativo 1 μ L de ARN total de la muestra Nb 2. En la tabla 3.8 se muestra un esquema.

	A	B	C	D	E
1	Tomate 1 +	Tomate 2 +	Tomate 3 +	Tomate 4 +	Tránsito frío +
2	<i>N. bentham</i> +	Tomate 5 -	<i>N. bentham</i> -	ARN <i>N. bentham</i> -	Tránsito frío 1:100 +

Tabla 3.8. Esquema de la membrana de muestras para la comprobar la especificidad de la sonda

Una vez que se secó la membrana, se fijaron los ácidos nucleicos mediante exposición a luz ultravioleta en un *crosslinker* durante 30 segundos.

3.2.2. Prehibridación de las membranas

Se introdujo cada membrana en un tubo cilíndrico de vidrio y cierre de rosca, con ayuda de unas pinzas. Se añadieron a cada tubo 20 mL de solución estándar

precalentada a 65°C: 5XSSC (0,75M NaCl, 75mM sodium citrate, pH 7), 0,1% N-laurilsarcosina, 50% formamida, 0,02% SDS, 2% Blocking Reagent (Roche). Se incubaron los tubos en un horno de hibridación (Hybridisation oven/shaker, Stuart Scientific, Bibby Sterilin) a 65°C en rotación, durante un mínimo de dos horas.

3.2.3. Hibridación de las membranas con la sonda de PepMV

Se preparó la solución de hibridación añadiendo 20 µL de la sonda de PepMV a 20 mL de solución estándar preparada nueva, y se incubó la mezcla a 65°C durante 5-10 min en baño de agua. Se preparó una para cada tubo de hibridación.

Tras eliminar la solución de prehibridación de los tubos con las membranas, se añadió la solución de hibridación y se incubaron en rotación a 65°C durante toda la noche.

3.2.4. Lavados post-hibridación

Se recogieron las sondas en tubos tipo Falcon y se guardaron a -20°C para su posterior reutilización.

Se añadió a los tubos una solución de 20 mL de 2X SSC, 0,1% SDS, y se incubaron en rotación en el horno de hibridación, a temperatura ambiente, durante 10 min. A continuación, y tras eliminar la solución de los tubos, se añadieron 20 mL de una solución de 0,1X SSC, 0,1% SDS precalentada a 65°C, incubándose durante 15 min, dos veces, cambiando dicha solución.

3.2.5. Detección quimioluminescente

Tras vaciar los tubos, se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.1.11.2.

3.3. SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DEL PepMV EN CULTIVOS DE TOMATE DE LA REGIÓN

Se realizó un seguimiento de la incidencia y evolución del PepMV en cultivos de tomate de la Región durante dos ciclos de cultivo consecutivos, el ciclo de verano de 2001 y el ciclo de otoño-invierno de 2001-2002.

3.3.1. Parcelas

3.3.1.1. Ciclo de verano 2001

Se eligieron 2 parcelas al aire libre (P1, P2), y 4 bajo malla (P3 a P6) para los muestreos periódicos. A lo largo del ciclo, también fueron muestreadas de forma puntual 12 parcelas de cultivos al aire libre y 7 bajo malla (Pr1 a Pr19). En la tabla 3.9 se muestran las características de estas parcelas.

	Variedad	Tipo de cultivo	Fecha plantación	Zona	Finca
P1	Ulises	Aire libre	20-jun-2001	La Atalaya	Fulgencio Dávila
P2	Boludo	Aire libre	5-jul-2001	Cañada de Gallego	Méndez
P3	Boludo	Malla	jul-2001	La Atalaya	Vivancos
P4	10.006	Malla	jul-2001	El Alamillo	Durán
P5	10.006 y 10.010	Malla	15-jul-2001	Mazarrón	Durán
P6	Tipo Cherry	Malla	jul-2001	Puerto Mazarrón	Prodema
Pr1	Resistente a TY	Malla	30-may-01	La Cañada	Durán
Pr2	Jasmine	Malla	Desconocida	Mazarrón	Sebastián Picó
Pr3	Tomate industria	Aire libre	Desconocida	Cazadores	-
Pr4	Campala	Aire libre	10-jul-01	Puerto Mazarrón	-
Pr5	Desconocida	Aire libre	Desconocida	Leiva	-
Pr6	Durinta	Aire libre	08-jul-01	La Atalaya	-
Pr7	Desconocida	Aire libre	30-jun-01	Puerto Mazarrón	Valdomero Nuevo –
Pr8	Campala	Malla	Desconocida	Isla Plana	Paloma
Pr9	Boludo	Malla	Desconocida	El Alamillo	-
Pr10	Pitenza	Aire libre	Desconocida	Mazarrón	-
Pr11	Durinta	Aire libre	Desconocida	Próxima a Fulgencio	-
Pr12	Big tomato	Malla	30-ago-01	Puerto Mazarrón	Prodema
Pr13	Boludo	Malla	Desconocida	La Atalaya	Vivancos
Pr14	Durinta, Boludo, Tiwai	Aire libre	28-jun-01	Ramonete	-
Pr15	Campala	Malla	sep-01	Puerto Mazarrón	Prodema
Pr16	Boludo, 10.010	Aire libre	20-jul-01	Ramonete	Agrimur
Pr17	Boludo	Aire libre	Desconocida	Ramonete	Los Gálvez
Pr18	¿Boludo?	Aire libre	Desconocida	Mazarrón	Rincones
Pr19	Boludo	Aire libre	Desconocida	Mazarrón	Coexma-Rodríguez

Tabla 3.9. Características de las parcelas muestreadas durante el ciclo de verano de 2001.

3.3.1.2. Ciclo de otoño-invierno 2001-2002

Se siguieron 9 invernaderos, 5 de los cuales pertenecían al término municipal de Lorca (Inv.1 a Inv.5), y los restantes al término municipal de Mazarrón (Inv.6 a Inv. 9). En la tabla 3.10 se detallan las características de estos invernaderos.

Los invernaderos 4 y 5, situados uno junto al otro, eran invernaderos experimentales, en los que se ensayaban diferentes portainjertos con la misma variedad y, diferentes variedades sobre el mismo patrón, respectivamente.

	Variedad/Patrón	Tipo de cultivo	Fecha plantación	Zona	Finca
Inv 1	10006/Heman y 10006	Invernadero	19-sep-2001	Ramonete	El Calar - Durán
Inv 2	Vicar/Beaufort y Vicar	Invernadero	25-sep-2001	Ramonete	Coara
Inv 3	Boludo	Invernadero	26-sep-2001	Ramonete	Suetos
Inv 4	El Diez sobre Heman, Trifort, Popeye, Beaufort, Brigeor, Maxiforts	Invernadero	3-nov-2001	Ramonete	Coara Experimental I
Inv 5	10003, Rex, 72/00, Silver, Boludo, El Diez Kampala y Poker sobre Heman	Invernadero	3-nov-2001	Ramonete	Coara Experimental II
Inv 6	Daniela/Heman y Daniela	Invernadero	26-dic-2001	La Atalaya	Vivancos
Inv 7	Boludo/Heman y Daniela	Invernadero	oct-2001	Mazarrón	Rodríguez
Inv 8	Daniela/Heman, Boludo en las bandas y Daniela	Invernadero	15-oct-2001	Mazarrón	Rincones
Inv 9	10006 injertada	Invernadero	oct-2001	Mazarrón	Durán

Tabla 3.10. Características de las parcelas muestreadas en el ciclo de otoño-invierno de 2001-2002.

3.3.2. Muestreos

3.3.2.1. Ciclo de verano 2001

El ciclo de verano comprende los meses de julio a noviembre, variando las fechas de inicio y final de cultivo de unas parcelas a otras (tabla 3.9). Los muestreos se realizaron cada dos semanas desde el comienzo del cultivo hasta que éste se dio por concluido.

Al principio del cultivo se marcaron en cada parcela, un mínimo de cuatro dobles filas de plantas, separadas entre sí por otras 5 ó 10 filas. Dentro de cada doble fila se marcaron varios tramos, separados por un pasillo de servicio. La primera de las filas marcadas se tomó al azar o en el punto más próximo al lugar de acceso a la parcela, dejando al menos dos filas en el borde de la parcela, para evitar la influencia del “efecto borde”.

En cada muestreo se tomaron muestras de forma aleatoria dentro de las filas control marcadas, de forma que se cubrieran las distintas zonas del invernadero evitando los bordes.

3.3.2.2. Ciclo de otoño-invierno 2001-2002

En los invernaderos del ciclo de otoño-invierno los muestreos se realizaron de forma similar al ciclo anterior, pero diferenciando, en este caso, filas de plantas injertadas y no injertadas.

Además de las plantas de tomate, también se muestrearon diferentes especies de malas hierbas asociadas a los cultivos en algunas parcelas.

3.3.3. Preparación de las muestras

Las muestras fueron preparadas *in situ* mediante la impronta de peciolo de hojas de tomate sobre una membrana de nylon positivamente cargada (Roche), tal y como se describe en el apartado 3.2.1.2.

A continuación, las membranas con las muestras se transportaban al laboratorio donde se añadían controles positivos y negativos de PepMV; normalmente, 1µL de un extracto de ARN de plantas con PepMV como control positivo, y de plantas de tomate sanas como control negativo. Las membranas se dejaban secar al aire unos minutos y, posteriormente, se fijaban con luz ultravioleta usando un *crosslinker*, durante 30 segundos.

3.3.4. Análisis de las muestras

Las muestras se analizaron por el método de hibridación molecular siguiendo el protocolo descrito en los apartados 3.2.2 a 3.2.5.

En el anejo 2 se muestran los esquemas de las membranas correspondientes a cada muestreo, así como los resultados de su hibridación con la sonda de PepMV.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SÍNTESIS DE UNA SONDA DE ARN PARA EL DIAGNÓSTICO DE PepMV

En la figura 4.1 se muestra el resultado de la detección quimioluminescente de la membrana preparada para la comprobación del marcaje de la sonda y su cuantificación.

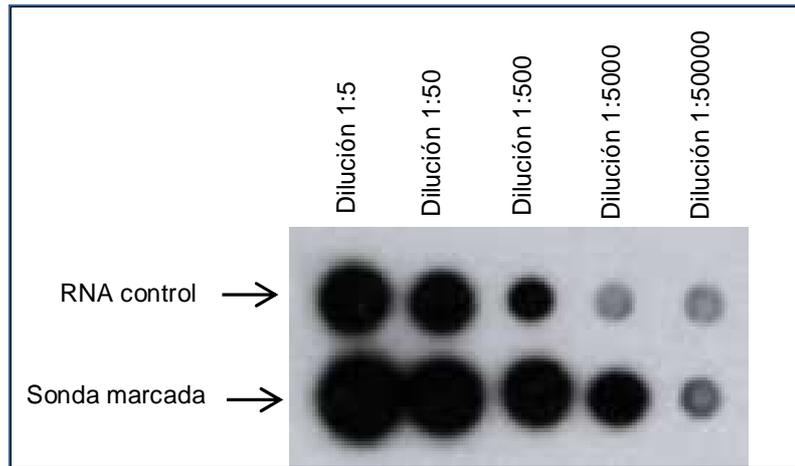


Figura 4.1. Cuantificación de la sonda marcada de PepMV mediante detección quimioluminescente.

Comparando la intensidad de las señales de la sonda y del ARN control de concentración $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$, se estimó que la dilución 1:500 de la sonda era de intensidad similar a la dilución 1:5 del ARN control. Es decir, la sonda estaba 100 veces más concentrada que el ARN, siendo su concentración estimada de $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

La especificidad de la sonda se realizó mediante la hibridación molecular de la membrana de condiciones, cuyo resultado se muestra en la figura 4.2.

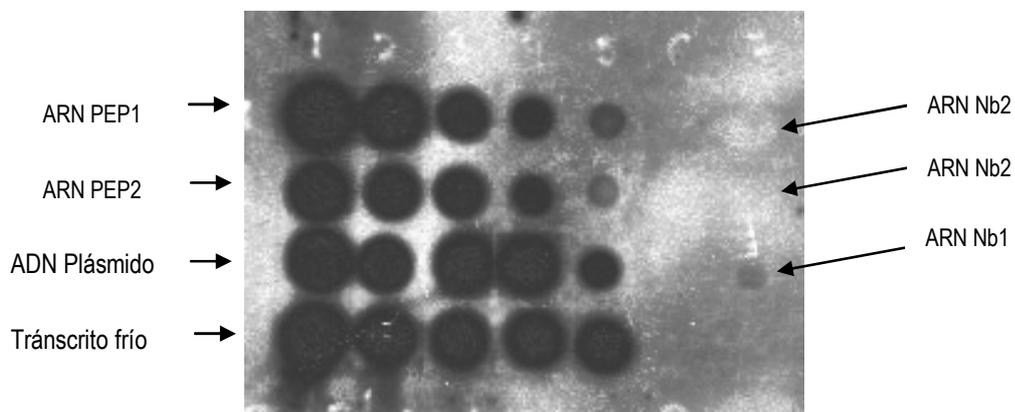


Figura 4.2. Hibridación de la membrana de condiciones para determinar la especificidad de la sonda.

La sonda es específica pues hibrida con las muestras de ARN de plantas de tomate y *Nicotiana* infectadas con PepMV, así como con el ADN del plásmido con el ADN inserto y el transcrito frío, de secuencia similar a la de PepMV, y no hibrida con las muestras de ARN de planta sana (ARN Nb2).

4.2. HIBRIDACIÓN MOLECULAR

El resultado de la hibridación molecular de la sonda con improntas de tejidos infectados sobre membranas de nylon se muestra en la figura 4.3.

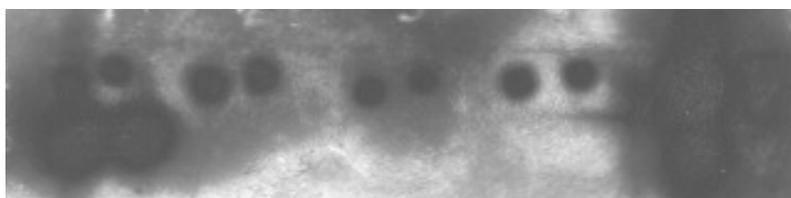


Figura 4.3. Hibridación molecular de una membrana de muestras de tomate y de *N. benthamiana* infectadas de PepMV.

Sólo las muestras infectadas de PepMV dieron un resultado positivo tras 10 minutos de exposición de la película autorradiográfica, así como el transcrito frío usado como control positivo, que dio una señal muy fuerte, lo que indicó que la sonda estaba muy concentrada. También la muestra de *N. benthamiana* infectada dio una señal muy intensa.

4.3. SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE PepMV EN CULTIVOS DE TOMATE DE LA REGIÓN

4.3.1. Ciclo de verano 2001

4.3.1.1. Parcelas de seguimiento

En los cultivos al aire libre (P1, P2), la incidencia de PepMV fue prácticamente nula en los meses de verano. Al final del cultivo, cuando empiezan a bajar las temperaturas y se acortan los días, empezaron a aparecer las primeras infecciones de PepMV.

En la parcela P1, situada en la zona de La Atalaya, se encontraron las

primeras infecciones de PepMV a principios de octubre, manteniéndose en un nivel por debajo del 20%.

En la parcela P2, situada en la zona de Cañada de Gallego, sólo se encontró un 10% de plantas afectadas en el mes de julio, y no aumentó la incidencia del PepMV hasta el mes de septiembre, encontrándose al final del cultivo un 88% de plantas afectadas.

Fecha de muestreo	P1			P2		
	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
11-jul-01	7	0	0	-	-	-
26-jul-01	48	0	0	20	0	0
07-ago-01	10	0	0	10	0	0
21-ago-01	10	0	0	10	0	0
05-sep-01	15	0	0	23	8	35
21-sep-01	10	0	0	28	11	39
03-oct-01	20	4	20	20	6	30
17-oct-01	20	1	5	19	6	32
31-oct-01	10	1	10	-	-	-
07-nov-01	-	-	-	24	21	88

Tabla 4.1. Resultados de los muestreos y análisis por hibridación molecular para detección de PepMV en las parcelas de cultivo al aire libre P1 y P2

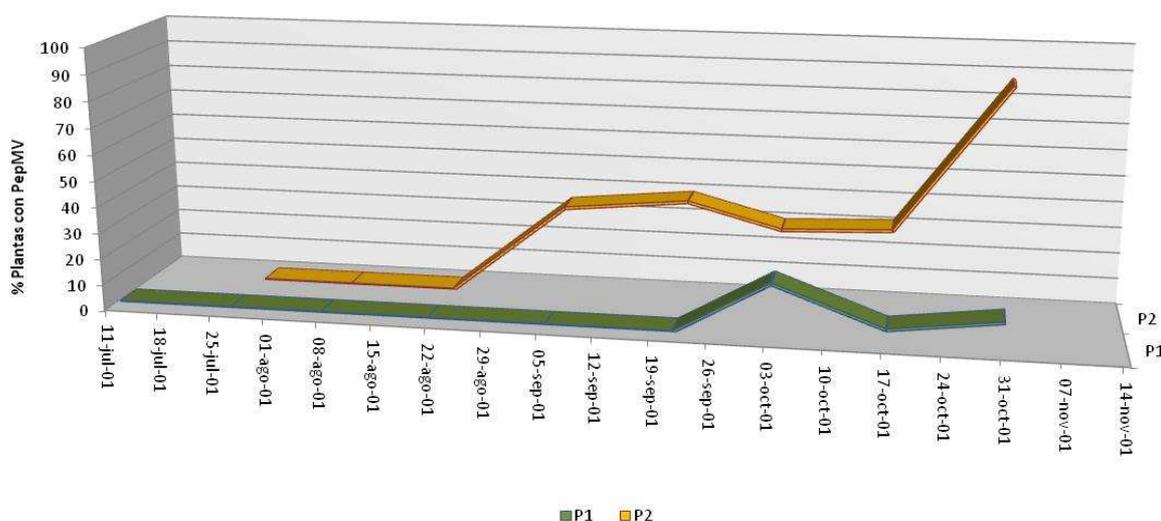


Gráfico 4.1. Evolución de la incidencia de PepMV en las parcelas de cultivo al aire libre, P1 y P2, del ciclo de verano de 2001.

En los cultivos bajo malla (P3, P4, P5, P6), la incidencia de PepMV fue variable según las parcelas, pero al igual que en los cultivos al aire libre, aumentó en los meses finales del ciclo.

Como se muestra en la tabla 4.2, la parcela P3, situada en la zona de La Atalaya, se mostró libre de PepMV durante todo el ciclo de cultivo. De forma similar, la parcela P4, situada en la zona costera del Alamillo, se mantuvo prácticamente libre de la enfermedad, solamente en un muestreo durante el mes de septiembre se encontraron 2 plantas de 20 analizadas con PepMV.

Fecha de muestreo	P3			Fecha de muestreo	P4		
	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV		Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
07-ago-01	10	0	0	11-jul-01	40	0	0
21-ago-01	10	0	0	01-ago-01	10	0	0
05-sep-01	22	0	0	16-ago-01	9	0	0
21-sep-01	10	0	0	29-ago-01	10	0	0
03-oct-01	20	0	0	14-sep-01	20	2	10
17-oct-01	20	0	0	27-sep-01	21	0	0
31-oct-01	20	0	0	10-oct-01	20	0	0
07-nov-01	16	0	0	24-oct-01	20	0	0

Tabla 4.2. Resultados de los muestreos y análisis por hibridación molecular para la detección de PepMV de las parcelas P3 y P4, con cultivo bajo malla.

En las parcelas P5 y P6, situadas cerca del pueblo de Mazarrón, la incidencia de PepMV fue mayor, manifestándose desde mediados de agosto en la parcela P5 y llegando a un 90% al final del cultivo, y manteniéndose en torno a un 15% en la parcela P6 durante octubre y noviembre (tabla 4.3).

Fecha de muestreo	P5			P6		
	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
01-ago-01	10	0	0	10	0	0
16-ago-01	10	1	10	11	0	0
29-ago-01	12	3	25	10	0	0
14-sep-01	35	9	26	40	0	0
27-sep-01	20	1	5	37	0	0
10-oct-01	18	6	33	20	3	15
24-oct-01	20	7	35	20	0	0
07-nov-01	10	9	90	20	2	10
21-nov-01	-	-	-	24	3	13

Tabla 4.3. Resultados de los muestreos y análisis por hibridación molecular para la detección de PepMV de las parcelas P5 y P6, con cultivo bajo malla.

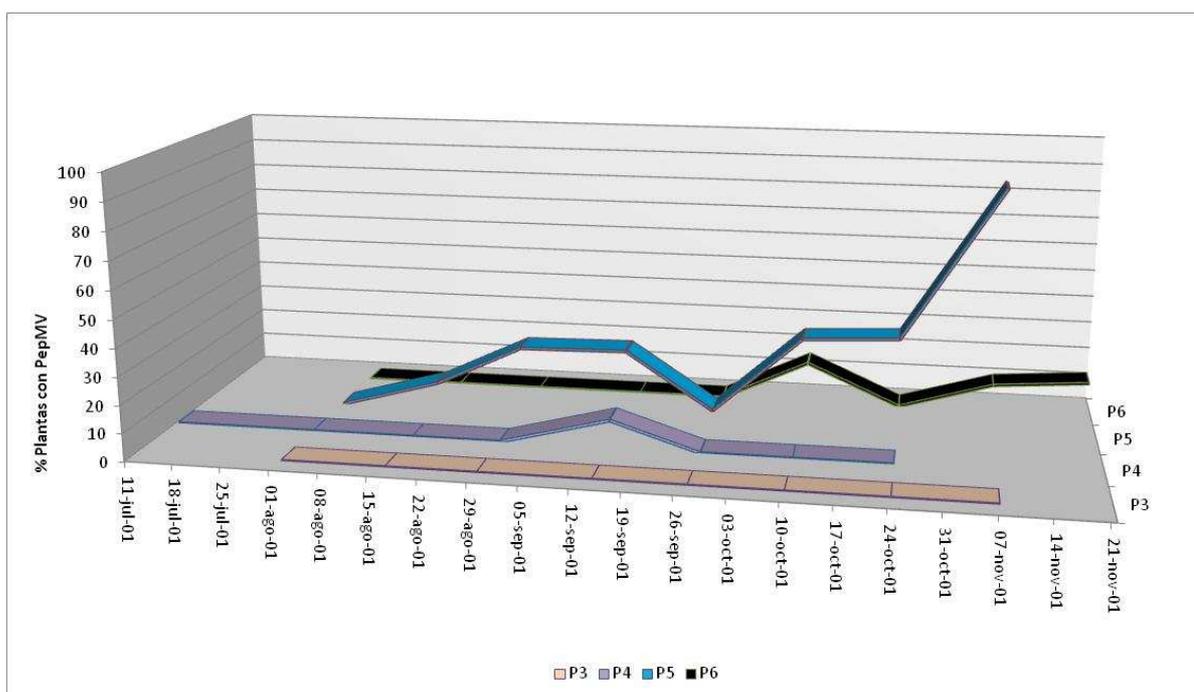


Gráfico 4.2. Evolución de la incidencia de PepMV en las parcelas de cultivo bajo malla, P3, P4, P5 y P6, durante el ciclo de verano de 2001.

4.3.1.2. Prospecciones

En las parcelas con cultivo al aire libre, de las muestreadas, sólo se detectó el virus en 3 de ellas, en los meses de setiembre y octubre, con un nivel de infección que no superó el 30%.

En las parcelas con cultivo bajo malla, de las 7 muestreadas se encontró PepMV en 3 de ellas, en los meses de julio y octubre, también con un bajo nivel de infección que no superó el 35% (tabla 4.4).

Parcela	Tipo de cultivo	Fecha muestreo	Plantas analizadas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
Pr 1	Malla	11-jul-01	40	8	20
Pr 2	Malla	26-jul-01	20	7	35
Pr 3	Aire libre	26-jul-01	12	0	0
Pr 4	Aire libre	01-ago-01	45	0	0
Pr 5	Aire libre	07-ago-01	40	0	0
Pr 6	Aire libre	21-ago-01	40	0	0
Pr 7	Aire libre	29-ago-01	38	0	0
Pr 8	Malla	12-sep-01	25	0	0
Pr 9	Malla	12-sep-01	20	0	0
Pr 10	Aire libre	12-sep-01	50	13	26
Pr 11	Aire libe	21-sep-01	10	0	0
Pr 12	Malla	26-sep-01	35	0	0
Pr 13	Malla	03-oct-01	30	5	17
Pr 14	Aire libre	03-oct-01	40	0	0
Pr 15	Malla	10-oct-01	50	0	0
Pr 16	Aire libre	17-oct-01	40	0	0
Pr 17	Aire libre	17-oct-01	40	2	5
Pr 18	Aire libre	24-oct-01	40	11	28
Pr 19	Aire libre	05-dic-01	40	0	0

Tabla 4.4. Resultados de las prospecciones realizadas de julio a diciembre de 2001.

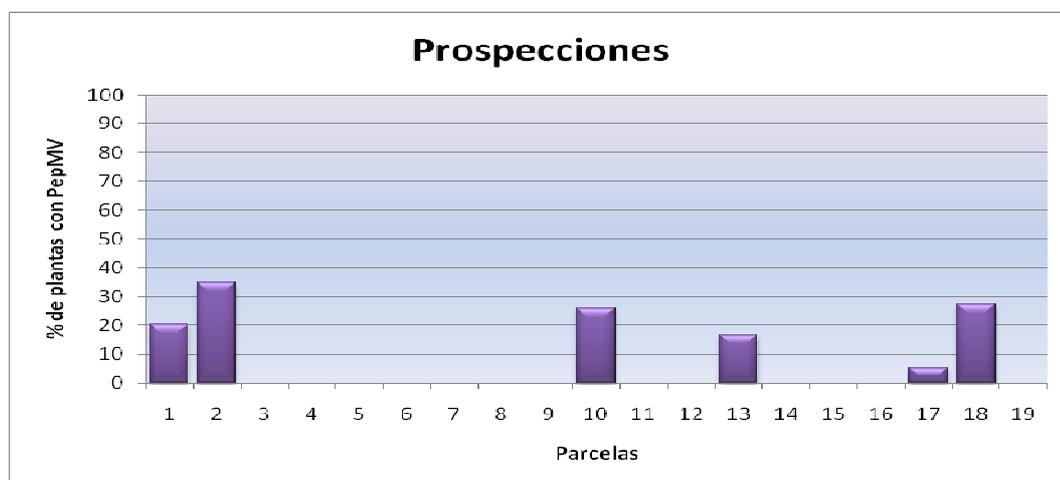


Gráfico 4.3. Incidencia de PepMV en diferentes parcelas prospectadas durante el ciclo de verano de 2001 en diferentes zonas de Mazarrón y Lorca.

4.3.1.3. Análisis de las malas hierbas asociadas a los cultivos

Al final del ciclo de cultivo, entre octubre y noviembre, se analizaron las diferentes especies de malas hierbas asociadas a los cultivos de las parcelas de seguimiento, así como de las prospecciones Pr18 y Pr19 llevadas a cabo al final de dicho periodo.

En la tabla 4.5 se muestra una lista de las especies analizadas y las parcelas en las que se encontraron, así como el resultado de la hibridación molecular. Se detectó PepMV en las especies *Amaranthus blitoides*, *Conyza bonariensis*, *Chenopodium album*, *Malva parviflora*, *Oxalis sp.*, *Sisymbrium irio* y *Sonchus oleraceus*.

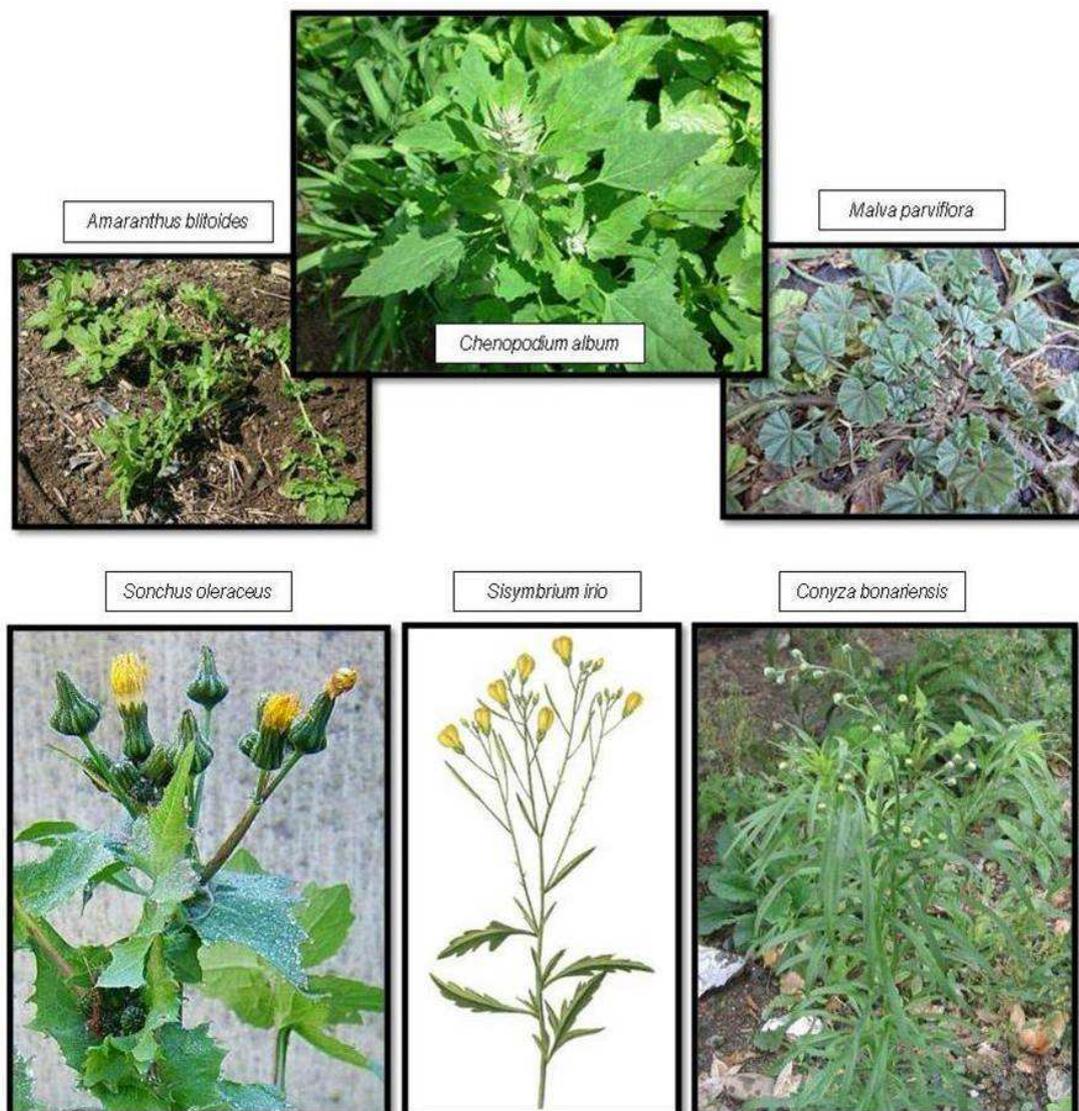


Figura 4.4. Especies de malas hierbas asociadas a los cultivos en las que se ha detectado PepMV.

Fuente: <http://commons.wikimedia.org>.

Especie	Parcela	Plantas analizadas	Plantas con PepMV	% plantas con PepMV
<i>Amaranthus blitoides</i>	P1	3	3	100
<i>Amaranthus blitoides</i>	P2	2	2	100
<i>Amaranthus blitoides</i>	P4	2	0	0
<i>Amaranthus blitoides</i>	P6	13	0	0
<i>Conyza bonariensis</i>	P1	2	0	0
<i>Conyza bonariensis</i>	P4	3	1	33
<i>Conyza bonariensis</i>	Pr19	3	0	0
<i>Chenopodium album</i>	P1	8	0	0
<i>Chenopodium album</i>	P4	1	0	0
<i>Chenopodium album</i>	P6	25	1	4
<i>Chenopodium album</i>	P4	1	1	100
<i>Chenopodium album</i>	Pr19	2	0	0
<i>Diplotaxis erucoides</i>	P1	1	0	0
<i>Cyperus rotundus</i> (Juncia)	Pr19	1	0	0
<i>Malva parviflora</i>	P1	7	1	14
<i>Malva parviflora</i>	P2	1	1	100
<i>Malva parviflora</i>	P4	16	2	13
<i>Malva parviflora</i>	Pr18	3	0	0
<i>Malva parviflora</i>	Pr19	4	0	0
<i>Moricandia arvensis</i>	Pr19	1	0	0
<i>Nicotiana sp.</i>	P2	2	0	0
<i>Oxalis sp.</i>	Pr19	6	5	83
<i>Sisymbrium irio</i>	P1	2	2	100
<i>Sisymbrium irio</i>	Pr19	1	0	0
<i>Solanum nigrum</i>	P1	6	0	0
<i>Solanum nigrum</i>	P2	2	0	0
<i>Solanum nigrum</i>	P4	1	0	0
<i>Solanum nigrum</i>	Pr18	7	0	0
<i>Sonchus oleraceus</i>	P1	1	1	100
<i>Sonchus oleraceus</i>	P4	6	2	33
<i>Sonchus oleraceus</i>	P6	6	3	50
<i>Sonchus oleraceus</i>	P4	8	0	0
<i>Sonchus oleraceus</i>	Pr19	1	0	0
Tomate	P1	2	0	0
Tomate	P2	2	0	0
Verdolaga	P6	1	0	0

Tabla 4.5. Resultados del análisis para la detección de PepMV en especies de malas hierbas asociadas a los cultivos al final del ciclo de verano de 2001.

4.3.2. Ciclo de otoño-invierno 2001-2002

4.3.2.1. Invernadero 1

Según se muestra en la tabla 4.6, el virus estuvo presente desde el principio del cultivo. A las dos semanas del trasplante se realizó el primer muestreo de plantas de la variedad 10006 injertadas sobre Heman, encontrándose un 60% de plantas con virus. A finales de octubre ya se había extendido casi por completo en las plantas injertadas y afectaba a un 55% de las plantas de la variedad 10006 no injertadas.

Fecha de muestreo	Plantas injertadas			Plantas no injertadas		
	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
03-oct-01	20	12	60	-	-	-
31-oct-01	20	19	95	20	11	55
14-nov-01	13	13	100	11	10	91
28-nov-01	23	15	65	23	19	83
12-dic-01	20	13	52	20	17	85
26-dic-01	20	20	100	20	20	100
09-ene-02	25	25	100	25	24	96
23-ene-02	20	20	100	20	20	100
06-feb-02	15	15	100	15	15	100
20-feb-02	20	17	85	20	19	95
07-mar-02	22	20	91	24	18	75
21-mar-02	20	19	95	20	19	95
18-abr-02	20	20	100	20	20	100

Tabla 4.6. Incidencia de PepMV en el invernadero 1.

4.3.2.2. Invernadero 2

El virus aparece a finales de noviembre en plantas sin injertar, dos meses después de la plantación, llegando a afectar a la totalidad de plantas injertadas en enero, y dos meses después a la totalidad de las plantas no injertadas. Los resultados de los análisis se muestran en la tabla 4.7.

4.3.2.3. Invernadero 3

En la tabla 4.8 se muestra la incidencia de PepMV en el invernadero 3. El virus apareció un mes después de la plantación, a mitad de noviembre en plantas no

injertadas y a finales de ese mes en plantas injertadas, afectando prácticamente a la totalidad del cultivo al cabo de un mes.

Fecha de muestreo	Plantas injertadas			Plantas no injertadas		
	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
03-oct-01	16	0	0	0	-	-
17-oct-01	20	0	0	20	0	0
31-oct-01	10	0	0	10	0	0
14-nov-01	10	0	0	11	0	0
28-nov-01	20	0	0	20	2	10
12-dic-01	20	13	65	20	13	65
26-dic-01	20	14	70	20	14	70
09-ene-02	20	20	100	20	20	100
23-ene-02	20	20	100	20	18	90
06-feb-02	20	20	100	20	18	90
20-feb-02	20	19	95	20	19	95
07-mar-02	20	15	75	20	20	100
21-mar-02	20	20	100	20	16	80
04-abr-02	22	22	100	23	23	100
18-abr-02	21	21	100	21	21	100
02-may-02	20	19	95	20	20	100
16-may-02	21	21	100	21	21	100
30-may-02	20	20	100	20	20	100

Tabla 4.7. Incidencia de PepMV en el invernadero 2.

4.3.2.4. *Invernaderos experimentales 4 y 5*

El invernadero 4 era un ensayo de portainjertos con la misma variedad, y el virus apareció antes que en el invernadero 5, extendiéndose rápidamente al resto del cultivo, con un 100% de plantas afectadas a finales de enero.

En el invernadero 5, ensayo de variedades sobre el mismo portainjertos, el virus apareció un mes más tarde, y se fue extendiendo progresivamente al resto del cultivo llegando a afectar al 100% de plantas después de tres meses, a finales de marzo.

Fecha de muestreo	Plantas injertadas			Plantas no injertadas		
	N° Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV	N° Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
17-oct-01	8	0	0	10	0	0
31-oct-01	10	0	0	10	0	0
14-nov-01	10	0	0	12	3	25
28-nov-01	20	5	25	20	10	50
12-dic-01	20	9	45	20	7	35
26-dic-01	20	20	100	20	19	95
09-ene-02	20	20	100	20	20	100
23-ene-02	20	20	100	20	19	95
06-feb-02	15	15	100	15	14	93
20-feb-02	20	17	85	20	18	90
07-mar-02	25	15	60	30	19	63
21-mar-02	20	13	65	20	14	70
04-abr-02	15	15	100	19	19	100
18-abr-02	21	21	100	20	20	100
02-may-02	26	26	100	26	26	100
16-may-02	20	20	100	20	20	100
30-may-02	20	20	100	20	20	100

Tabla 4.8. Incidencia de PepMV en el invernadero 3.

Fecha de muestreo	Invernadero 4			Invernadero 5		
	N° Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV	N° Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
28-nov-01	10	1	10	10	0	0
12-dic-01	10	9	90	10	0	0
26-dic-01	20	18	90	20	3	15
09-ene-02	20	13	65	20	5	25
23-ene-02	20	20	100	20	4	20
06-feb-02	20	18	90	40	26	65
20-feb-02	40	37	93	40	28	70
07-mar-02	48	48	100	48	37	77
21-mar-02	20	20	100	20	20	100
04-abr-02	44	44	100	40	40	100
18-abr-02	20	20	100	21	21	100
02-may-02	20	20	100	20	20	100
16-may-02	20	20	100	20	20	100
30-may-02	20	20	100	20	20	100

Tabla 4.9. Incidencia de PepMV en los invernaderos 4 y 5.

4.3.2.5. Invernadero 6

En el invernadero 6, se detectó el virus un poco antes en las plantas injertadas, a principios de abril, unos tres meses después de la plantación. Al mes siguiente, fue detectado en las plantas no injertadas con un nivel de afectación un 11% menor que en las injertadas, tal y como se puede ver en la tabla 4.10. El virus evolucionó rápidamente alcanzando un 100% de infección a finales de junio en las plantas injertadas.

Fecha de muestreo	Plantas injertadas			Plantas no injertadas		
	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
23-ene-02	20	0	0	20	0	0
06-feb-02	20	0	0	20	0	0
20-feb-02	20	0	0	20	0	0
07-mar-02	20	0	0	21	0	0
21-mar-02	40	0	0	20	0	0
04-abr-02	20	3	15	20	0	0
18-abr-02	20	0	0	20	0	0
02-may-02	42	13	31	20	4	20
16-may-02	20	12	60	20	5	25
30-may-02	20	15	75	20	12	60
06-jun-02	10	7	70	11	6	55
13-jun-02	21	19	90	23	19	83
20-jun-02	20	20	100	20	16	80
27-jun-02	20	19	95	20	18	90
04-jul-02	21	21	100	31	30	97
11-jul-02	24	24	100	24	24	100
18-jul-02	15	15	100	15	14	93

Tabla 4.10. Incidencia de PepMV en el invernadero 6.

4.3.2.6. Invernadero 7

El virus comienza a detectarse a mediados de diciembre en plantas injertadas, y al mes siguiente en las plantas no injertadas, con un nivel de infección superior. A mediados de enero se alcanza el 55% de infección en plantas no injertadas, mientras las plantas injertadas mantienen un 15% de infección. Sin embargo, las plantas injertadas llegan al 100% a finales de marzo, un mes antes que las no injertadas. Los resultados de los análisis se muestran en la tabla 4.11.

Fecha de muestreo	Plantas injertadas			Plantas no injertadas		
	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
24-oct-01	10	0	0	10	0	0
07-nov-01	7	0	0	3	0	0
21-nov-01	11	0	0	10	0	0
05-dic-01	20	0	0	20	0	0
19-dic-01	20	2	10	20	0	0
02-ene-02	20	3	15	20	4	20
16-ene-02	20	3	15	20	11	55
30-ene-02	21	5	24	22	16	73
13-feb-02	20	9	45	20	9	45
28-feb-02	20	12	60	20	18	90
14-mar-02	23	14	61	21	18	86
27-mar-02	20	20	100	20	16	80
11-abr-02	20	16	80	10	5	50
25-abr-02	17	17	100	18	17	94
09-may-02	21	21	100	20	20	100
23-may-02	20	20	100	20	20	100
06-jun-02	10	10	100	10	10	100

Tabla 4.11. Incidencia de PepMV en el invernadero 7.

4.3.2.7. Invernadero 8

En el invernadero 8 se detectó el virus a principios de diciembre en plantas injertadas, unos tres meses después de la plantación. Al mes siguiente, fue detectado en un 10% de las plantas no injertadas. El virus se extendió rápidamente entre plantas injertadas y no injertadas, alcanzándose el 100% de infección en todo el invernadero a finales de abril.

4.3.2.8. Invernadero 9

La infección de PepMV en este invernadero fue muy temprana, encontrándose en el 50% de las plantas analizadas al mes siguiente a la plantación. Desde mediados de noviembre hasta final del ciclo, los valores de infección se mantuvieron próximos al 100%.

Fecha de muestreo	Plantas injertadas			Plantas no injertadas		
	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
24-oct-01	10	0	0	10	0	0
07-nov-01	8	0	0	10	0	0
21-nov-01	8	0	0	10	0	0
05-dic-01	20	1	5	20	0	0
19-dic-01	20	2	10	20	0	0
02-ene-02	20	4	20	20	2	10
16-ene-02	20	9	45	20	10	50
30-ene-02	20	11	55	21	9	43
13-feb-02	20	18	90	21	15	71
28-feb-02	20	19	95	20	17	85
14-mar-02	24	23	96	21	17	81
27-mar-02	20	19	95	20	17	85
11-abr-02	30	16	53	20	10	50
25-abr-02	21	21	100	21	21	100
09-may-02	21	21	100	21	21	100
23-may-02	20	20	100	20	20	100
06-jun-02	20	20	100	20	20	100

Tabla 4.12. Incidencia de PepMV en el invernadero 8.

Fecha de muestreo	Plantas injertadas		
	Nº Plantas	Plantas con PepMV	%Plantas con PepMV
24-oct-01	10	0	0
07-nov-01	10	5	50
21-nov-01	11	5	45
05-dic-01	20	11	55
19-dic-01	20	19	95
02-ene-02	23	22	96
16-ene-02	40	40	100
30-ene-02	20	19	95
13-feb-02	40	40	100
28-feb-02	40	36	90
14-mar-02	40	37	93
27-mar-02	40	40	100
11-abr-02	20	16	80
25-abr-02	43	40	93
09-may-02	20	20	100
23-may-02	30	30	100
06-jun-02	40	38	95

Tabla 4.13. Incidencia de PepMV en el invernadero 9.

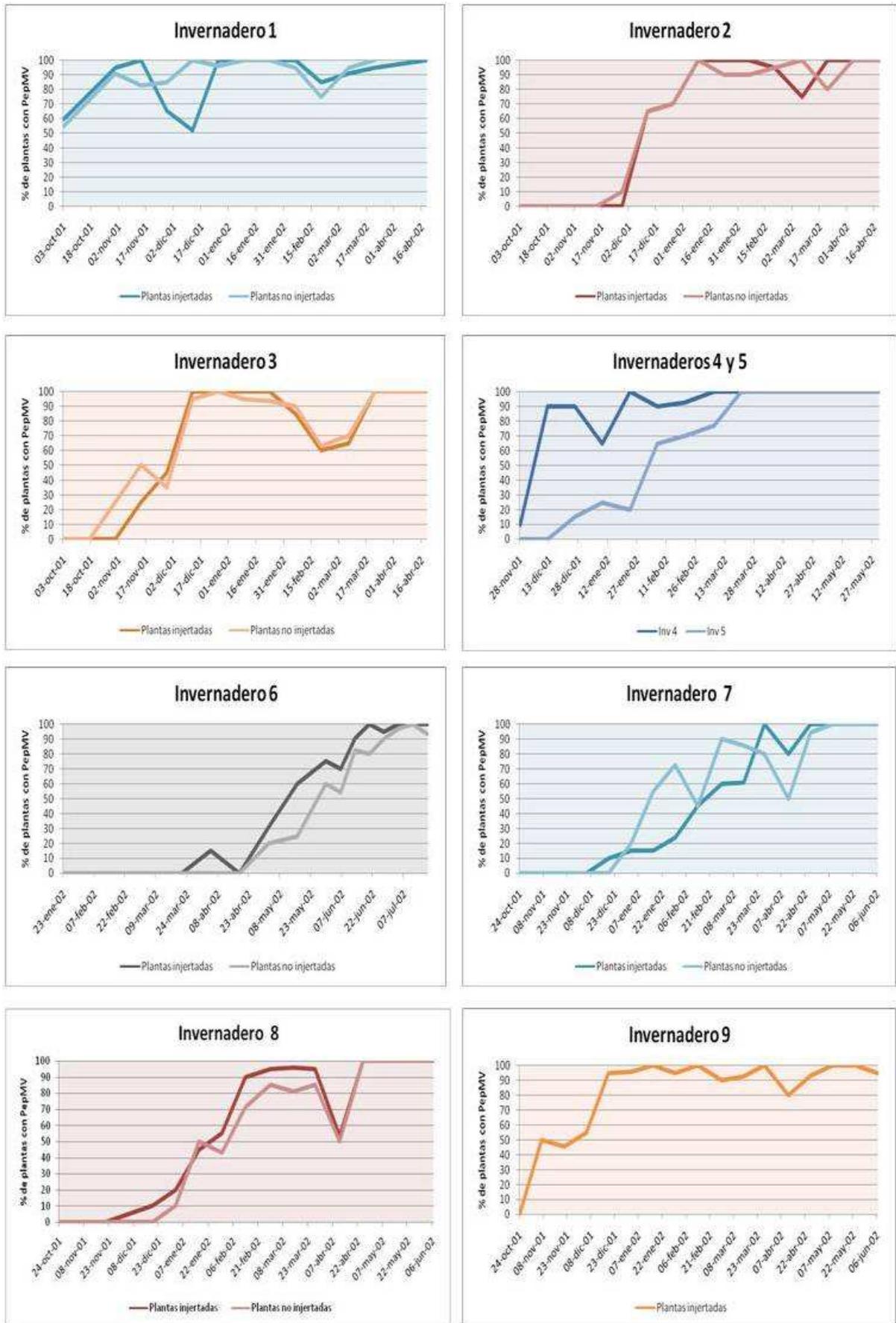


Figura 4.5. Gráficos que representan la evolución de la incidencia de PepMV en los invernaderos del ciclo de otoño-invierno de 2001-2002.

4.3.2.9. Análisis de las malas hierbas asociadas a los cultivos

En la tabla 4.14 se muestran las diferentes especies de malas hierbas que se encontraron asociadas al cultivo en los diferentes invernaderos, y el resultado de su análisis por hibridación molecular con la sonda de PepMV. Se detectó el virus en *Conyza bonariensis*, *Chenopodium album*, *Cyperus rotundus* (juncia), *Oxalis sp.*, *Solanum nigrum* y *Sonchus oleraceus*.

Especie	Parcela	Plantas analizadas	Plantas con PepMV	% plantas con PepMV
<i>Amaranthus blitoides</i>	Inv 3	3	0	0
<i>Amaranthus blitoides</i>	Inv 7	6	0	0
<i>Amaranthus blitoides</i>	Inv 8	4	0	0
<i>Conyza bonariensis</i>	Inv 1	27	24	89
<i>Conyza bonariensis</i>	Inv 3	29	18	62,
<i>Conyza bonariensis</i>	Inv 7	12	10	0
<i>Conyza bonariensis</i>	Inv 8	1	0	0
<i>Conyza bonariensis</i>	Inv 9	2	0	0
<i>Chenopodium album</i>	Inv 1	28	4	14
<i>Chenopodium album</i>	Inv 3	5	0	0
<i>Chenopodium album</i>	Inv 7	22	0	0
<i>Chenopodium album</i>	Inv 8	1	0	0
<i>Chenopodium album</i>	Inv 9	8	0	0
<i>Cyperus rotundus</i> (Juncia)	Inv 1	6	1	17
<i>Cyperus rotundus</i> (Juncia)	Inv 8	1	0	0
<i>Malva parviflora</i>	Inv 2	2	0	0
<i>Malva parviflora</i>	Inv 3	14	0	0
<i>Oxalis sp.</i>	Inv 8	1	1	100
<i>Solanum nigrum</i>	Inv 1	11	0	0
<i>Solanum nigrum</i>	Inv 3	1	0	0
<i>Solanum nigrum</i>	Inv 7	10	7	70
<i>Solanum nigrum</i>	Inv 9	10	3	30
<i>Sonchus oleraceus</i>	Inv 1	16	4	25
<i>Sonchus oleraceus</i>	Inv 3	14	3	21
<i>Sonchus oleraceus</i>	Inv 7	1	0	0
<i>Sonchus oleraceus</i>	Inv 9	4	0	0
Tomate	Inv 3	1	0	0
Tomate	Inv 7	4	0	0
Tomate	Inv 8	1	0	0
Tomate	Inv 9	1	0	0

Tabla 4.5. Resultados del análisis para la detección de PepMV en especies de malas hierbas asociadas al cultivo de tomate en los invernaderos del ciclo de otoño-invierno 2001-2002.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Se ha obtenido una sonda de ARN para la detección de PepMV que es específica y con alta sensibilidad para la detección del virus.
2. La hibridación molecular de la sonda producida con improntas de tejido en membranas de nylon positivamente cargadas ha resultado eficaz para la detección del PepMV en plantas de tomate.
3. La hibridación molecular usando improntas de tejidos, se ha mostrado como un método adecuado para el seguimiento de la enfermedad y su detección precoz antes de la aparición de los primeros síntomas.
4. En el seguimiento de la virosis en la campaña de verano 2001, tanto en cultivos al aire libre como bajo malla de distintas zonas costeras de Mazarrón y Lorca, se vio que la enfermedad no aparecía hasta los meses de septiembre y octubre, con una incidencia que no superó en la mayoría de las parcelas el 35%.
5. En la campaña de otoño-invierno 2001/02, las primeras manifestaciones del virus se dan en los meses de noviembre y diciembre, al principio del cultivo, con un 5-65% de plantas afectadas según parcelas. La enfermedad se va extendiendo a lo largo del ciclo de cultivo rápidamente, hasta afectar a todo el invernadero en los meses de abril y mayo.
6. Se analizaron separadamente plantas injertadas y no injertadas, y se vio que en la mayoría de los invernaderos, el virus aparece entre 15 y 20 días antes en las injertadas, que además alcanzan el 100% de infección antes que las plantas sin injertar.
7. Paralelamente al seguimiento de las parcelas se analizaron diferentes especies de malas hierbas asociadas a los cultivos, dando un resultado positivo en *Amaranthus blitoides*, *Conyza bonariensis*, *Chenopodium album*, *Cyperus rotundus*, *Sisymbrium irio*, *Malva parviflora* y *Solanum nigrum*. Dado que algunas de estas especies están descritas en la bibliografía como no hospedantes del virus, harían falta análisis con técnicas más sensibles para confirmar estos resultados.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

ABOUHAIDAR, M. G.; GELLATLY, D. 1999. Potexvirus. In: Grannoff, A., Webster, R.G. (eds). Encyclopedia of virology, 2nd edn. *Academic Press, San Diego, CA, USA, pp 1364-1368.*

BLAS, C. DE; ZABALGOGEAZCOA, I.; CASTRO, S.; ROMERO, J. 2000. Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales en “*Patología vegetal I. Ed. Phytoma, SEF, Mundi-Prensa. 695 pp.*”

CAMBRA, M.; GORRIS M.T.; TERRADA, M.E. 2000. Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus. En “*Patología vegetal I. Ed. Phytoma, SEF, Mundi-Prensa. 695 pp.*”

CONTRERAS, J.; BIELZA, P.; FRANCÉS, D.; MARTÍNEZ, J.A.; LACASA, A.; MORENO, D. 2003. Implicaciones de los hongos en el colapso del tomate. *Agrícola Vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura. Año 22, nº 260: 400-409.*

CÓRDOBA, M. C.; MARTÍNEZ-PRIEGO, LL.; JORDÁ, C. 2004. New natural hosts of *Pepino mosaic virus* in Spain. *Plant Disease, 88 (8): 906.*

CÓRDOBA-SELLÉS, M. C.; GARCÍA-RÁNDEZ, A.; ALFARO-FERNÁNDEZ, A.; JORDÁ-GUTIÉRREZ, C. (2007). Seed transmission of *Pepino Mosaic Virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease, 91(10): 1250-1254.*

EPPO (2008). EPPO Alert List – Viruses and virus-like diseases. *Pepino mosaic potexvirus*. http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/viruses/PEPMV0.htm

FRENCH, C. J.; BOUTHILLIER, M.; BERNARDY, M.; FERGUSON, G.; SABOURIN, M.; JOHNSON, R. C.; MASTER, C.; GODKIN, S.; MUMFORD, R. 2001. First Report of *Pepino Mosaic Virus* on in Canada and the United States. *Plant Disease, 85(10): 1121*

HANSEN, I. M.; PAELEMAN, A.; WITTEMANS, L.; GOEN, K.; LIEVENS, B.; BRAGARD, C.; VANACHTER, A. C. R. C.; THOMMA, B. P. H. J. 2007. Genetic

characterization of *Pepino mosaic virus* isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology*, 121 (2): 131-146.

[HTTP://COMMONS.WIKIMEDIA.ORG](http://commons.wikimedia.org). Wikimedia web con archivos y fotografías de libre uso.

[HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). National Center of the Biotechnology Information.

[HTTP://WWW.PCRLINKS.COM](http://www.pcrlinks.com). Guía web de la técnica de PCR.

JONES, R. A. C.; KOENING, R.; LESEMANN, D. E. 1980. Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology*, 94: 61-68.

JORDÁ, C.; LÁZARO, A.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.; MEDINA, V.; LACASA, A.; GUERRERO, M. M.; CANO, A.; HITA, I. 2000. Avances en el conocimiento de un nuevo virus: el PepMV. *Phytoma*, 121:36-41.

JORDÁ, C.; LÁZARO PÉREZ, A.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.; ABAD, P.; LACASA, A.; GUERRERO, M. M. (2001). First Report of Pepino Mosaic Virus on tomato in Spain. *Plant Disease*, 85(12): 1292.

JORDÁ, C.; MARTÍNEZ, L.; CÓRDOBA, M. C.; MARTÍNEZ, O.; JUÁREZ, M.; FONT, I. 2003. El "cribado" o "torrao" ¿una nueva enfermedad del cultivo del tomate? *Phytoma*, 152: 130-136.

LACASA, A.; JORDÁ, C. 2002. El virus del mosaico del pepino dulce y sus connotaciones en el cultivo del tomate. *Terralia* 26, artículo 174 (www.terralia.com).

LACASA, A.; JORDÁ, C.; GUERRERO, M.M.; LÁZARO, A.; CANO, A.; FONT, I.; ALCÁZAR, A.; ONCINA, M. 2000. La nueva enfermedad del tomate, producida por el virus del mosaico del pepino dulce (Pepino Mosaic Virus, PepMV). *FECOAM informa*, 28: 34-40.

LACASA, A.; GUERRERO, M. M.; HITTA, I.; MARTÍNEZ, M. A.; HERNÁNDEZ, M. D. 2001. La diseminación del virus del mosaico del pepino dulce (Pepino Mosaic Virus) en las labores de entutorado y desbrotado de las plantas de tomate. *Bol. San. Veg. Plagas*, 27: 489-501.

LACASA, A.; GUERRERO, M. M.; HITTA, I.; MARTÍNEZ, M. A.; JORDÁ, C.; BIELZA, P.; CONTRERAS, J.; ALCAZAR, A.; CANO, A. 2003. Implicaciones de los abejorros (*Bombus* spp.) en la dispersión del virus del mosaico del pepino dulce (Pepino mosaic virus) en cultivos de tomate. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 393-403.

LANGHAN, M. A. C. 2003. Plant Pathogenic Viruses en "Plant Pathology: Concepts & laboratory exercises. Eds. Robert Trigiano, Mark Windham and Alan Windham CRC Press LLC. 379 pp."

LING, K. S.; SCOTT, J. W. 2007. Sources of resistance to *Pepino mosaic virus* in tomato accessions. *Plant Disease*, 91: 749-753.

MARTÍN, G.; JANSSEN, D.; SEGUNDO, E.; CANO, M.; CUADRADO, I. M.; VELASCO, L.; SÁEZ, E. 2007. El virus del mosaico del pepino PepMV: caracterización biológica y molecular, diagnóstico, epidemiología e incidencia en Almería. *Phytoma*, 194: 30-35.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; LÁZARO, A.; ABAD CAMPOS, A.; JORDÁ, C. 2002. A RT-PCR assay combined with RFLP analysis for detection and differentiation of isolates of *Pepino mosaic virus* (PepMV) from tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 887-892.

MORENO GÓMEZ, P. 2000. Diagnóstico de virosis: Técnicas clásicas. En "Patología vegetal I. Ed. Phytoma, SEF, Mundi-Prensa. 695 pp."

MORIONES, E.; LUIS, M. 2000. Métodos de control de las virosis. En "Patología vegetal I. Ed. Phytoma, SEF, Mundi-Prensa. 695 pp."

MUMFORD, R.; BOONHAM, N.; TOMLINSON, J.; BARKER, I. 2006. Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 1–19.

MUMFORD, R. A.; METCALFE, E. J. 2001. The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology*, 146 (12): 2455-2460.

PAGÁN, I.; CÓRDOBA-SELLÉS, M. C.; MARTÍNEZ-PRIEGO, LL.; FRAILE, A.; MALPICA, J. M.; JORDÁ, C.; GARCÍA-ARENAL, F. 2006. Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology*, 96 (3): 274-279.

ROGGERO, P.; MASENGA, V.; LENZI, R.; COGHE, F.; ENA, S.; WINTER, S. 2001. First Report of Pepino Mosaic virus in tomato in Italy. *Plant Pathology*, 50: 798.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*.

SHIPP, J. L.; BUITENHUIS, R.; STOBBS, L.; WANG, K.; KIM, W. S.; FERGUSON, G. 2008. Vectors of *Pepino mosaic virus* by bumble-bees in tomato greenhouses. *Annals of Applied Biology*, May: 1-7

SOLER, S.; PROHENS, J.; NUEZ, F. (2000a). El virus del mosaico del pepino dulce en el cultivo del tomate (I). *Vida Rural, Diciembre*: 48-50.

SOLER, S.; CEBOLLA-CORNEJO, J.; PROHENS, J.; NUEZ, F. (2000b). El virus del mosaico del pepino dulce en el cultivo del tomate (y II). *Vida Rural, Diciembre* 42-44.

SOLER, S.; PROHENS, J.; DÍEZ, J. M.; NUEZ, F. 2002. Natural occurrence of *Pepino Mosaic Virus* in *Lycopersicon* species in Central and Southern Peru. *Journal of Phytopathology*, 150: 49-53.

SOLER-ALEIXANDRE, S.; LÓPEZ, C.; CEBOLLA-CORNEJO, J.; NUEZ, F. 2007. Sources of resistance to *Pepino Mosaic Virus* (PepMV) in tomato. *HortScience* 42(1): 40-45.

SPENCE, N.J.; BASHAM, J.; MUMFORD, R.A.; HAYMAN, G.; EDMONDSON, R.; JONES, D. R. 2006. Effect of *Pepino Mosaic Virus* on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology*, 55: 595-606.

VAN DER VLUGT, R. A. A.; STIJGER, C. C. M. M.; VERHOEVEN, J. Th. J. (2000). First Report of *Pepino Mosaic Virus* on Tomato. *Plant Disease*, vol. 84 (1): 103.

VERBEEK, M.; DULLEMANS, A. M.; VAN DEN HEUVEL, J. F. J. M. ; MARIS, P. C. ; VAN DER VLUGT, R. A. A. 2007. Identification and characterization of tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato. *Archives of Virology*, 152: 881-890.

VERHOEVEN, J. Th. J.; VAN DER VLUGT, R. A. A.; ROENHORST, J. W. 2003. High similarity between tomato isolates of *Pepino mosaic virus* suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 419-425.

7. ANEJOS

7. ANEJOS

Anejo 1

Secuencia parcial de PepMV del gen que codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN

A continuación se detalla la secuencia de 584 pb de ARN lineal publicada por van der Vlugt en mayo de 2000, con número de accesión en GeneBank AJ27099 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

```

1  CAT CAGCAAGCCAAGGATGAAACGC TTTTCTGGGCAACAATAGAAGCTAGACTTTCTATT
61  ACAACTCCGGAAGCCAATTTACGAGAATTTGTGCTGAAGAAAGATGTTGGAGACATCTTG
121 TTTTTCAACTACCACAATGCGATGTGCTTACCCGCTGATCCAGTGGACTTTGAGCCAAGA
181 ACATGGGAAATATGTGCTGCTGAAGTTAAAAATACTTACTTAGCCAAACCAATGGCTAAC
241 CTGATCAATGCTGCTAGCAGACAATCTCCTGATTTTGATGCTAATAAAATTTCCCTGTTC
301 TTTAAATCTCAATGGGTCAAAAAAGTGAAAAAATTAGGTGCTGTCAAATCAAAGCCTGGC
361 CAGACTATCGCAGCTTTCATGCAACAAACAGTGATGTTGTATGGGACCATGGCCAGATAC
421 CTCAGAAAGATGAGACAAAGATTCCAACCAAGCATATTTTCATTAATTGTGAGACAACA
481 ACGGATGATCTGAACCAATTTGTTAAACAAGGTTGGAACTTTAACAGAACGGCTCAGACA
541 AATGATTTACAGCTTTTGAC CAATCACAAGACGGGGCCATGCT

```

En azul se han marcado los fragmentos complementarios a los cebadores diseñados MA173 (nt 1 al 25) y MA172 (nt 562 al 583).

Anejo 2

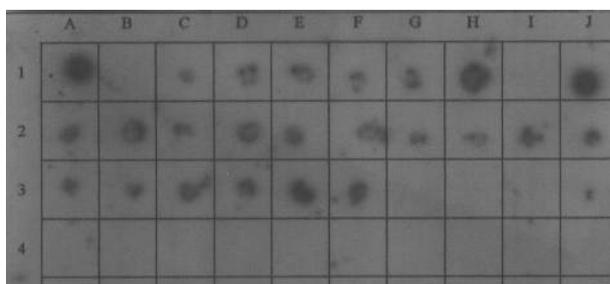
Esquema de los muestreos y resultados de las membranas analizadas por hibridación molecular

En este anejo se muestran tablas con el esquema de cada una de las membranas correspondiente a los muestreos realizados para la detección de PepMV. En algunos casos se tomaron muestras de otras parcelas que no son objeto de este trabajo y se han designado en cada tabla con la palabra “otras”. Las celdas coloreadas corresponden a las muestras que dieron positivas en la hibridación molecular.

Debajo de cada tabla se muestra la foto de la película autorradiográfica correspondiente con los resultados de dicha hibridación, salvo en los casos en que el revelado dio una película muy oscura, resultando visible solamente al trasluz.

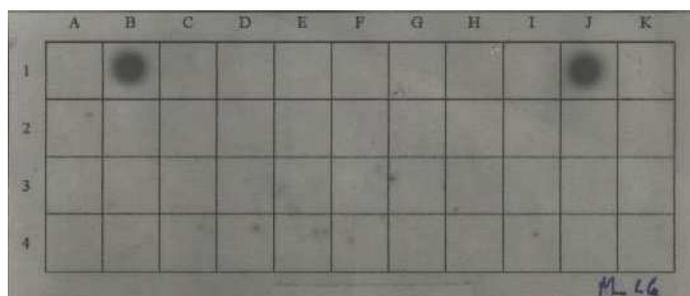
Membrana M13. Fecha de muestreo: 11-jul-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -	otras	Otras	Otras	otras	Otras	otras	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +
2	otras	otras	otras	Otras	Otras	otras	Otras	otras	otras	otras
3	otras	otras	otras	Otras	Otras	otras	Otras	otras	otras	otras
4	P 1	P 1	P 1	P 1	P 1	P 1	P 1	otras	otras	otras

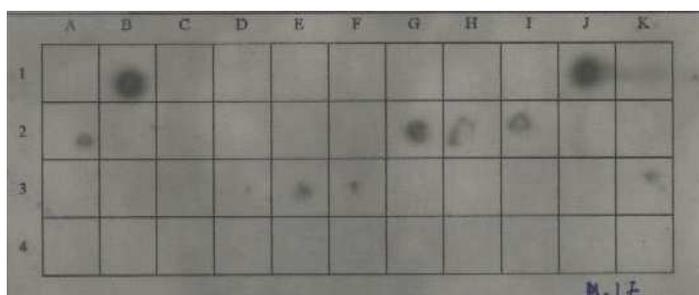


Membrana M16. Fecha de muestreo: 11-jul-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	P4	1 μ L ARN control + (1:100)	1 μ L ARN control - (1:100)						
2	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
3	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4

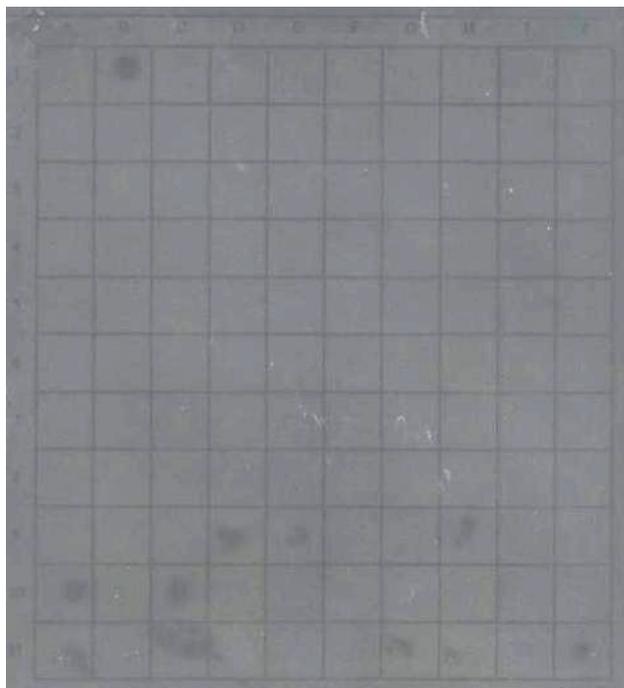
**Membrana M17. Fecha de muestreo: 11-jul-01.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	Pr 1	1 μ L ARN control + (1:100)	1 μ L ARN control - (1:100)						
2	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1
3	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1
4	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1	Pr 1



Membrana M24. Fecha de muestreo: 26-jul-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	P1							
2	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1
3	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1
4	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1
5	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1
6	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2
7	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2
8	Pr3	Pr3	Pr3	Pr3	Pr3	Pr3	Pr3	Pr3	Pr3	Pr3
9	Pr3	Pr3	otras							
10	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2
11	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2	Pr2



Membrana M30. Fecha de muestreo: 1-ago-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5
2	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
3	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4
5	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4
6	otras	otras	otras	otras	otras	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4
7	otras	otras	otras	otras	otras	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4
8	otras	otras	otras	otras	otras	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4
9	otras	otras	otras	otras	otras	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4
10	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4	Pr4

Membrana M36. Fecha de muestreo: 7-ago-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Pr5	Pr5								
2	Pr5	Pr5								
3	Pr5	Pr5								
4	Pr5	Pr5								
5	P3	P3								
6	P2	P2								
7	P1	P1								
8	otras	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -							

Membrana M45. Fecha de muestreo: 16-ago-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
2	P6	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
3	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5
4	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -								

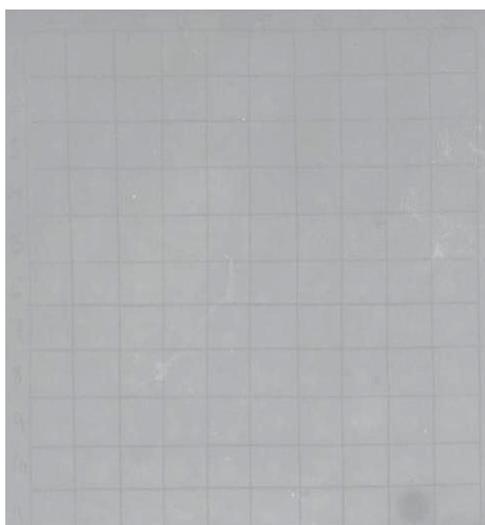
**Membrana M57. Fecha de muestreo: 27-ago-01.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	P5										
2	P6	1 μ L ARN control +									
3	P4	1 μ L ARN control -									



Membrana M48. Fecha de muestreo: 21,27-ago-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	P3	P3								
2	Pr6	Pr6								
3	Pr6	Pr6								
4	Pr6	Pr6								
5	Pr6	Pr6								
6	P1	P1								
7	P2	P2								
8	Pr7	Pr7								
9	Pr7	Pr7								
10	Pr7	Pr7								
11	Pr7	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -							

**Membrana M63. Fecha de muestreo: 5-sep-01.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1		P1									
2		P1	P1	P1	P1	P1	P3	P3	P2	P2	P2
3		P3									
4	1 μ L ARN control -	P3									
5	1 μ L ARN control +	P2									
	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2

Membrana M70. Fecha de muestreo: 14-sep-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
2	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
3	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
4	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
5	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
7	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10
8	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10
9	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10
10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10
11	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10	Pr10
12	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9
13	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9	Pr9
14	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8
15	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8
16	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	Pr8	P5	P5	P5	P5	P5
17	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5
18	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5
19	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5
20	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -								



Membrana M60. Fecha de muestreo: 21-sep-01.

	A	B	C	D	E
1	otras	otras	otras	otras	otras
2	otras	otras	otras	otras	otras
3	otras	otras	otras	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -
4	Pr11	Pr11	Pr11	Pr11	Pr11
5	Pr11	Pr11	Pr11	Pr11	Pr11

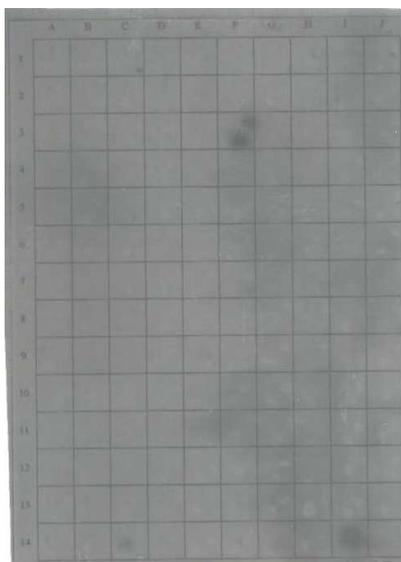
Membrana M73. Fecha de muestreo: 21-sep-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	P1	P1								
2	P3	P3								
3	P2	P2								
4	P2	P2								
5	P2	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -							

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1										
2										
3										
4										
5										
6										

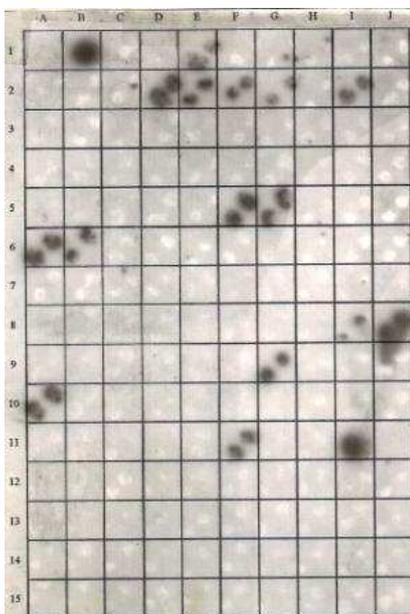
Membrana M78. Fecha de muestreo: 27-sep-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	P4	P4								
2	P4	P4								
3	P4	P5	P5							
4	P5	P5								
5	P5	P6	P6							
6	P6	P6								
7	P6	P6								
8	P6	Pr12	Pr12							
9	Pr12	Pr12								
10	Pr12	Pr12								
11	Pr12	Pr12								
12	Pr12	Pr12	Pr12	otras	Otras	otras	otras	otras	otras	otras
13	Otras	otras								
14	Otras	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -							



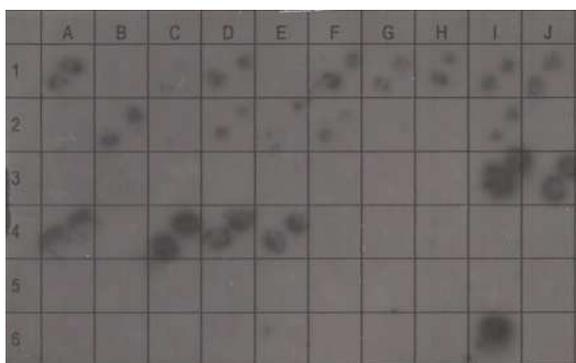
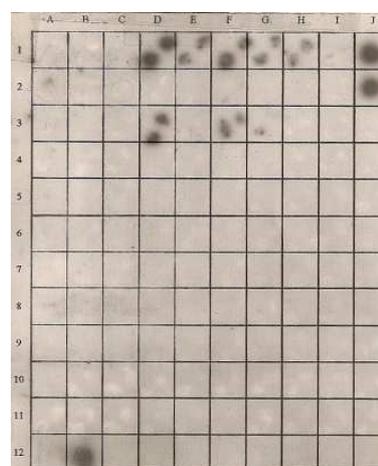
Membrana M83. Fecha de muestreo: 3-oct-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	P2	P2						
2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2
3	P2	P2	P3	P3						
4	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3
5	P3	P3	P1	P1						
6	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1
7	P1	P1	Inv2	Inv2						
8	Inv2	Inv2	Inv2	Inv2	Inv2	Inv2	Inv2	Inv2	Pr13	Pr13
9	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13
10	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13
11	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	Pr13	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -
12	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14
13	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14
14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14
15	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14	Pr14



Membrana M84. Fecha de muestreo: 3-oct-01.

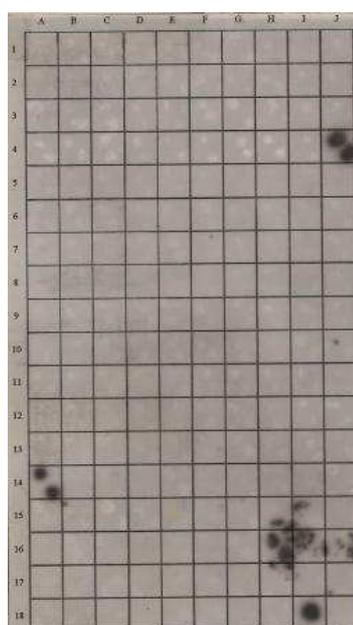
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv1	Inv1								
2	Inv1	Inv1								
3	otras	otras								
4	otras	otras								
5	otras	otras								
6	otras	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -							

**Membrana M84****Membrana M92****Membrana M92. Fecha de muestreo: 10-oct-01.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	1 μ L ARN control +
2	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	1 μ L ARN control +
3	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
4	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
5	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15
6	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15
7	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15
8	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15
9	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15	Pr15
10	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
11	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
12	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -							

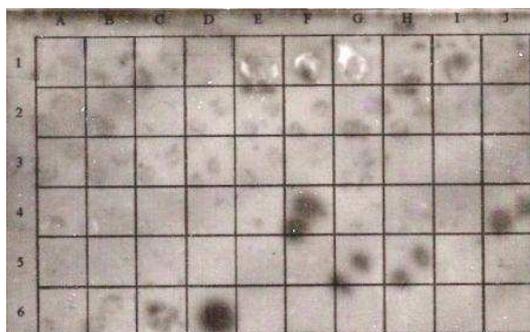
Membrana M101. Fecha de muestreo: 17-oct-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	P3	P3								
2	P3	P3								
3	P1	P1								
4	P1	P1								
5	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada								
6	Inv2 injetada	Inv2 injetada								
7	Inv2 injetada	Inv2 injetada								
8	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada								
9	Pr16	Pr16								
10	Pr16	Pr16								
11	Pr16	Pr16								
12	Pr16	Pr16								
13	Pr17	Pr17								
14	Pr17	Pr17								
15	Pr17	Pr17								
16	Pr17	Pr17								
17	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada								
18	Inv3 injetada	1 µL ARN control +	1 µL ARN control -							

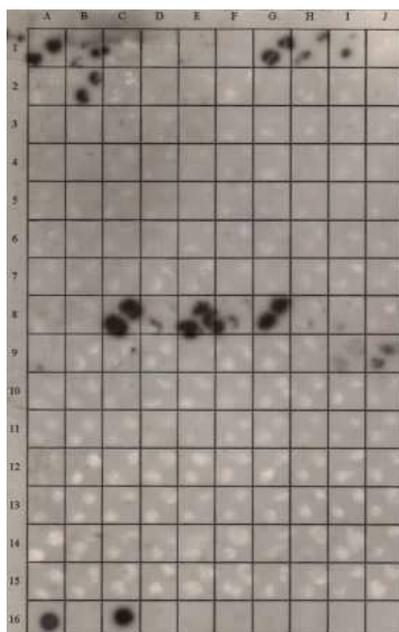


Membrana M106. Fecha de muestreo: 17-oct-01.

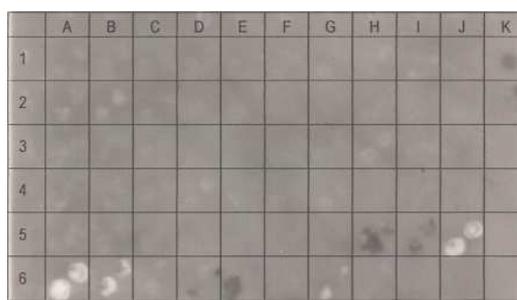
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Amaranthus P1	Amaranthus P1	Amaranthus P1	Amaranthus P1	Sonchus P1	Sonchus P1	Sonchus P1	Sonchus P1	Sonchus P1	Malva P1
2	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1
3	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Sisymbrium P1	Sisymbrium P1			
4	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2
5	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	
6	Amaranthus P2	Amaranthus P2	Malva P2	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -					

**Membrana M113. Fecha de muestreo: 24-oct-01.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5
2	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5
3	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
4	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada
5	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada
6	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18
7	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18
8	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18
9	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18	Pr18
10	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada
11	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada
12	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
13	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
14	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
15	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4	P4
16	1 μ L ARN control +		1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -					

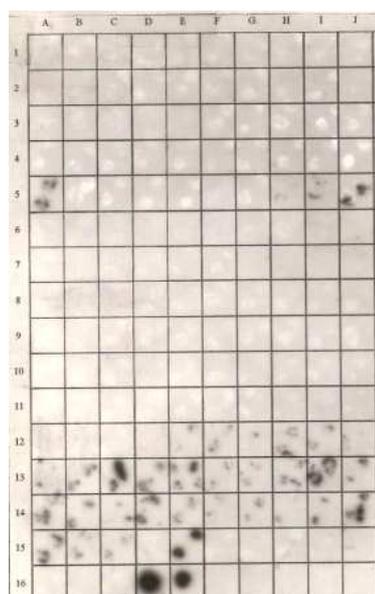
**Membrana M113****Membrana M116. Fecha de muestreo: 24-oct-01.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Chenopodium Inv 7	Tomate Inv7	Tomate Inv7	1 μ L ARN control +							
2	Tomate Inv7	Tomate Inv7	Chenopodium P6	Chenopodium P6	Chenopodium P6						
3	Chenopodium P6	Chenopodium P6	Amarantus P6	Amarantus P6	Amarantus P6	Amarantus P6	Chenopodium P6	Chenopodium P6	Verdolaga P6		
4	Solanum Pr18	Malva Pr18	Malva Pr18	Malva Pr18							
5	Malva P4	Sonchus P4	Sonchus P4	Sonchus P4							
6	Sonchus P4	Sonchus P4	Sonchus P4	Chenopodium P4	Conyza P4	Conyza P4	Amarantus P4				



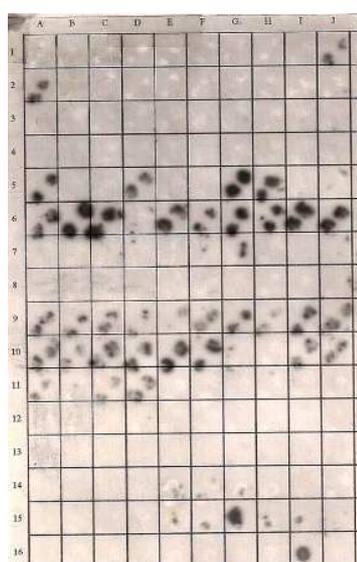
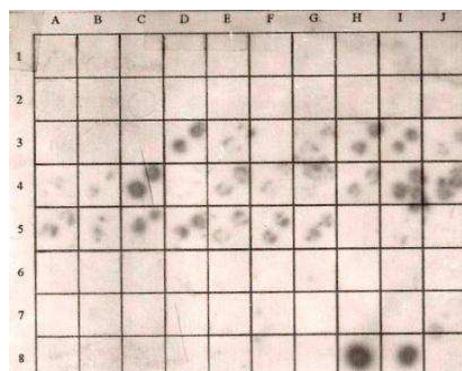
Membrana M122. Fecha de muestreo: 31-oct-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada
2	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada
3	Malva Inv2	Chenopodium Inv2	Chenopodium Inv2	Chenopodium Inv2	Malva Inv2	P1	P1	P1	P1	P1
4	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1
5	P1	P1	P1	P1	P1	Tomate P1	Tomate P1	Sisymbrium P1	Sisymbrium P1	Sonchus P1
6	Chenopodium P1	Chenopodium P1	Chenopodium P1	Chenopodium P1	Chenopodium P1	Chenopodium P1	Chenopodium P1	Chenopodium P1	Conyza P1	Conyza P1
7	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Solanum P1	Malva P1	Malva P1	Malva P1	Malva P1
8	Malva P1	Malva P1	Diploaxis P1	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3
9	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3
10	P3	P3	P3	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada
11	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada
12	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada
13	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada
14	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada
15	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada
16	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	1 µL ARN control +	1 µL ARN control +	1 µL ARN control -				



Membrana M125. Fecha de muestreo: 7-nov-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
2	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6	P6
3	Inv7	Inv7	Inv7	Inv7	Inv7	Inv7	Inv7	Inv7	Inv7	Inv7
4	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada
5	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
6	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5	P5
7	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada		
8	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada
9	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2
10	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2
11	P2	P2	P2	P2	P3	P3	P3	P3	P3	P3
12	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3	P3
13	<i>Chenopodium Inv7</i>	<i>Chenopodium Inv7</i>	<i>Chenopodium Inv7</i>	<i>Chenopodium Inv7</i>	<i>Amaranthus Inv7</i>	<i>Amaranthus Inv7</i>	<i>Chenopodium P6</i>	<i>Chenopodium P6</i>	<i>Chenopodium P6</i>	<i>Chenopodium P6</i>
14	<i>Chenopodium P6</i>	<i>Amaranthus P6</i>	<i>Amaranthus P6</i>	<i>Amaranthus P6</i>	<i>Sonchus P6</i>	<i>Sonchus P6</i>	<i>Sonchus P6</i>	<i>Sonchus P6</i>	<i>Solanum P6</i>	<i>Solanum P6</i>
15	<i>Solanum P6</i>	<i>Chenopodium P2</i>	<i>Chenopodium P2</i>	<i>Amaranthus P2</i>	<i>Sonchus P2</i>	<i>Sonchus P2</i>	<i>Sonchus P2</i>	<i>Sonchus P2</i>	<i>Sonchus P2</i>	<i>Sonchus P2</i>
16	<i>Solanum P2</i>	<i>Solanum P2</i>	Tomate P2	Tomate P2	<i>Nicotiana P2</i>	<i>Nicotiana P2</i>	<i>Nicotiana P2</i>	<i>Nicotiana P2</i>	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -

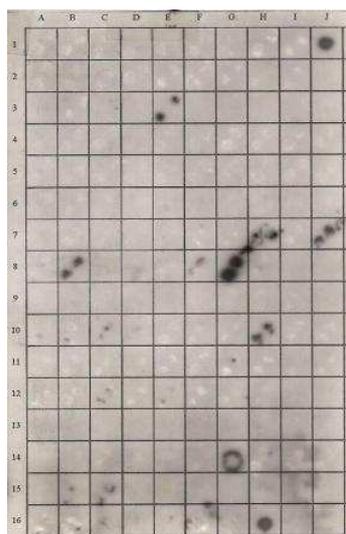
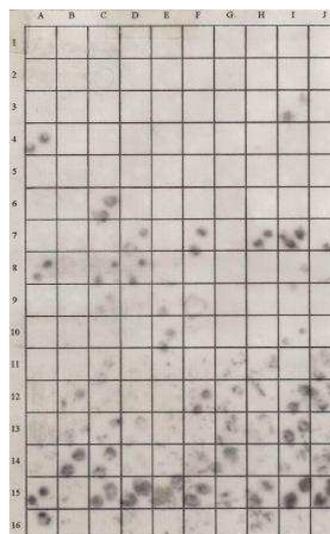
**Membrana M125****Membrana M132**

Membrana M132. Fecha de muestreo: 14-nov-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
2	Inv2 no injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
3	Inv2 injetada	<i>Chenopodium</i> Inv2	<i>Chenopodium</i> Inv2	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada
4	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada
5	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
6	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 injetada
7	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	<i>Chenopodium</i> Inv3
8	<i>Amaranthus</i> Inv3	<i>Tomate</i> Inv3	<i>Malva</i> Inv3	<i>Malva</i> Inv3	<i>Amaranthus</i> Inv3	<i>Amaranthus</i> Inv3	<i>Solanum</i> Inv3	1 µL ARN control +	1 µL ARN control +	1 µL ARN control -

Membrana M138. Fecha de muestreo: 21-nov-01.

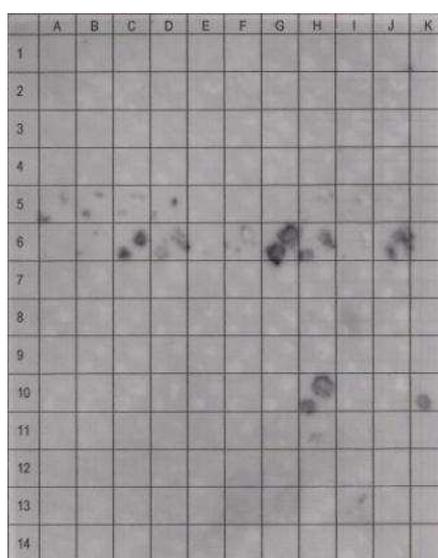
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv8 injetada	Inv8 no injetada	1 µL ARN control +							
2	Inv8 no injetada	1 µL ARN control -								
3	<i>Juncia</i> Inv8	<i>Tomate</i> Inv8	<i>Conyza</i> Inv8	<i>Chenopodium</i> Inv8	<i>Trebol</i> Inv8	<i>Amaranthus</i> Inv8	<i>Amaranthus</i> Inv8	<i>Amaranthus</i> Inv8	<i>Amaranthus</i> Inv8	Inv7 injetada
4	Inv7 injetada									
5	Inv7 no injetada									
6	<i>Amaranthus</i> Inv7	<i>Amaranthus</i> Inv7	<i>Amaranthus</i> Inv7	<i>Amaranthus</i> Inv7	<i>Chenopodium</i> Inv7	<i>Chenopodium</i> Inv7	<i>Chenopodium</i> Inv7	<i>Chenopodium</i> Inv7	<i>Chenopodium</i> Inv7	<i>Chenopodium</i> Inv7
7	<i>Chenopodium</i> Inv7	<i>Chenopodium</i> Inv7	<i>Chenopodium</i> Inv7	<i>Chenopodium</i> Inv7	<i>Sonchus</i> Inv7	<i>Conyza</i> Inv7	<i>Conyza</i> Inv7	Inv 9	Inv 9	Inv 9
8	Inv 9	<i>Chenopodium</i> Inv9	<i>Chenopodium</i> Inv9							
9	<i>Chenopodium</i> Inv9	<i>Chenopodium</i> Inv9	<i>Chenopodium</i> Inv9	<i>Chenopodium</i> Inv9	<i>Chenopodium</i> Inv9	<i>Chenopodium</i> Inv9	<i>Tomate</i> Inv9	<i>Conyza</i> Inv9	<i>Conyza</i> Inv9	<i>Malva</i> Inv9
10	<i>Sonchus</i> Inv9	<i>Sonchus</i> Inv9	<i>Sonchus</i> Inv9	<i>Sonchus</i> Inv9	P6	P6	P6	P6	P6	P6
11	P6									
12	P6	<i>Chenopodium</i> P6	<i>Chenopodium</i> P6							
13	<i>Chenopodium</i> P6	<i>Chenopodium</i> P6	<i>Chenopodium</i> P6	<i>Chenopodium</i> P6	<i>Chenopodium</i> P6	<i>Chenopodium</i> P6	<i>Amaranthus</i> P6	<i>Amaranthus</i> P6	<i>Amaranthus</i> P6	<i>Amaranthus</i> P6
14	<i>Amaranthus</i> P6	<i>Amaranthus</i> P6	<i>Sonchus</i> P6	<i>Sonchus</i> P6	<i>Amaranthus</i> P4	<i>Chenopodium</i> P4	<i>Conyza</i> P4	<i>mala hierba</i> P4	<i>mala hierba</i> P4	<i>Solanum</i> P4
15	<i>Malva</i> P4	<i>Sonchus</i> P4								
16	<i>Sonchus</i> P4	1 µL ARN control +	1 µL ARN control -							

**Membrana M138****Membrana M145****Membrana M145. Fecha de muestreo: 28-nov-01.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
2	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
3	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
4	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
6	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
7	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
8	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
9	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
10	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
11	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada
12	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada
13	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada
14	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada
15	Inv1 colapsada no injertada	Inv1 colapsada no injertada	Inv1 colapsada no injertada	Inv1 colapsada injetada	Inv1 colapsada injetada	Inv1 colapsada injetada		otras	otras	otras
16	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -						otras	otras	otras

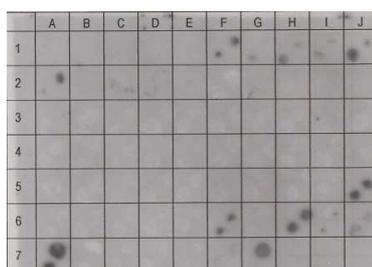
Membrana M151. Fecha de muestreo: 5-dic-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv7 no injetada										
2	Inv7 injetada										
3	Inv7 no injetada										
4	Inv7 injetada										
5	Inv9										
6	Inv9										
7	Inv8 no injetada										
8	Inv8 no injetada										
9	Inv8 injetada	1 μ L ARN control -									
10	Inv8 injetada	1 μ L ARN control +									
11	Pr19										
12	Pr19										
13	Pr19										
14	Pr19										

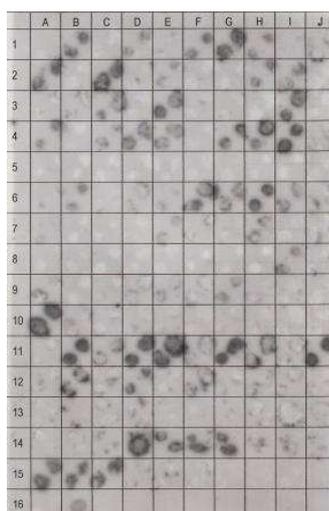


Membrana M152. Fecha de muestreo: 5-dic-01.

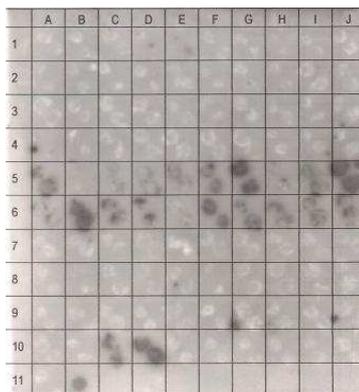
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Malva Pr19	Malva Pr19	Malva Pr19	Malva Pr19	Sonchus Pr19	Malva Pr19	Oxalis Pr19	Oxalis Pr19	Oxalis Pr19	Oxalis Pr19
2	Oxalis Pr19	Oxalis Pr19	Conyza Pr19	Conyza Pr19	Conyza Pr19	Mala hierba Pr19	Juncia Pr19	Moricandia Pr19	Sisymbrium Pr19	Chenopodium Pr19
3	Chenopodium Pr19	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
4	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
5	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
6	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
7	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	1 µL ARN control +	1 µL ARN control -		

**Membrana M158. Fecha de muestreo: 12-dic-01.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada
2	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada	Inv2 no injertada
3	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada
4	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada	Inv2 injertada
5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
6	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
7	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada
8	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada
9	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 no injertada	Inv3 no injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada
10	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada
11	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada
12	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada
13	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada	Inv1 injertada
14	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada	Inv1 no injertada
15	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada colapsada	Inv3 injertada sin síntomas	Inv3 injertada sin síntomas	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada	Inv3 injertada sin síntomas	
16	Impronta Tomate control -	1 µL ARN control +	1 µL ARN control -							

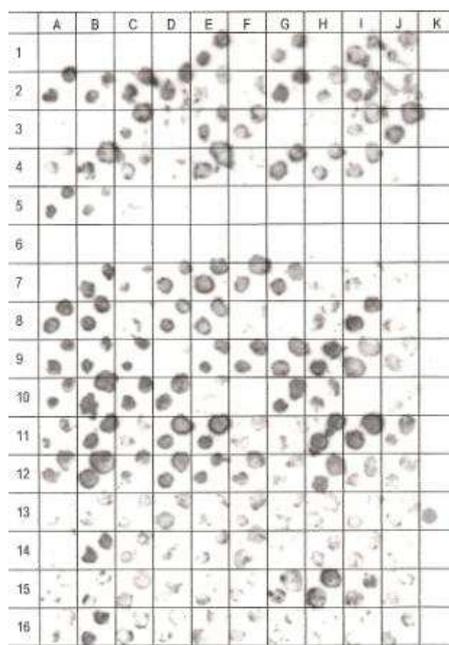
**Membrana M158****Membrana M161. Fecha de muestreo: 19-dic-01.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada
2	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada
3	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada
4	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada
5	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
6	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
7	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada
8	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada
9	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada
10	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada
11	Otra	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -	Tomate sano Control -						



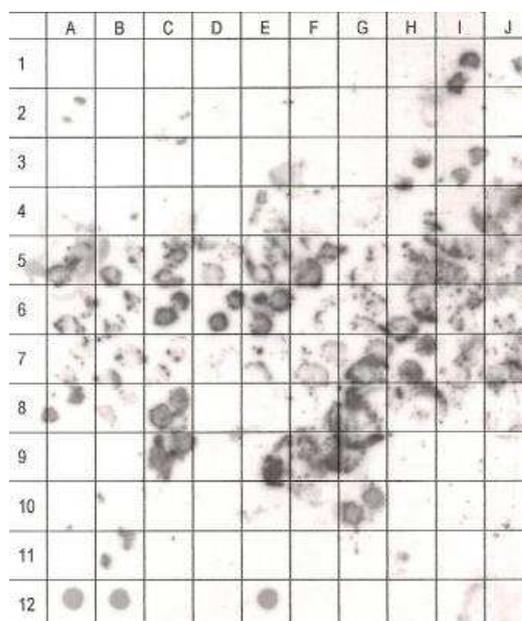
Membrana M167. Fecha de muestreo: 26-dic-01.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv2 no injetada										
2	Inv2 no injetada										
3	Inv2 injetada										
4	Inv2 injetada										
5	Inv5										
6	Inv5										
7	Inv4										
8	Inv4										
9	Inv3 no injetada										
10	Inv3 no injetada										
11	Inv3 injetada										
12	Inv3 injetada	1 µL ARN control +									
13	Inv1 no injetada	1 µL ARN control -									
14	Inv1 no injetada										
15	Inv1 injetada										
16	Inv1 injetada										



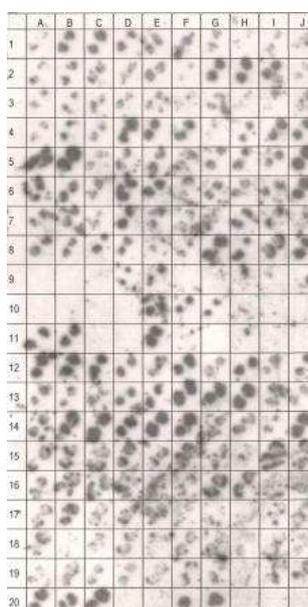
Membrana M170. Fecha de muestreo: 2-ene-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada					
2	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada					
3	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada					
4	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada					
5	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
6	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
7	Inv9 planta1	Inv9 planta1	Inv9 planta1	Inv9	Inv9					
8	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada					
9	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada					
10	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada					
11	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada					
12	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -				



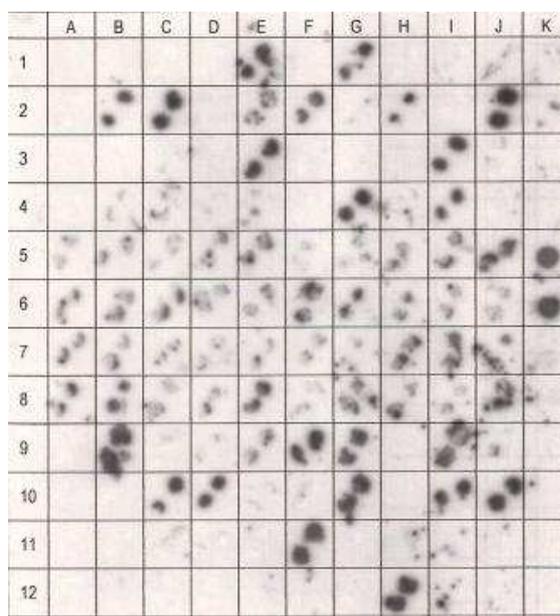
Membrana M178. Fecha de muestreo: 9-ene-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada					
2	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada					
3	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
4	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
5	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
6	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
7	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada					
8	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada					
9	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
10	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
11	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
12	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
13	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada
14	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada
15	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada
16	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada					
17	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada					
18	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
19	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
20	Inv 4 colapsada	Inv 4 colapsada	Inv 5 colapsada	Inv 5 colapsada	Inv 5 colapsada	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	



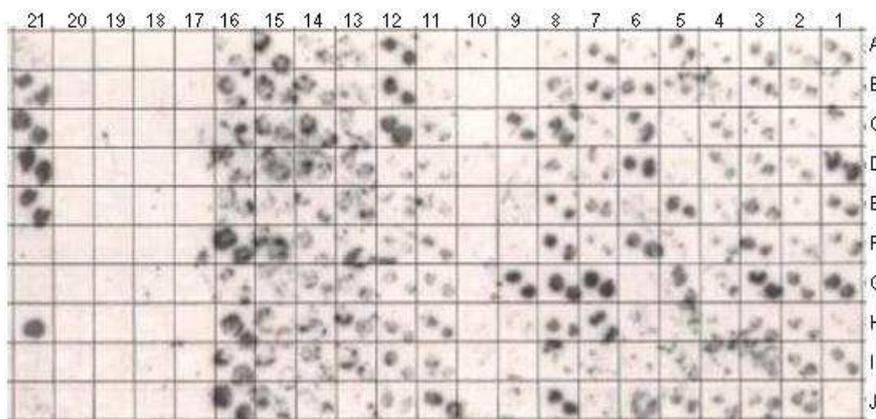
Membrana M184. Fecha de muestreo: 16-ene-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv8 no injertada	Tomate síntomas control +									
2	Inv8 no injertada	Tomate síntomas control +									
3	Inv8 injertada	Tomate sano control -									
4	Inv8 injertada	Tomate sano control -									
5	Inv9	1 µL ARN control +									
6	Inv9	1 µL ARN control +									
7	Inv9	1 µL ARN control -									
8	Inv9	1 µL ARN control -									
9	Inv7 no injertada										
10	Inv7 no injertada										
11	Inv7 injertada										
12	Inv7 injertada										



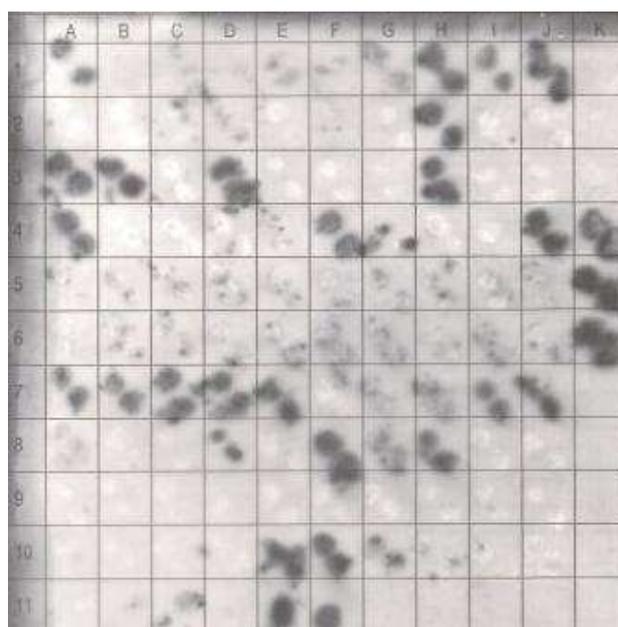
Membrana M187. Fecha de muestreo: 23-ene-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
2	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
3	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
4	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
5	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
6	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
7	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
8	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
9	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
10	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
11	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
12	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
13	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada
14	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada
15	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada
16	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada
17	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada
18	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada
19	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada
20	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada
21	Inv2 injetada	Inv2 no injetada colapsada	Inv2 no injetada	Inv4 injetada colapsada	Inv4 injetada colapsada		1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	Tomate sano control -	Tomate síntomas control +



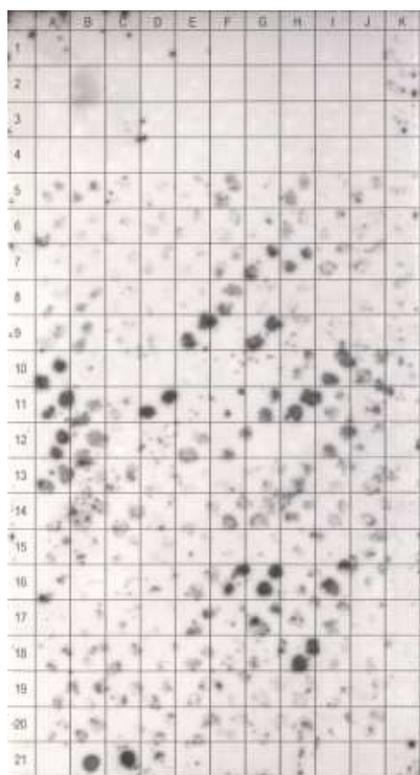
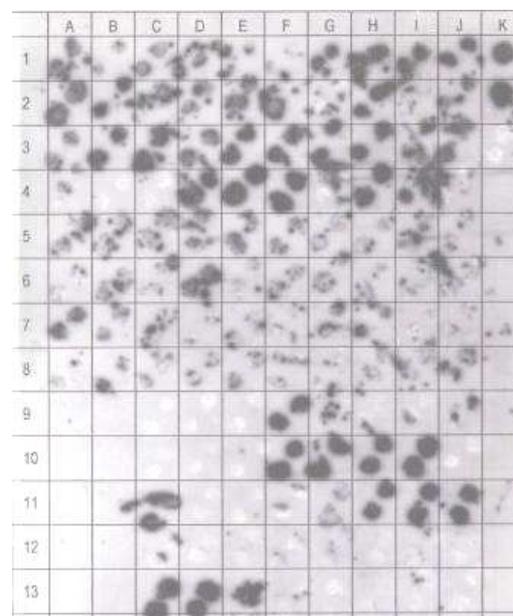
Membrana M190. Fecha de muestreo: 30-ene-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 no injetada colapsada
2	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv7 colapsada
3	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv7 colapsada
4	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv7 injetada
5	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv7 no injetada colapsada
6	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv7 no injetada colapsada
7	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	
8	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	
9	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	
10	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	
11	Tomate sano control -	Tomate síntomas control +	Tomate síntomas control +	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +					



Membrana M191. Fecha de muestreo: 6-feb-02.

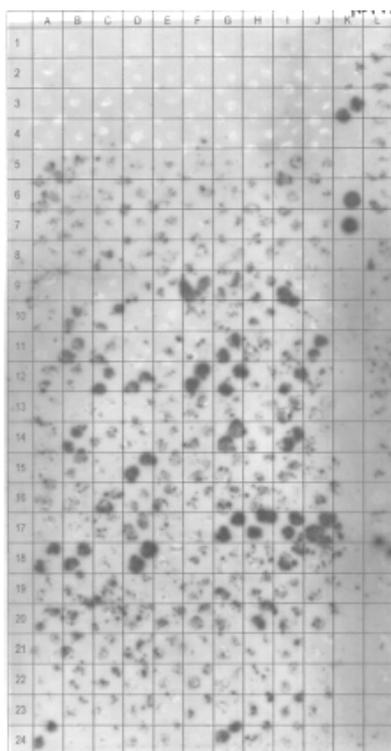
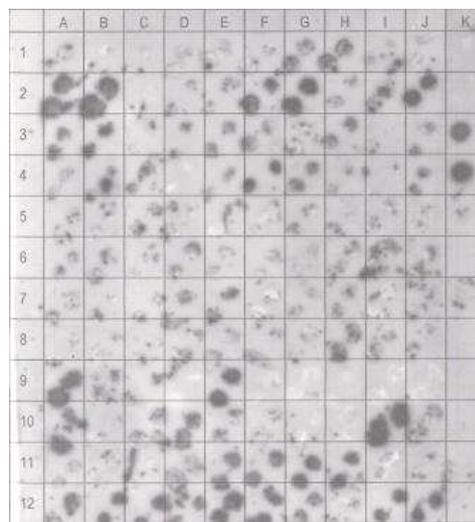
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv1 Conyza
2	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv1 Conyza
3	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv1 Conyza
4	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv1 Conyza
5	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv1 Conyza
6	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv1 Conyza
7	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv1 Conyza
8	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv1 Conyza
9	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv1 Chenopodium
10	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv1 Chenopodium
11	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv1 Chenopodium
12	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv1 Chenopodium
13	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv1 Sonchus
14	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv1 Sonchus
15	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv1 Sonchus
16	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 no injetada	Inv1 Sonchus				
17	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv1 Sonchus
18	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 Sonchus
18	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 no injetada	Inv1 Sonchus				
	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	
19	Tomate sano control -	1 µL ARN control +	1 µL ARN control +	1 µL ARN control -	2 µL ARN control -						

**Membrana M191****Membrana M192****Membrana M192. Fecha de muestreo: 13-feb-02.**

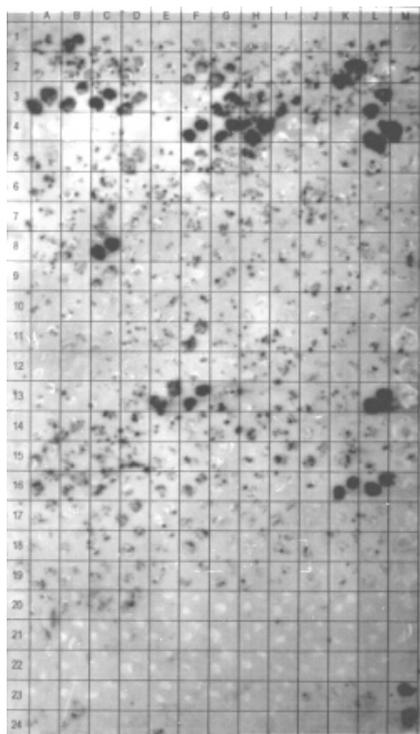
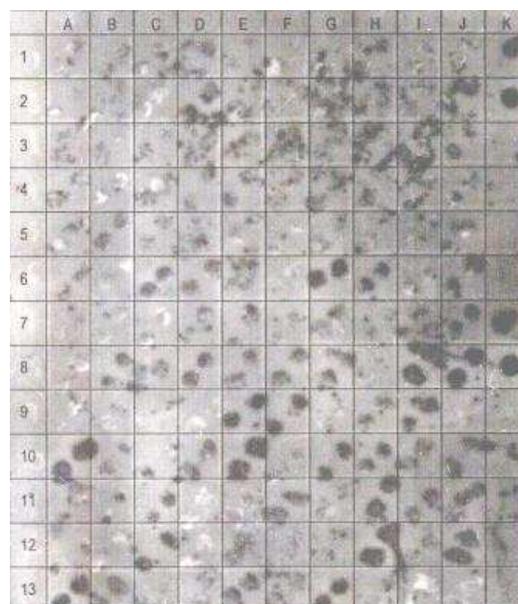
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv8 injetada	1 μ L ARN control +									
2	Inv8 injetada	1 μ L ARN control +									
3	Inv8 no injetada										
4	Inv8 no injetada	1 μ L ARN control -									
5	Inv9										
6	Inv9										
7	Inv9										
8	Inv9										
9			Inv7 injetada								
10			Inv7 injetada								
11			Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	
12			Inv7 no injetada								
13			Inv7 no injetada								

Membrana M193. Fecha de muestreo: 20-feb-02.

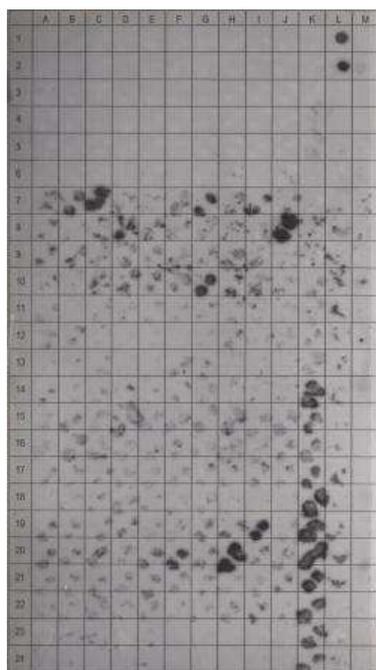
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Inv6 no injetada	Inv3 injetada colapsada	Inv3 Conyza									
2	Inv6 no injetada	Inv3 no injetada colapsada	Inv3 Conyza									
3	Inv6 injetada	Inv3 no injetada colapsada	Inv3 Conyza									
4	Inv6 injetada	Tomate sano control -	Inv3 Conyza									
5	Inv2 injetada	Tomate sano control -	Inv3 Conyza									
6	Inv2 injetada	1 µL ARN control +	Inv3 Conyza									
7	Inv2 no injetada	1 µL ARN control +	Inv3 Conyza									
8	Inv2 no injetada	1 µL ARN control -	Inv3 Conyza									
9	Inv5		Inv3 Conyza									
10	Inv5		Inv3 Conyza									
11	Inv5		Inv3 Conyza									
12	Inv5		Inv3 Conyza									
13	Inv4		Inv3 Conyza									
14	Inv4		Inv3 Conyza									
15	Inv4		Inv3 Conyza									
16	Inv4		Inv3 Chenopodium									
17	Inv1 injetada		Inv3 Chenopodium									
18	Inv1 injetada		Inv3 Chenopodium									
19	Inv1 no injetada		Inv3 Chenopodium									
20	Inv1 no injetada		Inv3 Chenopodium									
21	Inv3 injetada		Inv3 Sonchus									
22	Inv3 injetada		Inv3 Sonchus									
23	Inv3 no injetada		Inv3 Malva									
24	Inv3 no injetada											

**Membrana M193****Membrana M194****Membrana M194. Fecha de muestreo: 28-feb-02.**

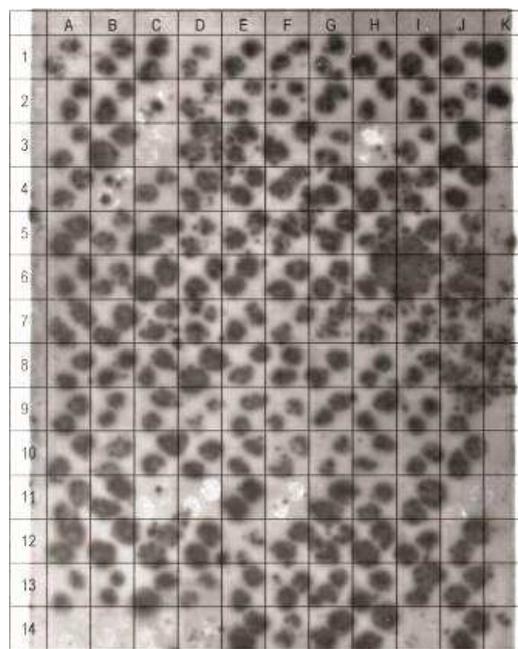
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv8 injetada	Tomate sano control -									
2	Inv8 injetada	Tomate sano control -									
3	Inv8 no injetada	1 µL ARN control +									
4	Inv8 no injetada	1 µL ARN control +									
5	Inv9	1 µL ARN control -									
6	Inv9	1 µL ARN control -									
7	Inv9										
8	Inv9										
9	Inv7 injetada										
10	Inv7 injetada										
11	Inv7 no injetada										
12	Inv7 no injetada										

**Membrana M196****Membrana M197****Membrana M197. Fecha de muestreo: 14-mar-02.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	1 μ L ARN control +
2	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	1 μ L ARN control +
3	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	1 μ L ARN control -
4	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	1 μ L ARN control -
5	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	1 μ L ARN control -
6	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Tomate sano control -
7	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	1 μ L ARN control +
8	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	1 μ L ARN control +
9	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	1 μ L ARN control -
10	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	1 μ L ARN control -
11	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	1 μ L ARN control -
12	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Tomate sano control -
13	Inv8 no injertada colapsada	Inv8 injertada colapsada	Inv8 injertada colapsada	Inv8 colapsada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv7 no injertada colapsada	Inv7 injertada colapsada	Inv7 injertada colapsada	Inv7 injertada	



Membrana M198



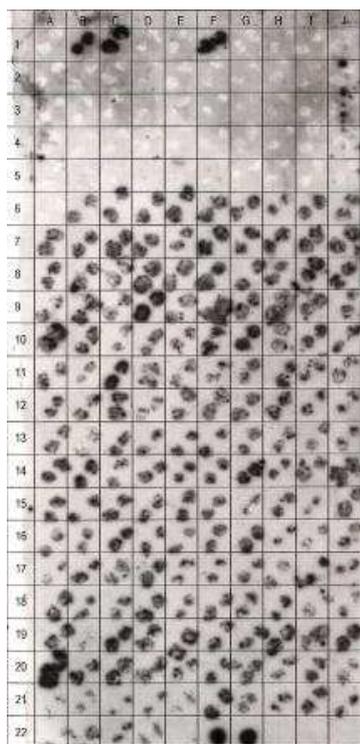
Membrana M199

Membrana M199. Fecha de muestreo: 27-mar-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv8 injetada	Inv8 injetada	1 μ L ARN control +								
2	Inv8 injetada	Inv8 injetada	1 μ L ARN control +								
3	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	1 μ L ARN control -								
4	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	1 μ L ARN control -								
5	Inv9	Inv9	1 μ L ARN control -								
6	Inv9	Inv9									
7	Inv9	Inv9									
8	Inv9	Inv9									
9	Inv7 injetada	Inv7 injetada									
10	Inv7 injetada	Inv7 injetada									
11	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada									
12	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada									
13	Inv8 colapsada	Inv7 colapsada	Inv7 colapsada	Inv7 colapsada							
14	Otras	Otras	Otras	Otras	Inv7 colapsada	Inv7 colapsada	Inv7 colapsada	Inv7 colapsada	Tomate sano control -	Inv7 con síntomas	

Membrana M200. Fecha de muestreo: 4-abr-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv6 injetada colapsada									
2	Inv6 injetada									
3	Inv6 no injetada colapsada									
4	Inv6 no injetada									
5	Otras									
6	Otras	Inv2 no injetada								
7	Inv2 no injetada									
8	Inv2 no injetada									
9	Inv2 injetada									
10	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 no injetada	Inv2 injetada	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
11	Inv5									
12	Inv5									
13	Inv5									
14	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
15	Inv4									
16	Inv4									
17	Inv4									
18	Inv4									
19	Inv3 no injetada									
20	Inv3 no injetada									
21	Inv3 injetada									
22	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 no injetada	Inv3 injetada	Tomate sano control -	1 µL ARN control +	1 µL ARN control +	1 µL ARN control -	1 µL ARN control -	1 µL ARN control -



Membrana M200



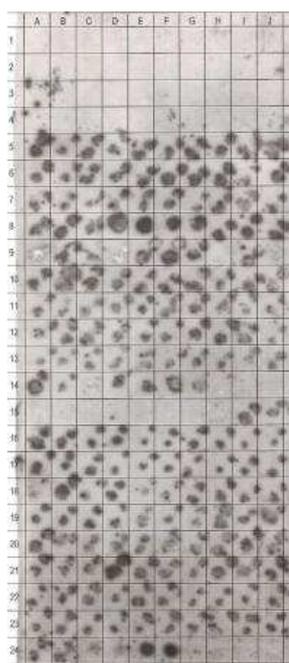
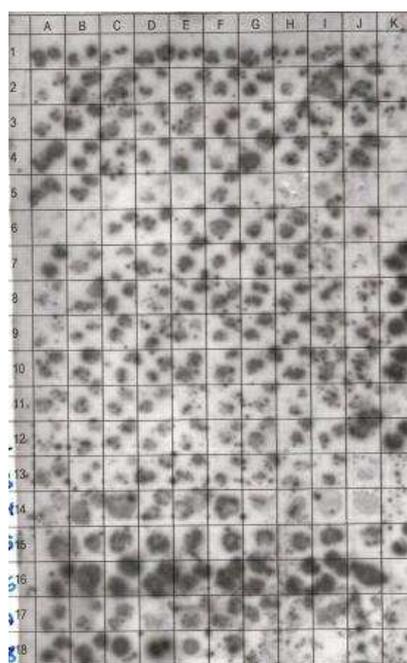
Membrana M201

Membrana M201. Fecha de muestreo: 11-abr-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
2	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
3	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
4	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
5	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada
6	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada
7	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada
8	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada
9	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada
10	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada
11	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada
12	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada
13	Tomate sana control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +					

Membrana M202. Fecha de muestreo: 18-abr-02.

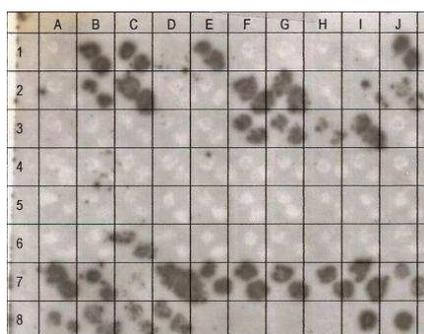
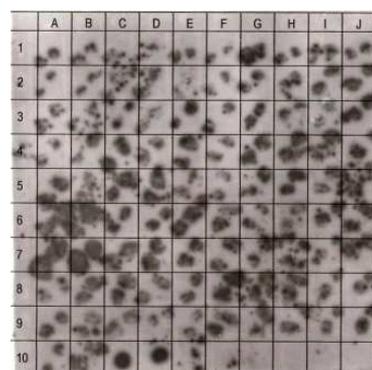
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada
2	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada
3	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada
4	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada
5	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada
6	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada	Inv1 injetada
7	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada
8	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada	Inv1 no injetada
9	Inv1 <i>Sonchus</i>	Inv1 <i>Conyza</i>	Inv1 <i>Conyza</i>	Inv1 <i>Chenop.</i>	Inv1 <i>Conyza</i>	Inv1 <i>Conyza</i>	Inv1 <i>Chenop.</i>	Inv1 <i>Chenop.</i>	Inv1 <i>Conyza</i>	Inv1 <i>Solanum</i>
10	Otras	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
11	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
12	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
13	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
14	Inv3 no injetada colapso	Inv3 injetada colapso	Inv3 <i>Sonchus</i>	Inv3 <i>Conyza</i>	Inv3 <i>Conyza</i>	Inv3 <i>Conyza</i>	Inv3 <i>Conyza</i>	Otras	Otras	Otras
15	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Inv2 no injetada colapso	Inv2 injetada colapso
16	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
17	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
18	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
19	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
20	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
21	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
22	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
23	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
24	Inv3 injetada	Inv3 injetada	1 µL ARN control -	1 µL ARN control -	1 µL ARN control +	1 µL ARN control +				

**Membrana M202****Membrana M203****Membrana M203. Fecha de muestreo: 25-abr-02.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Otras
2	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Otras
3	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Otras
4	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Otras
5	Inv8 no injertada	Inv8 injertada	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Inv 9	Otras	Otras
6	Otras	Otras	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Otras	Otras	Otras
7	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Otras
8	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Otras
9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Otras
10	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Otras
11	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
12	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Otras
13	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 no injertada	Otras
14	Inv7 Solanum	Inv7 Solanum	Inv7 Solanum	Inv7 Solanum	Inv7 Solanum	Inv7 Solanum	Inv7 Solanum	Inv7 Solanum	Inv7 Solanum	Inv7 Solanum	Otras
15	Inv7 Conyza	Inv7 Conyza	Inv7 Conyza	Inv7 Conyza	Inv7 Conyza	Inv7 Conyza	Inv7 Conyza	Inv7 Conyza	Inv7 Conyza	Inv7 Conyza	Otras
16	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada		Otras
17	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	Otras
18	Inv6 injertada	Inv6 injertada	1 µL ARN control +	1 µL ARN control +	1 µL ARN control -	1 µL ARN control -					Otras

Membrana M205. Fecha de muestreo: 2-may-02.

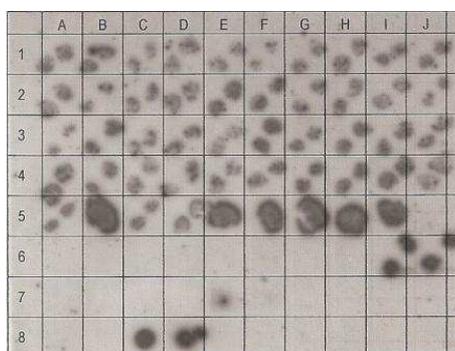
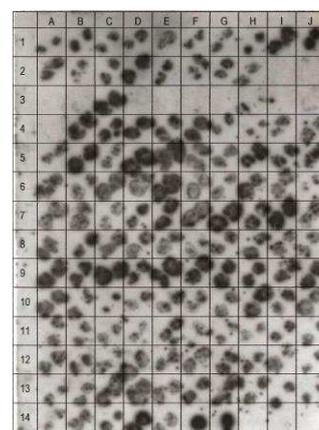
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada
2	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada
3	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada
4	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada
5	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada
6	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada
7	Inv6 injetada colapso	Inv6 no injetada colapso	Inv6 no injetada colapso	Inv6 injetada colapso	Inv6 no injetada colapso	Inv6 no injetada colapso	Inv1	Inv1	Inv1	Inv1
8	Inv1	Inv1	Inv1	Inv1			1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +

**Membrana M205****Membrana M206****Membrana M206. Fecha de muestreo: 2-may-02.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
2	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
3	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
4	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
5	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
6	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
7	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
8	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
9	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
10	Inv3 injetada	Inv3 no injetada	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -				

Membrana M207. Fecha de muestreo: 2-may-02.

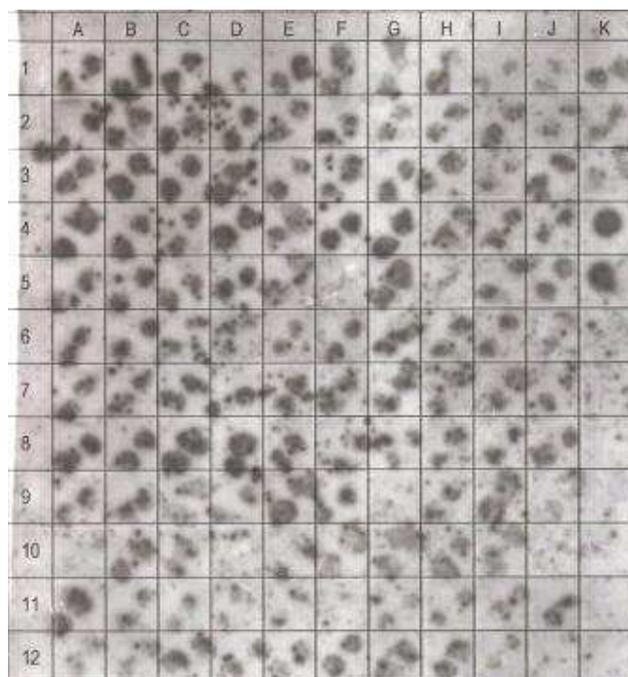
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
2	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5	Inv5
3	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4	Inv4
5	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
6	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
7	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
8	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +						

**Membrana M207****Membrana M208****Membrana M208. Fecha de muestreo: 9-may-02.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado
2	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado	Tomate inoculado		
3	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
4	Otras	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
5	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
6	Inv9	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada
7	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada
8	Inv8 injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada
9	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada
10	Inv8 no injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada
11	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada
12	Inv7 injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada
13	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada
14	Inv7 no injertada	Inv8 no injertada colapso	Inv8 no injertada colapso	Inv7 no injertada	Inv7 injertada	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	

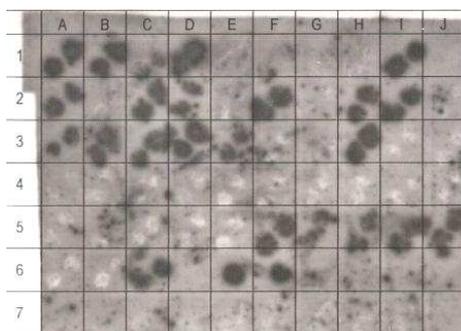
Membrana M210. Fecha de muestreo: 16-may-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv2 injetada										
2	Inv2 injetada	Inv2 no injetada									
3	Inv2 no injetada	Inv3 injetada									
4	Inv2 no injetada	1 μ L ARN control +									
5	Inv 4	1 μ L ARN control +									
6	Inv 4	1 μ L ARN control -									
7	Inv 5	1 μ L ARN control -									
8	Inv 5										
9	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 no injetada					
10	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 no injetada					
11	Inv3 no injetada										
12	Inv3 no injetada										

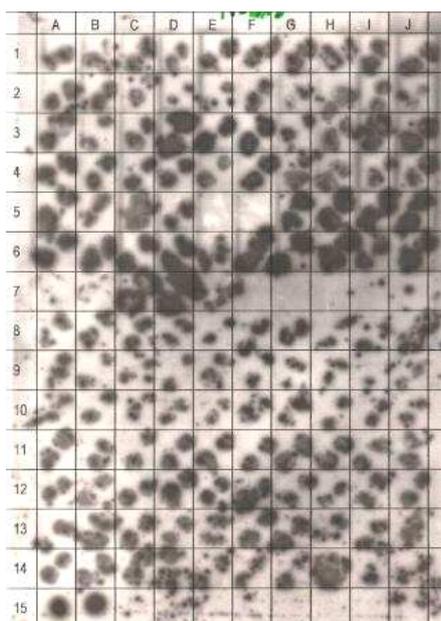
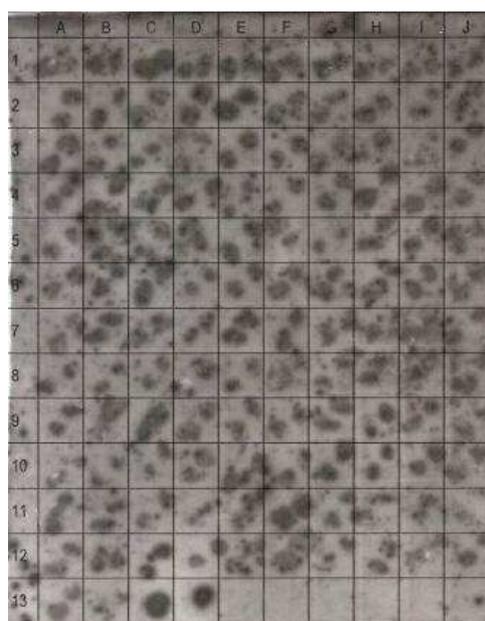


Membrana M211. Fecha de muestreo: 16-may-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras
2	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada
3	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada	Inv6 injetada
4	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada				
5	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada	Inv6 no injetada				
6	Otras	Otras	Otras		1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -		
7	Inv1 <i>Solanum</i>	Inv1 <i>Solanum</i>	Inv1 <i>Solanum</i>	Inv1 <i>Solanum</i>	Inv1 <i>Solanum</i>	Inv1 <i>Solanum</i>	Inv1 <i>Solanum</i>	Inv1 <i>Solanum</i>	Inv1 <i>Solanum</i>	Inv1 <i>Solanum</i>

**Membrana M213. Fecha de muestreo: 23-may-02.**

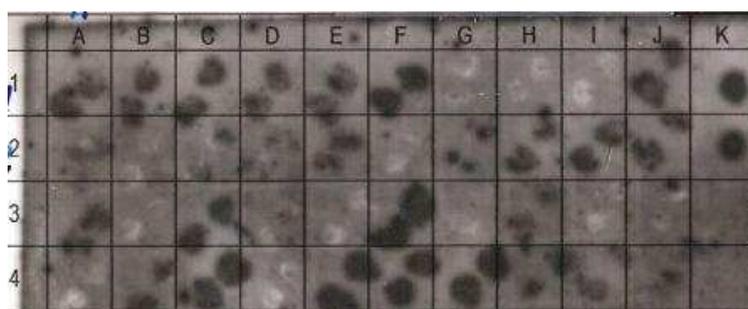
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada
2	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada	Inv8 injetada
3	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada
4	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada	Inv8 no injetada
5	Otras	Otras	Otras	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada
6	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada
7	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada	Inv 6 injetada					
8	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9
9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9
10	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9	Inv 9
11	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada
12	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada	Inv7 injetada
13	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada
14	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada	Inv7 no injetada
15	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -						

**Membrana M213****Membrana M214****Membrana M214. Fecha de muestreo: 30-may-02.**

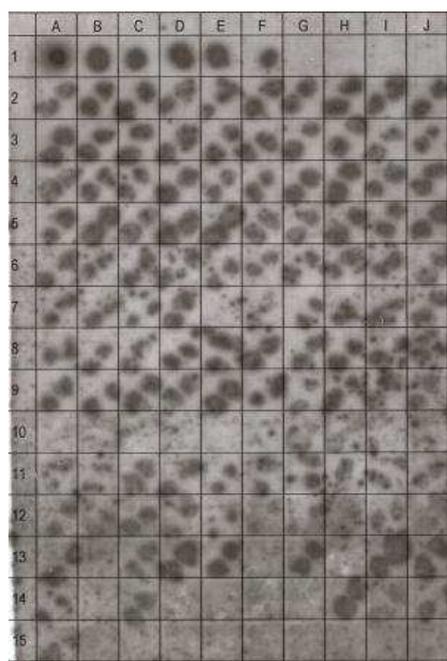
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
2	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada	Inv2 injetada
3	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
4	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada	Inv2 no injetada
5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5
6	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5	Inv 5
7	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4
8	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4	Inv 4
9	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
10	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada	Inv3 injetada
11	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
12	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada	Inv3 no injetada
13	Otras	Otras	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -				

Membrana M215. Fecha de muestreo: 30-may-02.

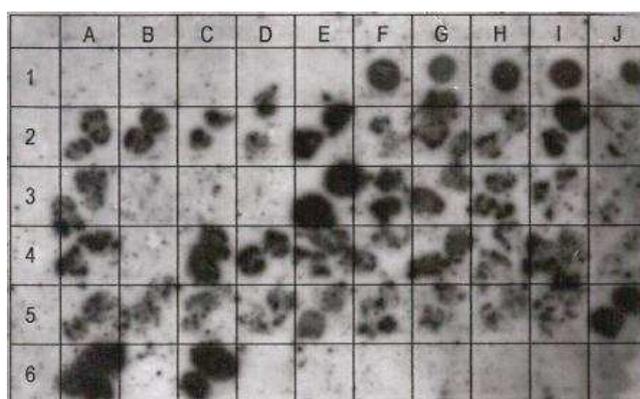
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv6 injertada	1 μ L ARN control +									
2	Inv6 injertada	1 μ L ARN control +									
3	Inv6 no injertada	1 μ L ARN control -									
4	Inv6 no injertada	1 μ L ARN control -									

**Membrana M216. Fecha de muestreo: 6-jun-02.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +				
2	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada
3	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada
4	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada	Inv8 no injertada
5	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada	Inv8 injertada
6	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
7	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
8	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9	Inv9
10	Inv 9 Solanum	Inv 9 Solanum	Inv 9 Solanum	Inv 9 Solanum	Inv 9 Solanum	Inv 9 Solanum	Inv 9 Solanum	Inv 9 Solanum	Inv 9 Solanum	Inv 9 Solanum
11	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada	Inv7 no injertada
12	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada	Inv7 injertada
13	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	Inv6 no injertada colapso	Inv6 no injertada colapso	Inv6 injertada colapso	Inv6 no injertada colapso	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada
14	Inv6 no injertada colapso	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada
15	Inv6 injertada	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -		

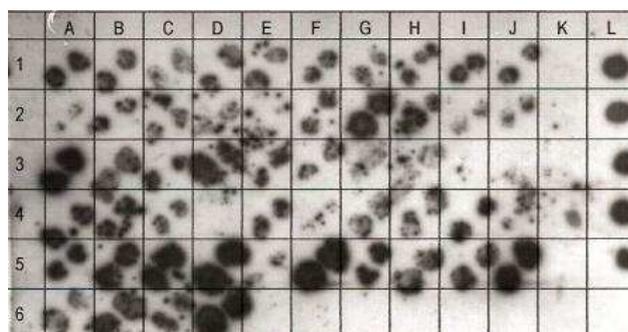
**Membrana M216****Membrana M217. Fecha de muestreo: 13-jun-02.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control +				
2	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada
3	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada
4	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada
5	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada
6	Inv6 no injertada colapso	Inv6 injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada colapso						
7	Tomate sano control -	Tomate sano control -	Tomate sano control -	Tomate sano control -	Tomate sano control -	Tomate sano control -	Tomate sano control -	Tomate sano control -	Tomate sano control -	Tomate sano control -

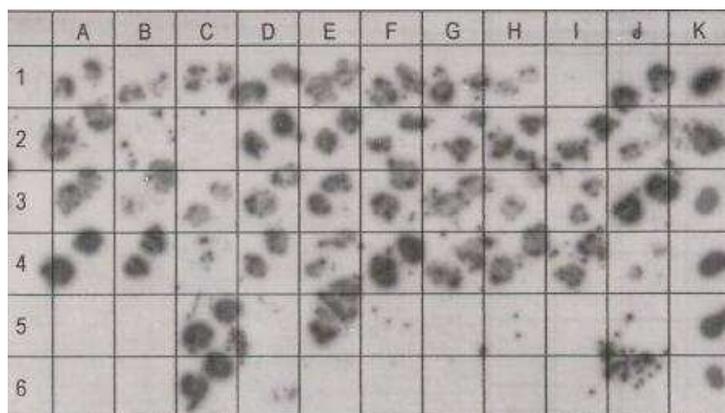


Membrana M218. Fecha de muestreo: 20-jun-02.

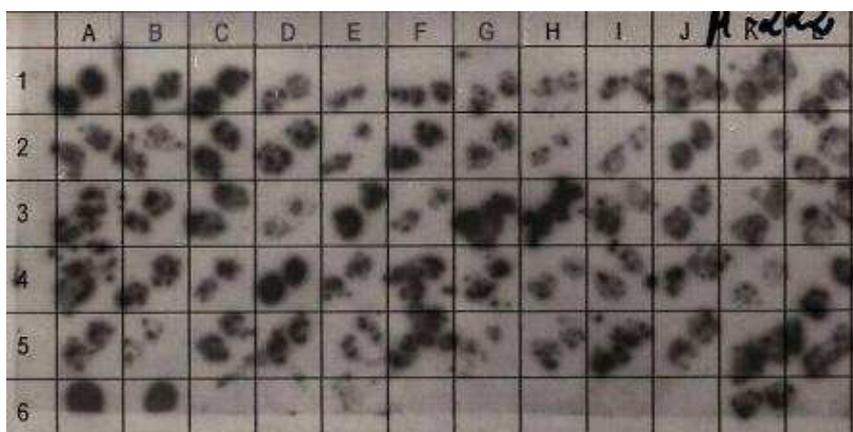
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Tomate sana control -	1 μ L ARN control +				
2	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Tomate sana control -	1 μ L ARN control +				
3	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Tomate sana control -	1 μ L ARN control +				
4	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Tomate sana control -	1 μ L ARN control +				
5	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Tomate sana control -	1 μ L ARN control +
6	Otras	Otras	Otras	Otras	1 μ L ARN control -							

**Membrana M219. Fecha de muestreo: 27-jun-02.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	1 μ L ARN control +				
2	Inv6 injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	1 μ L ARN control +
3	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	1 μ L ARN control +				
4	Inv6 injertada	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	1 μ L ARN control +				
5	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	Otras	1 μ L ARN control +
6	Otras	Otras	Otras	Otras	1 μ L ARN control -		1 μ L ARN control +				

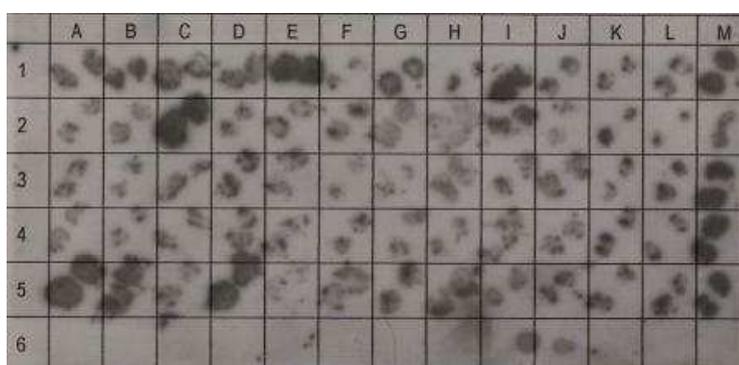
**Membrana M219****Membrana M222. Fecha de muestreo: 4-jul-02.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	
2	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	
3	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	Inv6 no injertada	
4	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	1 μ L ARN control -
5	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 injertada	Inv6 no injertada	1 μ L ARN control -
6	1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +							Tomate sana control -	Tomate sana control -	Inv6 no injertada	Inv6 no injertada	



Membrana M224. Fecha de muestreo: 11-jul-02.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Otras	Otras	Otras
2	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Otras	Otras	Otras
3	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Otras	Otras	Otras
4	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Otras	Otras	Otras
5	Inv6 inyectada colapso	Inv6 inyectada colapso	Inv6 inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 no inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 no inyectada colapso	Inv6 no inyectada colapso	Tomate síntomas	Otras	Otras	Otras	Otras
6				1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -				1 μ L ARN control +	1 μ L ARN control +			

**Membrana M226. Fecha de muestreo: 18-jul-02.**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Inv6 no inyectada	Otras	1 μ L ARN control +									
2	Inv6 no inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Inv6 inyectada	Otras	1 μ L ARN control +				
3	Inv6 inyectada	Otras	1 μ L ARN control +									
4	Otras	1 μ L ARN control -										
5	Otras	1 μ L ARN control -	1 μ L ARN control -									

