

Amarillos en los cultivos de tomate asociados a *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) en España

M. I. FONT, A. M. VAIRA, G. P. ACCOTTO, A. LACASA, J. SERRA, J. GOMILA, M. JUÁREZ, A.I. ESPINO, M. C. JORDÁ.

Durante 1997 se observaron en cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) de Málaga y Almería, síntomas anómalos en hojas que se caracterizaban por amarillo intermerval, manchas color púrpura, rojizas o necróticas, enrollado de las hojas viejas y aspecto quebradizo de las mismas; identificándose en el año 2000, por primera vez en España, al *Tomato chlorosis virus* (ToCV) como agente causal de esta enfermedad. En años posteriores se empezaron a observar síntomas similares en cultivos de tomate de Sevilla, Murcia, Alicante, Castellón, Mallorca, Tenerife y Gran Canaria, identificándose también al ToCV como el agente causal en la mayoría de muestras analizadas. En verano de 2001 se identificó, en cultivos de tomate de la provincia de Castellón, la presencia de un nuevo virus en España: *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV); que un año más tarde fue detectado en Alicante.

ToCV y TICV son crinivirus transmitidos por mosca blanca de manera semipersistente, limitados al floema y que infectan a tomate. ToCV es transmitido por *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *T. abutilonea* (Haldeman) y *Bemisia tabaci* (Gennadius); mientras que TICV es transmitido únicamente por *T. vaporariorum*. El rango de huéspedes de estos virus incluye varios cultivos importantes y especies ornamentales.

Todas las plantas de tomate procesadas en este trabajo fueron analizadas mediante transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando cebadores específicos de ToCV y TICV.

M. I. FONT y M. C. JORDÁ: Unidad de Virología del Instituto Agroforestal del Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. ETSI Agrónomos. Camino de Vera s/n. 46022-Valencia, España.

A. M. VAIRA y G. P. ACCOTTO: Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino, Italy.

A. LACASA: Departamento de Protección Vegetal, CIDA, C/ Mayor s/n, 30150 La Alherca (Murcia), España.

J. SERRA: Sección de Sanidad Vegetal de Valencia, Ctra. Alicante-Valencia, km 276.5, Silla (Valencia), España.

J. GOMILA: Sección de Sanidad Vegetal, Consejería de Agricultura, Comercio e Industria, Baleares, España.

M. JUÁREZ: Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Universidad Miguel Hernández. Carretera de Beniel km 3.2, 03312-Orihuela (Valencia), España.

A.I. ESPINO: Sección de Sanidad Vegetal de Tenerife, Finca Isamar s/n, Ctra. Boquerón, Valle de Guerra 38200 La Laguna (Tenerife), España.

Palabras clave: Amarillo, *Bemisia tabaci* (Gennadius), crinivirus, *Lycopersicon esculentum*, mosca blanca, RT-PCR, tomate, *Tomato chlorosis virus*, *Tomato infectious chlorosis virus*, *Trialeurodes abutilonea* (Haldeman), *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood).

INTRODUCCIÓN

El cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es uno de los principales cultivos hortícolas en España, estando citadas como las principales Comunidades autónomas productoras, según datos del M.A.P.A. de 2000: Extremadura, Región de Murcia, Andalucía, Cataluña, Comunidad Valenciana, Castilla La Mancha, Baleares y Canarias. En los últimos años, los cultivos hortícolas y entre ellos el tomate, se han visto afectados por la introducción periódica de nuevas plagas y enfermedades. El cultivo intensivo en invernadero durante casi todo el año, las nuevas variedades con diferentes grados de resistencia frente a distintas enfermedades, el movimiento de material vegetal entre los países y las condiciones climáticas en los invernaderos favorables para el establecimiento de los vectores y el desarrollo de nuevas enfermedades, parecen ser las causas más directas de la aparición e incremento de enfermedades víricas en el cultivo del tomate y de sus vectores transmisores, dificultando cada vez más la producción.

En 1997, se empezó a observar en el cultivo del tomate de Málaga y Almería una nueva sintomatología anómala que se caracterizaba por un amarilleamiento internervial de hojas de la zona baja e intermedia de la planta que en algunos casos desarrollaba manchas de color púrpura, rojizas o necróticas; también se pudo observar un enrollamiento de las hojas basales que se volvían quebradizas. Estos síntomas, en un principio, fueron atribuidos a problemas carenciales. En años posteriores la aparición y dispersión de esta sintomatología anómala se vio asociada con el incremento de poblaciones de la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gen. (NAVAS-CASTILLO *et al.*, 2000), lo cual hizo pensar que podría tratarse de una nueva enfermedad de etiología vírica transmitida por esta especie de mosca blanca.

Tres años después, se identificó al *Tomato chlorosis virus* (ToCV) como el agente causal de esta sintomatología (NAVAS-CASTILLO *et al.*, 2000). Ese mismo año, también

fue diagnosticada esta enfermedad en cultivos de tomate de Tenerife y Gran Canaria (ANÓNIMO, 2000).

En primavera y verano de 2001, se observaron también amarillos en el cultivo de tomate de Benicarló (Castellón). Estos síntomas eran similares a los que se venían observando desde 1997 y que eran ocasionados por ToCV; pero esta vez el agente causal de estos amarillos no se trataba de ToCV sino de otro crinivirus: el *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) (FONT *et al.*, 2002). Se trataba de la primera cita de esta enfermedad en España y la segunda en Europa después de Italia (FONT *et al.*, 2002 y VAIRA *et al.*, 2002).

Tomato chlorosis virus (ToCV) y *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) pertenecen al nuevo género *Crinivirus* de la familia *Closteroviridae*, han sido clasificados como los dos únicos closterovirus que infectan a tomate, transmitidos por moscas blancas, de genoma bipartito, con partículas virales flexuosas y limitados al floema (DUFFUS *et al.*, 1996; WISLER *et al.*, 1996; 1998a y 1998b; FAUQUET and MAYO, 1999).

En cuanto a la distribución espacial y temporal del ToCV y TICV a nivel mundial diremos que ToCV fue detectado por primera vez en cultivos de tomate de Florida (USA) en 1989 (SIMONE *et al.*, 1996), posteriormente en Colorado, Louisiana (USA) (WISLER *et al.*, 1998b), Taiwán (WISLER *et al.*, 1999), España (NAVAS-CASTILLO *et al.*, 2000), Islas Canarias (ANÓNIMO, 2000), Portugal (LOURO *et al.*, 2000), Sur Africa. (Wisler & Cortez, 2000-01), Puerto Rico (WINTERMANTEL *et al.*, 2001), e Italia (ACCOTTO *et al.*, 2001), y recientemente en Grecia (DOVAS *et al.*, 2002). TICV fue detectado por primera vez en cultivos de tomate de California (USA) en 1993 (DUFFUS *et al.*, 1994) y posteriormente en invernaderos de tomate del norte de Carolina (1997), Taiwan e Italia (WISLER *et al.*, 1999 y VAIRA *et al.*, 2002) y recientemente en España (FONT *et al.*, 2002) y Grecia (DOVAS *et al.*, 2002).

Las plantas de tomate infectadas tanto por ToCV como por TICV presentan un



Figura 1.- Síntomas generales de ToCV: planta de tomate con amarilleamiento internerval, enrollado de hojas de la zona baja e intermedia de la planta.



Figura 2.- Fuerte amarilleamiento internerval de hojas de la zona baja de una planta de tomate.



Figura 3.- Planta de tomate que presenta amarilleamiento y manchas color púrpura en la zona internerval.





Figura 4.- Detalle de una hoja de tomate con amarilleamiento de la zona marginal e internervial de los foliolos y manchas color púrpura.

amarilleamiento internervial de hojas de la zona baja e intermedia de la planta que pueden desarrollar manchas de color púrpura, rojizas o necróticas; así como enrollamiento de las hojas basales que se vuelven quebradizas, mientras que las hojas jóvenes apenas presentan síntomas (Figuras 1, 2, 3 y 4). En el caso del TICV estos síntomas pueden ser un poco más severos. La producción puede verse disminuida ya que se reduce la capacidad fotosintética de las plantas. En fruto no se observan síntomas evidentes, pero si puede verse reducido su tamaño y el número de frutos (WISLER *et al.*, 1998a). El principal inconveniente que presenta el diagnóstico visual de estos virus es precisamente que sus síntomas pueden ser confundidos con desórdenes fisiológicos o nutricionales (WISLER *et al.*, 1998b).

Aunque ToCV y TICV causan síntomas similares en tomate, se trata de virus distintos (WISLER *et al.*, 1998b y LOURO *et al.*, 2000),

que se pueden diferenciar en el tamaño de sus partículas virales, en la especie de mosca blanca transmisora, en el rango de huéspedes y en que no existe relación serológica entre ellos (DUFFUS *et al.*, 1996 y WISLER *et al.*, 1998a). A continuación vamos a señalar las diferencias que presentan ambos virus y en su caso la forma de poder distinguirlos:

Sintomatología de plantas indicadoras:

Como ya hemos citado anteriormente, estos virus producen síntomas similares en tomate; pero pueden diferenciarse con el empleo de plantas indicadoras: *Nicotiana benthamiana* Domin y *N. clevelandii* Gray. Estas plantas presentan amarillos internerviales cuando están infectadas por TICV o ToCV, pero únicamente TICV induce manchas necróticas (WISLER *et al.*, 1998b).

Partículas virales:

Tanto ToCV como TICV poseen partículas virales flexuosas, pero en el caso de ToCV se caracterizan por tener una longitud entre 800-850 nm, mientras que las del TICV entre 850-900 nm y 12 nm de anchura (WISLER *et al.*, 1998a y 1996). Dado el pequeño tamaño al que nos referimos y el posible rango de diferencias entre ambos, 50 nm, son prácticamente indistinguibles en su observación al microscopio electrónico.

Especies de mosca blanca transmisoras:

ToCV puede ser transmitido por *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *T. abutilonea* (Haldeman) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (WISLER *et al.*, 1998a y 1998b) de manera semipersistente (WISLER *et al.*, 1999); y TICV es transmitido también de forma semipersistente pero únicamente por la mosca blanca *T. vaporariorum* (Westwood) (DUFFUS *et al.*, 1996 y WISLER *et al.*, 1996).

Rango de huéspedes:

En cuanto al rango de huéspedes naturales tanto ToCV como TICV, como ya se ha comentado, pueden infectar a tomate, pero ninguno se ha descrito infectando especies de la familia *Curcubitaceae* (WISLER & COR-

TEZ., 2000-01) y únicamente TICV puede infectar a lechuga (*Lactuca sativa* L). ToCV además de tomate puede infectar a tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot), tabaco (*N. tabacum*), espinaca (*Spinacia oleracea* L), y entre las especies ornamentales cultivadas citaremos: ranunculus (*Ranunculus acuticus* L.), Aster de China (*Callistephus chinensis* Noes), caléndula (*Calendula officinalis* L.), zinnia o rascamoño (*Zinnia elegans* Jacq) y petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) (WISLER *et al.*, 1999 y WISLER & CORTEZ., 2000-01). TICV, además de tomate y lechuga, puede encontrarse infectando a tomatillo, patata (*Solanum tuberosum* L.), tres especies de nicotianas (*N. benthamiana* Domin, *N. clevelandii* Gray y *N. glauca* Graham), cardo perruno o hierba gusanera (*Picris echioides* L), alcachofa (*Cynara scolymus* L.), cardo (*C. cardunculus* L.), ranunculus, Aster de China y petunia entre otros (WISLER *et al.*, 1998a, 1996 y DUFFUS *et al.*, 1996).

El objetivo de este trabajo es dar a conocer la importancia de estas dos virosis: *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) detectadas recientemente en zonas productoras de tomate en España; cómo poder diferenciar estos dos virus tan similares en cuanto a sintomatología se refiere, revelar su distribución actual a nivel nacional y las técnicas de diagnóstico más fiables para su detección como apoyo a limitar su incidencia y expansión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre los métodos de detección empleados para el diagnóstico del ToCV y TICV podemos citar la técnica serológica ELISA, transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), y las técnicas de hibridación molecular: Northern blot, Western blot y dot-blot (WISLER *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 1998 y Louro *et al.*, 2000).

Tabla I.- Muestras de tomate con amarillos de hojas analizadas mediante RT-PCR con cebadores específicos de ToCV y TICV.

Nº de muestra	Fecha muestreo	Origen	RT-PCR	
			ToCV	TICV
5116	Abril 2001	Perelló (Valencia)	-	-
5131	Mayo 2001	Benicarló (Castellón)	-	+
4900-14	Junio 2001	Tenerife	+	-
4903-7	Junio 2001	Tenerife	+	-
4903-8	Junio 2001	Tenerife	-	-
4904-1	Junio 2001	Tenerife	-	-
4904-3	Junio 2001	Tenerife	-	-
4905-5	Junio 2001	Tenerife	-	-
4905-6	Junio 2001	Tenerife	-	-
4905-7	Junio 2001	Tenerife	-	-
4905-8	Junio 2001	Tenerife	-	-
4910-1	Junio 2001	Gran Canaria	-	-
4910-3	Junio 2001	Gran Canaria	-	-
5233	Junio 2001	Almería	-	-
5234	Junio 2001	Almería	-	-
5235	Junio 2001	Almería	-	-
5236	Junio 2001	Almería	-	-
5237	Junio 2001	Almería	+	-
5267	Junio 2001	Badajoz	-	-

5268	Junio 2001	Badajoz	-	-
5269	Junio 2001	Badajoz	-	-
5270	Junio 2001	Benicarló (Castellón)	-	-
5271	Junio 2001	Benicarló (Castellón)	-	-
5272	Junio 2001	Benicarló (Castellón)	-	-
5273-1	Junio 2001	Benicarló (Castellón)	-	-
5273-2	Junio 2001	Benicarló (Castellón)	-	+
5308	Julio 2001	Badajoz	-	-
5309	Julio 2001	Benicarló (Castellón)	-	-
5310	Julio 2001	Benicarló (Castellón)	-	+
5311	Julio 2001	Benicarló (Castellón)	-	+
5348	Agosto 2001	Badajoz	-	-
5349	Agosto 2001	Badajoz	-	-
5351	Agosto 2001	Guadalajara	-	-
5352	Agosto 2001	Guadalajara	-	-
5427	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5428	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	-	-
5429	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5430	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5431	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	-	-
5432	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5433	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5434	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5435	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5436	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5437	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5438	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5439	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5440	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5441	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5442	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5443	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5444	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5445	Noviembre 2001	Benicarló (Castellón)	+	-
5454-4	Noviembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5454-5	Noviembre 2001	Mazarrón (Murcia)	-	-
5454-7	Noviembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5457	Noviembre 2001	Mallorca	+	-
5466	Noviembre 2001	Torrellano (Alicante)	+	-
5467	Noviembre 2001	Torrellano (Alicante)	+	-
5468	Noviembre 2001	Torrellano (Alicante)	+	-
5469	Noviembre 2001	Torrellano (Alicante)	+	-
5473	Noviembre 2001	Albatera (Alicante)	+	-
5474	Noviembre 2001	Albatera (Alicante)	+	-
5481	Diciembre 2001	Manacor (Mallorca)	+	-
5491	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-

5496	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5497	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5498	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5499	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5500	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	-	-
5501	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5504	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5513	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5515	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5517	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5526	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5527	Diciembre 2001	Mazarrón (Murcia)	+	-
5534	Enero 2002	Alicante	+	-
5535	Enero 2002	Alicante	+	-
5544	Enero 2002	Mazarrón (Murcia)	-	-
5585	Abril 2002	Bacarot (Alicante)	-	-
5586	Abril 2002	Bacarot (Alicante)	-	-
5587	Abril 2002	Bacarot (Alicante)	-	-
5588	Abril 2002	Bacarot (Alicante)	+	-
5589	Abril 2002	Bacarot (Alicante)	+	-
5590	Abril 2002	Bacarot (Alicante)	-	-
5591	Abril 2002	Bacarot (Alicante)	-	-
5592	Abril 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5593-1	Abril 2002	Muchamiel (Alicante)	-	-
5593-2	Abril 2002	Muchamiel (Alicante)	-	-
5594	Abril 2002	Muchamiel (Alicante)	-	-
5595	Abril 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5596	Abril 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5597	Abril 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5598	Abril 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5599	Abril 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5600	Abril 2002	Perelló (Valencia)	-	-
5606	Abril 2002	Ramonete (Murcia)	+	-
5607-1	Abril 2002	Ramonete (Murcia)	-	-
5607-2	Abril 2002	Ramonete (Murcia)	-	-
5608	Abril 2002	Ramonete (Murcia)	+	-
5609-1	Abril 2002	Ramonete (Murcia)	+	-
5609-2	Abril 2002	Ramonete (Murcia)	+	-
5610	Abril 2002	Ramonete (Murcia)	-	-
5611	Abril 2002	Ramonete (Murcia)	-	-
5612	Abril 2002	Ramonete (Murcia)	+	-
5620-1	Mayo 2002	Murcia	-	-
5620-2	Mayo 2002	Murcia	-	-
5620-3	Mayo 2002	Murcia	-	-
5620-4	Mayo 2002	Murcia	-	-
5620-5	Mayo 2002	Murcia	-	-

5620-6	Mayo 2002	Murcia	-	-
5620-7	Mayo 2002	Murcia	-	-
5620-8	Mayo 2002	Murcia	-	-
5620-9	Mayo 2002	Murcia	-	-
5625	Mayo 2002	Manacor (Mallorca)	+	-
5626	Mayo 2002	Manacor (Mallorca)	+	-
5627	Mayo 2002	Manacor (Mallorca)	+	-
5630-1	Mayo 2002	Elche (Alicante)	+	-
5630-2	Mayo 2002	Elche (Alicante)	+	-
5630-3	Mayo 2002	Elche (Alicante)	+	-
5631-1	Mayo 2002	Elche (Alicante)	+	-
5631-2	Mayo 2002	Elche (Alicante)	+	-
5631-3	Mayo 2002	Elche (Alicante)	+	-
5643-1	Junio 2002	Bacarot (Alicante)	-	-
5643-2	Junio 2002	Bacarot (Alicante)	-	-
5643-3	Junio 2002	Bacarot (Alicante)	-	-
5644-1	Junio 2002	Bacarot (Alicante)	+	-
5644-2	Junio 2002	Bacarot (Alicante)	+	-
5646	Junio 2002	Bacarot (Alicante)	-	-
5646	Junio 2002	Bacarot (Alicante)	+	-
5647-1	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	-	-
5647-2	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	-	-
5648-1	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	-	-
5648-2	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	-	+
5648-3	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	-	+
5648-4	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	+	+
5648-5	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	+	+
5648-7	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	+	+
5648-8	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5648-9	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	-	+
5649-1	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	-	-
5649-2	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5649-3	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5649-4	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	-	-
5650-1	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5650-2	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5650-3	Junio 2002	Muchamiel (Alicante)	+	-
5651-1	Junio 2002	Puerto de Mazarrón (Murcia)	-	-
5651-2	Junio 2002	Puerto de Mazarrón (Murcia)	-	-
5651-3	Junio 2002	Puerto de Mazarrón (Murcia)	-	-
5651-4	Junio 2002	Puerto de Mazarrón (Murcia)	-	-
5651-5	Junio 2002	Puerto de Mazarrón (Murcia)	-	-
5651-6	Junio 2002	Puerto de Mazarrón (Murcia)	-	-
5651-7	Junio 2002	Puerto de Mazarrón (Murcia)	-	-
5651-8	Junio 2002	Puerto de Mazarrón (Murcia)	-	-
5651-9	Junio 2002	Puerto de Mazarrón (Murcia)	-	-

5651-10	Junio 2002	Puerto de Mazarrón (Murcia)	-	-
5652-1	Junio 2002	Benicarló (Castellón)	-	+
5652-2	Junio 2002	Benicarló (Castellón)	-	+
5652-3	Junio 2002	Benicarló (Castellón)	-	+
5652-4	Junio 2002	Benicarló (Castellón)	-	+
5652-5	Junio 2002	Benicarló (Castellón)	-	+
5652-6	Junio 2002	Benicarló (Castellón)	-	+
5652-7	Junio 2002	Benicarló (Castellón)	-	-
5652-8	Junio 2002	Benicarló (Castellón)	-	-
5652-9	Junio 2002	Benicarló (Castellón)	-	-
5653	Junio 2002	Mazarrón (Murcia)	-	-
5656	Junio 2002	Badajoz	-	-
5657	Junio 2002	Badajoz	-	-
5658	Junio 2002	Badajoz	-	-
5720	Julio 2002	Extremadura	-	-
5721	Julio 2002	Extremadura	-	-
5722	Julio 2002	Extremadura	-	-
5723	Julio 2002	Extremadura	-	-
5724	Julio 2002	Extremadura	-	-
5725	Julio 2002	Extremadura	-	-
5726	Julio 2002	Extremadura	-	-
5817	Octubre 2002	Tenerife	+	-
5818	Octubre 2002	Tenerife	+	-
5819	Octubre 2002	Tenerife	+	-
5820	Octubre 2002	Gran Canaria	+	-
5821	Octubre 2002	Gran Canaria	+	-
5846	Noviembre 2002	Tenerife	+	-
5847	Noviembre 2002	Tenerife	+	-
5848	Noviembre 2002	Tenerife	+	-
5849	Noviembre 2002	Tenerife	+	-
5850	Noviembre 2002	Gran Canaria	+	-
5851	Noviembre 2002	Gran Canaria	+	-
5855	Diciembre 2002	Tenerife	+	-
5856	Diciembre 2002	Tenerife	+	-
5857	Diciembre 2002	Gran Canaria	+	-
5858	Diciembre 2002	Gran Canaria	+	-
5859	Diciembre 2002	Gran Canaria	+	-
5860	Diciembre 2002	Gran Canaria	-	-
5864	Diciembre 2002	Sevilla	+	-

Nosotros hemos empleado la técnica RT-PCR, con cebadores específicos de ToCV y de TICV, debido a la alta sensibilidad y especificidad de la misma.

Procedencia de las muestras. En este trabajo se han analizado desde Abril de 2001

hasta Diciembre de 2002 un total de 196 muestras de planta de tomate procedentes de las principales zonas productoras de este cultivo en España y que presentaban síntomas de amarilleos en hojas (Tabla 1). Las muestras fueron enviadas a nuestro laboratorio

(Laboratorio Nacional de Referencia de virus, viroides y fitoplasmas) para comprobar la presencia de ToCV y/o TICV, o bien muestreadas por el personal de este laboratorio con el mismo propósito.

Como controles positivos de ToCV y TICV se emplearon dos aislados procedentes de Italia (ToCV-Italy y TICV-Italy respectivamente) cedidos por la Dra. Vaira. El control negativo se obtuvo de una planta de tomate sana.

Extracción de ARN. Para la extracción de ARN de las muestras objeto de estudio, se emplearon 0.1 g de tejido fresco de hojas procedentes de la zona intermedia de la planta y que mostraban amarillosos. El ARN total de estas muestras fue extraído utilizando el reactivo comercial RNawiz (Ambion) siguiendo las instrucciones recomendadas por la casa comercial. El ARN total se resuspendió en 40 µl de H₂O Depc (0.1-0.5 µg/µl).

Amplificación por RT-PCR. Para llevar a cabo la amplificación por RT-PCR se empleó el Kit One Step RT-PCR System (Invitrogen) y dos parejas de cebadores específicos: ToCV-172(+) / ToCV-610(-) para la detección de ToCV (Louro *et al.*, 2000) y TICV-32(+) / TICV-532(-) para la detección de TICV (Vaira *et al.*, 2002). La

desnaturalización inicial de los ARNs totales (1:70 en H₂O Depc) se realizó a 65°C durante 5 min. La RT-PCR se llevó a cabo con 5 µl del RNA desnaturalizado de cada una de las muestras y 20 µl de la mezcla para RT-PCR que se añadió a cada uno de los tubos. El primer paso de la transcripción reversa se hizo a 50°C durante 30 min., seguido de un paso de desnaturalización a 94°C durante 2 min. y 35 ciclos de 94°C - 30 seg., 55°C - 30 seg. y 72°C - 30 seg. cada uno de ellos; finalizando con un paso de extensión a 72°C durante 5 min. La RT-PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal). Los productos de la RT-PCR se separaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% en tampón TBE 0.5x, teñidos en un baño de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 15 min. y visualizados con un transiluminador de luz UV. Para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos se compararon con un marcado de ADN de 100 pb (MBI Fermentas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis mediante la técnica RT-PCR reveló que 95 muestras procedentes de Alicante, Almería, Castellón, Gran Canaria, Mallorca, Murcia, Sevilla y Tenerife, recolectadas durante la primavera, otoño e invierno, amplificaron un fragmento de 439 pb, tamaño que corresponde con el esperado de la secuencia de ToCV (Figura 5). En 16 muestras procedentes de Benicarló (Castellón) y Muchamiel (Alicante), recolectadas en los meses de Mayo, Junio y Julio; amplificaron un fragmento de 501 pb, tamaño que coincide con el esperado de la secuencia de TICV (Figura 6). En 3 muestras de Muchamiel (Alicante) se detectaron infecciones mixtas de ToCV y TICV.

Estos resultado confirmaron la dispersión del *Tomato chlorosis virus* (ToCV) por la mayoría de las principales zonas productoras de tomate: Sevilla, Málaga, Almería, Murcia, Alicante, Castellón, Mallorca, Tenerife y Gran Canaria (Figura 7) y la detección por primera vez en España de un segundo crinivi-

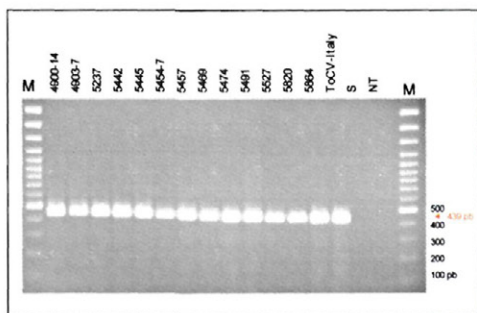


Figura 5.- Detección de ToCV mediante RT-PCR con cebadores específicos: ToCV-172(+) y ToCV-610(-). Gel de agarosa al 1.5% en tampón TBE 0.5x, teñido con Bromuro de etidio y visualizado con luz UV. S= muestra de planta de tomate sana; NT= sin muestra; M= Marcador de 100 pb de Fermentas, los tamaños de los fragmentos en pares de bases son: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb.

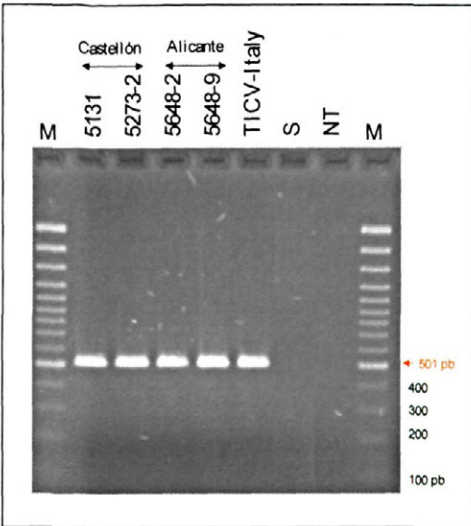


Figura 6.- Detección de TICV mediante RT-PCR con cebadores específicos: TICV-32(+) y TICV-532(-). Gel de agarosa al 1.5% en tampón TBE 0.5x, teñido con Bromuro de etidio y visualizado con luz UV. S= muestra de planta de tomate sana; NT= sin muestra; M= Marcador de 100 pb de Fermentas, los tamaños de los fragmentos en pares de bases son: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb.

rus: *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) en Castellón en 2001 y en Alicante en 2002.

El continuado movimiento de material vegetal de unas zonas a otras podría haber sido la causa de la rápida dispersión del ToCV. Según se observa en el mapa de la figura 7, resulta extraño pensar que ToCV no esté presente en Granada y Valencia y sí en

zonas colindantes como son Málaga, Almería, Alicante y Castellón. Quizás el ToCV si esté presente en estas zonas, y la explicación a estos resultados podría deberse a la ausencia de muestras de tomate analizadas procedentes de Granada y Valencia.

El ToCV fue diagnosticado en muestras recolectadas principalmente en primavera, otoño e invierno; mientras que el TICV se diagnosticó en muestras recolectadas en primavera y verano. Estos resultados nos permiten emitir la hipótesis que las poblaciones de las diferentes especies de mosca blanca predominantes, en función de las condiciones ambientales, estarían marcando la época de aparición de una u otra enfermedad, además de la posible interacción de las citadas condiciones ambientales y los requerimientos de cada virus en particular.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado gracias al apoyo del convenio de colaboración entre la Dirección General de Agricultura (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) y la Unidad de Virología de la Universidad Politécnica de Valencia para el diagnóstico, detección e identificación de enfermedades causadas por virus, viroides y fitoplasmas. También se agradece la colaboración de los laboratorios de Sanidad Vegetal de las distintas Comunidades Autónomas.

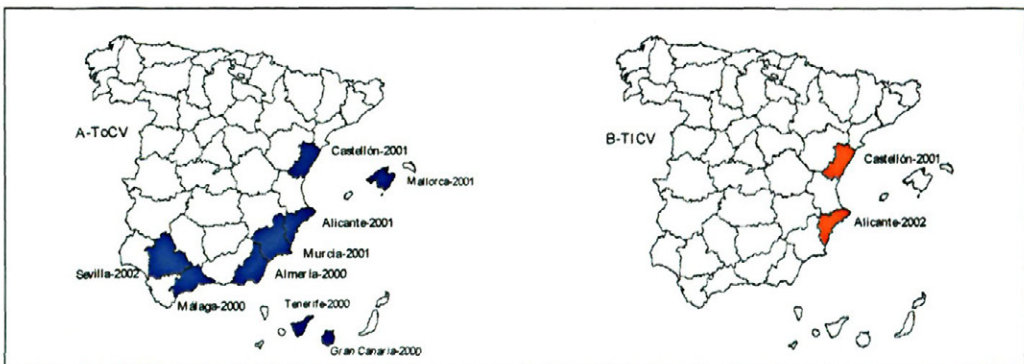


Figura 7.- Distribución espacial y temporal del ToCV (A) y TICV (B) en España.

ABSTRACT

FONT M. I., A. M. VAIRA, G. P. ACCOTTO, A. LACASA, J. SERRA, J. GOMILA, M. JUÁREZ, A.I. ESPINO, M. C. JORDÁ. Yellowing of tomato crops associated with Tomato chlorosis virus (ToCV) and Tomato infectious chlorosis virus (TICV) in Spain. *Bol. San. Veg. Plagas*, **29**: 109-121.

During 1997, tomato (*Lycopersicon esculentum*) crops with symptoms of interveinal yellowing, brozing, brittleness, and rolling of lower leaves were observed in Malaga and Almeria (southern Spain) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV) was detected for the first time in Spain in 2000 as the causal agent of this disease. Later similar symptoms began to be observed in other tomato crops in Sevilla, Murcia, Alicante, Castellon, Mallorca, Tenerife and Gran Canaria and ToCV was also identified as the causal agent in most of the samples analyzed. In addition, in several tomato samples collected during the summer of 2001 in Castellon province tomato crops a new virus: *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) was identified. This was the first report of TICV in Spain. To our knowledge, TICV has only been detected in Spain, within the Castellon and Alicante provinces.

ToCV and TICV are both whitefly-transmitted criniviruses. They are transmitted in a semipersistent manner and are phloem-limited tomato-infecting viruses. ToCV is transmitted by *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *T. abutilonea* (Haldeman) and *Bemisia tabaci* (Gennadius); whereas TICV is transmitted only by *T. vaporariorum*. The host range of these viruses includes some important crops and ornamental species.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using ToCV- and TICV-specific primers was used for the reliable diagnosis of ToCV and TICV in field samples.

Key words: *Bemisia tabaci* (Gennadius), crinivirus, *Lycopersicon esculentum*, RT-PCR, tomato, *Tomato chlorosis virus*, *Tomato infectious chlorosis virus*, *Trialeurodes abutilonea* (Haldeman), *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), whitefly, yellowing.

REFERENCIAS

- ACCOTTO, G.P., VAIRA, A.M., CECCHIATI, M., FINETTI-SIALER, M.M. y GALLITELLI, D. 2001. First report of *Tomato chlorosis virus* in Italy. *Plant Disease*, **85**: 1208.
- ANÓNIMO. 2000. Canary Islands results. *EWSN Newsletter*, no.3, p 2.
- DOVAS, C.I., KATIS, N.I. y AVGELIS, A.D. 2002. Multiplex detecting of criniviruses associated with epidemics of yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Disease*, **86** (12): 1345-1349.
- DUFFUS, J.E., LIU, H-Y and WISLER, G.C. 1994. A new closterovirus of tomato in southern California transmitted by the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). *Phytopathology*, **84**: 1072-1073.
- DUFFUS, J.E., LIU, H-Y and WISLER, G.C. 1996. *Tomato infectious chlorosis virus* – A new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *European Journal of Plant Pathology*, **102**: 219-226.
- FAUQUET, M.C. and MAYO, M.A. 1999. Abbreviations for plant virus names-1999. *Archives of Virology*, **144**: 1249-1273.
- FONT, M.I., MARTÍNEZ-CULEBRAS, P., JORDÁ, M.C., LOURO, D. VAIRA, A.M. and ACCOTTO, G.P. 2002. First report of *Tomato infectious chlorosis virus* in Spain. *Plant Disease*, **86**(6): 696.
- LI, R.H., WISLER, G.C., LIU, H.Y., DUFFUS, J.E. 1998. Comparison of diagnostic techniques for detecting *Tomato infectious chlorosis virus*. *Plant Disease*, **82**: 84-88.
- LOURO, D., ACCOTTO, G.P., and VAIRA, A.M. 2000. Occurrence and diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 589-592.
- NAVAS-CASTILLO, J., CAMERO, R., BUENO, M., and MORIONES, E. 2000. Severe yellowing Outbreaks in Tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease*, **84**: 835-837.
- SIMONE, G.W., HOCHMUTH, R.C., WISLER, G.C., DUFFUS, J.E., LIU, H-Y and LI, R.H. 1996. A new whitefly-vectored closterovirus of tomato in Florida. *Tom. Inst. Proc.*, 71-74.
- VAIRA, A.M., ACCOTTO, G. P., VECCHIATI, M. and BRAGALONI, M. 2002. *Tomato infectious chlorosis* causes leaf yellowing and reddening of tomato in Italy. *Phytoparasitica*, **30** (3): 290-294.
- WINTERMANTEL, W.M., POLSTON, J.E., ESCUDERO, J., PALI, E.R. 2001. First report of *Tomato chlorosis virus* in Puerto Rico. *Plant Disease*, **85**: 228.
- WISLER, G.C. and CORTEZ, A.A. 2000-01. Differential transmission characteristics among four whitefly vectors of *Tomato chlorosis crinivirus*. In: USDA Whitefly Abstracts 2000-01. Section B: Virus, Epidemiology, & Virus-Vector Interaction-2000. <http://ag.arizona.edu/crops/cotton/insects/wf/abstracts/usdabstr00/usdabst00B.html>

- WISLER, G.C., DUFFUS, J.E., and LIU, H.-Y. 1999. Expansion of tomato-infecting Criniviruses into new areas. In: *Plant Virus Epidemiology: Current Status and Future Prospects*, Abstracts VII Int. Plant Virus Epidemiology Symposium (P 70) Almería, Spain.
- WISLER, G.C., DUFFUS, J.E., LIU, H.-Y. and LI, R.H. 1998a. Ecology and Epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Disease*, **82**: 270-280.
- WISLER, G.C., LI, R.H., LIU, H.-Y., LOWRY, D.S., and DUFFUS, J.E. 1998b. *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology*, **88**: 402-409.
- WISLER, G.C., LIU, H.-Y., KLAASSEN, V.A, DUFFUS, J.E., and FLAK, B.W. 1996. *Tomato infectious chlorosis virus* has a bipartite genome and induces phloem-limited inclusions characteristic of the closteroviruses. *Phytopathology*, **86**, 622-626.

(Recepción: 7 mayo 2002)

(Aceptación: 6 junio 2002)