

Necrosis del tomate: “torrao” o “cribado”

A. ALFARO FERNÁNDEZ, M. C. CÓRDOBA SELLÉS, M. C. CEBRIÁN MICÓ, I. FONT, M. JUÁREZ, V. MEDINA, A. LACASA, J. A. SÁNCHEZ NAVARRO, V. PALLÁS, C. JORDÁ GUTIÉRREZ

Desde la primavera de 2001, viene presentándose en España una nueva enfermedad conocida con el nombre de “torrao” o “cribado”. Los síntomas que habitualmente presentan las plantas afectadas son una necrosis en la parte basal del foliolo que evoluciona a cribado, en los peciolos aparecen manchas longitudinales en ocasiones endurecidas que llegan a curvar los foliolos, y los frutos manifiestan manchas necróticas, deformaciones que finalmente lo rajan, quedando comercialmente inviables. Muestreos realizados desde su aparición han determinado la mayor incidencia de la enfermedad en la zona de Murcia, seguido de Canarias y en menor proporción Almería, y Alicante. Los resultados de los análisis realizados a las 369 muestras recogidas determinan que el 67% de las muestras analizadas eran positivas a *Pepino mosaic virus* (PepMV). En los ensayos de transmisión, únicamente mediante el injerto, se consiguió reproducir los síntomas de la enfermedad en dos casos, en el resto las plantas inoculadas e injertadas únicamente mostraban síntomas típicos de PepMV y los análisis realizados confirmaron este aspecto. A la vista de los resultados obtenidos, se diseñó un nuevo método de diagnóstico que ha permitido la caracterización del 89% de las muestras analizadas como aislado Chileno 2 de PepMV, recientemente publicado en el Gen Bank (Accesión number: DQ000985). De acuerdo con lo expuesto podría tratarse de uno de los agentes implicados en el desarrollo del síndrome junto con otros factores aún por determinar.

A. ALFARO FERNÁNDEZ, M. C. CÓRDOBA SELLÉS, M. C. CEBRIÁN MICÓ, I. FONT, C. JORDÁ GUTIÉRREZ. Instituto Agroforestal Mediterráneo- Virología Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022 Valencia. (mjordaj@eaf.upv.es)

M. JUÁREZ. Universidad Miguel Hernández. Orihuela. Alicante.

V. MEDINA. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Lleida.

A. LACASA. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. La Alberca, Murcia.

J. A. SÁNCHEZ NAVARRO, V. PALLÁS. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universidad Politécnica de Valencia-CSIC.

Palabras clave: *Pepino mosaic virus*, microscopía electrónica, diagnóstico, virosis, serología, RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

En la primavera del año 2001 se detecta en invernaderos de tomate de Murcia una nueva sintomatología no observada anteriormente en la zona. Esta sintomatología se denominó “cribado” o “torrao” del tomate, nombre que hace referencia al aspecto quemado que adquieren las plantas afectadas. Las prospecciones realizadas desde su apari-

ción en la Región de Murcia han determinado la naturaleza estacional de la enfermedad, ya que sólo se presenta en primavera y otoño, mostrando su mayor agresividad a mitad de dichas estaciones, aunque esto puede variar en función de la campaña (JORDÁ *et al.*, 2003). Desde su primera detección, el “torrao” ha ido apareciendo en diferentes zonas productoras de tomate de nuestro país.



Figura 1. Síntomas de “torrao” observados en plantas afectadas. a. Amarillo y necrosis en la zona basal de los folíolos. b. Cribado de las lesiones necróticas de la base del foliolo. c. Manchas internerviales de color negro que avanzan hacia la zona apical del foliolo. d. Arabescos necróticos. e. Aspecto general de una planta afectada por “torrao”. f. Manchas longitudinales endurecidas en los peciolo que se asemejan a “costuras”. g. Manchas negras longitudinales no endurecidas en los peciolo que forman “chorreras”.

Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen en las nuevas brotaciones. En las hojas, puede observarse un amarilleo en la zona basal de los folíolos y junto al nervio central que posteriormente se necrosa (Figura 1a). Estas lesiones necróticas presentan una típica coloración marrón que evoluciona a “cribado” (Figura 1b). Otro de los síntomas observados en las hojas es la aparición de manchas necróticas internerviales de color negro en la base del folíolo, que van avanzando hacia la zona apical (Figura 1c), pudiendo formar arabescos (Figura 1d). En este caso las manchas necróticas negras no evolucionan, y los folíolos no presentan el típico “cribado”, aunque la apariencia general de la planta enferma es similar al caso anterior, tiene un aspecto “quemado” o “torrao” (Figura 1e).

En los pecíolos, pedúnculos y tallos también se observa una manifestación variable de los síntomas, presentándose unas manchas longitudinales de color pardo, endurecidas que se asemejan a “costuras” (Figura 1f). Estas “costuras” ejercen una tensión tal en los tejidos que desemboca en el retorcimiento en espiral de la hoja. En algunos casos, los pecíolos presentan manchas longitudinales no endurecidas de color negro que forman “chorreras” (Figura 1g). Los síntomas descritos, tanto en hojas como en tallos y pecíolos, pueden aparecer juntos, presentándose en la misma planta, o separados, detectándose plantas aisladas con una u otra manifestación.

Las flores de plantas afectadas por “torrao” pueden presentar también necrosis y caer (JORDÁ *et al.*, 2003). No obstante, es más habitual observar la afección en los frutos recién cuajados o frutos verdes de menos de 5 cm de diámetro, mostrando manchas marrones o negras, pudiendo ser lineales o circulares (Figura 2a), que presentan aspecto de “costura”. A medida que el fruto engorda las lesiones se hacen más evidentes, y la tensión ejercida en el fruto termina por rajarlo (Figura 2b). Generalmente son los frutos verdes los que suelen verse en los invernaderos con la citada sintomatología, pero si las

plantas afectadas no son eliminadas, aparecen frutos maduros totalmente rajados, deformados y con necrosis (Figura 2c). En cualquier caso, estos frutos son comercialmente inviables.

Cuando el “torrao” o “cribado” aparece en los primeros estados de desarrollo, las plantas presentan porte reducido, frutos pequeños y cosecha escasa. En ocasiones, cuando se producen ataques poco severos o



Figura 2. Síntomas observados en frutos de plantas afectadas por “torrao”. a. “Costuras” en fruto verde. b. Frutos verdes rajados. c. Frutos maduros rajados, deformados y con necrosis.

las condiciones no son las adecuadas para el desarrollo del “torrao” la planta continúa su desarrollo, emitiendo nuevas hojas y manteniendo como único síntoma patente el cribado en hojas más viejas (JORDÁ *et al.*, 2003).

El “torrao” en campo puede aparecer en infecciones mixtas con otros virus que afectan habitualmente al cultivo del tomate como son *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y el *Potato virus Y* (PVY). En estos casos los síntomas se acentúan. Los síntomas típicos del “torrao” siempre se ven asociados con la sintomatología típica del *Pepino mosaic virus* (PepMV), virosis muy extendida por las zonas productoras de tomate de nuestro país desde 1998 (JORDÁ *et al.*, 2001). Las plantas afectadas manifiestan los síntomas anteriormente descritos junto con abullonado, filiformismo, rizado y mosaicos típicos del PepMV.

Los primeros estudios realizados en la detección del agente causal de la enfermedad descrita apuntaron a la posible implicación de *Parietaria mottle virus* (ARAMBURU y ARIÑO, 2003), Ilarvirus de partículas isométricas que produce una sintomatología similar a la típica de “torrao”. Este virus provoca, en las plantas de tomate afectadas, la aparición de manchas necróticas internerviales y anillos en las hojas del brote. Los tallos muestran un mosaico que progresa a necrosis, observándose en la superficie de los frutos manchas marrones y anillos acorchados. Posteriormente, una comunicación presentada en el Tomato Working Group Meeting XV (Bari, Septiembre 2005) señaló que el agente causal de esta enfermedad es un nuevo virus, proponiéndose para éste la denominación “*Tomato torrado virus*” (ToTV), compuesto por partículas esféricas de aproximadamente 28 nm de diámetro similar a las de los miembros de la familia Comoviridae y Sequiviridae (VERBEEK *et al.*, 2005).

La disparidad de criterios junto con otras observaciones realizadas, han determinado el planteamiento de este trabajo, donde se recogen los estudios preliminares realizados

para establecer el posible agente causal de la sintomatología descrita como “torrao” o “cribado”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreos realizados

Desde su primera aparición en el año 2001, se han venido realizando muestreos en los invernaderos y campos afectados de diferentes zonas productoras de tomate de España, recogiendo también otras muestras que presentaban diferentes tipos de necrosis y sintomatologías similares al “torrao”. El número de muestras recogidas, el año de muestreo y su procedencia se recogen en el Cuadro 1.

Evaluación de la incidencia viral

Análisis serológicos

Las muestras recogidas fueron analizadas por técnica serológica DAS-ELISA utilizándose extractos de hojas y/o frutos de dichas

Cuadro 1. Año de muestreo, número y procedencia del total de muestras recogidas con síntomas de “torrao” y otras muestras con sintomatología similar.

Año	Procedencia	Nº muestras	Total/año
2001	Murcia	28	32
	Alicante	1	
	Mallorca	3	
2002	Murcia	19	24
	Alicante	3	
	Vizcaya	2	
2003	Murcia	27	34
	Canarias	7	
2004	Murcia	6	19
	Almería	2	
	Canarias	9	
	Tarragona	2	
2005	Murcia	98	110
	Canarias	10	
	Valencia	2	
2006	Canarias	17	150
	Murcia	133	
Nº total de muestras			369

Cuadro 2. Antisueros específicos empleados para todos los virus considerados en los análisis y casas comerciales a las que pertenecen.

Casa comercial del antisuero	Entidad viral analizada
Loewe Biochemica. Sauerlach, Germany	<i>Tomato spotted wilt</i> (TSWV)
	<i>Potato virus Y</i> (PVY)
	<i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV)
	<i>Potato virus X</i> (PVX)
	<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)
	<i>Tobacco necrosis virus</i> (TNV)
	TNV+ satélite
	<i>Tomato chlorotic spot virus</i> (TCSV)
	<i>Groundnut ringspot virus</i> (GRSV)
	<i>Broad bean wilt virus- I</i> (BBWV-I)
Bio-rad Phyto-Diagnostics. Marnes- La Coquette, France	<i>Tobacco streak virus</i> (TSV)
	Potyvirus-General
	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)
	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)
	<i>Tomato blackring virus</i> (TBRV)
	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)
	<i>Tomato ring spot virus</i> (ToRSV)
DSMZ Deutsche Sammlung von mikroorganismen und Zellkulturen. Braunschweig, Germany	<i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV)
	<i>Pelargonium zonate spot virus</i> (PZSV)
	<i>Pepper mottle virus</i> (PepMoV)
Adgen Phytodiagnosics. Auchincruive, United Kingdom	<i>Potato virus Y- raza N</i> (PVYN)
	<i>Potato virus Y- raza 0</i> (PVYO)

plantas frente a los antisueros específicos para los virus que están recogidos en el Cuadro 2, con el fin de descartar la implicación de las virosis conocidas que atacan al tomate. En todos los casos, se siguieron los protocolos indicados por las propias casas comerciales, utilizando como testigo negativo tejido de tomate sano y como positivo extractos foliares de plantas infectadas por los diferentes virus analizados.

Análisis moleculares

Las muestras recogidas se analizaron mediante distintas técnicas moleculares (PCR, Nested-PCR, RT-PCR e hibridación molecular), tras realizar la pertinente extracción de ácidos nucleicos. Los extractos de RNA se obtuvieron empleando el kit de extracción RNAwiz (Ambion catalog. nº 9736). En los casos en los que se analizaron

virus cuyo material genético está compuesto por DNA, la extracción de éste se realizó con el kit EZNA Plant DNA Miniprep kit (Omega Bio-tek).

El análisis por PCR de Begomovirus y TYLCV se llevó a cabo según el método descrito por MARTÍNEZ-CULEBRAS *et al.* (2001). Para descartar la presencia de fitoplasmas las muestras se analizaron mediante Nested-PCR con cebadores universales de la forma descrita por LEE *et al.* (1993). Se aplicó la técnica RT-PCR para la detección en un paso de PepMV, *Tomato chlorosis virus*, *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Parietaria mottle virus* (PMoV) y *Bean yellow disorder virus* (BnYDV) usando cebadores específicos para cada uno de ellos: PepMV (PAGAN *et al.*, 2006), TICV (VAIRA *et al.*, 2002), ToCV (LOURO *et al.*, 2000), AMV (MARTÍ-

NEZ-PRIEGO *et al.*, 2004), PMoV (JANSSEN *et al.*, 2005) y BnYDV (SEGUNDO *et al.*, 2004). Se buscó descartar la presencia de cualquier virosis de los géneros Potexvirus, Potyvirus, Ilarvirus y Luteovirus mediante el análisis de las muestras por RT-PCR en dos pasos con cebadores degenerados para Potexvirus (MARTÍNEZ-CULEBRAS *et al.*, 2002), Potyvirus (MARTÍNEZ-PRIEGO *et al.*, 2002), Ilarvirus (análisis realizados en el laboratorio del Dr. Pallás) y Luteovirus, Tospovirus y TSWV (análisis diseñados en el Laboratorio de Referencia de Virus y todavía en fase de experimentación, no publicados). Todos los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TAE 1X y teñidos con bromuro de etidio. El tamaño del fragmento obtenido se estableció por comparación con un marcador de pesos moleculares conocidos GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España). Las muestras se analizaron posteriormente mediante hibridación molecular no radioactiva con digoxigenina con sonda específica de PMoV suministrada por el Dr. Pallás (GALIPIENSO *et al.*, 2005).

Microscopía electrónica de transmisión (M.E.T)

Se seleccionaron 23 muestras que presentaban distinto grado de agresividad en la sintomatología, para su observación al microscopio electrónico de transmisión. Para ello, se hicieron preparaciones del extracto fresco de las muestras mediante su tinción con la sal sódica del ácido fosfotúngstico al 2% pH: 7,2 y 6,5, realizándose asimismo preparaciones con extractos pre-purificados de material infectado. Se procedió a la inclusión en resinas de 35 muestras que presentaban síntomas típicos de torrao procedentes de las diferentes zonas afectadas, cortándose con ultramicrotomo y observándose mediante M.E.T. con el fin de identificar posibles inclusiones virales típicas de alguno de los virus anteriormente citados, detectar la presencia de partículas virales y los cambios citológicos en el tejido infectado.

Ensayos de transmisión

Inoculación mecánica artificial

Al comienzo de la primavera del 2001, se llevó a cabo la inoculación mecánica de plantas de tomate sanas con material vegetal procedente de las primeras plantas que mostraron los síntomas de la enfermedad objeto de este estudio recogidas en Murcia. Previamente, se efectuó el análisis serológico de las muestras a inocular, eliminándose aquel material vegetal que presentaba infección con alguna de las virosis descritas hasta ese momento en los campos de producción de tomate.

Ante los resultados obtenidos en esta transmisión previa, se realizaron distintos ensayos de inoculación mecánica. Para ello, se seleccionaron muestras que presentaban los síntomas típicos de "torrao" descritos anteriormente, analizándose asimismo el material a utilizar en la transmisión para descartar la presencia de cualquier otra entidad que interfiriera con el objetivo marcado de demostrar la transmisibilidad del posible agente causal de este síndrome.

Las muestras seleccionadas para realizar la transmisión mecánica a partir del homogeneizado de hoja fresca y sus características quedan recogidas en el Cuadro 3. Asimismo se realizó una purificación parcial de los aislados 7826, 7827, 8493, 9023 (Cuadro 4) y se procedió a su inoculación mecánica artificial.

En los distintos ensayos de transmisión se variaron las condiciones de la inoculación (momento del ciclo vegetativo, estado de desarrollo de la planta, técnica de inoculación, tampón de inoculación, pH, etc...) para determinar cuáles eran las que permitían la reproducción del síndrome. Las plantas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas en invernadero o en fitotrón.

La variedad de tomate seleccionada para la realización de la transmisión mecánica artificial fue Marmande, excepto en el último ensayo, en el que se utilizó la variedad Boludo por observar en campo una mayor sensibilidad a la manifestación del síntoma de "torrao". La inoculación mecánica se realizó por frotación con el abrasivo Carborun-

Cuadro 3. Características de los aislados originales empleados en los ensayos de transmisión mediante inoculación mecánica del extracto fresco de hoja, número de plantas inoculadas con cada aislado, síntomas observados en las plantas inoculadas y resultados obtenidos en el análisis a PepMV.

Nº aislado	Muestras originales		Nº plantas inoculadas	Plantas inoculadas	
	Síntomas originales	Resultados a PepMV		Síntomas en las plantas inoculadas	Resultados a PepMV
8413	"Torrao", amarilleo y abullonado	-	3	Asintomática	-
8414	"Torrao". Abullonado	-	3	Asintomática	-
8597*	Mosaico verde claro-verde oscuro	+	8	Mosaico verde claro-oscuro. Evolución a mancha aislada.	+
8599	"Torrao", costuras, abullonado y mosaico	+	11	Fuerte abullonado y filiformismo	+
8941	Abullonado. "Torrao". Inicio de apuntamiento	+	2	Ligero abullonado e inicio de apuntamiento	+
8942	Mosaico dorado, mosaico en cáliz y tallo. Fruto verde con manchas verde oscuro. Amarilleo en la base del foliolo y clorótico en el ápice.	+	2	Amarilleo internervial, abullonado y deformación. Mancha amarilla aislada (1)	+
8965*	Mancha amarilla aislada y mosaico	+	3	Fuerte abullonado y rizado	+
8975	"Torrao" con cribado, amarilleo internervial y abullonado	+	2	Fuerte abullonado	+
8980	Abullonado y "torrao"	+ ¹	3	Asintomáticas (2) Apuntamiento de foliolos (1)	+ ¹
9003	Abullonado, apuntamiento, "torrao", arabesco, cribado, amarilleo internervial	+	2	Fuerte abullonado y nervios marcados	+
9052	"Torrao"	-	3	Abullonado e inicio de rizado	+ ¹
9053	"Torrao"	+	3	Abullonado y apuntamiento de los foliolos	+ ¹
9054	"Torrao"	+	3	Abullonado y apuntamiento de los foliolos	+
9055	"Torrao"	+	4	Abullonado y apuntamiento de los foliolos. Mancha aislada.	+

*: Aislado que presentaba en campo síntomas exclusivamente de PepMV.

¹: Análisis negativo mediante serología. Análisis positivo a RT-PCR con los cebadores específicos de PepMV. (1), (2): Nº plantas afectadas con el síndrome descrito.

dum (tamaño de partícula 0,013 mm) e inoculación con el homogeneizado de hoja fresca de material infectado o del purificado. Se observó la evolución de los síntomas durante 60 días, testándose a los 15 días de la inoculación serológicamente y por RT-PCR según se creyó conveniente al observar la sintomatología obtenida.

Transmisión por injerto

Al comienzo de la aparición de la enfermedad se realizaron dos ensayos previos de transmisión mediante injerto con el fin de mantener el material para proseguir el estudio y para comprobar la posible existencia de un agente fitopatógeno. En dichos ensayos se injertaron dieciséis y veinte plantas

Cuadro 4. Características de los aislados originales purificados, número de plantas inoculadas con los purificados virales obtenidos, sintomatología observada en las plantas inoculadas y resultados de los análisis a PepMV.

Nº aislado	Muestras originales		Nº plantas inoculadas	Plantas inoculadas	
	Síntomas originales	Resultados a PepMV		Síntomas en las plantas inoculadas	Resultados a PepMV
7826	Abullonado, amarilleo "torrao", cicatrices en foliolos y cribado	-	12	Amarilleo, abullonado, apuntamiento y curvamiento de los foliolos. Asintomáticas (2)	+
7827	Abullonado, amarilleo, "torrao", cicatrices en foliolos y cribado	+ ¹	12	Mosaico verde claro-verde oscuro, amarilleo basal y apuntamiento de foliolos. Abullonado. Inicio de curvamiento de foliolos. Asintomáticas (2)	+
8943	"Torrao con cribado, Abullonado. Mosaico amarillo internerval. Curvamiento foliolos. Costuras en tallo.	+	5	Apuntamiento de foliolos y abullonado. Asintomática (1)	+
9023	"Torrao"	+	5	Rizado, abullonado y apuntamiento de foliolos. Enanismo (1).	+

¹: Análisis negativo mediante serología. Análisis positivo a RT-PCR con los cebadores de Potexvirus, secuencia obtenida de PepMV, 97% homología con aislado Ch2.

(1), (2): Nº plantas afectadas con el síndrome descrito.

respectivamente. Se seleccionaron plantas con síntomas típicos de "torrao" y se analizaron las muestras seleccionadas para descartar la presencia de cualquier otro agente. El injerto del material afectado se realizó por escudete.

Posteriormente, debido a la baja eficiencia obtenida en los ensayos anteriores, se realizaron otros dos ensayos partiendo de material afectado procedente de campo como en el caso anterior pero introduciendo cambios en el procedimiento. Se seleccionaron 14 muestras de tomate con síntomas típicos de "torrao", 11 procedentes de Cañada del Gallego-Mazarrón (Murcia) recogidas en mayo de 2005 (ensayo 1) y 3 recogidas en Calnegre-Mazarrón (Murcia) recogidas en junio de 2006 (ensayo 2), analizándolas previamente a realizar el injerto. El modo de injerto empleado fue el mismo que en el caso anterior. Las plantas injertadas en el ensayo 1 se mantuvieron en el fitotrón en condiciones controladas de humedad y temperatura (20°C/24°C, noche/día) y las del ensayo 2 se mantuvieron en invernadero. Las caracterís-

ticas de las muestras originales se recogen en el Cuadro 5. Se observó la evolución de las plantas injertadas y se procedió a realizar los análisis pertinentes.

RESULTADOS

Evaluación de la incidencia viral, variedades afectadas y distribución geográfica del síndrome

Desde que apareció la enfermedad hace ya seis años, se han recogido 369 muestras que presentaban la sintomatología descrita en este trabajo. De las muestras recogidas el 84%, procedían de Murcia, mientras que el 12% aproximadamente correspondían a muestreos en las Islas Canarias, zonas donde la incidencia ha sido más notable. Las muestras recogidas en la mitad norte del país (Vizcaya, Tarragona y Valencia) presentaban una necrosis en los foliolos, que se podría confundir con los típicos síntomas de "torrao" como puede observarse en la (Figura 3a y 3b), sin embargo los resultados de su diagnóstico diferían de las muestras recogidas en

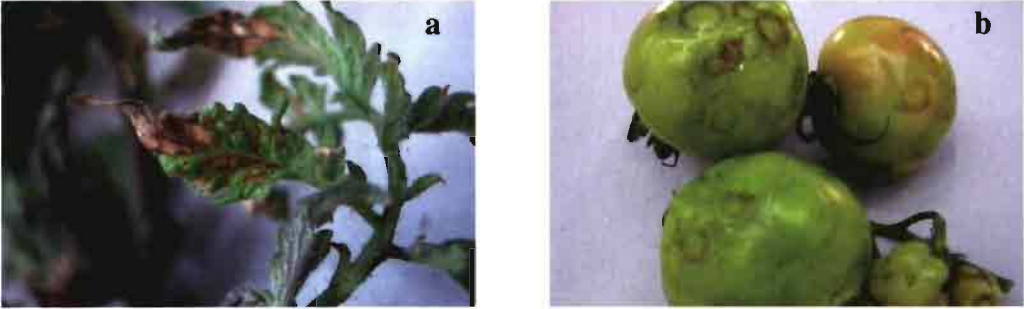


Figura 3. Síntomas observados en plantas infectadas por PMoV. a. Áreas necróticas en los foliolos típicos de PMoV. b. Círculos necróticos en fruto verde causados por PMoV.

las otras zonas muestreadas. Hay que puntualizar que las 3 muestras de “torrao” recogidas en Mallorca, procedían de un semillero de Murcia. Según nuestros datos, la sintomatología típica del síndrome conocido como “torrao” o “cribado” ha sido detectada en Murcia, Almería, Alicante, Tenerife, Gran Canaria y Mallorca.

En general se puede afirmar que todas las variedades de tomate cultivadas en la actualidad se ven afectadas en mayor o menor grado por el “torrao”. Se observaron diferencias en el comportamiento de las diferentes variedades en cuanto a la agresividad y momento de aparición de los síntomas de “torrao”, sin embargo parece apreciarse una menor sensibilidad en algunas variedades resistentes a otras virosis, aunque esta apreciación requiere un mayor estudio al respecto. Las variedades más sensibles presentan tempranamente síntomas tanto en hoja como en frutos todavía verdes.

La distribución de las plantas afectadas en el interior de los invernaderos suele presentarse en focos localizados generalmente en las líneas cercanas a las puertas, así como en las zonas cercanas al pasillo central, aunque en las filas centrales del invernadero y en la parte intermedia de las filas, también se presentan plantas afectadas. El número de plantas afectadas va incrementándose con el paso del tiempo. Según testimonios de los propios productores y estudios llevados a cabo por uno de los autores de este artículo, se obser-

va una clara relación entre la incidencia de la enfermedad y presencia de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood en campo.

Resultados de los análisis realizados a las muestras recogidas

Análisis serológicos

Los resultados serológicos de todas las muestras recogidas de campo a lo largo de los diferentes años se sintetizan en la Figura 4. De todas las virosis analizadas, la que presentó un mayor número de resultados positivos fue el *Pepino mosaic virus*, donde un 60% de las muestras analizadas fueron positivas (Figura 4). El 11% de los casos analizados a TSWV resultaron positivos, así como el 6% de los análisis realizados a PVY. Debemos indicar que los resultados positivos obtenidos en los análisis de TSV y el TNV + satélite dieron una señal muy débil, por lo que no fueron considerados como resultados fiables, pudiendo tratarse de falsos positivos por una escasa sensibilidad del suero utilizado o ruido de fondo del experimento.

Hay que indicar que los análisis serológicos iban dirigidos por la sintomatología presentada; se recogieron diferentes tipos de necrosis, pero alguna de ellas entraba en el estudio sospechosa de ser portadora de otros agentes virales que desarrollan también síntomas de necrosis, como es el caso de PVY, AMV, PVX o el propio TSWV. En otros casos, se analizaron virosis que han sido descritas en otros países como productoras de

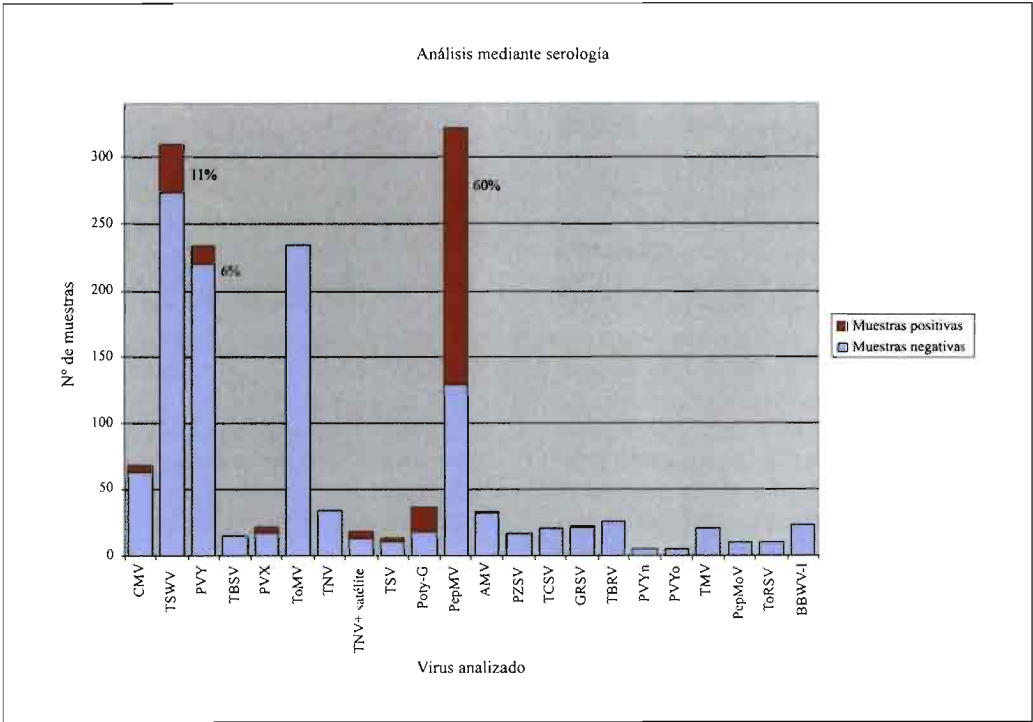


Figura 4. Número de positivos y negativos del total de muestras analizadas para cada una de las virosis estudiadas mediante análisis por serología.

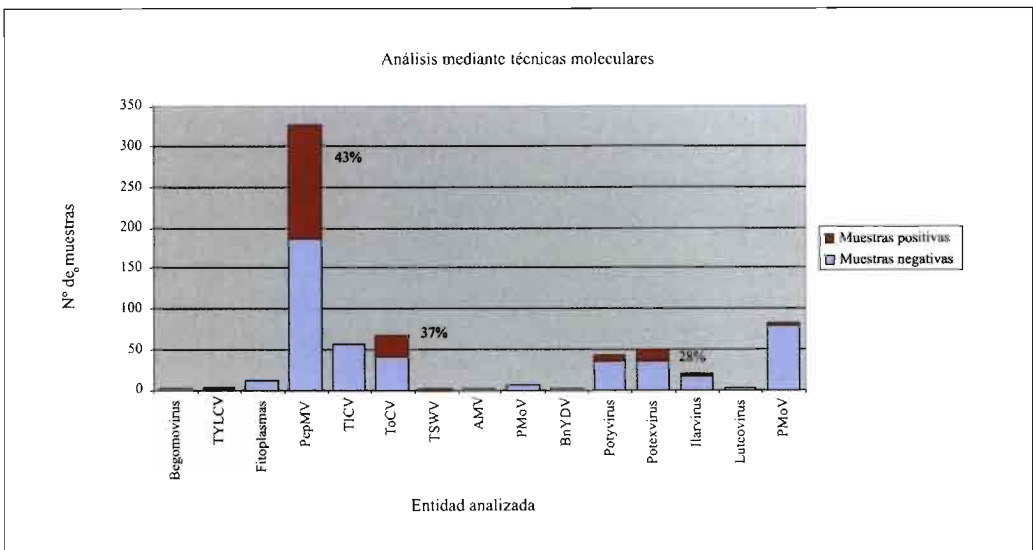


Figura 5. Número de positivos y negativos del total de muestras analizadas para cada una de las entidades estudiadas mediante análisis por técnicas moleculares.

necrosis en tomate como es el caso de PZSV, descrito en Italia (GALLITELLI, 1982).

Análisis moleculares

Los resultados de los distintos análisis moleculares se resumen en la Figura 5. Los análisis realizados mediante RT-PCR con los cebadores específicos de PepMV resultaron positivos en el 43% de los 322 casos analizados, estando presente también el ToCV en el 37% de las 68 muestras analizadas a este virus (Figura 5).

El *Pepino mosaic virus* se analizó en algunas muestras, como se ha explicado anteriormente, mediante distintas técnicas de análisis: serología, RT-PCR con cebadores espe-

cíficos y mediante RT-PCR en dos pasos con cebadores degenerados de Potexvirus. En aquellas muestras a las que se realizó más de un análisis para la detección de esta entidad, normalmente los resultados fueron coincidentes, pero en algunos casos por ejemplo, en muestras que por serología habían resultado negativas, el análisis mediante RT-PCR con cebadores específicos de PepMV resultó positivo, debido lógicamente a la mayor sensibilidad de la técnica molecular. En determinados casos, hubo que recurrir a la RT-PCR con cebadores degenerados del género Potexvirus y posterior secuenciación para determinar la presencia de este virus. Haciendo un recuento total del número de

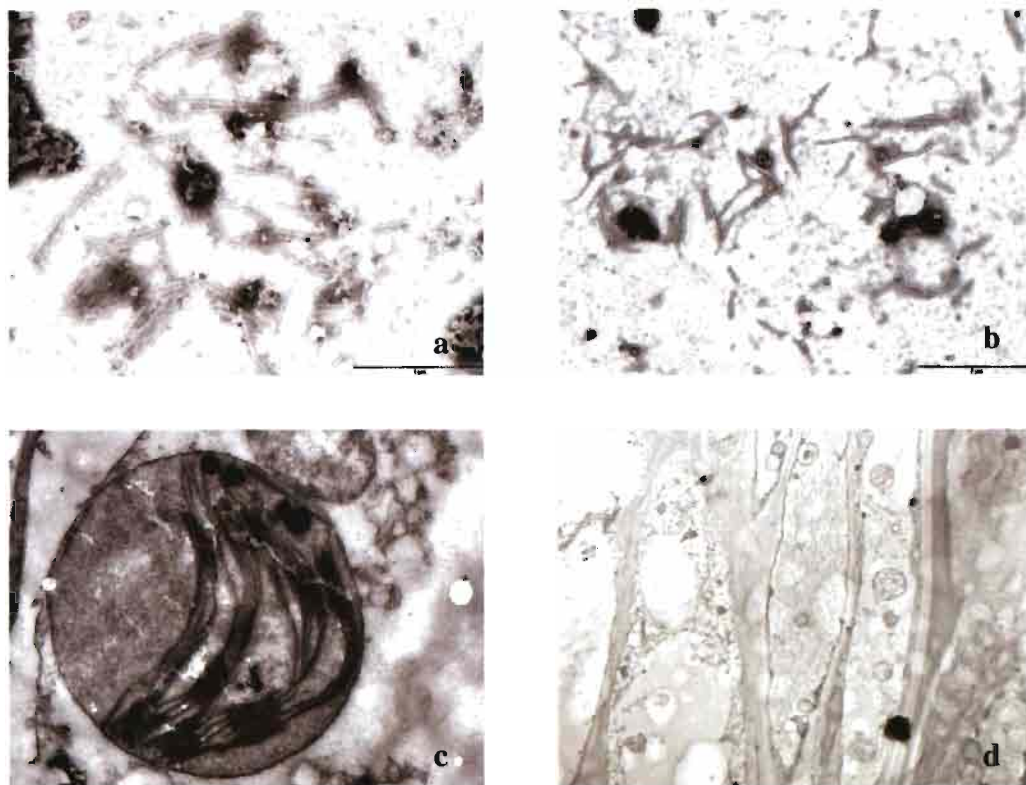


Figura 6: Observaciones del extracto directo de hoja y de cortes de inclusiones en resina mediante M.E.T.
 a. Varillas agregadas y degradadas observadas en la preparación del extracto fresco de muestras afectadas por "torrao".
 b. Partículas virales típicas de PepMV y ToCV en la preparación del extracto fresco de muestras afectadas por estos virus. c. Cloroplasto totalmente hinchado y deformado perteneciente al tejido de una planta afectada por "torrao". d. Inclusiones de partículas flexuosas típicas de los Potexvirus.

muestras positivas al PepMV, independientemente del análisis realizado, se obtuvieron 228 muestras positivas de un total de 339 muestras analizadas, es decir, más de un 67% de las muestras analizadas a este virus resultó positivo al análisis.

Los análisis de PMoV sólo resultaron positivos en cuatro muestras que procedían de Vizcaya, Valencia y Tarragona, y que como hemos señalado anteriormente mostraban una sintomatología similar, pero no idéntica a la del resto de muestras de otras procedencias.

Microscopía electrónica de transmisión (M.E.T)

Los extractos de hoja fresca con síntomas típicos de "torrao" o "cribado" con diferentes grados de agresividad observados mediante M.E.T, mostraron la presencia de partículas en forma de varillas alargadas y rígidas que se agregaban entre ellas, apareciendo en grupos en toda la preparación. En la Figura 6a pueden observarse dichas estructuras en comparación con las partículas que presentan extractos de hoja infectadas con PepMV y ToCV de otra preparación (Figura 6b). La observación del purificado viral mediante M.E.T, puso de manifiesto la presencia de las mismas estructuras agregadas que aparecían en el extracto de tejido fresco, pero en mayor cantidad y agregación.

En las inclusiones realizadas con las muestras infectadas no se observaron dichas estructuras agregadas, y uno de los cambios ultraestructurales más evidentes fue la deformación total de los cloroplastos que se hinchaban totalmente (Figura 6c), llegando a estallar. En algunos casos se observaron los vasos llenos de partículas flexuosas y en el citoplasma inclusiones de partículas flexuosas típicas de los Potexvirus (Figura 6d). En ninguno de los casos, se observaron partículas esféricas o inclusiones que hicieran sospechar la presencia de otro tipo de agentes. Hay que recordar que el material con el que se realizaron los estudios de microscopía electrónica previamente había sido analizado para asegurar que no era portador de otras virosis.

Ensayos de transmisión

Inoculación mecánica artificial

En los ensayos previos únicamente se consiguió obtener síntomas típicos de PepMV en las plantas inoculadas, por lo que se pensó que procedía de la planta original, aunque en el análisis previo había resultado negativo.

En los ensayos posteriores las plantas inoculadas con extractos crudos de los aislados nº 8413 y 8414 no mostraron ninguna sintomatología y al ser analizadas por ELISA a PepMV resultaron negativas (Cuadro 3). Sin embargo, el resto de aislados inoculados sí mostraron sintomatologías concretas que están descritas en el Cuadro 3, así como los resultados de los análisis realizados mediante serología. Las plantas inoculadas presentan típicos síntomas de PepMV como filiformismo en distintos grados, abullonado y rizado. Algunas plantas inoculadas con los aislados nº 8942 y 9055, mostraron mancha amarilla aislada. No se consiguió reproducir los síntomas de "torrao" en ninguna planta inoculada, pero sí aparecieron síntomas no presentes en las plantas originales como el caso de mancha aislada en las plantas inoculadas con la muestra nº 9055. En las plantas inoculadas con un aislado original con síntomas exclusivamente de PepMV (nº 8965) el aspecto general de las plantas inoculadas era similar al de otras inoculadas con aislados con los síntomas típicos de "torrao" (nº 8975).

Las plantas que habían sido inoculadas con el aislado nº 8599, que presentaba síntomas de "torrao" originariamente (Cuadro 3), manifestaron un abullonado y filiformismo muy marcado, ya visible a los 15 días después de la inoculación (ddi). Las plantas inoculadas con el aislado nº 8597, que mostraba originalmente síntomas exclusivamente de PepMV (Cuadro 3), a los 15 ddi mostraron un mosaico muy fuerte verde claro-oscuro, similar al de la planta original. Las plantas inoculadas con estos dos aislados se reubicaron en el invernadero para que recibieran mayor iluminación. Días más tarde (45 ddi) se observó en las plantas inoculadas con el

aislado n° 8597 la aparición de mancha amarilla aislada además del mosaico que ya presentaba. Las plantas inoculadas con el aislado 8599, mantuvieron los síntomas descritos anteriormente.

Las plantas inoculadas con los purificados virales de los aislados n° 7826 y 7827 comenzaron a manifestar algunos síntomas (Cuadro 4) al mes de ser inoculadas. Las plantas mostraban amarillosos, en algunos casos, otras abullonados, e incluso en algunas se observaba un curvamiento del foliolo hacia el envés. Los síntomas evolucionaron haciéndose más intensos y, en determinadas plantas, generando un mosaico internervial de distinta intensidad en las diferentes plantas, y clareado de venas que recordaban a los síntomas de PepMV. En ningún caso se consiguió reproducir los síntomas de "torrao". En cambio, las plantas inoculadas con los purificados virales de los aislados n° 8943 y n° 9023 ya a los 15 ddi mostraban síntomas característicos, recogidos en el Cuadro 4. El aislado n° 9023, presentaba síntomas más agresivos de apuntamiento y abullonado que el n° 8943.

En todos los casos, los análisis mediante serología a PepMV resultaron positivos a excepción de los aislados n° 8413 y n° 8414 indicados anteriormente.



Figura 7: Necrosis del foliolo observada en la planta injertada con el aislado n° 8976 (flecha).

Ensayos de transmisión por injerto

En los ensayos previos de transmisión por injerto, se obtuvo una sola transmisión en el lote de las dieciséis plantas injertadas, manifestándose el síntoma típico de "torrao", pero fue tan agresivo que la planta murió a los pocos días. En el lote de las veinte plantas injertadas no se obtuvo la necrosis buscada, apareciendo únicamente síntomas típicos de PepMV a pesar de que se partió de material vegetal cuyo análisis por técnicas moleculares resultó negativo a dicho virus.

En las plantas injertadas con material infectado con "torrao" procedente de Cañada del Gallego (Murcia) únicamente se observó en tres de las plantas injertadas un curvamiento en espiral del foliolo (Cuadro 5). Se realizaron análisis para descartar la implicación del PepMV y sólo tres de las muestras resultaron positivas. Los resultados de los análisis se recogen en el Cuadro 5. Las plantas injertadas con material procedente de Calnegre (Murcia) manifestaron un ligero filiformismo, mostrando en un solo caso un ligero amarilleo basal de los folíolos. Una de las plantas injertadas con el aislado n° 8976 presentó una ligera necrosis en los folíolos que podría tratarse de la transmisión de la enfermedad (Figura 7). Los resultados de los análisis a PepMV del segundo ensayo de transmisión por injerto resultaron positivos en todos los casos a excepción de 2 de las cuatro plantas injertadas con el aislado n° 9010, probablemente debido a un fallo en el injerto (Cuadro 5).

Repetición de análisis en base a los diferentes resultados obtenidos

Debido a la continua asociación del "torrao" con PepMV, se plantea la posible implicación de este último en el síndrome descrito. Además, en base a los resultados obtenidos, se observó la continua aparición de síntomas típicos de PepMV al inocular plantas con muestras originalmente afectadas por "torrao". Los resultados positivos a PepMV en estas muestras inoculadas nos llevó a volver a analizar algunas muestras originales, que en un principio habían resul-

Cuadro 5. Características de las muestras originales empleadas en los ensayos de injerto, número de plantas injertadas y resultados del obtenidos del injerto: sintomatología y análisis a PepMV.

Nº aislado	Muestras originales		Nº plantas inoculadas	Plantas inoculadas		
	Síntomas originales	Resultados a PepMV		Síntomas en las plantas inoculadas	Resultados a PepMV	
Ensayo 1	7522	Mosaico verde claro-oscuro, necrosis con cribado y abullonado en foliolos. Necrosis en peciolo.	-	2	Asintomática	-
	7528	Abullonado y cribado fase intermedia, mosaico. Necrosis incipiente en los peciolos	+1	1	Asintomática	-
	7529	Necrosis tipo "torrao" en los foliolos. Abullonado. Curvamiento de foliolos	-	2	Asintomática	-
	7531	Cribado incipiente. Abullonado y mosaico	+	2	Curvamiento del foliolo	+
	7533	Mosaico, abullonado y cribado incipiente en foliolos. Comienzo de necrosis en el peciolo.	+2	2	Asintomática	-
	7534	Mosaico. Abullonado. Cribado incipiente. Apuntamiento. Retorcimiento de los foliolos.	+1	1	Asintomática	+
	7537	Abullonado. Cribado muy avanzado. Necrosis. Peciolo necrosados	+	1	Asintomática	-
	7544	"Torrao" típico. Cicatrices en el peciolo. Mosaico, abullonado. Arabesco.	+2	2	Asintomática	+
	7547	Mosaico, retorcimiento, abullonado y necrosis en foliolos con cribado. costras en peciolo.	-	2	Curvamiento del foliolo	-
	7548	Necrosis que avanza desde la base del foliolo. Abullonado en foliolos	+	1	Asintomática	+
Ensayo 2	8966	"Torrao", amarillo, abullonado y curvamiento del foliolo en forma de espiral	+	2	Amarilleo basal de los foliolos. Filiformismo	+
	8976	"Chorrera", "torrao", cribado avanzado	+	2	Abullonado, filiformismo. Necrosis en foliolos (1)	+
	9010	Costras y "torrao" en foliolos. Fruto reventado con anillos, abullonado	+	4	Ligero filiformismo	+ ³

¹: Análisis negativo mediante serología. Análisis positivo mediante RT-PCR con los cebadores de Potexvirus.

²: Análisis negativo mediante serología. Análisis positivo mediante RT-PCR con los cebadores específicos de PepMV.

³: Únicamente 2 de las 4 plantas injertadas resultó positiva.

(1): N° plantas afectadas por el síntoma observado.

tado negativas. Se pretendía asimismo confirmar si se trataba de una posible contaminación de las plantas inoculadas. Se realizó la RT-PCR con los cebadores degenerados de Potexvirus y se consiguió amplificar la banda esperada de 760 pb, que se purificó con el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,

Germany) y se secuenció. La secuencia obtenida, al compararla con las secuencias de Gen Bank presentó un 97% de homología con el aislado Ch2 de PepMV (Accession number: DQ000985) recientemente publicado.

Este nuevo resultado determinaba que los negativos a PepMV obtenidos hasta el

momento con las técnicas tradicionales podían tratarse de falsos negativos, ya que este nuevo aislado no siempre resultaba positivo por serología o mediante RT-PCR con los cebadores específicos de PepMV. Por todo ello, se ha diseñado un nuevo método de detección que permite la diferenciación de tres tipos de aislados de PepMV que actualmente se encuentra en fase de publicación. Con este método, se han vuelto a analizar 122 muestras, hasta el momento, con síntomas típicos de “torrao” recogidas de campo a lo largo de los distintos años de estudio y de distintas zonas geográficas. Los resultados del análisis han determinado que 104 muestras son positivas, caracterizándose éstas como el aislado Chileno 2 de PepMV.

DISCUSIÓN

El cultivo del tomate presenta una complejidad fitosanitaria propiciada por su gran intensificación, complejidad que se ve reflejada en la aparición de nuevas enfermedades de etiología diversa. El caso del “torrao” o “cribado”, enfermedad de etiología viral presente en nuestro país más de seis años (JORDÁ *et al.*, 2003), produce infecciones muy graves tanto por sí solo, como en infecciones mixtas con otras entidades virales presentes en el campo, las cuales agravan sus síntomas e incluso a veces llevan a confundirlos, debido a su capacidad de producir necrosis en plantas de tomate afectadas. Estas causas incrementan la dificultad del diagnóstico de esta enfermedad. Asimismo, se aprecia la influencia de diversos factores que confluyen para determinar la manifestación de la misma, lo que obliga a tener en cuenta la pluralidad de los distintos componentes implicados que interaccionan en la determinación del síndrome e intentar determinar no sólo el agente causal sino también dichos componentes.

Según los muestreos realizados a lo largo de los años, queda patente que esta enfermedad presenta una mayor incidencia en Murcia, habiéndose recogido también un importante número de muestras en Canarias y en menor medida en otras zonas productoras.

Los síntomas causados por el “torrao” o “cribado”, se diferencian de la infección por *Parietaria mottle virus* (PMoV), Ilarvirus detectado en tomate en España en 2001 (ARAMBURU, 2001). Únicamente las muestras recogidas de la mitad norte del país (Vizcaya, Tarragona y Valencia), además de presentar una necrosis algo diferente a la típica del “torrao”, resultaron positivas a este Ilarvirus.

En campo pueden observarse diversidad de síntomas necróticos en plantas de tomate, que pueden confundirse en ocasiones, como se ha reiterado a lo del trabajo, con la sintomatología típica de “torrao”. Entre ellas, además de la necrosis causada por PMoV indicada anteriormente, otros virus como el TSWV, PVY, PVX o AMV también pueden producir necrosis. Algunas de las muestras recogidas, presentaban necrosis causadas por los virus anteriormente citados, y su diagnóstico permitió establecer una comparación entre las necrosis producidas por estos agentes y la necrosis típica de “torrao” para su diferenciación en futuros muestreos. Por otra parte, en plantas con síntomas de “torrao” se han encontrado, al margen de PepMV presente en la mayoría de las muestras, otros virus que habitualmente se encuentran en el campo en infección mixta con “torrao” como es el caso del ToCV. Por todos estos motivos, no es de extrañar que se presenten resultados positivos a estos virus en los análisis realizados. También cabe indicar la presencia de otras necrosis en el cultivo del tomate, diferentes en su expresión al síndrome que nos ocupa, de las cuales se desconoce su etiología.

La aparición, incidencia y agresividad de los síntomas de “torrao” se ven influenciadas por la confluencia de factores anteriormente indicada. Entre ellos, la variedad de tomate a la que infecta y las condiciones ambientales de humedad, temperatura e iluminación son factores determinantes en la aparición del síndrome. Por tanto, las dificultades observadas en los intentos de transmisión realizados se deben a esta última causa, no se han conseguido alcanzar las condiciones idóneas para la reproducción del síndrome en las instalacio-

nes donde se llevaron a cabo los ensayos de transmisión. Únicamente en el caso del injerto se consiguió reproducir los síntomas.

A lo largo de los años se ha considerado siempre que el agente causal, tras descartar otras entidades, debía ser un virus desconocido, ya que ninguna virosis conocida había resultado positiva. La reciente comunicación a un congreso de un grupo de trabajo holandés, ha señalado como el agente causal de esta enfermedad un nuevo virus, similar en morfología y tamaño de partícula a los miembros de la familia Comoviridae y Sequiviridae, pero con una organización genómica distinta y sus secuencias no homólogas a virus de estas familias (VERBEEK *et al.*, 2005). Las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica, en el presente estudio, tanto de extracto crudo de muestras infectadas por “torrao” o “cribado” como de purificados virales, no presentan en ningún caso partículas de las características señaladas por estos autores. Únicamente se han encontrado en todos los casos partículas en forma de varillas alargadas que aparecen agregadas, aunque bastante degradadas, morfología totalmente distinta a la que presentan los miembros de las familias indicadas. Si bien, la sintomatología descrita por estos autores para el *Tomato torrado virus* cursa con necrosis internervial que se inicia desde la base del foliolo, en ningún caso describen el típico “cribado” en hoja ni la deformación y rajado en fruto.

Debido a los resultados de los distintos ensayos de transmisión realizados que siempre reproducían el PepMV y a la constante asociación en campo del PepMV y el “torrao”, se planteó estudiar la posible implicación del PepMV en esta enfermedad, reconsiderando así la hipótesis de partida. Para estudiar la asociación PepMV- “torrao”, como se ha indicado anteriormente, algunas de las muestras positivas a PepMV afectadas por “torrao”, se secuenciaron, y la secuencia obtenida se alineó con las publicadas en el Gen Bank obteniéndose una homología del 97-98% con el aislado Chileno 2 del *Pepino mosaic virus*.

Este resultado ha conducido al diseño del nuevo sistema de detección que permite la diferenciación de tres tipos de aislados del PepMV, anteriormente descrito. Este método ha permitido la obtención de 104 positivos caracterizados como aislado Chileno 2 de PepMV de las 122 muestras ensayadas hasta el momento. Actualmente, el estudio se encuentra en fase de volver a analizar y comprobar los negativos obtenidos, ya que debido a la antigüedad de algunas de las muestras empleadas y del estado del material vegetal de partida que suele estar bastante oxidado, han podido presentarse falsos negativos al análisis. Aún así, el porcentaje de positivos obtenido con el nuevo método, que alcanza el 89%, es lo suficientemente elevado como para poder afirmar que el aislado Chileno 2 del *Pepino mosaic virus* está presente en las muestras de “torrao”. Se han realizado también análisis a algunas plantas de los distintos ensayos de transmisión y por el momento el agente transmitido en las inoculaciones e injertos ha resultado ser el PepMV- Aislado Ch2. El hecho de que un aislado de PepMV esté implicado en esta enfermedad y pueda producir síntomas de necrosis no se aparta del comportamiento habitual de este virus, ampliamente extendido en el cultivo de tomate en España, ya que el PepMV presenta una gran variabilidad sintomatológica y una clara dependencia de las condiciones ambientales (JORDÁ *et al.*, 2000; PAGÁN *et al.*, 2006).

En España estudios sobre la variabilidad genética y la estructura poblacional del PepMV en cultivos de tomate afectados determinaron que el genotipo prevaleciente en España era los aislados tipo Europeo (80% de la población pertenecía a dicho aislado). Con una menor frecuencia relativa, se encontraban también los aislados tipo Peruano, aunque estos siempre aparecían en infecciones mixtas con el aislado Europeo (PAGÁN *et al.*, 2006). La publicación del nuevo aislado Ch 2 de PepMV y la identificación de éste en muestras afectadas por “torrao” amplía esta estructura poblacional, aunque se necesitan un estu-

dio más exhaustivo al respecto. La secuencia completa de este nuevo aislado de PepMV (Ch2) se caracteriza por presentar una homología del 91% con el aislado US2 de este virus. Ambos aislados forman un grupo que se diferencia del resto de aislados en un 80%, porcentaje que lleva a pensar en una gran diferencia a nivel molecular entre estos aislados y los comúnmente encontrados en nuestro país, hecho que podría determinar asimismo una gran diferencia en el comportamiento biológico del aislado, tanto en manifestación de síntomas como en condiciones propicias para su manifestación.

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante serología nos indican que aproximadamente 40% de las muestras analizadas a PepMV resultaron negativas al análisis, hecho que se explica con la menor sensibilidad que presenta esta técnica frente a los análisis moleculares. El diseño del nuevo método nos ha permitido comprobar que algunas muestras negativas por serología eran realmente positivas.

De este trabajo se concluye que la enfermedad denominada "torrao" está presente en España desde su aparición, manifestándose en mayor o menor medida según la campaña, muy dependiente de condiciones ambien-

tes y de la variedad a la que infecta. También se pone de manifiesto la presencia del aislado Chileno 2 del *Pepino mosaic virus* en este síndrome. Queda pendiente determinar exactamente las condiciones ambientales bajo las cuales este agente, sólo o en combinación con otro, es capaz de alterar su sintomatología típica de PepMV y causar necrosis, cribado y costuras en plantas de tomate infectadas. Por otra parte, hay que destacar que únicamente ha sido determinada una pequeña parte del total de su genoma en la que se establece la relación de homología con el aislado Chileno 2. Se requiere, por tanto, la realización de estudios más amplios de otras partes del genoma para determinar si es realmente este nuevo aislado de PepMV o pudiera tratarse de una nueva entidad muy próxima a este virus, lo que implicaría para su establecimiento, entre otros, estudios sobre su comportamiento biológico en plantas hospedantes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está siendo financiado por el Ministerio Español de Ciencia y Tecnología a través de los proyectos: AGL2004-07752-C02. (1 año) y AGL2005-06682-C03. (3 años).

ABSTRACT

ALFARO FERNÁNDEZ A. , M. C. CÓRDOBA SELLÉS, M. C. CEBRIÁN MICÓ, I. FONT, M. JUÁREZ, V. MEDINA, A. LACASA, J. A. SÁNCHEZ NAVARRO, V. PALLÁS, C. JORDÁ GUTIÉRREZ. 2006. Tomato necrosis disease: "Torrao" or "Cribado". *Bol. San. Veg. Plagas*. 32: 545-562.

A new disease, known with the local name of "torrao", is reported in Spanish tomato crops since springtime of 2001. Affected plants show necrotic spots starting at the base of the leaflets. Later these spots fall down producing little holes ("cribado"). Longitudinal stains appear on the stems and the fruits are distorted with necrotic lines and finally crack, becoming unmarketable. Affected plants present a burn-like appearance. Sampling carried out since the apparition of the disease, has determined more incidence in Murcia (84%) and Canary Islands (12%), following a lower frequency in Almería and Alicante. The results of the analysis performed determined that 67% of the samples were positive to *Pepino mosaic virus* (PepMV) from a total of 369 samples analysed. Transmission assays have only reproduced the symptoms of the disease in two plants grafted with infected plants. The rest of the plants inoculated or grafted showed typical PepMV symptoms. Posterior analysis confirmed this fact. All the results pointed out the design of a new diagnosis method that allowed the characterization of 89% of the tested samples as Chilean 2 isolate of PepMV, recently published in the Gen Bank database (Accesión number: DQ000985). To our knowledge, this isolate could be

one of the implicated agents on the syndrome development together with other undetermined factors.

Key words: *Pepino mosaic virus*, shot-hole, electron microscope, diagnosis, virosis, serology, RT-PCR.

REFERENCIAS

- ARAMBURU, J. 2001. First report of *Parietaria mottle virus* on tomato in Spain. *Plant Disease*, **85**: 1210.
- ARAMBURU, J. y ARIÑO, J. 2003. La "necrosis apical del tomate". Una nueva virosis causada por una raza del virus del moteado de la parietaria (PMoV). *Phytoma España*, **151**: 32-38.
- GALLITELLI, D. 1982. Properties of tomato isolate of *Pelargonium zonate spot virus*. *Annals of Applied Biology*, **100**: 457-466.
- GALAPIENSO, L., HERRANZ, M.C., PALLAS, V. y ARAMBURU, J. 2005. Detection of a tomato strain of *Parietaria mottle virus* (PMoV-T) by molecular hybridization and RT-PCR in field samples from north-eastern Spain. *Plant Pathology*, **54**: 29-35.
- JANSSEN, D., SAEZ, E., SEGUNDO, E., MARTÍN, G., GIL, F., y CUADRADO, I. M. 2005. *Capsicum annum*- a new host of *Parietaria mottle virus* in Spain. *Plant Pathology*, **54** (4): 567.
- JORDÁ, C., LÁZARO, A., FONT, I., LACASA, A., GUERRERO, M. M. y CANO, A. 2000. Nueva enfermedad en el tomate. *Phytoma España*, **119**: 23-29.
- JORDÁ, C., LÁZARO-PÉREZ, A., MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. y ABAD, P. 2001. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato in Spain. *Plant Disease*, **85**: 1292.
- JORDÁ, C., MARTÍNEZ, M. C., CÓRDOBA, M. C., MARTÍNEZ, O., JUÁREZ, M. y FONT, I. 2003. El "cribado" o "torrao", ¿una nueva enfermedad del cultivo del tomate? *Phytoma España*, **152**: 130-136.
- LEE, I. M., HAMMOND, R. W., DAVIS, R. E. AND GUNDERSEN, D. E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. *Phytopathology*, **83**: 834-842.
- LOURO, D., ACCOTTO, G. P. y VAIRA, A. M. 2000. Occurrence and diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 589-592.
- MARTÍNEZ- PRIEGO, L., CÓRDOBA, M. C. y JORDÁ, C. 2002. Diseño de un método de diagnóstico para Potyvirus. XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Octubre 2002. Almería (España).
- MARTÍNEZ-CULEBRAS, P., FONT, I. y JORDÁ, C. 2001. A rapid PCR method to discriminate between *Tomato yellow leaf curl virus* isolates. *Annals of Applied Biology*, **139**: 251-257.
- PAGÁN, I., CÓRDOBA-SELLÉS, M. C., MARTÍNEZ-PRIEGO, L., FRAILE, A., MALPICA, J. M. JORDÁ, C. y GARCÍA-ARENAL, F. 2006. Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology*, **96**: 274-279.
- SEGUNDO, E., MARTÍN, G., CUADRADO, I. M. y JANSSEN, D. 2004. A new yellowing disease in *Phaseolus vulgaris* associated with a whitefly- transmitted virus. *Plant Pathology*, **53** (4):517.
- VAIRA, A. M., ACCOTTO, G. P., VECCHIATI, M. y BRAGALONI, M. 2002. *Tomato infectious chlorosis virus* causes leaf yellowing and reddening of tomato in Italy. *Phytoparasitica*, **30** (3): 290-294.
- VERBEEK, M., DULLEMANS, A. M. y VAN DER VLUGT, R. A. A. 2005. *Tomato torrado virus*, a new virus infecting tomato. XV Tomato working group meeting. Bari, Italia. Comunicación oral.

(Recepción: 1 septiembre 2006)

(Aceptación: 6 septiembre 2006)