

Situación actual de la población de las especies de geminivirus asociadas a la enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) en cultivos de tomate de exportación en Tenerife y Gran Canaria

*Espino de Paz, A. P**, *Montero Gómez, N. ***, *Hernández Suárez, E.***; *Carnero Hernández, A.***, *Rodríguez Rodríguez, J. M.****, *Martín Suárez, R. *****, *Galbán Sintés, F. ***** y *Estévez Gil, J. R.***

* Laboratorio de Sanidad Vegetal de Tenerife. Dirección General de Desarrollo Agrícola

** Departamento de Protección Vegetal. ICIA.

*** Granja Experimental del Cabildo Insular de Gran Canaria.

**** Sanidad Vegetal de Gran Canaria. Dirección General de Desarrollo Agrícola.

Resumen

La enfermedad de la cuchara TYLCD, se detectó por primera vez en Canarias en la isla de Tenerife en 1992 (Espino, 1994), identificándose la especie Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV (conocida anteriormente como aislado israelí, Tomato yellow leaf curl virus-Is, TYLCV-Is). En 1999 se vuelve a detectar TYLCD pero con mayor agresividad, determinándose la misma especie (Espino *et al.*, 2000; Font *et al.*, 2000).

En 1999 se detectan por primera vez, en la isla de Gran Canaria (Rodríguez y Rodríguez, 2000) las especies Tomato yellow leaf curl Sardinia virus, TYLCSV (conocida anteriormente como aislado Sardinia, Tomato yellow leaf curl virus- Sar, TYLCSV-Sar) (Espino *et al.*, 2001) y TYLCV, que solamente se detectó en unas pocas muestras (Font *et al.*, 2000).

Según el presente estudio con muestras tomadas en la campaña 2001-2002, podemos destacar:

- En Tenerife, se mantiene una población estable en cultivo de tomate (especie TYLCV) desde 1992 hasta el 2002 y se detecta por PCR e Hibridación Molecular esta misma especie en las malas hierbas *Solanum nigrum*, *Malva parviflora* y *Chenopodium murale*, considerando estas dos últimas como posibles nuevos huéspedes no citados hasta el momento en la Península (Jordá *et al.*, 2001).
- En Gran Canaria, en base a los datos obtenidos por hibridación molecular parece haber

habido un desplazamiento de TYLCSV a TYLCV y un gran dinamismo de la población de TYLCD, en un período de tiempo muy corto (3 años), similar a lo que ha ocurrido en la Península (6 años) (Sanchez- Campos *et al.*, 1999; Monci *et al.*, 2003). Además, se detecta en algunos casos la asociación de las dos especies TYLCV y TYLCSV, que pudiera tratarse de infecciones mixtas o la presencia de un recombinante natural entre las dos especies (Monci *et al.*, 2002).

Un estudio similar se ha repetido en la campaña 2002-2003 con las mismas técnicas y con nuevos protocolos. Estos resultados nos permitirán aclarar y confirmar los resultados preliminares obtenidos en el estudio que presentamos.

Antecedentes y situación actual del TYLCD en Canarias

Actualmente la enfermedad (Complejo virus) del rizado amarillo del tomate o "Enfermedad de la cuchara" (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD), causada por diferentes aislados virales, procedentes de diferentes países, se agrupan en 7 especies, que pertenecen al género Begomovirus de la familia Geminiviridae (Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), Fauquet *et al.*, 2003). Su material genético contiene un genoma circular de DNA monocatenario (de cadena simple) de aproximadamente 2,8 kb, cuyas partículas virales son geminadas o pareadas de aproximadamente 20 – 30 nm.

Esta enfermedad es muy importante en varias zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, especialmente causando graves pérdidas económicas en el cultivo del tomate. Se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, especialmente en las regiones mediterráneas, Sudeste asiático, Oriente medio, Africa tropical, Centro América y el Caribe. Actualmente se encuentra descrito para: Sudan, Etiopía, Somalia, Senegal, Nigeria, Egipto, Túnez, Jordania, Líbano, Iraq, Arabia Saudí, Taiwan, Turquía, India, Chipre, Sicilia, Cerdeña, Grecia, Marruecos, España, Portugal, Mexico, República Dominicana, Jamaica y Cuba (Potston *et al.*, 1997; Jordá *et al.*, 1998; Monci *et al.*, 2000).

El TYLCD se transmite por el vector *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) de forma persistente propagativa, según lo descrito por algunos autores (Harris *et al.*, 1995) y ocurre cuando se alimentan las ninfas y adultos de los jugos del floema de la planta. Tanto el período de adquisición a partir de plantas enfermas, como el de inoculación (transmisión) a plantas sanas oscilan entre 15 y 30 minutos (la eficiencia de transmisión aumenta al prolongarse dichos períodos). El período de incubación o latencia puede tardar de 17 a 25 horas, durante el cual los insectos vectores no pueden transmitir el virus. El vector puede permanecer infectivo de 7 a 20 días.

En Canarias se han descrito dos biotipos de *B. tabaci*, el biotipo B y el Q. El biotipo B se encuentra presente en todo el archipiélago y el Q solamente en las islas de La Palma, Gran Canaria y Tenerife, con poblaciones mixtas en esta última (Guirao *et al.*, 1997; Beitia *et al.*, 1998; Bank *et al.*, 1999; Hernández-Suárez, 1999; Simón *et al.* 2002). En la actualidad se encuentra en Tenerife una clara distribución zonal de los dos biotipos (Gobbi *et al.*, 2003).

La enfermedad de la cuchara se detecta por primera vez en la Península Ibérica en 1992, identificándose solamente la especie Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) en cultivos de tomate de invernadero en Murcia y Almería (Moriones *et al.*, 1993). Posteriormente en el año 1997, la especie Tomato yellow leaf curl virus TYLCV en cultivos de tomate y judía (Navas-Castillo *et al.*, 1999). En tomate se detectó la presencia de síntomas más agresivos con la segunda especie.

El rango de huéspedes de forma natural es limitado (Jordá, 1999). En la Península Ibérica se ha detectado la enfermedad (tabla 1), diferenciando las especies virales presentes en algunas plantas, tanto cultivadas como silvestres (Moriones *et al.*, 1993; Navas-Castillo *et al.*, 1997; Reina *et al.*, 1999; Sánchez-Campo *et al.*, 2000 y Jordá *et al.*, 2001).

Especie vegetal	TYLCD	TYLCV	TYLCSV
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	X	X	X
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	X	X	-
<i>Capsicum annuum</i> L.	X	X	-
<i>Solanum nigrum</i> L.	X	-	X
<i>Solanum luteum</i> Mill	X	-	X
<i>Mercurialis ambigua</i>	X	X	-
<i>Datura stramonium</i> L.	X	X	X
<i>Malva parviflora</i> L.	X		
<i>Chenopodium murale</i> L.	X		
<i>Conyza sumatrensis</i>	X		
<i>Ditrichia viscosa</i>	X		
<i>Convolvulus</i> sp.	X		
<i>Cuscuta</i> sp.	X		
		Especies no determinadas	

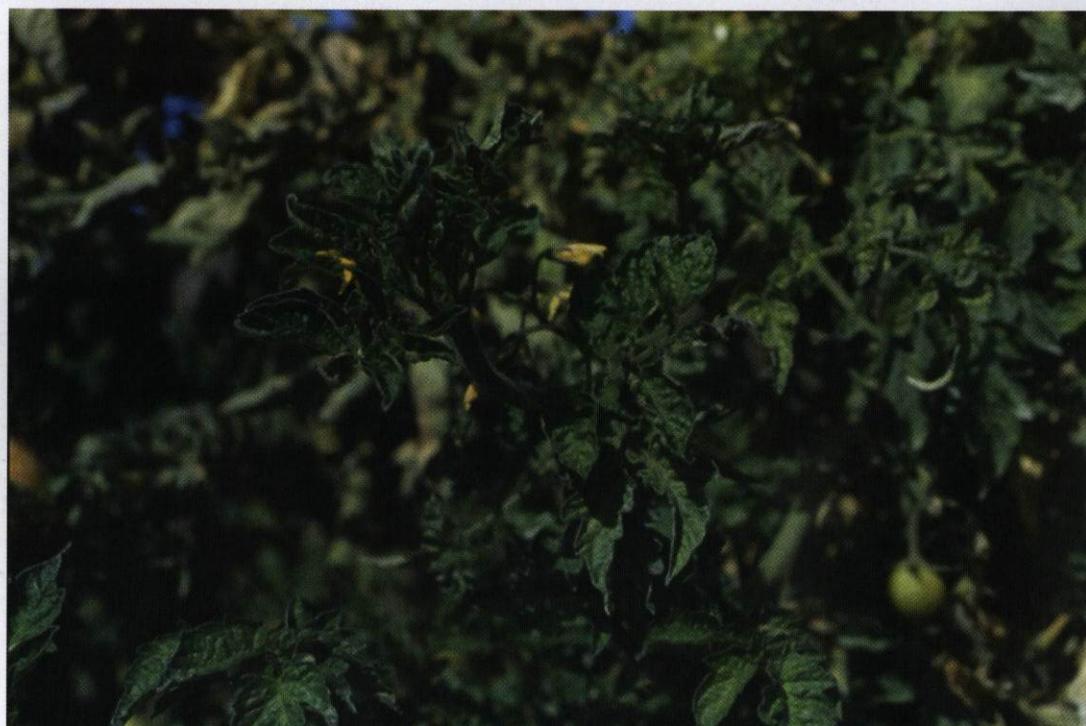


Foto 1.
Primera
detección en Tenerife
de TYLCD en 1992



Foto 2. Síntomas evidentes de la enfermedad con resultados negativos (Tenerife, 1994)

dación molecular con sonda iraelí (Díaz-Ruíz J.R. 1993 (CSIC-Madrid), comunicación personal).

En la campaña siguiente se detecta la enfermedad en campo con síntomas evidentes de TYLCD (**Foto 2**) pero con resultados negativos por ELISA-TAS en el Laboratorio de Sanidad Vegetal y por PCR e hibridación molecular en el Laboratorio de Referencia CIT-INIA Madrid (Espino *et al.*, 1995).

En septiembre de 1999 se detectó una grave incidencia en cultivos de tomate de exportación (invernadero malla, variedad Daniela) ubicados en el municipio de Santiago del Teide (Tamaimo) al Su-

roeste de Tenerife, donde se observaron síntomas muy agresivos característicos de la cuchara (**Foto 3**). El desarrollo de la enfermedad coincidió con una elevada población de mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Genn.) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)) desde el principio de la campaña.

Por otra parte durante la misma campaña se detectó la enfermedad por primera vez en el Sur de Gran Canaria (Rodríguez y Rodríguez, 2000), en zonas de cultivo del tomate en el municipio de Santa Lucía de Tirajana (invernadero malla, variedad Daniela), extendiéndose hacia todas las zonas de cultivo del Sur (San Bartolomé de Tirajana,

En la Península Ibérica en 1999 en la provincia de Almería, se detecta por primera vez un recombinante natural entre TYLCV y TYLCSV en cultivos de judía (Monci *et al.*, 2002). En estudios posteriores se demostró que el recombinante poseía un rango de huéspedes más amplio que TYLCV y TYLCSV. El recombinante infectaba tomate, judía, *Solanum nigrum* y *S. luteum*, mientras que TYLCSV nunca infectaba judía y TYLCV tampoco infectaba ninguna de las dos especies de *Solanum*. En la actualidad este nuevo recombinante está imponiéndose en los cultivos de judía e incrementando en tomate (Monci *et al.*, 2003). Este recombinante se ha considerado una nueva especie, Tomato yellow leaf curl Málaga virus (TYLCMaIV) (Fauquet *et al.*, 2003).

En Tenerife se detecta por primera vez la enfermedad de la cuchara se detecta en noviembre de 1992 (Espino, 1994; 1999), en cultivos de tomate al aire libre de exportación de la variedad Daniela en la zona Sur oeste, distribuida en el cultivo en plantas aisladas y de forma generalizada en Güía de Isora y Tamaimo, respectivamente. Los síntomas observados presentaban folíolos curvados hacia el haz formando la cuchara con los márgenes morados (**Foto 1**). Se detecta la especie TYLCV, mediante hibri-

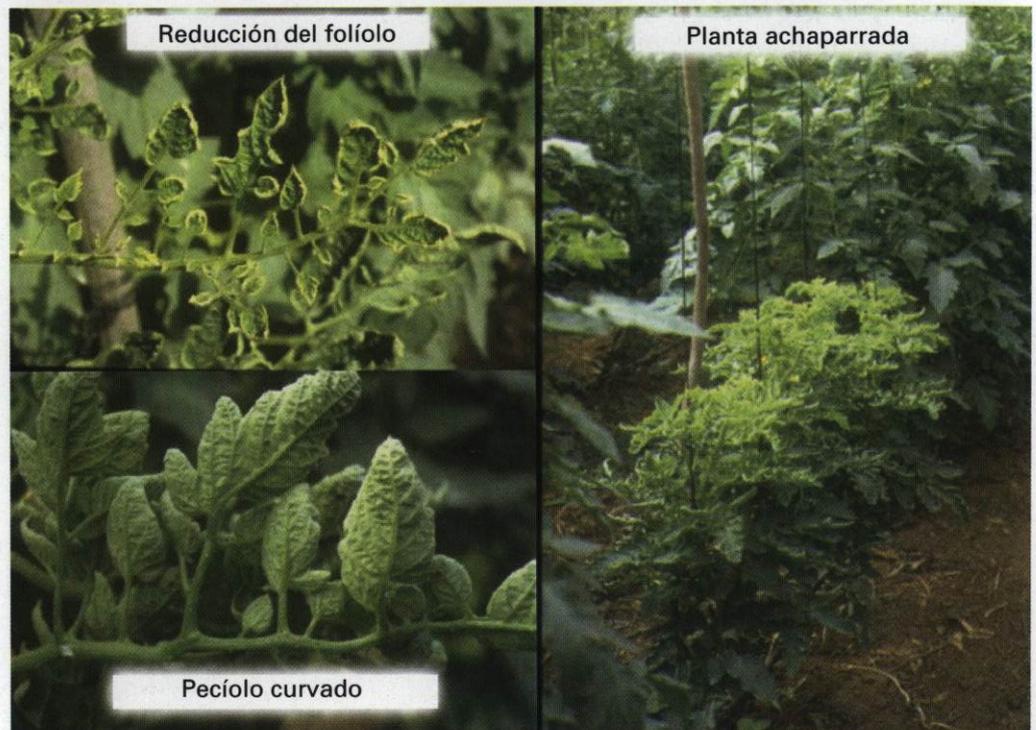


Foto 3. Síntomas agresivos de la enfermedad en 1999

Aguimes, Ingenio y Telde). En la campaña siguiente (00-01) se detectó en San Nicolás de Tolentino y en una zona aislada donde no se cultiva tomate en el municipio de Arucas en la Granja Experimental del Cabildo (Galban-Sintes y Rodríguez- Rodríguez, 2003, comunicación personal).

La enfermedad TYLCD en Tenerife y Gran Canaria se determinó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Dirección General de Desarrollo Agrícola (Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias), mediante la técnica serológica ELISA-TAS (anticuerpos específicos de Adgen).

Las especies de TYLCD de las muestras de Tenerife y Gran Canaria se diagnosticaron por métodos de biología molecular en el Laboratorio de Referencia del MAPA (Laboratorio de Virología de la Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia). Se empleó la técnica de PCR, primeramente con iniciadores ("primers") genéricos para determinar el género Begomovirus y luego se utilizaron enzimas de restricción para detectar diferencialmente entre la especie TYLSV y TYLCV según la metodología de Acotto *et al.* (1999). Las muestras de Tenerife resultaron positivas para la especie TYLCV y las de Gran Canaria para las especies TYLCSV (26 muestras) y TYLCV (7 muestras) de un total de 33 muestras (Font *et al.*, 2000).

En otros muestreos realizados en cultivos de tomate en Tenerife y Gran Canaria por diferentes grupos de investigadores (European Whitefly Studies Network y CSIC- Málaga) confirmaron la detección de la especie TYLCV en Tenerife (Bridson *et al.* 1999) y la TYLCSV en Gran Canaria (Bridson *et al.*, 1999; Monci *et al.*, 2000).

Al mismo tiempo la enfermedad TYLCD se detecta por primera vez con grave incidencia en cultivos de tomate de exportación en condiciones de invernadero de la variedad Daniela en la isla de Fuerteventura en el municipio de Tuineje (Juan Gopar y Rosa de los James), que inmediatamente se extendió hacia los municipios de Pájara y Antigua. En las campañas sucesivas se tomaron las medidas de higiene necesarias, así como la aplicación de productos específicos para la mosca blanca, alternándolos cada semana. En actualidad se siguen utilizando variedades susceptibles, pero han podido controlar la enfermedad, ya que estas explotaciones tienen la ventaja de que están distanciadas una de la otra (Manrique, 2003, Sociedad Cooperativa Agrícola Gran Tarajal, comunicación personal).

También se detectó por primera vez en el año 2000, en la isla de Lanzarote en los municipios de

Tinajo y Tías, en cultivos de tomate de verano para ensalada (variedades susceptibles), al aire libre distribuyéndose en el cultivo por focos. En la campaña siguiente (00-01) se detectó con grave incidencia y de forma generalizada. En las campañas posteriores se usaron variedades resistentes y la enfermedad en la actualidad ha ido disminuyendo hasta casi desaparecer (Garrido, 2003, Granja Experimental del Cabildo de Lanzarote, comunicación personal).

En el año 2000, la enfermedad de TYLCD se confirmó por ELISA-TAS en el Laboratorio de Fitopatología de la Granja Experimental del Cabildo de Gran Canaria en las islas de Fuerteventura y Lanzarote (Gonzalo *et al.*, 2001).

Como consecuencia de la gravedad y extensión de la enfermedad en las islas productoras de tomate de exportación (Tenerife, Gran Canaria y Fuerteventura), la Dirección General de Desarrollo Agrícola desarrolló una orden en el año 2000, por la que se establecieron medidas de control fitosanitarias obligatorias a tomar para dicha enfermedad (BOC Nº 44, 2000) y un tríptico de divulgación con la descripción de la enfermedad, sintomatología, transmisión, plantas huéspedes y medidas de control.

En las campañas 00-01 y 01-02 se realizaron estudios en colaboración con el Departamento de Protección Vegetal del ICIA, sobre la incidencia del TYLCD en cultivos de tomate bajo condiciones de invernadero y aire libre en los que se utilizaban variedades tolerantes y susceptibles. Como resultado, en la campaña 00-01 los primeros síntomas aparecieron al aire libre y con mayor severidad que en invernaderos; por otro lado al final de la campaña 01-02 las variedades Boludo y Timpany (tolerantes) obtuvieron un 0% de infección frente a un 60% en Daniela (susceptible), siendo la incidencia en la zona de estudio de un 21,43% en variedades tolerantes (Cordero, 2002).

También en el mismo período 2000-2002, durante las campañas mencionadas se realizó la detección y diagnóstico de malas hierbas hospedantes de TYLCD en la isla de Tenerife en los municipios de Güímar, Granadilla, Guía de Isora y Tamaimo, mediante ELISA-TAS y un diagnóstico diferencial para detectar las especies TYLCV y TYLCSV utilizando las técnicas de PCR e hibridación molecular. Se analizó un total de 214 plantas de 40 especies diferentes pertenecientes a 25 familias, con resultados positivos para TYLCD por ELISA-TAS de las siguientes especies: *Amaranthus retroflexus* L., *Sonchus oleraceus* L., *Chenopodium murale* L., *Malva parviflora* L., *Oxalis europea* L., *Setaria adherens* (Forssk.) Chiov. Y *Solanum nigrum* L. (Cordero, 2002). Se obtuvieron resultados negati-

vos por PCR para todas las muestras analizadas y positivos para TYLCV por hibridación molecular en las siguientes especies: *Sonchus oleraceus* L., *Chenopodium murale*, *Malva parviflora*, *Nicotiana glauca* Graham, *Solanum nigrum*, *Datura stramonium* L., citadas anteriormente en la literatura como hospedantes (Hernandez-Suárez *et al.*, 2003). *Amaranthus retroflexus* L., *Oxalis europaea* L., *Setaria adherens* (Forssk) Chiov. Y *Forskaolea angustifolia* Retz no han sido citadas para TYLCD en la bibliografía consultada, por lo que si se confirmaran estos resultados mediante otros estudios, podrían constituir un potencial de inóculo de la enfermedad. Concretamente, las especies *Malva parviflora* y *Chenopodium murale* resultarían nuevas citas en España para la especie TYLCV.

En el año 2002, se detecta por primera vez en la isla de la Palma en el municipio de Puntagorda en cultivos de tomate de ensalada al aire libre (variedad Indalo). Actualmente, la enfermedad no se ha vuelto a detectar desde su primera aparición (Betancourt, 2002, Agencia de Extensión Agraria de Punta Gorda, comunicación personal). Se confirmó la enfermedad por ELISA-TAS en el Laboratorio de Sanidad Vegetal.

Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es la detección y diagnóstico de la enfermedad TYLCD y especies implicadas TYLCV y TYLCSV por diferentes métodos de diagnóstico: serológicos con anticuerpos específicos para TYLCD (ELISA-TAS) y moleculares con "primers" y sondas específicas para TYLCV y TYLCSV (PCR e hibridación molecular), en cultivos de tomate de exportación en Tenerife y Gran Canaria, así como la detección de estas especies en malas hierbas procedentes de Tenerife.

Material y Métodos

Se realizó un muestreo al final de la Campaña del 2001-2002 en las zonas de cultivo de tomate de exportación de Tenerife y Gran Canaria. Se hicieron muestreos de plantas con síntomas de TYLCD, tanto en cultivos en condiciones de aire libre como invernadero (malla). Además, se tomaron diferentes muestras de malas hierbas con síntomas localizadas en las parcelas estudiadas de Tenerife.

Las zonas prospectadas fueron:

- Tenerife: Granadilla, Arico, Güía de Isora, Santiago del Teide.
- Gran Canaria: Telde, Ingenio, Agüimes, Santa Lucía de Tirajana, San Bartolomé de Tirajana.

Se muestrearon diferentes variedades tanto tolerantes (T) como susceptibles (S) al virus de la cuchara, que presentaron síntomas de la enfermedad, apareciendo rangos desde ligero hasta severo en las diferentes zonas. Las variedades tomadas fueron:

- Tenerife: Boludo (T), Cherry (S), Mali (S), Dominique (S), Thomas (S), Timpany (T), Dorothy (T), Tyrade (T), Daniela (S).
- Gran Canaria: Isa (T), Gardel (T), Boludo (T), Naysica (S), 1003 (T) El Diez (T) Icra (S), Pitenza (S), Yosefin (S), Daniela (S), Boro (T), Sinatra (S), Nereyda (S)

Para el diagnóstico de todas las muestras, tanto tomate como malas hierbas se utilizó el método serológico (ELISA-TAS) para comprobar la presencia del TYLCD. Posteriormente se diagnosticaron mediante métodos moleculares (PCR e Hibridación Molecular) para determinar las especies presentes: TYLCV, TYLCSV y la asociación TYLCV + TYLCSV.

A continuación se resumen los métodos de análisis y reactivos empleados:

ELISA-TAS (Triple Antibody Sandwich):

Para la detección del TYLCD se usaron 3 anticuerpos de la marca DSMZ:

- Anticuerpo Policlonal IgG : AS-0588.
- Anticuerpo Monoclonal Mab: A-0546/2.
- Anticuerpo de antirátón marcado con fosfatasa alcalina RAM-ap.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):

- Extracción del ADN: Se utilizó el producto EZNA Plant DNA Miniprepkit (referencia D3486-02, de Omega).
- Amplificación del ADN: Se utilizó el Set TYLCV de Need, que contiene los primers AV632-AC923 y AV950 (Martínez- Culebras *et al.*, 2001).
- Electroforesis: Los productos de la PCR (ADN amplificado) se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, tras tinción con Bromuro de Etidio, utilizando el marcador de peso molecular: Gene RubeTM 100 pb ladder Plus (Ref. SM 0321, MBI Fermentas) para determinar el peso molecular de las bandas generadas: TYLCV- 462 pb y TYLCV+TYLCSV - 462 y 135 pb.

Hibridación con Sondas Moleculares marcadas con Digoxigenina (DIG)

Las muestras recolectadas fueron analizadas para detectar la presencia de virus mediante el pro-

toloco de diagnóstico por Hibridación con Sondas Moleculares marcadas con Digoxigenina (DIG) (detección no radioactiva quimioluminiscente) de la empresa Roche.

Las Sondas de ADN utilizadas fueron: TYLCV-M1d (psp 72/97) para detectar la especie TYLCV (obtenida del clon pPORT2 de un aislado proveniente de Portugal) y TYLCSV (psp98) para detectar la especie Sardinia, TYLCSV obtenidas mediante el protocolo DIG y el Kit de detección (Boehringer Mannheim GmbH) (Navas-Castillo *et al.*, 1999).

Resultados y Discusión

Se detectó por ELISA-TAS la presencia de la enfermedad de la cuchara (TYLCD) en todas las zonas muestreadas, tanto en Gran Canaria como Tenerife, en variedades sensibles y tolerantes, aunque estas últimas manifiesten los síntomas de forma menos severa (Foto 4).

Se diagnosticó por PCR la especie TYLCV en todas las zonas de cultivo de tomate de Tenerife, causando daños de ligeros a severos en variedades tolerantes y susceptibles respectivamente (Tabla 2, Gráfico 1 y Figura 1).

Sin embargo en Gran Canaria por PCR, se detectó la presencia de la especie TYLCV únicamente en una muestra y TYLCSV en el resto (Tabla 3, Gráfico 2 y Figura 2).

Para interpretar los resultados obtenidos es necesario tener en cuenta algunos aspectos importantes sobre las técnicas moleculares utilizadas para la detección. Por un lado, la técnica de PCR y por otro la Hibridación Molecular, y aunque ambas tienen alta sensibilidad y pueden detectar específicamente la presencia de especies virales, es de resaltar que con la segunda se puede detectar una mayor población del virus dentro de una misma especie, por ser menos específica que la primera. Además, el protocolo de PCR utilizado tiene el inconveniente de no poder distinguir una especie de la otra en presencia de poblaciones mixtas de TYLCD; el kit contiene dos primers universales (AV632-AC923) que amplifican una banda a 462 pb, presente en un gran número de begomovirus, y que se obtendría tanto en presencia de TYLCV como TYLCSV; sin embargo, contiene otro primer (AV950) que es específico y solamente amplifica una banda a 135 pb presente en TYLCSV (Martínez-Culebras *et al.*, 2001). Por tanto, cuando se obtienen las 2 bandas no podemos discriminar si únicamente está presente la especie TYLCSV o una población mixta TYLCV-TYLCSV.

Por la técnica de PCR, con el protocolo utilizado y teniendo en cuenta los inconvenientes antes mencionados, en Gran Canaria se detecta la especie TYLCV y mayoritariamente la especie TYLCSV con la posibilidad de que esté presente en asociación con la anterior.



Foto 4. Síntomas suaves de la enfermedad en variedad tolerante (Eldiez) en 2002

Por hibridación molecular en Tenerife se diagnosticó TYLCV y en Gran Canaria se detectan TYLCV y TYLCSV tanto por separado como de forma mixta, sin embargo, la especie TYLCV se detecta en mayor número de muestras que la especie TYLCSV. Los resultados positivos se corresponden a variedades tolerantes y susceptibles de tomate (Figura 3). Las muestras en las que se han diagnosticado ambas especies de esta enfermedad deben ser estudiadas en mayor profundidad, ya que podría tratarse de poblaciones mixtas o de la presencia de algún recombinante natural entre las dos especies asociadas.

Tras el análisis de malas hierbas por ELISA-TAS, se obtuvieron resultados positivos para TYLCD en diferentes especies: *Malva parviflora*, *Solanum nigrum* y *Chenopodium murale*. Estos resultados se vieron confirmados con los resultados de PCR e hibridación molecular que también dieron positivos para TYLCV en las especies mencionadas.

Actualmente se mantiene este estudio, con el análisis de nuevas muestras tomadas en la campaña 2002-2003 para seguir la evolución de ambas especies virales en Canarias. Esto permitirá aclarar y confirmar los resultados preliminares obtenidos.

CONCLUSIONES

- Existe la presencia del Virus de la Cuchara (TYLCD) afectando tanto a variedades de tomate susceptibles como tolerantes en diferentes zonas de Tenerife y Gran Canaria.
- Se encontró una distribución diferente de las especies de TYLCD en las 2 islas estudiadas.
- En Tenerife se detectó solamente la especie TYLCV.
- En Gran Canaria se detectaron las dos especies por separado TYLCSV y TYLCV, además de la asociación de ambas.

- Se confirmó en Tenerife la especie TYLCV en las malas hierbas: *Solanum nigrum*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora*, considerando estas dos últimas como posibles nuevos huéspedes.

Como consecuencia de los resultados obtenidos, es complicado tomar unas medidas de control eficaces, ya que la población actual de TYLCD está constituida por diferentes especies virales TYLCV, TYLCSV, la asociación de ambas especies y/o la posible presencia de algún recombinante, que estaría por determinar. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas variedades comerciales que tuvieran en cuenta esta diversificación genética de la población (Monci *et al.*, 2003), así como seguir tomando las medidas fitosanitarias conocidas por todos de forma exhaustiva y por zonas en conjunto, por todos los agricultores.

AGRADECIMIENTOS:

Queremos desear nuestro más sincero agradecimiento a todos los técnicos de las diferentes Cooperativas y Casas Comerciales por acompañarnos a las distintas explotaciones de cultivos de tomate para recoger las muestras, que se relacionan a continuación: Pedro de la Fé Linares (Cooperativa Coagisora), Teresa Cabrera (Cooperativa de Tamaimo), Víctor Luis Expósito (Cooperativa Ntra Sra de Chío), Rosario Suárez Pérez y Fernando Delgado Benítez (Cooperativa Ntra Sra del Carmen), Bruno Morales González y Luis Marrero (Cooperativa Ntra Sra de Abona), Nancy Melo Herrera (Marante S.L.).

También queremos agradecer a Enrique Moriones (CSIC, "La Mayora", Málaga) por cedernos la sonda de ADN utilizadas para detectar las dos especies TYLCV y TYLCSV y a Alfredo Reyes (Universidad de La Laguna) por identificarnos las especies de malas hierbas muestreadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acotto, G.P., Navas-Castillo, J., Noris, E., Moriones, E. and Louro, D., 2000. Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 179-186.
2. Bedford, I.D., Kelly, A., Banks, G.K., Briddon, R.W., Cenis, J.L. and Markham, P.G., 1998. *Solanum nigrum*: an indigenous weed reservoir for a tomato yellow leaf curl geminivirus in southern Spain. *Europe Journal Plant Pathology*, 104: 221-222.
3. Beitia, F., Hernández-Suárez, E., Carnero, A., Alonso, C. Y Cenis, J.L., 1998. *Analysis of biotypes Bemisia tabaci and its parasitoids in the Canary Islands*. International Workshop on Bemisia and Geminivirus, San Juan (Puerto Rico), June 1998.
4. Espino de Paz, A.I., 1994. Virosis de hortalizas en Tenerife y Gran Canaria en 1993. *Reuniones Anuales de los Grupos de Trabajo Fitosanitarios*, MAPA.
5. Espino de Paz, A.I., 1999. Virosis del Tomate en Canarias. *La Granja*, 6: 53-59.
6. Fauquet, C.M., Biscoo, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Harrison, B.D., Rybicki, E.P., Stenger, D.C. and Stanley, J., 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae and an undated list of begomovirus species. *Arch Virol*, 148: 405-421.
7. Font, I., Martínez-Culebras, P. And Jordá, C., 2000. First Report of Tomato yellow leaf curl virus-Is in the Canary Islands. *Plant Disease*, 84 (9): 1046.
8. Gobbi, A., Pascual, S., Aviles, M., Beitia, F., Hernández-Suárez E. and Carnero, A., 2003. *Rapid-*

- PCR caracterización of *Bemisia tabaci* (Gennadius) populations in the Canary Islands. 3rd International Bemisia Workshop. Barcelona.
9. Guirao, P., Beitia, F. and Cenis, J.L., 1997. Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Bulletin of Entomological Research, 87(6): 587-593.
 10. Hernández Suárez, E., Montero Gómez, N., Cordeiro, C., Méndez, M.J., Espino de Paz, A.I. y Carnero, A., 2003. Ocurrrence of tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) and Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) in the Canary Islands. 3rd International Bemisia Workshop. Barcelona (España).
 11. Jordá, C., Arias, M., Tello, J., Lacasa, A. y del Moral, J., 1998. La sanidad del cultivo del tomate. Ed. Phytoma-España,
 12. Jorda, C., Font, I., Martínez-Culebras, P., Juárez, M., Ortega, A. and Lacasa, A., 2001. Current Status and New Natural Hosts of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Spain. Plant Disease: 445.
 13. Monci, F., García Andrés, S., Sánchez-Campos, S., Martín, M.V., Navas-Castillo, J. Y Moriones, E., 2003. Rápida evolución de la población de geminivirus implicados en el rizado amarillo del tomate ("Enfermedad de la cuchara") en España. Agrícola Vergel, marzo 2003 (aceptado para publicación).
 14. Monci, F., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. And Moriones, E., 2002. A Natural Recombinant between the Geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus. Exhibits a Novel Pathogenic Phenotype and Is Becoming Prevalent in Spanish Populations. Virology 303: 317-326.
 15. Moriones, E., Arnó, J., Acotto, G.P., Noris, E. and Cavallarín, L., 1993. First report of Tomato yellow leaf curl virus in Spain. Plant Disease, 77: 953.
 16. ORDEN de 23 de marzo de 2000, por la que se establecen medidas fitosanitarias obligatorias contra el Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) en cultivos de tomate. BOC-2000/044- Lunes 10 de Abril de 2000.
 17. Polston, J.E. and Anderson, P.K., 1997. Emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. Plant Disease 81: 1358-1369.
 18. Cordero, C., 2002. Estudio del Virus del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) y su vector *Bemisia tabaci* en cultivo de tomate en Tenerife. Proyecto de fin de Carrera. Escuela Superior de Ciencias Agrarias. Universidad de La Laguna.
 19. Espino de Paz, A.I. y de León Rodríguez, J.M., 1995. Problemática de las virosis en tomate en la isla de Tenerife. Reuniones Anuales de los Grupos de Trabajo Fitosanitarios, MAPA.
 20. Harris, K., Esbroeck, Z and Duffus, J. 1995. Anatomy of a Virus Vector. In Gerling, D. & R.T. Mayer (eds.). *Bemisia: 1995. Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. Intercept Ltd, Uk. Pp 289-350.
 21. Hernández Suárez, E., 1999. La familia Aleyrodidae y sus enemigos naturales en las Islas Canarias. 687. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna.
 22. Navas-Castillo, J., Sánchez-Campos, S. and Díaz, J.A., 1999. Tomato yellow leaf curl virus -Is Causes a Novel Diseases of Common Bean and Severe Epidemic in Tomato in Spain. Plant Disease 83 (1): 29-32.
 23. Banks, G. And Johansen, N.S., 1999. Whitefly species from the Canary Islands. The European Whitefly Studies Network (EWSN) Canary Island Workshop.
 24. Briddon, R., Katis, N., Louro, D. And Winter, S., 1999. Whitefly-transmitted viruses from the Canary Island 1999. The European Whitefly studies Network (EWSN) Canary Island Workshop.
 25. Espino de Paz, A.I. y de León Rodríguez, J.M., 2000. Virus del rizado amarillo del tomate, Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) en la isla de Tenerife. Reuniones Anuales de los Grupos de Trabajo Fitosanitarios, MAPA.
 26. Monci, F., Navas-Castillo, J., Cenis, J.L. and Lacasa, A., 2000. Spread of Tomato yellow leaf curl virus Sar from the Mediterranean Basin: Presence in The Canary Islands and Morocco. Plant disease 84 (4): 490.
 27. Espino de Paz, A.I. y de León Rodríguez, J.M., 2001. Detección de TYLCV- Is y TYLCV-Sr.. Reuniones Anuales de los Grupos de Trabajo Fitosanitarios, MAPA.
 28. Gonzalo-Bartolomé, O. Y Rodríguez Rodríguez, J.M., 2001. Extensión del virus de la "cuchara" en nuestros cultivos de tomates, después de repetidos muestreos en las zonas de producción. La Granja, 8: 7-9.
 29. Rodríguez, J.M., Rodríguez, R., 2000. Patología vegetal y Entomología Agraria: notas sobre nuevos problemas o de aumento de la incidencia. El virus de la cuchara del tomate, Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV). Granja (7), 21
 30. Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Camero R., Soria C., Díaz, J.A. and Moriones, E., 1999. Displacement of Tomato Yellow Leaf Curl Virus TYLCV-Sr by TYLCV-Is in Tomato Epidermics in Spain. Phytopathology 89 (11): 1038-1043.
 31. Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Monci, F., Díaz, J.A. and Moriones, E., 2000. Mercurialis ambigua and Solanum luteum: two newly discovered natural host of tomato yellow leaf curl geminiviruses. European Journal of Plant Pathology 106: 391-394.
 32. Simón, B., Hernández-Suárez, E., Carnero, A., Beitia, F., Aguiar, A., Benazoun, A. and Cenis, J.L., 2001. Biotypes of *Bemisia tabaci* (Genn) in the western mediterranean basin and the Atlantic islands. European Whitefly Symposium, Sicily (Italy).

Anexos

Tabla 2. Incidencia de TYLCD en Tenerife (2001-2002)

Municipios	Nº muestra	ELISA-TAS +	PCR		Hibridación Molecular		
			TYLCV +	TYLCSV * +	TYLCV +	TYLCSV +	TYLCV/ TYLCSV +
Granadilla Inv. 1	8	6	6	0	6	0	0
Granadilla Inv. 2	7	7	5	0	7	0	0
Arico Inv. 1	6	6	4	0	4	0	0
Arico Inv. 2	9	9	6	0	5	0	0
Arico Inv. 3	7	6	4	0	5	0	0
Guía de Isora Inv. 1	5	1	4	0	3	0	0
Guía de Isora Inv. 2	5	5	5	0	5	0	0
Guía de Isora Inv. 3	7	2	3	0	4	0	0
Santiago del Teide	3	3	2	0	2	0	0

**: Ver Resultados y Discusión*

Gráfico 1. Incidencia de TYLCD en Tenerife (2001-2002)

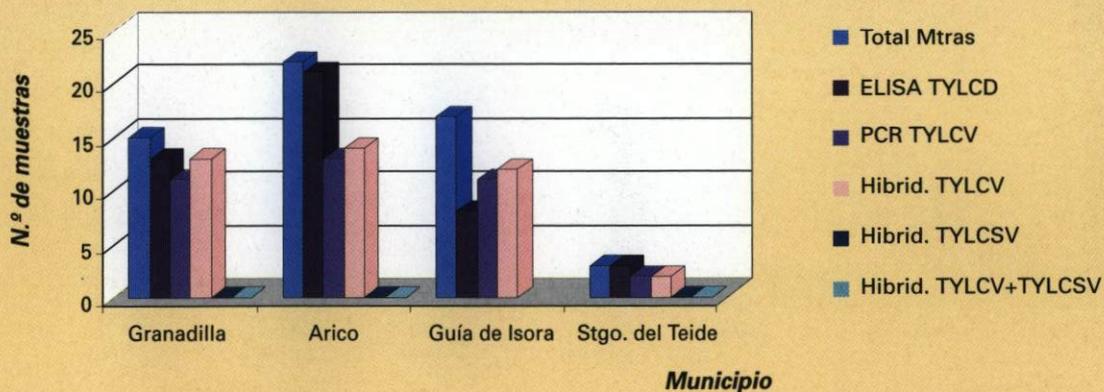
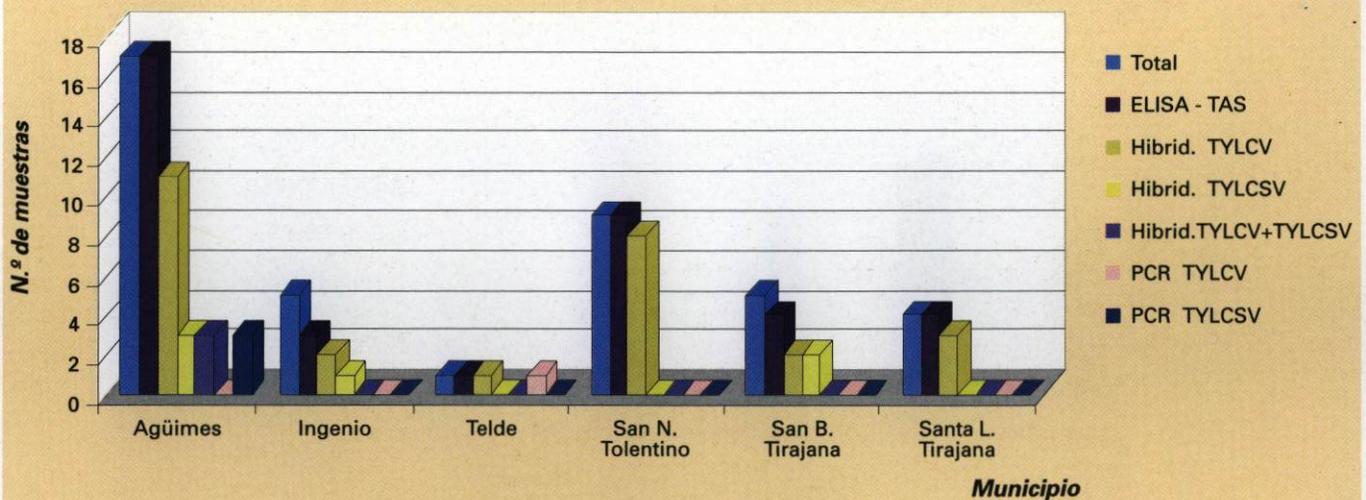


Tabla 3. Incidencia de TYLCD en Gran Canaria (2001-2002)

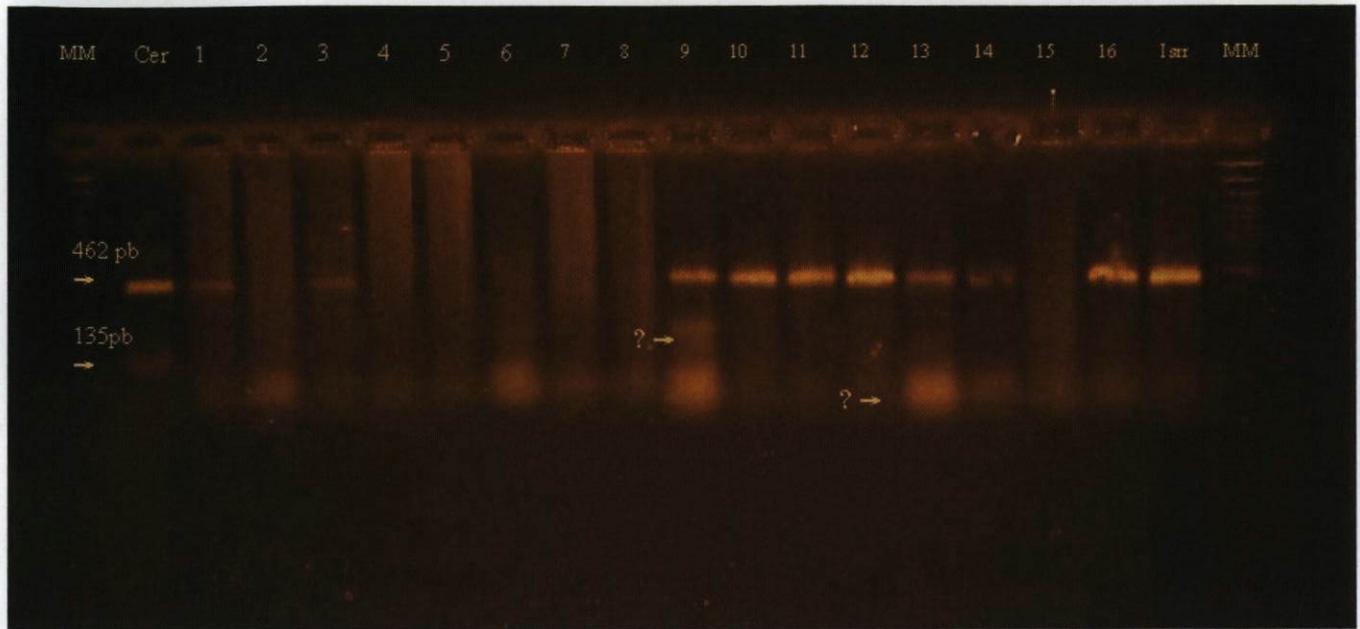
Municipios	Nº muestra	ELISA-TAS +	PCR		Hibridación Molecular		
			TYLCV +	TYLCSV * +	TYLCV +	TYLCSV +	TYLCV/ TYLCSV +
Aguimes Inv.1	10	10	0	4	7	2	2
Aguines Inv. 2	2	2	0	2	1	0	0
Aguines Inv. 3	5	5	0	5	3	1D	1
Ingenio	5	3	0	2	2	1D	0
Telde	1	1	1	0	1	0	0
San N. Tolentino	9	9	0	5	8	0	0
San B. Tirajana	5	4	0	4	2	2	0
Santa L. Tirajana	4	4	0	3	3	0	0

*: Ver Resultados y Discusión

Gráfico 2. Incidencia de TYLCD en Gran Canaria (2001-2002)



ELECTROFORESIS PCR 2. Tenerife Sur



Leyenda:

Experimento de Resistencia con variedades de tomate.
Controles positivos y negativos:

1. Var Daniela (C+). 2. Var Doroty (C+). 3. Var Boludo (C+) Var Timpany (C+). 5. Var Daniela (C-). 6. Var Boludo (C-)

Muestras de mala hierba prospección Tenerife Sur:

9. *Solanum nigrum* (40-5b) 13. *Malva parviflora* (41-10)
14. *Chenopodium* sp. (43-8)

Muestras 7, 8, 10, 11, 12, 15 y 16: Muestras de tomate de la prospección de campo al sur de Tenerife:

7. M 391-14 8. M 39.2-21 10. M 40-3 11. M 41-1
12. M 41.6 15. M 43.2-2 16. M 43-1

? : Bandas dudosas

MM: Marcador molecular

Cer e Isr: Controles positivos

(+): positivas

Figura 1. Resultados en TYLCV en Tenerife

ELECTROFORESIS PCR 6. Muestras en Gran Canaria

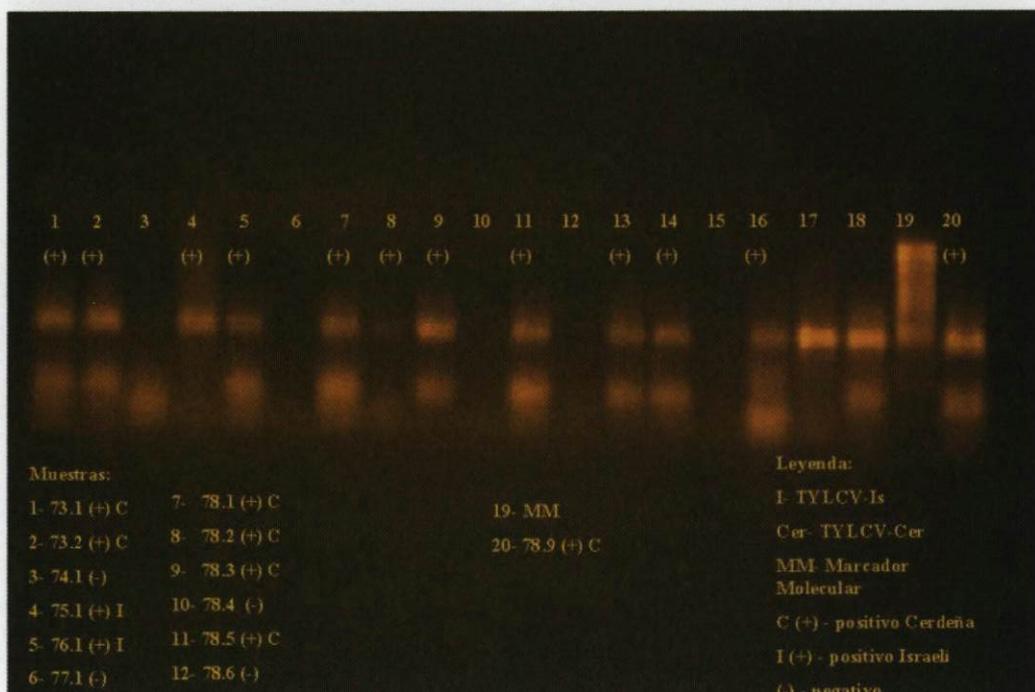


Figura 2. Resultados en TYLCSV en Gran Canaria

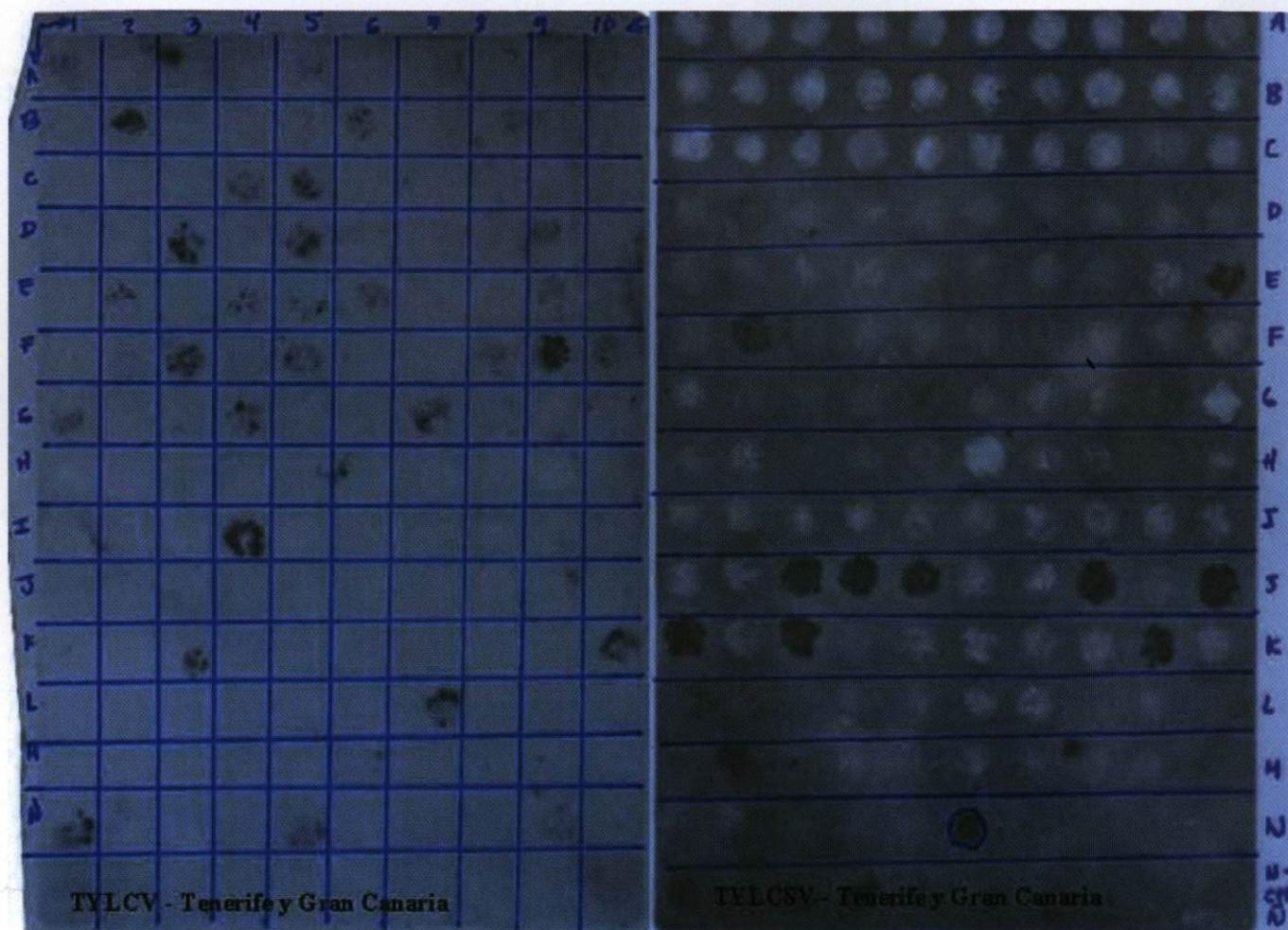


Figura 3. Resultados de TYLCV y TYLCSV por hibridación molecular en Tenerife y Gran Canaria