

# DetECCIÓN DEL VIRUS DEL TORRADO DEL TOMATE (*Tomato torrado virus - ToTV*) EN TOMATE DE EXPORTACIÓN EN CANARIAS

A.I. Espino\*, M. Botella\*, R. Martín\*\*, O. del Toro\*\*\*, P. Gómez\*\*\*\*,  
P. Benito\*\*\*\*\*, E. Gómez\*, J. A. Reyes\*\*\*\*\*, D. Monroy\*\*\* y E. Fontela\*\*\*

\*Laboratorio de Sanidad Vegetal de Tenerife

\*\*Sanidad Vegetal de Gran Canaria

\*\*\* Merco Canarias S.A.U.

\*\*\*\* Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CEBAS-CSIC, Murcia

\*\*\*\*\* Granja Experimental del Cabildo de Gran Canaria

\*\*\*\*\* Sanidad Vegetal de Tenerife

## Resumen

A comienzos del año 1996 se detecta por primera vez en Canarias una nueva enfermedad. En el año 2003 fue diagnosticada para la ciencia de etiología viral en el cultivo del tomate "Tomato torrado virus" ToTV (Verbeek et al., 2005) conocida con el nombre de "torrao" por el aspecto quemado que le da a la planta. Se encuentra esta enfermedad en invernadero (Rodríguez et al., 1996) en la zona de Vecindario e Ingenio (Gran Canaria) y también en Tenerife (1997) en cultivos de exportación de la variedad Daniela en la mayoría de los casos, tanto al aire libre como en invernadero en diferentes zonas productoras de tomate (Espino et al., 1999).

En la campaña 2006-2007 se ha realizado una prospección exhaustiva de diferentes explotaciones de Tenerife y Gran Canaria con un total de 104 muestras con el objetivo de confirmar el diagnóstico de ToTV con plantas con síntomas típicos de "torrao" mediante diferentes técnicas moleculares (RT-PCR e hibridación molecular con print y Dot Blot) así como conocer el método de mayor eficacia, incidencia de la enfermedad en campo, distribución geográfica, la posible implicación y/o asociación de PepMV con el ToTV y por último la distribución de ToTV en la planta. Los resultados indican que la RT-PCR se muestra eficaz más que la hibridación molecular y que en esta hay diferencia entre el dot-blot y print, este último parece más eficaz. La superficie total afectada de la enfermedad en ambas islas ha sido de 56.15 has. En Gran Canaria hubo una grave incidencia en la Aldea de San Nicolás de Tolentino en la variedad Mariana con una incidencia del 31.35%, llegando a arrancarse 13,88 has de cultivo. El PepMV tipo chilense 2 no parece estar implicado en esta enfermedad como ocurre en Murcia. La distribución del virus en la planta se encuentra en su parte media y apical.

Foto 1. Amarilleo y necrosis en base de los folíolos



## INTRODUCCIÓN

La enfermedad del "torrao" está causada por el virus del torrado del tomate, "Tomato torrado virus" (ToTV). Su posición taxonómica aún no está totalmente definida pero según los



Foto 2. Cribado

estudios realizados (Verbeek *et al.*, 2007) este virus muestra características del virión y secuencia similares con virus del género *Sequivirus* y *Waikavirus* (familia *Sequiviridae*) y a los géneros no asignados *Cheravirus* y *Sadwivirus*. Esto debería constituir un género nuevo debido a la similitud que presenta en los análisis filogenéticos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos con los



Foto 3. Necrosis en cremallera del peciolo.

Foto 4. Tallo necrosado estriado



necrótica (Foto 1), dando el aspecto de "cribado" (Foto 2). En los peciolos se presentan manchas marrones secas de forma intermitente con un aspecto tipo cremallera (Foto 3). En los tallos pueden aparecer manchas necróticas continuas longitudinales (Foto 4). Los frutos presentan manchas circulares necróticas tipo cremallera, se deforman (Foto 5) y en algunos casos se abren y quedan las semillas vistas (Foto 6). También en algunas ocasiones se riza la hoja hacia el envés y los folíolos de la hoja se manifiestan deformados (Foto 7). La parte apical de la planta toma un aspecto de quemado de ahí el nombre conocido como "torrao" (Foto 8).

El ToTV se transmite por el vector *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) con baja eficiencia, se ha realizado un ensayo que consistió en la suelta 200 individuos de moscas blancas



Foto 5. Necrosis de frutos, tipo cremallera

previamente infectadas con plantas enfermas de "Torrao" a 50 plantas sanas y solamente se manifestaron 2 plantas con síntomas (P. Maris, de De Ruiters Seeds comunicación verbal "Características y peculiaridades del ToTV"; 2007).

En Polonia se demuestra la transmisión: por *Trialeurodes vaporariorum* con una eficacia del 100% y mecánicamente mediante inoculación (50-70%) (Pospieszny et al., 2007).

Estudios realizados mediante transmisión con *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* lo confirman siendo la más eficiente *T. vaporariorum* (comunicación persona, M. Aranda).

En esta campaña 2006-2007 ha habido una grave incidencia de *Trialeurodes vaporariorum* sobre *Bemisia tabaci* en todas las zonas productoras de tomate donde se encuentra la enfermedad.

Según nuestras detecciones en numerosas muestras tanto de Gran Canaria como de Tenerife desde que apareció la enfermedad en 1996 hasta el año 2006 se ha podido comprobar que la enfermedad se encuentra distribuida en la mayoría de las zonas productoras de tomate de invierno de exportación a excepción de Guía de Isora en Tenerife y de Gáldar en Gran Canaria.

En nuestras observaciones a lo largo de estos años la enfermedad parece tener un comportamiento errático, dado que se presenta en otoño con temperaturas medias-bajas y con una humedad relativa alta cuando la planta se encuentra en estado fenológico con los primeros frutos o racimos de frutos para luego desaparecer por completo a medida que se desarrolla el cultivo y aumenta la temperatura. Pero sin embargo en esta campaña en la Aldea de San Nicolás ha tenido un comportamiento diferente, la enfermedad ha aparecido desde el principio del cultivo hasta el final del cultivo prácticamente. Ha coincidido con una

elevada población de mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) y unos cambios bruscos de temperatura durante todo el año.

La enfermedad se manifiesta en algunos casos en asociación con otras virosis TSWV y PVY, en casos aislados TYLCV y en muchos casos con PepMV de gran extensión en todas las zonas productoras desde su primera aparición en el año 2000 (Espino et al., 2001) y últimamente en muchos casos también con el



Foto 6. Tomates deformados con semillas vistas

ToTV cada vez más extendido y con mayor incidencia en todas las zonas productoras de tomate tanto en Tenerife como en Gran Canaria.

En la Península, y concretamente en la región de Murcia se detecta por primera vez en invernaderos de tomate una nueva sintomatología en la primavera del año 2001. Esta sintomatología se conoce con el nombre de "torrao" por el aspecto de quemado que adquieren las plantas afectadas. Los primeros síntomas se detectan en las nuevas brotaciones, se observa un amarilleo en la base de los folíolos que posteriormente se necrosan y evolucionan a cribado (C. Jordá, et al., 2003).

En primavera del 2001 aparecen por primera vez en España (Tarragona) unos síntomas similares en tomate relacionados con *Parietaria mottle virus* (PMoV) (Aramburu et al., 2002), que en principio se pensó que podría tratarse del "torrao".

En esta época también se descarta la posibilidad de cualquier tipo de alteración fisiológica, efecto fitotóxico, hongos y bacterias fitopatógenas, ya que en alguna ocasión se llegó a pensar que podría tratarse de una enfermedad fisiológica llamada "Catface" o "cara de gato" por la sintomatología detectada en fruto, la forma y cicatrices de este (Scott, 2000)

Verdaderamente se confirma por primera vez el "torrao" del tomate *Tomato torrado virus* (ToTV) en

el año 2003 mediante microscopía electrónica. Se observaron partículas esféricas de 28nm de diámetro aproximadamente. También se observaron partículas del género Potexvirus y por ELISA se confirmó la presencia de PePMV. Se purificaron las partículas virales no conocidas hasta el momento y se inocularon mecánicamente en plantas sanas y se reprodujeron los síntomas típicos de "torrao". Tras la centrifugación por gradiente de densidad se observaron dos bandas, la banda superior contenía viriones con moléculas de ARN de 5.5 kb aproximadamente y la banda inferior una molécula de ARN de aproximadamente 8 kb. Las partículas virales de ambas bandas contenían tres proteínas de la cápsida. Ambas bandas de RNA fueron sometidas a síntesis de cDNA y posteriormente clonadas. Las secuencias completas de nucleótidos fueron determinadas a partir de cDNA clonado y fragmentos generados por PCR (Verbeek, *et al.*, 2005)

Recientemente en Méjico (Culiacán, estado de Sinaloa), se ha detectado una nueva enfermedad, en cultivos de tomate de exportación que mostraban síntomas de necrosis apical, causada por una nueva especie de etiología viral Picorna-Like. Por microscopía electrónica se detecta un virus isométrico, aislado en muestras de tomate que mostraban síntomas necróticos severos. Se transmitió mecánicamente sobre *Chenopodium quinoa* y sobre tomate se reprodujeron los síntomas de necrosis apical. Se purificó el virus y se obtuvo un anticuerpo policlonal. Se confirmó esta nueva enfermedad mediante ELISA-DAS. Se purificaron las partículas virales conteniendo dos cadenas de RNA, RNA1 y RNA2 de 7 kb y 5 kb respectivamente. Los análisis de secuencia indican que tienen similitud con miembros de la familia Sequiviridae. La nueva especie de virus es propuesta provisionalmente con el nombre de Tomato apex necrosis virus. En

principio se pensaba que se trataba de nuevas razas de TSWV pero sin embargo TSWV no fue detectado como agente causal. (Torina *et al.*, 2007).

Esta nueva enfermedad detectada en Méjico, el Virus de la necrosis apical del tomate, puede estar relacionada con el "torrao" debido a la similitud que presenta su sintomatología, las características de sus partículas virales y su contenido en ácidos nucleicos, así como su análisis de secuencia.

## ANTECEDENTES

El "torrao" se detecta por primera vez en Canarias a principios de 1996, en tomates bajo invernadero en el Sur de Gran Canaria (Vecindario e Ingenio). La enfermedad se manifiesta con un grave amarilleo y necrosis en la base de los folíolos de las hojas apicales con la presencia de necrosis y estrías en los pecíolos y tallos. Según la sintomatología observada, la enfermedad coincidía con la ocasionada por el Virus del mosaico del pepino portador de un RNA satélite (CARNA-5 o necrosis del tomate) o por el Virus del mosaico de la alfalfa, AMV descrita por Blancard (Rodríguez *et al.*, 1996). Las muestras se enviaron al Laboratorio de Virología de la Universidad Politécnica de Valencia y se analizaron mediante microscopía electrónica detectándose partículas virales esféricas pero sin llegar a nada concluyente (J. M. Rodríguez, datos sin publicar).

En Tenerife se detecta por primera vez en 1997 en la zona Suroeste (Arico y Tamaimo) en cultivos de tomate de invierno para exportación de la variedad Daniela en la mayoría de los casos, tanto al aire libre como en invernadero. La sintomatología de la enfermedad presenta manchas marrones en

la parte basal del foliolo, en el pecíolo de la hoja y en el tallo. Estos síntomas son similares a los que describe la bibliografía para el AMV. En el Laboratorio se analizaron mediante ELISA-DAS para TSWV, CMV, PVY, PVY-n, PVX y ToMV. Todas las muestras analizadas resultaron negativas. Se enviaron al Laboratorio de Referencia de Virus de la Universidad Politécnica de Valencia y se analizaron por ELISA-DAS para AMV, PVY y TSWV, obteniendo resultados negativos. También se analizaron mediante microscopía electrónica y no se llegó a ningún resultado concluyente (Espino *et al.*, 1999).

Esta nueva sintomatología se presentó en la

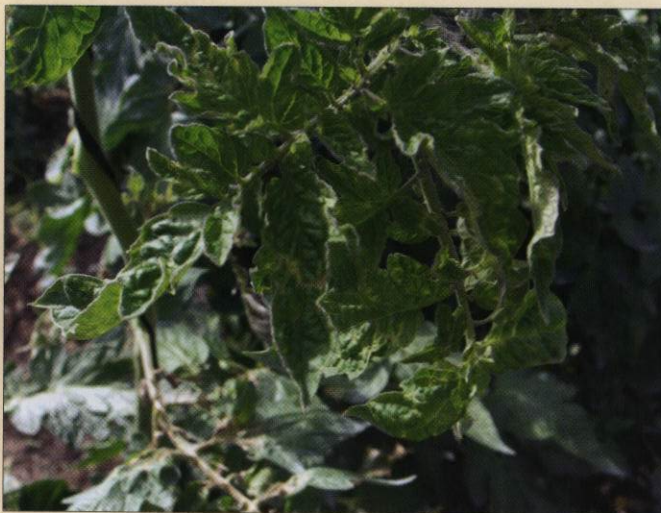


Foto 7. Los folíolos de la hoja se manifiestan deformados



Foto 8. Brote quemado

mayoría de los casos en otoño a mitad de campaña en plena producción de forma generalizada en el cultivo mientras que en Gran Canaria se detectó con mayor incidencia que en Tenerife. En ambos casos el virus desaparecía a medida que la planta se desarrollaba.

En Gran Canaria continua apareciendo necrosis y cribado en la base de los folíolos del ápice y estriado del tallo del tomate sin la virulencia mostrada al principio y aunque se sospechaba fuera de origen vírico (CMV ó AMV). Tal sospecha no ha sido confirmada por análisis, a pesar de numerosas muestras enviadas a laboratorios especializados (Rodríguez *et al.*, 1999).

En Tenerife partir del año 2000 analizamos también la enfermedad para el AMV y para el Virus del mosaico del pepino dulce, *Pepino mosaic virus* (PepMV), donde se detecta por primera vez en Tenerife en la campaña 99-00 (Espino *et al.*, 2000)

En la isla de Tenerife (Arico) en octubre-noviembre del 2002 se detecta en tomates en invernaderos (variedad Daniela injertada sobre Beaufort) en plantas aisladas y en asociación con ToCV que se encontraba de forma generalizada en el cultivo.

En (mayo-julio) de este mismo año, durante la primera etapa del cultivo de tomate de verano al aire libre (variedades Boludo, Thyra y Daniela) se volvió a detectar la enfermedad de forma generalizada. Se analizaron para todas las virosis mencionadas

anteriormente incluyendo el PepMV y el AMV, se obtuvieron resultados negativos excepto para el PVY, aunque los síntomas detectados no correspondían con este virus, se corroboró en el Laboratorio de Referencia. También se detectó AMV con baja densidad óptica.

Este diagnóstico, se complementó con el injerto, se tomaron brotes con síntomas y se injertaron en bisel en plantas sanas de tomate que se mantuvieron durante 15 días bajo condiciones controladas (jaulas con malla anti-trips), observándose al cabo de este tiempo la sintomatología descrita anteriormente y al mes también se detectaron deformaciones y necrosis circulares en el fruto.

Al mismo tiempo se realizaron varias consultas a los Laboratorios de Diagnóstico de las Comunidades Autónomas. En Almería se detecta

PVX con síntomas similares y en Murcia está apareciendo un síntoma similar pero aún sin identificar. Analizando los últimos trabajos de la SEF, encontramos también en Tarragona una nueva enfermedad durante la primavera del 2001, en cultivos del tomate al aire libre. Los síntomas se manifiestan con lesiones necróticas en las hojas apicales, que evolucionan hacia una necrosis del tallo que causa la muerte del brote apical, en la nuevas brotaciones no aparecen síntomas. Los frutos se deforman con aparición de lesiones necróticas (Espino *et al.*, 2002). En análisis biológicos de transmisión y serológicos por ELISA, se detecta un Irlavirus en tomate relacionado con *Parietaria mottle virus* (PMoV) (Aramburu *et al.*, 2002).

A lo largo del año 2003, recibimos en el Laboratorio numerosas muestras de tomate procedentes de diferentes zonas de Tenerife y Gran Canaria de variedades susceptibles y tolerantes al virus de la cuchara (Daniela, Boludo, Thyra y Doroty), tanto no injertadas como injertadas sobre patrón Beaufort. La mayoría de las muestras presentaban: amarilleo y manchas necróticas en la base de los folíolos de las hojas apicales, necrosis longitudinales en los pecíolos de las hojas, talos y pedúnculos de las flores, necrosis total de la parte apical de la planta, necrosis circulares y deformación de los frutos y necrosis total de los frutos del tamaño de un boliche. Se realizaron análisis mediante ELISA para TSWV, AMV, ToMV, PVY, PVX, CMV, TYLCD y PepMV, se obtuvieron resultados positivos en muy pocos casos para PVY, TYLCD y PepMV. En el Laboratorio de Referencia y el Laboratorio de Virología

del IRTA no se observa la presencia de PMoV. (Espino *et al.*, 2003).

Según los últimos estudios realizados en la Península, esta enfermedad podría estar asociada a lo que se conoce en la Península como "cribado" o "torrao" del tomate, una nueva enfermedad del cultivo del tomate, aún sin conocer su agente causal (Jordá *et al.*, 2003)

En el año 2003 se diagnostica por primera vez en diferentes cultivos de tomate con los síntomas descritos para "torrao" vez un nuevo virus en tomate en España (Murcia) denominado "*Tomato torrado virus*" (ToTV) (Verbeek *et al.*, 2005)

Se han analizado numerosas muestras tanto de Tenerife como de Gran Canaria desde que apareció la enfermedad hasta el 2006 haciendo uso de la técnica serológica inmunoenzimática por ELISA-DAS con anticuerpos específicos de la casa comercial Loewe para TSWV, AMV, CMV, PVY, PVY-n, PVX, ToMV, AMV, PepMV (a partir del 2000 este último), TBSV, TRSV y TFYV (a partir del 2004) y mediante técnicas moleculares por hibridación molecular con sondas no radiactivas de DNA específicas de TYLCV y TYLCSV suministradas por L. Velasco del IMIDA-Murcia y E. Moriones del CSIC-Málaga y de RNA específica del ToCV cedida por J. Navas del CSIC-Málaga. Se obtuvieron resultados positivas en varios casos para PepMV y ToCV (ambas virosis extendidas en todas las zonas productoras de tomate), además de TSWV, PVY y TYLCV en algunos casos. (Espino *et al.*, 1999, 2002, 2003 y datos sin publicar, 2004- 2006). Al mismo tiempo se enviaron al Laboratorio de Referencia pero sin obtener hasta el momento ningún resultado concluyente con respecto al "torrao".

En las dos últimas campañas (2004-2005, 2005-2006) ha habido una grave incidencia de la enfermedad en diferentes explotaciones de Gran Canaria en el municipio de La Aldea de San Nicolás. Se volvieron a enviar muestras al Laboratorio de Referencia, sin resultados concluyentes de nuevo.

Estudios realizados en la Península hasta el verano del 2006 muestran la asociación persistente del PepMV, concretamente el aislado tipo Chileno 2 en muestras con síntomas típicos de "torrao" (A. Alfaro-Fernández *et al.*, 2006, 2007)

A partir de agosto del 2006 se pone en conocimiento un protocolo de diagnóstico mediante RT-PCR, así como la pareja de iniciadores para detectar la enfermedad, descrito en la patente internacional N° WO20066085749 (Van Der Vlug *et al.*, 2006).

A partir del 2007 ya se dispone en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la pareja de iniciadores específicos para realizar el diagnóstico mediante RT-PCR del Virus del torrado del tomate "*Tomato torrado virus*" (ToTV) y de las sondas no radiactivas marcadas con digoxigenina específicas de RNA para el ToCV, PepMV

Tipo europeo y PepMV Tipo chilense -2 mediante hibridación molecular suministradas por M. Aranda del CSIC- Murcia.

En la actual campaña se ha vuelto a detectar, desde finales de agosto, una grave incidencia de la enfermedad en diferentes explotaciones de La Aldea de San Nicolás y se ha obligado el levantamiento de las parcelas afectadas a finales de octubre del pasado año. A finales de noviembre se presenta otra vez con grave incidencia en las mismas explotaciones.

Esta grave incidencia se debe a la presencia de cultivos hortícolas para el mercado interior (habichuela, calabaza, calabacín). Además se observó la presencia de malas hierbas y moscas blancas en casi todos estos cultivos. Al levantar los cultivos no se aplican herbicidas ni tratamientos específicos para la mosca blanca, al objeto de evitar la migración de la plaga a otras parcelas. La poca alternativa de materias activas para el control de mosca blanca crea resistencias además de disminuir la eficacia de estas. Tampoco se presentan medidas preventivas de control como placas amarillas y dobles puertas.

A principios de octubre del 2006 se recibieron en el Laboratorio un total 16 muestras de otras tantas explotaciones diferentes de La Aldea de San Nicolás. La mayoría de éstas presentaban necrosis de color marrón y negro con cribado en los folíolos y manchas longitudinales e intermitentes secas tipo cremallera necrosadas en los pecíolos. En otros casos se presentan arabescos en folíolos y curvamiento y deformación de los folíolos hacia el envés. En el laboratorio se analizaron mediante ELISA-DAS para los virus: TSWV, CMV, PVY, PVX, ToMV, PepMV, TBSV, ToRSV y TFYV, se obtuvieron resultados negativos en todos los casos excepto en uno que resultó positivo para TSWV. Al mismo tiempo estas mismas muestras se enviaron al Laboratorio de Referencia y a finales de diciembre se recibió el informe de los resultados. Las muestras fueron analizadas por RT-PCR con primers específicos de PepMV y ToTV. De las 16 muestras se obtuvieron 3 muestras positivas a ToTV una muestra positiva a PepMV tipo chileno-2 Según el Laboratorio de Referencia los resultados obtenidos no fueron fiables debido al estado en que llegaron las muestras.

A partir de enero del presente año la Consejería de Agricultura del Gobierno de Canarias mediante la empresa Merco Canarias, S.A.U. ha contratado los servicios de un ingeniero técnico agrícola, con el objetivo de hacer un seguimiento de las parcelas afectadas, analizando la evolución de los cultivos de tomate, la incidencia de la enfermedad y asesorar a los agricultores de hortalizas en la aplicación de buenas prácticas agrícolas y en mantener un buen estado fitosanitario de los cultivos además de mantener un buen cerramiento en los invernaderos, dobles puertas y controlar las malas hierbas.

En las actuaciones llevadas en el campo se observan diferentes problemas: no se controlan las

poblaciones de mosca blanca, abuso de las mismas materias activas, y el desarrollo del cultivo durante todo el verano sin interrumpir el ciclo biológico de la mosca blanca.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Prospecciones realizadas:

La prospección se realizó en febrero del presente año, en 17 explotaciones de tomate de invierno de exportación con síntomas típicos de "torrao" cuando los cultivos estaban en plena producción. El denominador común de todas las explotaciones era la elevada población de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* frente a la *Bemisia tabaci* que había en ese momento o la que hubo anteriormente. Además de la elevada incidencia y extensión de PepMV con una sintomatología leve en la planta (mosaico suave y abullonado en foliolos, pero manchado de fruta de forma generalizada) y ToCV, esta última cada vez más extendida.

En Gran Canaria a principios de febrero, se visitaron 9 explotaciones, se recogieron un total de 54 muestras de diferentes municipios: Agüimes (24), Sta. Lucía (6) y La Aldea de San Nicolás (24). Una de las explotaciones muestreadas en Agüimes presenta síntomas de "torrao" en asociación con amarilleo del tomate, ToCV (Foto 9). Los frutos se pueden manifestar con distintos grados de necrosis.

En Tenerife se visitaron a finales de febrero 10 explotaciones: Arico (30), Granadilla (18), Guía de Isora (3) y Santiago del Teide (6). Una de las fincas muestreadas en Guía de Isora presentaban síntomas de ToCV en el 100% de las plantas y en los brotes de 3 plantas aisladas "torrao" de forma incipiente.

Las variedades muestreadas son Boludo, Mariana y Dorothy injertadas sobre Beaufort.

De cada explotación se recogen 6 muestras con síntomas de "torrao", 6 de PepMV, 6 de TSWV (en alguna ocasión) y 6 de ToCV. En algunas explotaciones se detectaron síntomas de TSWV, PVY y TYLCV. En La Aldea de San Nicolás la mayoría de las muestras tomadas presentaban síntomas agresivos de ToTV en la parte apical de la planta (necrosis en la base de los foliolos, cribado no siempre, rizado de las hojas



Foto 9. Síntomas del Virus del torrao del tomate y su asociación con ToCV

hacia el envés, deformación de los foliolos y necrosis de los frutos) y síntomas leves de PeMV en la parte media de la planta.

### Análisis serológicos:

Las muestras se analizaron con la técnica serológica inmunoenzimática mediante ELISA-DAS con anticuerpos específicos marcados con fosfatasa alcalina para PepMV aislado europeo y TSWV de las casas comerciales DSMZ y Loewe respectivamente. Los controles positivos eran de extractos congelados de plantas infectadas de dichas virosis y los negativos de la casa comercial.

### Detección de ácidos nucleicos:

Las muestras de "torrao", PepMV aislado europeo y PepMV aislado chilense-2 se analizaron mediante hibridación molecular con "dot-blot" (extractos de ARN) y con "print" (improntas de secciones transversales del peciolo del foliolo) y las de ToCV solamente con "print".

Unas pocas muestras de "torrao" se seleccionaron y se analizaron también por RT-PCR.



Foto 10. Distintos grados de manifestación de necrosis por "torrao", ToTV en los frutos

En la Hibridación molecular se utilizaron sondas de ARN específicas no radioactivas marcadas con digoxigenina para "torrao" (ToTV), PepMV tipo europeo, PepMV tipo chilense-2 y ToCV Primero se inmoviliza el material genético ARN de la planta en una membrana de nitrocelulosa y se fijan con luz ultravioleta. Luego se prehibrida (bloqueo de la membrana para evitar uniones inespecíficas) con un tampón estándar más 50% de formamida. A continuación hibridamos (unión de la sonda específica para el virus), la ponemos en contacto en una solución con sonda de ácidos nucleicos marcadas y previamente desnaturada 10' a 65°C y se incubaba toda la noche a 65°C en un horno de hibridación. Tras la hibridación se realizan varios lavados con diferentes soluciones para eliminar los productos que no han reaccionado. La reacción de los híbridos muestra-sonda con el anticuerpo (anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina de ROCHE más un agente bloqueante) y la detección con un sustrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina (CDP-Star de ROCHE) producen una reacción química cuando está presente el virus. Dicha reacción genera luz la cual vela una película fotográfica que colocamos encima apareciendo los positivos como puntos en dicha película (protocolo Laboratorios de Virología del CSIC-Murcia y Málaga)

Para la extracción del ácido nucleico ARN de cada una de las muestras se emplearon 0.1 g. de folíolos de los brotes apicales con síntomas incipientes. El ARN total se extrajo con el kit comercial RNAwiz de Ambion para ToTV y PepMV (Tipo europeo y chilense-2) siguiendo el protocolo de la casa comercial. El ARN total se resuspendió en 40µl de H<sub>2</sub>O Depc.

La extracción del ARN de estos virus se utilizó tanto para la hibridación molecular mediante "dot- blot" como para la RT-PCR solamente para ToTV.

Los controles positivos de extractos de ARN de ToTV, PepMV tipo europeo y PepMV tipo chilense-2 fueron cedidos por M. Aranda del CEBAS CSIC - Murcia.

Se analizaron 14 muestras mediante RT-PCR con la pareja de iniciadores del RNA2, 5'-CCCATCATCAC-CACCCTCCTCTTCGTA-3' y la reverso 5'-TTCCAGTAAT-GATCCAACCAAT-3' con un producto de amplificación

de 585pb, descrito en la patente N° WO20066085749 (Van Der Vlug *et al.*, 2006)

La amplificación por RT-PCR se utilizó el kit comercial One Step RT-PCR System de Invitrogen. La desnaturalización inicial de los ARNs totales se realizó a 65°C durante 5min. El cóctel de amplificación se realizó con 5 µl de RNA extraído de cada muestra y 20. µl de la mezcla para RT-PCR que se añadió a cada uno de los tubos (protocolo Laboratorio de Referencia). El primer paso de 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. Por último un paso de extensión a 72°C durante 5 min descrito en la patente N° WO20066085749 (Van Der Vlug *et al.*, 2006)

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, luego se tiñe en una dilución con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 15 min. y se visualizan en un transiluminador de UV. El tamaño de las bandas de ácidos nucleicos se estima comparándolo con un marcador de ADN de 100 pb de MBI Fermentas (protocolo Laboratorio de Referencia).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultados análisis serológicos:

De las 64 muestras analizadas para PepMV, 25 muestras resultaron positivas para el Tipo europeo y de las 12 muestras para TSWV, 8 muestras resultaron positivas. Todas las explotaciones afectadas están concentradas en los diferentes municipios de Tenerife excepto La Aldea de San Nicolás de Gran Canaria (Tabla 1 y Tabla 2). Estos resultados indican que el PepMV está extendido en todas las zonas productoras de tomate de la isla de Tenerife.

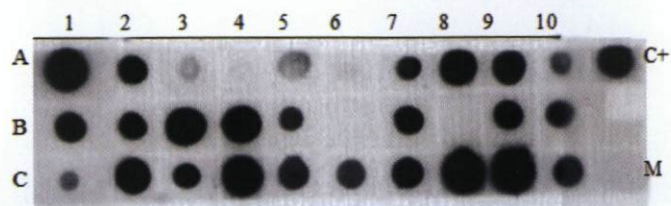
### Resultados análisis de ácidos nucleicos mediante hibridación molecular con "dot- blot":

#### Muestras de "torrao"

De las 104 muestras analizadas procedentes de diferentes municipios de Tenerife y Gran Canaria



47 muestras resultaron positivas. En la figura 1 se observan manchas negras que representan los resultados positivos de algunas de las muestras analizadas en una de la membrana hibridada con "dot blot"



**Figura 1.** Detección de ToTV mediante hibridación por Dot Blot con una sonda marcada con digoxigenina. Se han incluido 30 extracciones de RNA total procedente de hojas jóvenes de plantas de tomate con síntomas de torrao. C+, control positivo; M, planta no infectada.

En las Tablas 1 y 2 se presentan los resultados de las distintas muestras según los municipios. Para las otras visrosis, a continuación del número de muestras analizadas, se indica entre paréntesis el nº de muestras positivas.

Según los resultados obtenidos se destaca que la mayor incidencia de la enfermedad se encuentra en la isla de Gran Canaria en la Aldea de San Nicolás seguida de Arico y Granadilla en la isla de Tenerife.

A partir de nuestras observaciones, aproximadamente el 50% de los análisis no coinciden con los resultados del laboratorio ya que todas las muestras analizadas presentan síntomas típicos de "torrao"; pensamos que puede ser debido a que el material necrótico de muchas muestras es muy sensible para mantener estable el material genético del virus y como consecuencia el ARN se degrada con muchísima facilidad, de ahí la gran cantidad de falsos positivos en los resultados de los análisis.

### Muestras de PepMV tipo europeo y tipo chilense-2

De un total de 66 muestras se obtienen 37 resultados positivos para PepMV tipo europeo. Los resultados positivos por municipios aparecen detallados en las Tablas 1 y 2. Estos resultados indican que el PepMV tipo europeo se encuentra en la mayoría de las explotaciones donde hay "torrao"; detectándose la mayor incidencia en la isla de Tenerife alcanzando en Granadilla el 100% seguida de Arico. También observamos que la hibridación molecular parece más sensible que el ELISA-DAS. Se detecta por primera vez en Canarias en la isla de Gran Canaria PepMV tipo chilense-2 en una explotación en el municipio de Agüimes con síntomas agresivos de mosaico amarillo fuerte tipo variegata en las hojas y manchado y deformación en frutos.

Municipio	Nº de muestras "torrao"	ELISA-DAS TSWV	ELISA-DAS PepMV Europeo	Hibridación molecular ToTV	Hibridación molecular ToCV	Hibridación molecular PepMV Europeo	Hibridación molecular PepMV Chilense-2	Asociación PepMV/ToTV
Arico	30		12(9)	14	6(2)	12(9)	12(0)	12(8)
Granadilla	15		12(12)	8	12(12)	12(12)	12(0)	12(4)
Guía de Isora	2		6(3)	1	6(6)	6(5)	6(0)	6(3)
Santiago del Teide	3		6(4)	2		6(5)	6(0)	
Total	50		28	25	20	31		15

**Tabla 1.- Resultados de Laboratorio en Tenerife**

Municipio	Nº de muestras "torrao"	ELISA-DAS TSWV	ELISA-DAS PepMV Europeo	Hibridación molecular ToTV	Hibridación molecular ToCV	Hibridación molecular PepMV Europeo	Hibridación molecular PepMV Chilense-2	Asociación PepMV/ToTV
Agüimes	24	6(2)	12(6)	10	6(0)	12(0)	12(6)*	
Sta Lucía	6							
La Aldea de s. Nicolás	24		18(4)	17	12(6)	18(6)	18(0)	18(6)**
Total	54	2	4	27	6	6	6	6

**Tabla 2.- Resultados de Laboratorio en Gran Canaria**

\* PepMV tipo chilense-2

\*\*PepMV parte media (abullonado) y "torrao" parte apical

## Asociación de "torrao" con PepMV tipo europeo y tipo chilense-2

En muestras con síntomas de "torrao" solamente se detecta asociación de "torrao" con PepMV tipo europeo en Arico seguida de Granadilla (Tablas 3 y 4).

En muestras con síntomas de "torrao" en la parte apical y de PepMV en la parte media de la planta se detecta asociación de "torrao" con PepMV solamente en La Aldea de San Nicolás (Tablas 3 y 4).

En ninguna de las muestras con síntomas de "torrao" se encuentra asociación con PepMV tipo chilense-2 como ocurre en Murcia.

### Hectáreas afectadas y % de incidencia de "torrao" por municipios

La superficie afectada está considerada por parcelas donde aparecían los síntomas. En las Tablas 3 y 4 se describen la superficie afectada y la incidencia de la enfermedad de las distintas explotaciones.

Municipio	Superficie total aproximada (has.)	Superficie afectada (has.)	% sobre el total	Variedades afectadas
Arico	111,46	11,995	10,76	Dorothy; Boludo; Mariana
Granadilla	106,39	6,2	5,82	Boludo; Kyller Mariana 37
Arona	5,44	0,71	13,05	Mariana 37
Guía de Isora	183,2	0,094	0,05	Dorothy
Santiago del Teide	15,44	0,04	0,25	Dorothy Boludo
<b>Total</b>	<b>421,93</b>	<b>19,749</b>	<b>4,68</b>	

Tabla 3.- Superficie afectada e incidencia en Tenerife

Municipio	Superficie total aproximada (has.)	Superficie afectada (has.)	% sobre el total	Variedades afectadas
Telde	55,94	0	0	Boludo, Birloque
Ingenio	77,09	0	0	Boludo
Agüimes	276,77	0,65	0,23	Boludo; Tovi Fantasy
Santa Lucía	138,59	0,01	0,007	Boludo
San Bartolomé de Tirajana	261,69	0	0	Boludo
Aldea de San Nicolás	312,01	36,45	11,68	Mariana Dorothy
<b>Total</b>	<b>727,37</b>	<b>37,11</b>	<b>2,99</b>	

Tabla 4.- Superficie afectada e incidencia en Gran Canaria

### Incidencia del ToTV

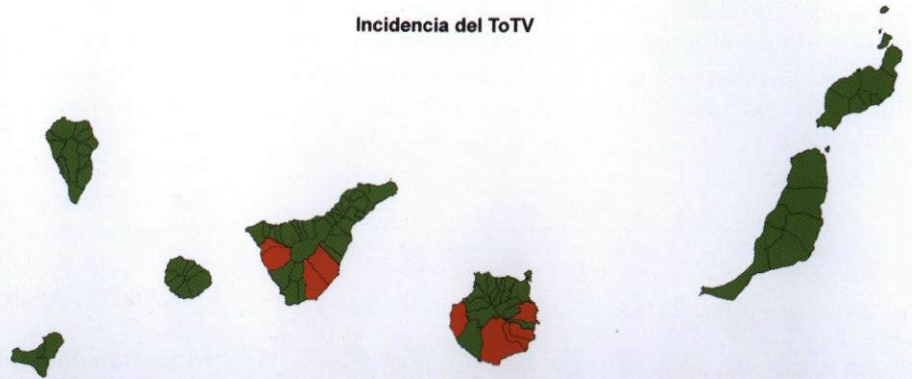


Figura 2. Distribución geográfica por municipios del ToTV en Tenerife (Arico, Granadilla, Arona, Guía de Isora y Santiago del Teide). Arona no está representada en el mapa y Gran Canaria (Telde, Ingenio, Agüimes, Santa Lucía, San Bartolomé de Tirajana y La Aldea de San Nicolás). Ingenio no está representada en el mapa.

Elaboración: Servicio de Planificación de Obras y Ordenación Rural de la Consejería de Agricultura.

En Telde y San Bartolomé de Tirajana solamente se observaron síntomas en plantas aisladas y en Ingenio en esta campaña no se detectó.

El municipio que tuvo mayor incidencia en Canarias fue el de La Aldea de San Nicolás en Gran Canaria, con una incidencia de 11.68% seguido de Arona con un 13.05% y Arico con 10.76%. De la zona de Arona no se recogieron muestras para analizar y confirmar el "torrao" mediante análisis en el Laboratorio. En Telde y San Bartolomé se han observado solamente en plantas aisladas, sin confirmar, en el Laboratorio y en Ingenio en esta campaña no se han observado síntomas como en otras campañas.

Según nuestras observaciones el virus afecta por igual a todas las variedades (Dorothy, Boludo y Mariana 37) pero la de mayor virulencia parece ser la variedad Mariana 37.

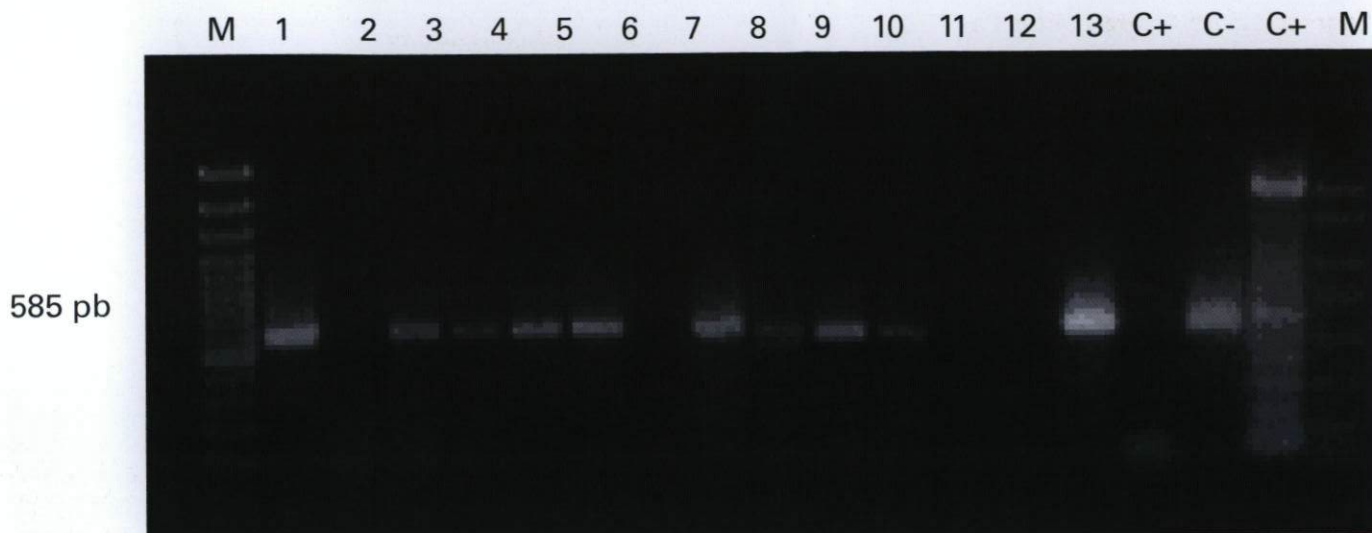
Con estos resultados podemos destacar la presencia de "torrao" en la mayoría de las zonas productoras de tomate de las islas de Tenerife y Gran Canaria. (Figura 2).

### Comparación de técnicas de diagnóstico, hibridación molecular ("dot-blot" y print) y RT-PCR:

Los resultados obtenidos indican que la RT-PCR detecta mayor número de muestras positivas que con la hibridación molecular. Estas amplificaron una banda de ADN con un tamaño de fragmento de 585 pb. Este producto final se separa por electroforesis horizontal en un gel de agarosa 1% en TBE, teñido con Bromuro de etidio y visualizado con luz UV (Figura 3).

Por otro lado, mediante hibridación molecular detectamos un mayor número de muestras positivas para ToTV por "print" que con "dot-blot".

Esta sensibilidad de diagnóstico, nos sorprendió, porque esperábamos que la hibridación molecular tanto con "dot-blot" como con "print" fuera la más eficaz



**Figura 3.** Detección de ToTV mediante RT-PCR con iniciadores específicos: ToTV- (+) y ToTV- (-) en gel de agarosa teñido con Bromuro de etidio y visualizado con luz UV. Se han incluido 14 muestras con síntomas de "torrao", los marcadores moleculares de 100pb en los extremos del gel, 2 controles positivos y un control negativo.

para la detección del "torrao", seguida de la RT-PCR independientemente que esta sea la más sensible.

El motivo de esta afirmación es debido a que en la hibridación molecular la sonda está formada por una secuencia de ácidos nucleicos mayor que la pareja de iniciadores utilizados en la PCR y como consecuencia mediante hibridación podría detectar mayor número de muestras. Estos resultados nos hacen pensar que muchas de las muestras debido a su necrosis el ARN se degradó rápidamente

#### **Distribución de torrao en planta con síntomas de torrao en la parte apical y síntomas de PepMV en la parte media de la planta mediante hibridación molecular con dot-blot:**

De las 18 muestras seleccionadas resultaron positivas a "torrao" 14 en la parte media de la planta y 16 en la parte apical.

Estos resultados indican que el virus parece distribuirse bien en estas dos partes de la planta a pesar de no presentar síntomas en la parte media de ésta.

#### **CONCLUSIONES**

- Se detecta ToTV en todas las zonas productoras de tomate de Tenerife y Gran Canaria.

- No se encuentra asociado el PepMV tipo chilense-2 con el "torrao" como ocurre en Murcia
- La presencia de *Trialeurodes vaporariorum* parece estar directamente relacionada con la incidencia de la enfermedad.
- La grave incidencia de la enfermedad en La Aldea de San Nicolás está implicada por la fuerte migración de *Trialeurodes vaporariorum* procedente de los cultivos hortícolas de verano colindantes.
- El "torrao" afecta a todas las variedades cultivadas.
- La enfermedad parece tener un comportamiento errático relacionado directamente con las condiciones ambientales.
- El virus se distribuye de forma homogénea en la planta.
- Para el diagnóstico es imprescindible que la toma de muestras sea en brotes con síntomas incipientes y el procesado en el laboratorio sea lo más rápido posible (muchos falsos negativos por la degradación del RNA).

Por último es fundamental que los agricultores tomen conciencia de la importancia que tiene mantener libre de mosca blanca el cultivo durante toda la campaña de tomate de invierno y los cultivos de verano.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- ALFARO-FERNANDEZ, A., CORDOBA-SELLÉS, M. C., CEBRIÁN-MICÓ, M. C., FONT, I., JUÁREZ, M., MEDINA, V., LACASA, A., SANCHEZ-NAVARRO, J. A., PALLÁS, V., JORDÁ-GUTIÉRREZ, C. 2006. Necrosis del tomate: "torrao" o cribado. Bol. San. Veg. Plagas, **32**: 545-562.
- ALFARO-FERNANDEZ, A., CORDOBA-SELLÉS, M. C., CEBRIÁN-MICÓ, M. C., FONT, I., JUÁREZ, M., MEDINA, V., LACASA, A., SANCHEZ-NAVARRO, J. A., PALLÁS, V., JORDÁ-GUTIÉRREZ, C. 2007. Avances en el estudio del "torrao" o cribado del tomate Bol. San. Veg. Plagas, **33**: 99-109.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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
- ESPINO, A. I; RODRIGUEZ; B., CABRERAT. 1999. Enfermedad en Tenerife sin identificar. XV Reunión del grupo de trabajo de laboratorio de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitaria, Badajoz
- ESPINO, A. I; RODRIGUEZ; B., CABRERAT. 1999. Detección del PepMV por primera vez en Canarias . XV Reunión del grupo de trabajo de laboratorio de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitaria, Badajoz
- ESPINO, A. I, DE LEON J.M. MONTERO, N. 2002 Nueva etiología viral en el cultivo del tomate en Canarias. XIII Reunión del Grupo de trabajo de Laboratorios de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias, Gran Canaria
- ESPINO, A. I, DE LEON J.M. GOMEZ, E. 2003 Enfermedad del tomate aún sin identificar . XIX Reunión del Grupo de trabajo de Laboratorios de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias, San Sebastián
- JORDA, C., MARTINEZ, M:C., CORDOBA, M.C.,MRTINEZ,O.; JUAREZ, M: y FONT,I: 2003. El "cribado" o "torrao", ¿una nueva enfermedad del cultivo del tomate? *Phytoma. España*, **152**: 130-136
- POPIESZNY, H., BORODYNKO, N., OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. HASIÓW, B. 2007. The First Report of Tomato Virus in Poland. *Plant Disease* 91: 10, 1364.
- RODRIGUEZ, J.M. RODRIGUEZ, M. 1996 Presencia de nuevo virus. Grave incidencia del amarilleo y necrosis basal de foliolos en tomate. GRANJA n° 3 Cabildo de Gran Canaria.
- RODRIGUEZ, J.M; RODRIGUEZ, M. 1999 Presencia de nuevos síntomas de enfermedades del tomate que pudieran estar relacionados en nuevos virus. GRANJA n° 7. Cabildo de Gran Canaria.
- RODRIGUEZ, J.M. RODRIGUEZ, M. 1999 La necrosis y cribado de la base de los foliolos del ápice y estriado del tallo del tomate. Reuniones anuales de los grupos de trabajo fitosanitarios.
- VAN DER HEUVEL, J. F, MARIS, P. C., VERBEEK, M., DULLEMANS, A. M., y VAN DER VLUGT, R. A. 2006. Plant virus designated Tomato torrado virus. N° Patente WO2006085749.
- 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..
- VERBEEK, M. DULLEMANS, A. M., VAN DER HEUVEL, J.F.J. M., MARIS, P.C. Y VAN DER VLUGT, R. A. A. 2007. Identification and characterization of Tomato torrado virus a new plant picorna-like virus from tomato. *Archives of Virology*, **152**: 881-990
- RINA, M., RICKER, M.D., LENZI, R., MANSEGA, V. AND CIUFFO, M. 2007. A Severe Disease of Tomato in the Culiacan Area (Sinaloa, Mexico) Is Caused by a New Picorna-Like Viral Species. *Plant disease/ Vol.91 No. 8*

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado por la colaboración prestada por parte de los técnicos en la indicación de las diferentes explotaciones afectadas y recogida de muestras: Manuel Flores de la Cooperativa Ntra. Sra. de Abona, Ricardo González de SAT Raymi, SAT Beig, Luis Emilio SAT Finca San Juan, Rosario Suárez de la Cooperativa Ntra. Sra. del Carmen, Librada Luis, Pablo Pérez, Agustín Farrota, Sagrario López y Victoria Calzadilla de la Cooperativa Coagisora, José Alberto Gómez de la Cooperativa de Tamaimo, José Ignacio Buxen de

la Cooperativa Yeoward, Juan Manuel Cruz de la Cooperativa de San Rafael, Manuel y Juan Félix de la Cooperativa Coagrisan.

También queremos agradecer al Dr. Miguel Aranda del CSIC- Murcia por suministrarnos las sondas no radiactivas de RNA marcadas con digoxigenina, ToTV, PepMV tipo europeo y PepMV tipo chilense-2, así como su asesoramiento prestado (datos bibliográficos, su propia experiencia y opinión) en todo momento sobre este estudio.