

Espino de Paz, A.I.

Laboratorio de Sanidad Vegetal, Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural, Consejería de Agricultura Ganadería Pesca y Aguas, Valle de Guerra- La Laguna Tenerife.

Botella Guillén, M.

Laboratorio de Sanidad Vegetal, Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural, Consejería de Agricultura Ganadería Pesca y Aguas, Valle de Guerra- La Laguna Tenerife.

Reyes Carlos, J.A.

Servicio de Sanidad de Sanidad Vegetal de Sanidad Vegetal, Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural, Consejería de Agricultura Ganadería Pesca y Aguas, Santa Cruz de Tenerife.

González García, A.C.

Servicio de Genómica de la Universidad de La Laguna.

Martín Suárez, R.

Servicio de Sanidad de Sanidad Vegetal de Sanidad Vegetal, Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural, Consejería de Agricultura Ganadería Pesca y Aguas, Las Palmas de Gran Canaria.

Evolución del virus del amarilleo del tomate (*tomato chlorosis virus, ToCV*) y su detección mediante técnicas moleculares en Canarias

INTRODUCCIÓN

Desde el año 1997 comenzó a detectarse en tomates de exportación, bajo invernadero de malla, tanto en Tenerife como en Gran Canaria, síntomas de amarilleo. Al año siguiente, a final de campaña, con la visita de la Doctora Wisler (viróloga especialista en la familia *Closteroviridae*) se tomaron muestras de tomate (variedad Daniela) en cultivos al aire libre en el municipio de Guía de Isora (suroeste de Tenerife).

Se detectaron en plantas aisladas en infecciones mixtas con PVY, pero no con los síntomas típicos de amarilleo sino con las hojas moradas en toda la planta, enrolladas hacia el envés, estos síntomas se podían confundir con fitoplasmas, deficiencia nutricional, problemas fisiológicos o incluso con senescencia.

Posteriormente, en 1999, se volvieron a detectar síntomas de amarilleo desde la base de la planta hasta su parte apical, en Tenerife y en Gran Canaria con una incidencia media y grave respectivamente.

Se confirmó mediante análisis moleculares RT-PCR, con primers específicos descritos por Louro, el Virus del amarilleo del tomate *Tomato chlorosis virus* (ToCV), perteneciente al género *Crinivirus* de la familia *Closteroviridae*.

En campañas sucesivas ha ido aumentando la incidencia de la enfermedad en la mayoría de las zonas productoras de tomate de exportación en Tenerife y en Gran Canaria hasta alcanzar una incidencia del 100%



Vista general de ToCV en Gran Canaria.



Vista detalle ToCV en Gran Canaria.

en la campaña 2005-2006.

Esta incidencia coincidía con una elevada población de mosca blanca de las especies *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*, siendo ambas transmisoras de la enfermedad. En este caso la *Bemisia tabaci* presentaba una mayor incidencia, éstas suelen convivir juntas en las islas.

En este trabajo se presenta el análisis mediante hibridación molecular y RT-PCR de diferentes muestras de pimiento con síntomas de clorosis y amarilleo desde la base hasta la parte apical de la planta, procedentes de diferentes parcelas de la isla de Tenerife. En todas las parcelas prospectadas había presencia de mosca blanca de las especies (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*). Los amplicones secuenciados confirman la primera detección en la isla de Tenerife del amarilleo del tomate, *Tomato chlorosis virus* (ToCV) en cultivos de pimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

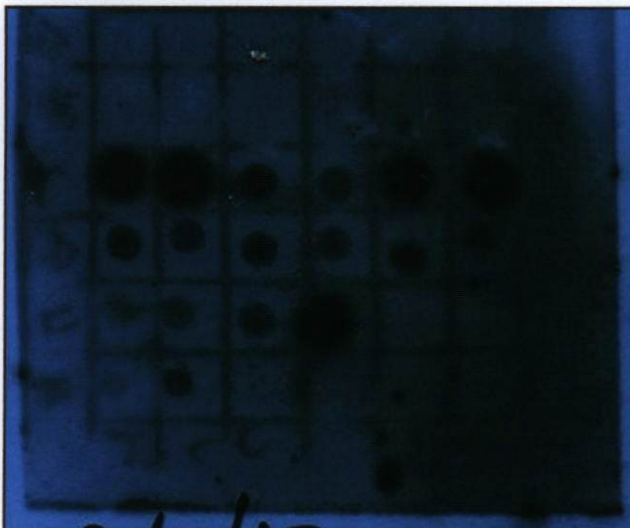
En el año 2012 se realiza una prospección para *Tomato chlorosis virus* (ToCV) en cultivos en seis explotaciones de pimiento bajo invernadero de malla en diferentes municipios del Sur y Norte de la isla de Tenerife (Guía de Isora, Arico y Buenavista).

En estas explotaciones se detectaron síntomas de amarilleo y acucharado en algunas ocasiones. Se analizaron 18 muestras (tres plantas con síntomas de cada explotación), mediante hibridación molecular por Dot-Blot con sonda de ADN (Servicio de Genómica ULL) y RT-PCR con primers específicos de ToCV diseñados por J.Navas-Castillo, IHSM-UMA-CSIC). Para la extracción del ARN y la reacción de amplificación se utilizaron los Kits Tri-reagent - Roche y el SuperScript One-Step RT-PCR With Platinum Taq-Invitrogen respectivamente, siguiendo las recomendaciones del fabricante en ambos casos.

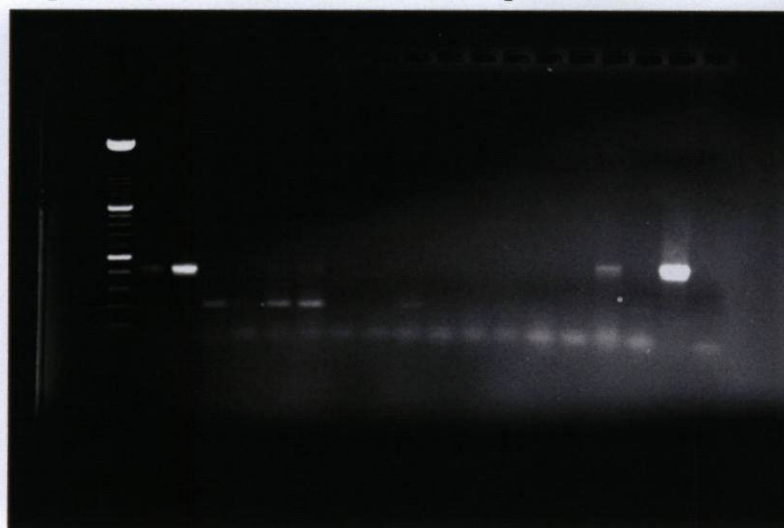


ToCV en Tenerife.

Las muestras amplificadas se cargaron en un gel de agarosa al 1.5% y la electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 120V durante 60 minutos. A continuación el gel se tiñó con REALSAFE nucleid Acid Staining Solution-REAL Durviz (alternativa al tradicional Bromuro de etidio pero presentando menos mutaciones genéticas con la misma sensibilidad) y se visualizaron con luz UV. Para confirmar que los amplificados obtenidos correspondían con la especie descrita, se tomaron varios amplicones, se clonaron en un vector plasmídico



Detección de ToCV mediante hibridación molecular por Dot Blot.



Productos de amplificación de ToCV de aproximadamente 400 pb.

(PGEMT-Easy, Promega) y se secuenciaron en un mega RACE 500. La secuencia de nucleótidos obtenida, se introdujo en la base de datos *Gen Bank* y se realizó una búsqueda con el programa *Blast* de secuencias homólogas ya descritas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 18 muestras analizadas mediante Hibridación molecular (un control positivo y un control negativo de planta sana) y RT-PCR (un control positivo, un control negativo y un marcador molecular de 100pb) resultaron positivas nueve por hibridación molecular y cuatro por RT-PCR.

Estos resultados demuestran que los síntomas de amarilleo en pimiento detectados en esta campaña en la isla de Tenerife, se trata del Virus del amarilleo de tomate, Tomato chlorosis virus (ToCV).

Para confirmar estos resultados se secuenciaron varios productos de amplificación. La secuencia de nucleótidos obtenida tiene un 99% de homología con el ToCV (Accession number JN867337), lo que confirma la primera detección de ToCV en cultivos de pimiento en Canarias.

BIBLIOGRAFÍA

- EPINO, A.I. y ESTEVEZ GIL, J.R. 1998: Detección ToCV en Canarias. Informes Reuniones Anuales de los Grupos de Trabajo Fitosanitarios. MAPA.
- FONT, M.I.; VAIRA, A. M.; ACOTTO, G.P.; LACASA, A.; SERRA, L.; GOMILA, J.; JUAREZ, M.; ESPINO, A. I. y JORDA, C. 2003: Amarillos en los cultivos de tomates asociados a Tomato chlorosis virus (ToCV) y Tomato infectious chlorosis virus en España. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas. 29:109-121.
- ESPINO, A. I. NAVAS-CASTILLO, J. y BOTELLA, M. 2006: Ficha Tomato chlorosis virus (ToCV) Virus del amarilleo del tomate. Fichas de Diagnóstico en Laboratorio de Organismos Nocivos de los Vegetales. Ministerio de Agricultura Medio Rural y Marino
- LOURO, D.; ACOTTO, G.P. AND VAIRA, A.M. 2000: Occurrence and diagnosis of Tomato chlorosis virus in Portugal. European Journal of Plant Pathology, 106:589-592.
- LOZANO, G.; MORIONES, E. AND NAVAS-CASTILLO, J., 2004: First report of sweet pepper (*Capsicum annuum*) as a natural host plant for Tomato chlorosis virus. Plant Disease 88:224.
- LOZANO, G.; FORTES, I.; GARCÍA-CANO, E.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES y E. AND NAVAS-CASTILLO, J., 2007: El virus del amarilleo del tomate (Tomato chlorosis virus, ToCV): una amenaza más para los cultivos protegidos del tomate y pimiento. Agrícola Vergel 293:263-268.
- VARIOS AUTORES: 1999, Whitefly-Transmitted Viruses TYLCV y ToCV in Canary Island. The European Whitefly Studies Network. Canary Island Workshop.



ToCV en pimiento.



ToCV en pimiento 2.