

# “Estudio de la gama de huéspedes del crinivirus *Lettuce Chlorosis Virus-SP*, y la susceptibilidad de distintos cultivares de judía”



Alumna: Aurora Tomás Rodríguez

Dirigido por: Leticia Ruiz, Fernando Yuste y Carmen Capel

Realizado en el I.F.A.P.A. “La Mojonera” (Almería)

Trabajo Fin de Máster en Biotecnología industrial y agroalimentaria. 2017/2018



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



JUNTA DE ANDALUCÍA

Centro de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  
INSTITUTO ANDALUZ DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, este trabajo se lo quiero dedicar a mi abuela Aurora, que aunque hace poco que ya no esta a mi lado, sigo sintiendo su apoyo incondicional en todo lo que hago.

Gracias a todas las maravillosas personas que han confiado en mí y me han brindado su ayuda incondicional. Con mucho cariño, quiero darles las gracias a mis compañeros, Antonia, Óscar y Carmen, por enseñarme a trabajar con tanta paciencia, amabilidad y generosidad. Mi más sincero agradecimiento a Dirk y Leticia, por darme esta gran oportunidad de aprender de gente tan solidaria y brillante. Pero, sobre todo, hacer mención especial a mi tutora, Leticia, por intentar transmitirme de la mejor manera todos sus conocimientos y por confiar en mi haciéndome sentir útil y segura. Junto con ella, quiero agradecerle a mi tutor Fernando el tiempo que me han dedicado, gracias. Os agradezco a todos y cada uno de los trabajadores del I.F.A.P.A. La Mojonera el haberme hecho sentir parte de la vida de este centro.

Queridos papá y mamá, gracias por ser la esencia de todo esto, estoy orgullosa de ser vuestra “niña”. Gracias tata, gracias por ser la mejor hermana mayor y una de mis personas favoritas. Y aunque pareciendo cómico, gracias a mi sobrina, Anabel, de tres años, y a mi perro, Gordi, de doce, que con sus ocurrencias han hecho más agradables mis malos ratos. Por último, a mis abuelos, que creyeron en mi como solo los abuelos saben hacer.

Pero estos agradecimientos no serían del todo justos, si no le diera las gracias a la buena persona que, mediante sus explicaciones en clase, me hizo maravillarme por el mundo de las plantas, D. José María Ramos Clavero, mi profesor de la Universidad de Granada.

## ABSTRACT

In 2014, the new *Lettuce chlorosis virus* (LCV) strain and denominated LCV-Spain (LCV-SP) was identified in bean crops in the southeast of Spain. This virus belonging to the genus *Crinivirus* (family Closteroviridae) is transmitted by *Bemisia tabaci* whitefly. Its symptoms are typical of diseases known as yellowing, they consist of internervial mottling and chlorosis of the basal and intermediate leaves, accompanied by brittleness and stiffness of the leaves. In the most susceptible specimens, malformations appear in the fruit and thickening of the seed. In addition to bean, LCV-SP can infect *Pisum sativum* L, *Lens culinaris* and *Vigna unguiculata*, crops for which LCV-SP infection had not been studied previously. However, the virus was detected neither in *Glycine max* nor in crop species belonging to the Solanaceae, Apiaceae and Cucurbitaceae families. Knowledge of the host range affected by LCV-SP can be a key element to help control the virus. The efficiency of transmission of the virus by *B. tabaci*, was 40 or 59.7% depending on whether the transmission was carried out with one or two adult individuals. These percentages are higher than the transmission efficiency percentages of the Lettuce chlorosis virus in California (LCV-CA). This is probably due to the fact that LCV-SP is a recombinant virus between the Californian strain LCV-CA and BnYDV. The transmission experiments showed that *Gomphrena globosa*, an ornamental species, is able to transmit the virus efficiently, and that it has been an efficient source of inoculum for LCV-SP transmission.

## RESUMEN

En el año 2014, una nueva cepa de *Lettuce chlorosis virus* (LCV) y denominada LCV-Spain (LCV-SP) fue identificada en el sureste español sobre cultivos de judía. Este virus perteneciente al género *Crinivirus* (familia Closteroviridae) es transmitido por la mosca blanca, *Bemisia tabaci*. Sus síntomas son los típicos de las enfermedades conocidas como amarilleos, ya que consisten en un moteado internervial y clorosis de las hojas basales e intermedias, acompañado de debilidad y acartonamiento de las hojas. En los ejemplares más susceptibles, aparecen malformaciones en el fruto y engrosamiento de la semilla. Además de la judía, LCV-SP puede infectar a *Pisum sativum* L, *Lens culinaris* y *Vigna unguiculata*, cultivos cuya infección por LCV-SP no se había estudiado con anterioridad. Sin embargo, no se detectó el virus ni en *Glycine max*, ni en especies de cultivo pertenecientes a las familias Solanaceae, Apiaceae y Cucurbitaceae. El conocimiento del rango de huéspedes al que afecta LCV-SP puede ser un elemento clave que ayude en el control de este virus. La eficacia de transmisión del virus por *B. tabaci*, fue del 40 o 59,7% dependiendo si la transmisión se realizó con uno o dos individuos adultos. Estos porcentajes son superiores a los que están descritos para la cepa americana de LCV (LCV-CA). Probablemente esto se deba a que LCV-SP es un virus recombinante entre la cepa californiana LCV-CA y BnYDV. Los experimentos que se llevaron a cabo revelaron además que *Gomprhena globosa*, una especie ornamental, es capaz de transmitir el virus de forma eficaz, y por tanto es una fuente de inóculo eficiente para la transmisión de LCV-SP.

# ÍNDICE

1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Importancia del cultivo de la judía en el sureste español.....	1
1.2. Etiología de los amarillos transmitidos por mosca blanca .....	2
1.3. Familia Closteroviridae, Género <i>Crinivirus</i> .....	5
1.4. <i>Lettuce chlorosis virus</i> , un patógeno emergente.....	6
1.5. Transmisión: <i>Bemisia tabaci</i> , origen distribución geográfica e importancia .....	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
3.1. Análisis de <i>G. globosa</i> como fuente de inóculo.....	10
3.2. Estudio de la gama de huéspedes y la susceptibilidad de los distintos cultivares de judía .....	10
3.2.1. Siembra y posterior trasplante de la gama de distintas especies .....	10
3.2.2. Inoculación de LCV-SP .....	11
3.2.3. Recogida de muestras .....	12
3.2.4. Detección de LCV-SP mediante RT-PCR .....	12
3.3. Ensayo de eficiencia de transmisión del virus.....	13
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Análisis de <i>G. globosa</i> .....	15
4.2. Rango de huéspedes .....	16
4.3. Susceptibilidad de distintos cultivares de judías.....	17
4.4. Ensayo de la eficacia de transmisión del virus.....	19
5. DISCUSIÓN.....	21
6. CONCLUSIONES.....	25
7. BIBLIOGRAFÍA.....	26
8. ANEXOS.....	30
ANEXO 1 .....	30
ANEXO 2 .....	31
ANEXO 3 .....	32

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Importancia del cultivo de la judía en el sureste español

La judía (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano más importante en España. En cuanto a rendimiento, Andalucía es la comunidad que lidera la producción de judía fresca, produciendo el 42% de lo que se cultiva en todo el territorio español. Dentro de este porcentaje, sólo el 34% de la producción nacional se desarrolla en cultivos protegidos, de los que el 90% se encuentran en la comunidad andaluza. Dentro de esta región, la producción se concentra en la zona oriental (Figura 1) liderada por Almería, seguida de Granada y Málaga, y de ella el 97, 49 y 96% respectivamente, se realiza bajo invernadero



Figura 1: Provincias de Andalucía con cultivos de judía bajo plástico. (Fuente: Servifapa).

(MAPAMA, 2017). Este hecho puede deberse a las adecuadas condiciones climáticas del sureste español, con suaves temperaturas en invierno, y, además, el uso del modelo de invernadero que ha favorecido, durante años, a una alta productividad. Todo esto hace de la provincia de Almería una zona apta para una agricultura intensiva y de primor, pero al mismo tiempo, estos factores favorecen la propagación de diversas enfermedades,

entre las cuales hay que destacar las producidas por virus. Las hectáreas dedicadas a producir esta hortaliza comenzaron a disminuir en el año 2004, siendo la virosis uno de los principales motivos de esta disminución. Los virus en los cultivos hortícolas intensivos constituyen una importante preocupación para los agricultores del sureste español, y más, los transmitidos por aleuródidos, ya que están teniendo un resurgimiento significativo, a pesar de que el control integrado de estos es bastante exitoso (Elorrieta et al., 2015; Velasco, 2015; Ayllón et al., 2016).

## **1.2. Etiología de los amarillos transmitidos por mosca blanca**

Como mosca blanca se conoce comúnmente a un conjunto de insectos que pertenecen al orden Homóptera, de la familia *Aleyrodidae*. En España, se han descrito dos especies de mosca blanca como plagas de cultivos hortícolas en invernaderos: *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (mosca de los invernaderos), la primera es originaria de Oriente y la segunda de Europa. Aunque las moscas blancas, desde siempre, han causado daños en la agricultura mediterránea, su importancia principalmente radicaba, hasta hace unos 30 años, en ser insectos succionadores de savia, provocando lo que se ha denominado "daño directo" a la planta. Además de este último, y más importante, *B. tabaci* es responsable de la transmisión de más de 120 virus de plantas (Janssen et al., 2017).

Los Amarillos, o sea, cuando las hojas de la planta se vuelven amarillas, puede ser debido a una situación anormal tipificada como *clorosis* y que ocurre cuando las hojas pierden el pigmento verde clorofila (Figura 2). Las causas de la clorosis pueden ser múltiples y de origen abiótico: la falta de luz solar o estrés por altas temperaturas, salinidad o encharcamiento de raíces. La falta de macro- y micronutrientes como el hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, nitrógeno, potasio y zinc, provocan generalmente amarillos internerviales. La clorosis también puede ser consecuencia de ataques de fitopatógenos como arañas rojas, bacterias, fitoplasmas u hongos (Ayllón et al., 2016).



Figura 2. A: síntomas típicos de amarillos en judía. B: síntomas de amarilleo en tomate.

A principios de los 90, aparecieron en España síntomas de amarilleo asociados a desórdenes nutricionales o fisiológicos en cultivos de cucurbitáceas. Investigaciones posteriores demostraron que la causa de estos síntomas era la infección inducida por un miembro del género *Crinivirus* denominado "virus del falso amarilleo de la remolacha" (*Beet pseudoyellows virus*, BPYV) y transmitido por la mosca blanca *T. vaporariorum*. Relacionado con la presencia de una nueva plaga de mosca blanca, *B. tabaci*, BPYV fue desplazado por otro crinivirus que inducía los mismos síntomas que el anterior, el virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*, CYSDV), transmitido por *B. tabaci* y que a día de hoy sigue causando grandes pérdidas. Los síntomas que caracterizan a esta enfermedad son clorosis internervial en hojas medias e intermedias de la planta. Las plantas infectadas tanto por BPYV como por CYSDV presentan una producción significativamente menor que las plantas sanas sin que la calidad del fruto se vea afectada (Ayllón et al., 2016). Otro crinivirus, transmitido por *B. tabaci* y *T. vaporariorum* e introducido en el sureste español a finales de la década de los 90 es *Tomato chlorosis virus* (ToCV), causante de amarilleamientos en las hojas de tomate, por lo que se reduce la capacidad fotosintética de la planta y por tanto el rendimiento, aunque no afecta a la calidad del fruto (Velasco, 2015). Los síntomas que induce ToCV son muy similares a los causados por los crinivirus que afectan a cucurbitáceas. Inicialmente, aparecen manchas cloróticas generalmente poligonales en las hojas inferiores y se extienden hacia la parte superior de la planta.



Estas manchas dan lugar a clorosis internervial y en ocasiones se vuelven de color rojizo o se necrosan. Las hojas viejas suelen enrollarse longitudinalmente y adquieren una textura quebradiza. En ocasiones se conserva una reducción del número y tamaño de los frutos y retraso en la maduración (Ayllón et al., 2016).

Otros cultivos minoritarios, como es el caso de la judía, también son diana de virosis transmitidas por mosca blanca. Hay 34 virus en el mundo que infectan a las judías en las principales regiones productoras de este cultivo. En 2003, se detectó y describió el primer crinivirus que infecta a la familia Leguminosae, *Bean yellow disorder virus* (BnYDV), transmitido por *B.tabaci*. Su presencia afectó enormemente a los cultivos de judía fresca. El virus presenta un rango de huéspedes bastante reducido, restringido a la familia de las leguminosas (Velasco, 2015). Los síntomas de amarilleo que induce en la planta comienzan por un moteado y amarilleo internervial de las hojas situadas en la zona media y baja de la planta, y malformaciones en hojas y fruto. Como consecuencia de estos síntomas, la producción disminuye drásticamente. La calidad de los frutos también se ve afectada ya que se deforman, adquiriendo formas de ganchillo o espiral, lo que despreja su valor comercial (Elorrieta et al., 2015).

En la actualidad, la presencia de BnYDV se ha visto desplazada por otro crinivirus que produce síntomas similares, *Lettuce chlorosis virus-Spain* (LCV-SP), descrito en 2014 sobre cultivos de judía (Ruiz et al., 2014). Hasta 2014, LCV se consideraba restringido al suroeste de Estados Unidos, concretamente a la zona de California y afectando a cultivos de lechuga y remolacha. En España, sin embargo, se ha descrito afectando a cultivos de judía y no de lechuga. Los síntomas que induce LCV-SP en la planta también son amarillos en las hojas, malformaciones en el fruto y engrosamiento de la semilla, siendo indistinguible a simple vista de BnYDV (Martín et al., 2010; Ruiz et al., 2014). LCV-SP, ha sido recientemente descrito como el primer virus ARN recombinante transmitido por mosca blanca (Ruiz et al., 2018). Los síntomas inducidos por LCV-SP van a depender también de la diversidad genética de los cultivares de judía, de la cepa del virus y del estado fenológico de la planta. AL ser LCV-SP un virus recombinante, no existe un conocimiento previo de cómo puede afectar a su rango de huéspedes. El estudio de la susceptibilidad de los cultivares a esta virosis es de vital importancia para realizar un adecuado manejo del cultivo (Ruiz et al., 2014). Mientras tanto las medidas de control

de LCV-SP han de dirigirse al control del vector, ya que ninguno de ellos se transmite ni al embrión, ni mecánicamente entre plantas, ya sea de modo natural o experimental (Elorrieta et al., 2015).

### 1.3. Familia Closteroviridae, Género *Crinivirus*

LCV pertenece al género *Crinivirus*, familia Closteroviridae, que representa a un grupo grande, diverso y emergente de patógenos que afectan a cultivos de gran importancia económica, como la remolacha azucarera, los cítricos, el tomate y la lechuga, entre otros (King et al., 2011). Esta familia comprende virus filamentosos con genomas mono o bipartitos de ARN de cadena sencilla con dos módulos de genes conservados. Uno de ellos codifica proteínas asociadas con la replicación, y el otro bloque contiene genes de gran importancia que codifican para proteínas que forman parte de los componentes de las partículas virales. Estas partículas virales están compuestas por al menos cinco proteínas, que se ensamblan en una estructura denominada “serpiente de cascabel” (“rattlesnake”). Estas cinco proteínas, son: CP (proteína de la cápsida), CPd (duplicado de la proteína de la cápsida que comprende solo la región terminal del ARN), HSP70h y P59, que son componentes estructurales del virión, y la CPM que es un determinante de la transmisibilidad de la mosca blanca (Kiss et al., 2013; Ayllón et al., 2016).

En base al vector de transmisión (orden Hemiptera) y a la filogenia, la familia Closteroviridae se clasifica en tres géneros: *Closterovirus* (transmitidos por pulgones, Aphididae), *Crinivirus* (transmitidos por moscas blancas, Aleyrodidae) y *Ampelovirus* (transmitidos por pseudocóccidos, Pseudococcidae) (King et al., 2011; Kiss et al., 2013; Ayllón et al., 2016). Recientemente ha sido propuesto un nuevo género llamado *Velarivirus*. Todos los miembros del género *Crinivirus* (Figura 3) presentan genomas bipartitos, son transmitidos por la mosca blanca y están limitados al floema (Al Rawahin et al., 2012). El tamaño de los genomas está comprendido entre 15.3 y 19 kb, y está constituido por dos moléculas de ARN de cadena sencilla, denominadas ARN 1 y ARN 2, de polaridad positiva y lineal, excepto en el caso del virus de *Las venas amarilla de la patata* (*Potato yellow virus*, PYVV), cuyo genoma se encuentra dividido en tres moléculas. Los dos ARN se encapsidan por separado en partículas virales filamentosas,

cuyos tamaños oscilan entre 650-850 nm y 700-900 nm de longitud, respectivamente. Los genes localizados en el ARN1 codifican proteínas relacionadas con la replicación, mientras que en el ARN2 se encuentran genes que codifican proteínas implicadas en la protección del genoma, el movimiento del virus y la interacción con el vector (Ayllón et al., 2016).

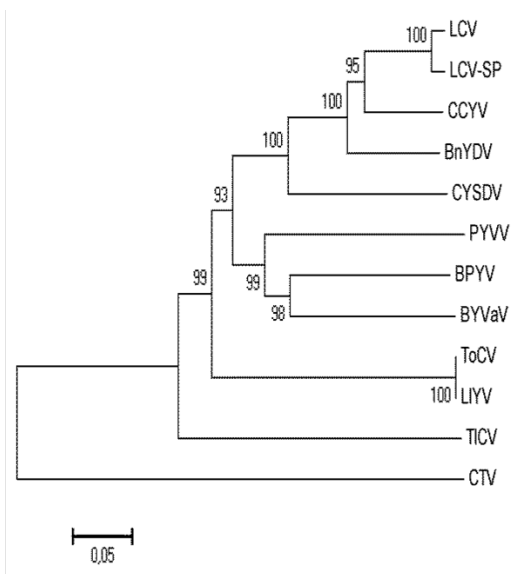


Figura 3: Análisis filogenético de la HSP70 de LCV-SP y otros miembros del género Crinivirus: *Citrus tristeza virus* (CTV), *Lettuce chlorosis virus* (LCV), *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), *Cucurbit yellow disorder virus* (CYSVDV), *Cucurbit chlorotic yellow virus* (CCYV), *Bean yellow disorder virus* (BnYDV), *Beet pseudo yellows virus* (BPYV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Potato yellow vein virus* (PYVV). Fuente: Ruiz et al., 2014.

#### 1.4. *Lettuce chlorosis virus*, un patógeno emergente

##### 1.4.1. Distribución, huéspedes y razas de LCV descritas

LCV, fue descrito por primera vez en California (EEUU) en los años 90, afectando a cultivos de lechuga y remolacha. Es capaz de inducir clorosis internervial en las hojas basales y medias, además de debilidad y engrosamiento de estas (Duffus et al., 1996). En septiembre del 2011, se observaron en invernaderos de judía en las provincias de Granada y Almería, síntomas de amarilleos, fácilmente atribuibles a BnYDV (Ruiz et al., 2014) pero que correspondían a la presencia del recombinante LCV-SP. Aunque todos los miembros del género *Crinivirus* comparten un paquete de genes conservados, presentan una alta variabilidad en el extremo 3' del ARN 1. LCV-SP, presenta alta homología con LCV-CA, de modo que las secuencias de las proteínas situadas en el extremo 5' del ARN 1 del genoma de LCV-SP comparten alta identidad nucleotídica con la del LCV-CA mientras que el extremo 3' terminal codifica proteínas que son únicas en

BnYDV (P26 y P6) y que presentan un 99.5% y 100% de homología con BnYDV (Figura 4). Es la primera vez que se demuestra la existencia de un closterovirus recombinante entre dos especies distintas (Ruiz et al., 2018).

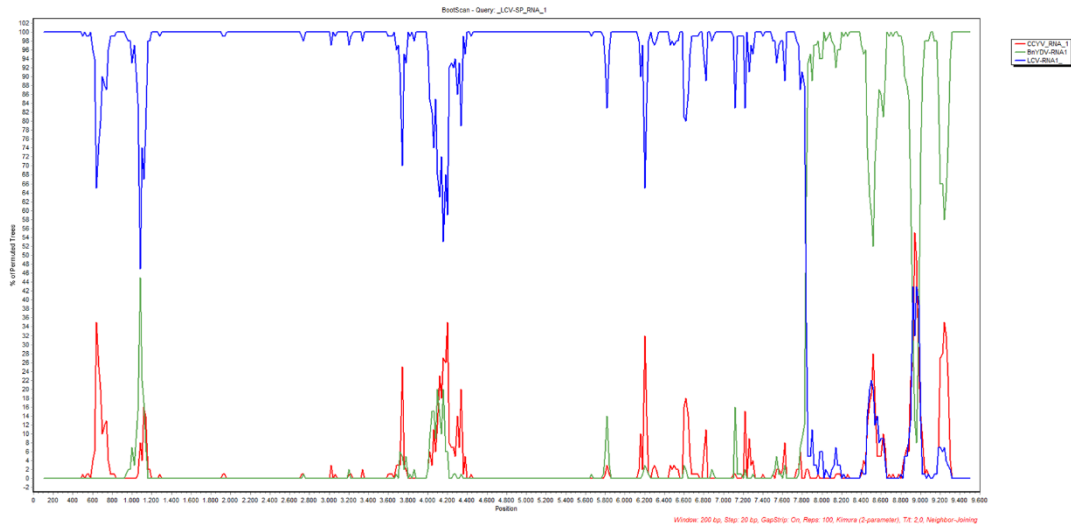


Figura 4: Recombinación de LCV-SP. Azul parte superior: LCV-SP; verde: BnYDV; azul parte inferior: LCV-CA; rojo: CCYV.

Recientemente en China se han descrito dos nuevas cepas de LCV, que afectan a tomate y *Nicotiana* (var. Samsun), pero no se tiene conocimiento de que estas puedan o no afectar a su huésped original, la lechuga (Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2017).

### 1.5. Transmisión: *Bemisia tabaci*, origen distribución geográfica e importancia

*B. tabaci* es un insecto que se alimenta, generalmente, en el envés de las hojas de las plantas (Figura 5). Son de pequeño tamaño, alados y con el cuerpo cubierto de una fina capa de polvo blanco de aspecto harinoso (Simón, 2017). A día de hoy, está presente en la mayoría de las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo, donde es una de las amenazas más graves para los cultivos importantes a nivel económico (EFSA Panel on plant health, 2013).



Figura 5. A: *Bemisia tabaci* sobre una hoja de judía (var. Emerite). B: *B. tabaci* rodeada de puestas de huevos (Fuente: Koppert).

Durante su ciclo biológico, presenta cuatro estados: huevo, larva, pupa y adulto que duran aproximadamente un mes. La longevidad de los adultos es muy variable, dependiendo de la planta y la temperatura, esta última puede ser determinante. Sin embargo, existe una gran variabilidad para las mismas temperaturas y plantas hospedantes, lo que podría indicar que influyen otras variables no tenidas en cuenta. Los machos tienen una longevidad que puede situarse entre 15-16 días a 28°C y, en el caso de las hembras, entre 30-31 días a 16°C, con la existencia de un período de preoviposición corto, de 2 a casi 4 días. Temperaturas por debajo de los 9°C y por encima de los 40°C, son letales. La fecundidad de las hembras depende de diversos factores como: la temperatura, especie y estado fisiológico de la planta, y puede estar comprendida entre 2,5 y 7,1 huevos/hembra y día, ésta se reduce de manera notable al hacerle la temperatura. El rango de temperatura para su desarrollo está entre 16°C y 34°C, estableciéndose un óptimo en 29°C aproximadamente (Simón, 2017).

La presencia de *B. tabaci* en España se conoce desde 1943 pero no ha tenido tanta importancia como plaga hasta la década de los 90 donde desplazó a *T. vaporariorum* en los cultivos hortícolas de Almería (Janssen et al., 2017).

El término biotipo alude a diferentes poblaciones indistinguibles morfológicamente, especies morfo crípticas, que exhiben diferentes características biológicas, incluyendo el rango de huésped, la fecundidad, el comportamiento de dispersión, la eficiencia de transmisión de los virus y la resistencia a los insecticidas

(Brown, 2005; Brown et al., 2010). En estas diferencias biológicas pueden ser identificadas mediante secuenciación de ADN (Janssen et al., 2017). En la zona del Mediterráneo el biotipo mayoritario es el conocido como biotipo Q, actualmente denominado especie MED, que se atribuye también a África (De Barro et al., 2000). Este biotipo tiene una mayor capacidad de supervivencia que biotipos descritos anteriormente en la zona bajo condiciones de bajas y altas temperaturas, y, además, ha presentado mayor resistencia a insecticidas, contribuyendo, quizá, al desplazamiento de otros biotipos en algunas zonas (Teng et al., 2010). Este biotipo está más asociado que otros a la distribución de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) o ToCV, BnYDV, CYSDV, *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) y *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) (Janssen et al., 2017).

## 2. OBJETIVOS

Para conocer la gama de huéspedes de LCV-SP y su susceptibilidad a distintos cultivos de judía, hemos abordado los siguientes objetivos:

1. Estudiar la existencia de *Gomphrena globosa* como fuente de inóculo de LCV-SP.
2. Conocer la gama de huéspedes capaces de ser infectados por LCV-SP y su sintomatología.
3. Analizar la susceptibilidad de LCV-SP a diferentes variedades de judía.
4. Evaluar la eficacia de transmisión de *B. tabaci* a plantas de judía.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología para desarrollar los objetivos propuestos fue la siguiente:

#### 3.1. Análisis de *G. globosa* como fuente de inóculo

Para estudiar la capacidad de *G. globosa* (Figura 6) como fuente de inóculo, se pusieron en contacto plantas sanas de *G. globosa* sanas con moscas blancas infectadas



Figura 6: Plantas de *G. globosa* sana.

Fuente: Starr F. & Starr K. 2008.

con LCV-SP y se dejaron alimentar durante 48h. Pasado ese tiempo, se eliminaron las moscas blancas virulíferas y se dejaron alimentar moscas blancas sanas, para que adquieran el virus desde *G. globosa*. Posteriormente se analizaron muestras de tejido vegetal para comprobar si *G. globosa* puede verse afectada por LCV-SP.

Seguidamente, las moscas blancas, se pusieron en contacto con judías (var. Emerite) libres del virus.

Pasadas dos semanas se analizaron muestras provenientes de las judías, para conocer si *G. globosa* es capaz de transmitir LCV-SP.

#### 3.2. Estudio de la gama de huéspedes y la susceptibilidad de los distintos cultivos de judía

##### 3.2.1. Siembra y posterior trasplante de la gama de distintas especies

Se sembraron en semillero la gama de distintas especies que iban a ser estudiadas: *Pisum sativum* (cv. Jumbo), *Phaseolus vulgaris* L. (cv. Buenos aires), *P. vulgaris* L. (cv. Amethyst), *P. vulgaris* L. (cv. Maravilla), *P. vulgaris* L. (cv. Vitalis), *P. vulgaris* L. (cv. Rocquencourt), *P. vulgaris* L. (cv. Dwarf Bean), *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *Lens culinaris*, *Cucumis melo*, *C. pepo*, *C. sativus*, *Citrullus lanatus*, *Nicotiana xanthi*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana tabacum* (var. Samsun), *Daucus carota*, *Solanum lycopersicum* y *Gomprhena globosa*. Para facilitar la germinación de las plantas, se colocaron en una cámara con un ciclo 16:8 con una temperatura de 25°C de día y 18°C



de noche y un 70% de humedad. Una vez tuvieron el tamaño adecuado, se trasladaron las plántulas a maceta y se estableció el ensayo en un invernadero de ambiente controlado (Figuras 7 y 8).

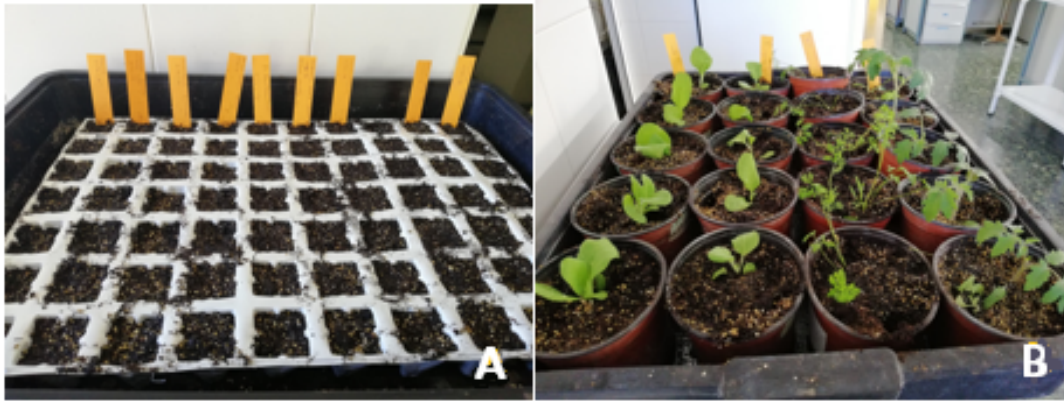


Figura 7. A: siembra de las especies a estudiar. B: trasplante a maceteros para llevar al invernadero de ambiente controlado.

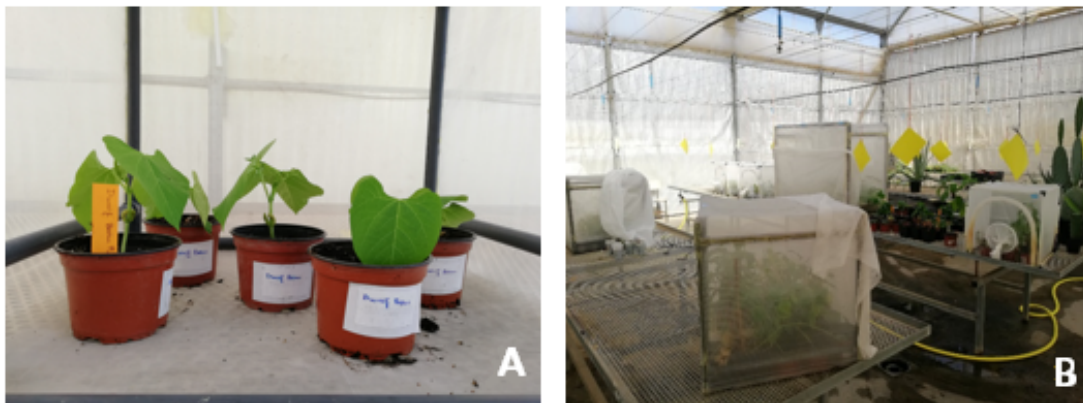


Figura 8. A: Macetas en las jaulas antes de la suelta de moscas blancas virulíferas. B: jaulas con las plantas y las moscas virulíferas en el invernadero de ambiente controlado.

### 3.2.2. Inoculación de LCV-SP

Adultos de *B. tabaci* procedentes de poblaciones controladas del vector y transmisoras de LCV-SP, se pusieron en contacto con una batería de distintos cultivares de *P. vulgaris* y otras especies de plantas hortícolas. Los adultos se dejaron alimentar durante tres semanas y se analizaron mediante cebadores específicos por RT-PCR. Se



dejaron crecer las plantas para así estudiar también los posibles síntomas que induce el virus en las distintas especies estudiadas.

### 3.2.3. Recogida de muestras

La toma de muestras se lleva a cabo en el invernadero de ambiente controlado, donde se encontraban las plantas inoculadas con LCV-SP. Se recogían muestras entre los días 18-20 desde el primer contacto con la mosca blanca virulífera. Las hojas que presentaban síntomas se guardaban en bolsas de plástico etiquetadas, y se conservaban en el frigorífico a 4°C hasta el momento de su análisis (Figura 9).



Figura 9. A: recogida de muestras de bolsas rotuladas de *Gomphrena globosa* inoculadas con LCV-SP. B: recogida de muestras de judía inoculadas con LCV-SP con síntomas en bolsas rotuladas.

### 3.2.4. Detección de LCV-SP mediante RT-PCR

A las muestras recogidas con anterioridad se les practicó:

- Extracción de ácidos nucleicos (Anexo 1).
- Las amplificaciones de secuencias genómicas de LCV-SP, se realizaron usando los cebadores específicos para amplificar una zona del genoma perteneciente al ARN 2 de LCV-SP. Esta región comprende el gen que codifica para la proteína de choque térmico HSP-70, que fue amplificada por la pareja de primers (LCVSP 1- Up 5'-TGTTGGAAGGTGGTGAGGTC-3') (LCVSP 2- Low 5'-CAGAGACGAGTCATACGTACC-3'), dando lugar a una banda de 463 pb. La

reacción consta de dos fases: síntesis de ADNc mediante retrotranscripción y amplificación por PCR (Anexo 2).

- RT-PCR: El ADN complementario (ADNc) se sintetizó, en el termociclador Eppendorf Mastercycler, en dos pasos:
  - 1- Desnaturalización a 85°C durante 2 minutos.
  - 2- Transcripción inversa a 42°C durante 60 minutos.
- PCR - Perfil de amplificación (Tabla 1):

Tabla 1: Pasos de la PCR con sus respectivas temperaturas, duración y repeticiones.

PASOS	Nº CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial	1	94°C	2'
Desnaturalización		55°C	35''
Anillamiento	35	55-57°C	50''
Polimerización		72°C	50''
Extensión final	1	72°C	5'

Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador Eppendorf Mastercycler y los productos fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE (Trisacetato EDTA), utilizando procedimientos estándar (Green & Sambrook, 2012). Las muestras fueron consideradas como positivas, si estaba presente una banda de ADN, claramente visible, de 463 pb.

### 3.3. Ensayo de eficiencia de transmisión del virus

Se sembraron 200 semillas de judía (var. Emerite). Estas plantas se dividieron en dos grupos de individuos cada uno, que se trasplantaron en vasos de plástico, un ejemplar por recipiente. El primer grupo se puso en contacto con 1 sola mosca virulífera, rodeada por una bolsa de plástico con ventilación, el segundo grupo con 2 moscas

(Figura 10). Se dejó que se alimentaran durante 48 horas, después se retiraron las bolsas y con ellas las moscas. Para asegurar la eliminación de estos insectos, se trató con Imidaclopid 20 mg/l, y se dejaron crecer en jaulas, en ausencia de insectos vectores. A las 3 semanas se analizaron en grupos de 4 mediante RT-PCR.



Figura 10: Ensayo de eficacia de transmisión.

Para corroborar los resultados positivos obtenidos mediante RT-PCR, se puso a punto la técnica de hibridación molecular (Figura 11). Esta técnica permite procesar mayor número de muestras, se elimina el riesgo de contaminación y permite detectar bajas cantidades de carga vírica (Anexo 3).

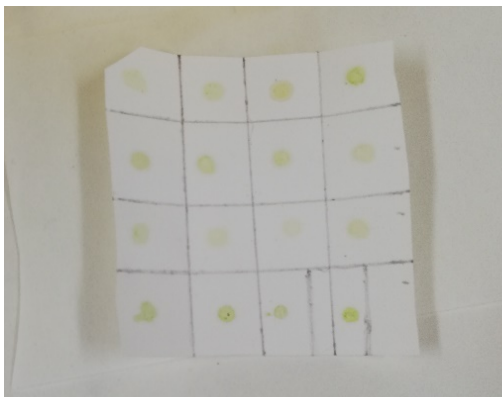


Figura 11: Membrana de nylon preparada con las muestras.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análisis de *G. globosa*

*G. globosa* es capaz de transmitir el virus de forma eficaz, y ha sido una fuente de inóculo eficiente para la transmisión de LCV-SP. En cuanto a la sintomatología, presentaba los típicos síntomas de LCV-SP (Figuras 12), y, como se podía esperar, resultó positiva en la RT-PCR (Figura 13).

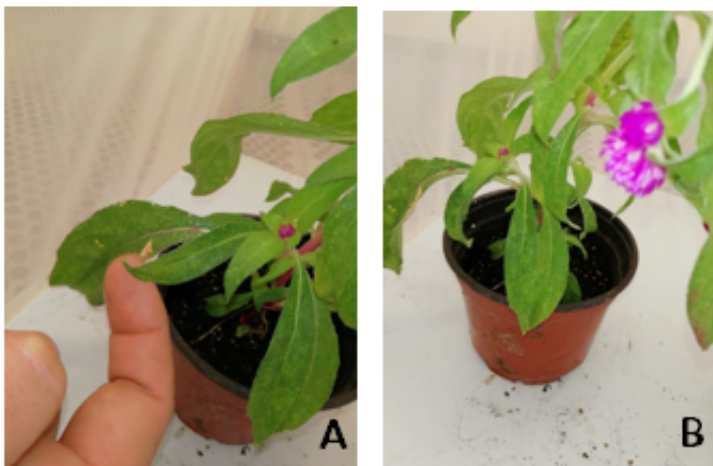


Figura 12. A: moteado en hojas, típico de LCV-SP. B: sintomatología típica de LCV-SP.

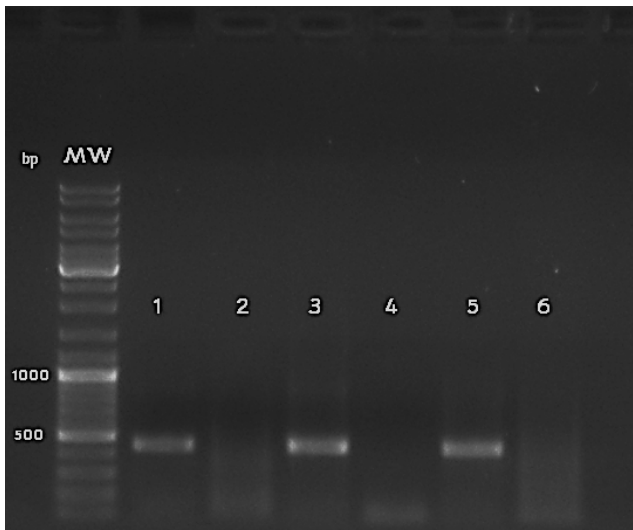


Figura 13: Resultados de la RT-PCR: carril 1: *P.vulgaris* (var. Emerite) de la caja nº 1 inoculada con LCV-SP; carril 2: *P. vulgaris* (var. Emerite) de la caja nº2 inoculada con LCV-SP; carril 3: *G.globosa*; carril 4: control negativo de la reacción; carriles 5 y 6 controles positivos.

## 4.2. Rango de huéspedes

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la RT-PCR y la sintomatología de las 14 especies hortícolas inoculadas con LCV-SP usando *B. tabaci* virulífera. Se obtuvieron tres resultados positivos no descritos con anterioridad, *P. sativum*, *V. unguiculata* y *L. culinaris* (Figuras 14 y 15). En guisante, no se apreciaron síntomas de ninguna clase, aunque su analítica para LCV-SP era positiva.

Tabla 2: Resultados de la RT-PCR y sintomatología observada de las especies estudiadas

Huéspedes	Familia	Nombre común	Número de plantas inoculadas	RT-PCR	Síntomas
<i>Gombphrena globosa</i>	Amarantaceae	Amaranto globoso	2	+	Cl
<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	Frijol de carita, chicharito	5	+	Cl, D
<i>Lens culinaris</i>	Fabaceae	Lenteja	5	+	Cl
<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	Guisante	10	+	AS
<i>Daucus carota</i>	Apiaceae	Zanahoria	5	-	AS
<i>Nicotiana tabacum</i> (var. <i>Samsun</i> )	Solanaceae	Tabaco	5	-	AS
<i>Nicotiana tabacum</i> (var. <i>Xanthi</i> )	Solanaceae	Tabaco	5	-	AS
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Solanaceae	Nicotiana glutinosa	5	-	AS
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae	Tomate	5	-	AS
<i>Cucumis melo</i>	Cucurbitaceae	Melón	5	-	CS
<i>Cucumis pepo</i>	Cucurbitaceae	Calabacín	5	-	CS
<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitaceae	Pepino	5	-	Cl
<i>Citrullus lanatus</i>	Cucurbitaceae	Sandía	5	-	CS
<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Soja	5	-	Cl, D

Cl: clorosis, D: deformación de fruto, CS: clorosis suave; AS: asintomático.

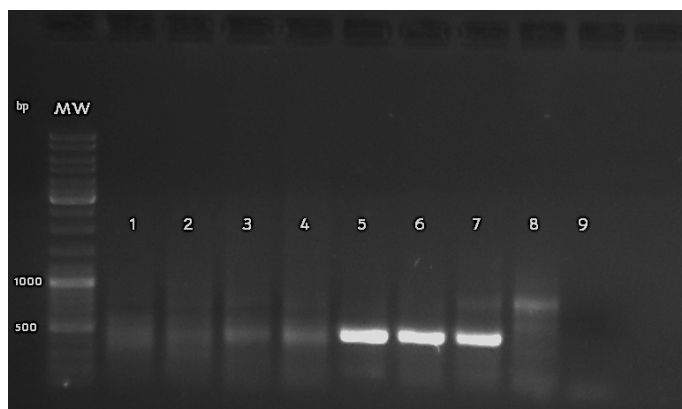


Figura 14: Resultado de RT-PCR: carriles 1, 2: *G. max*; carriles 3 y 4: *P. vulgaris* (var. *Vitalis*); carriles 5 y 6: muestra 1 y 2 de *V. unguiculata*; carril 7: control positivo; carril 8: control negativo de planta sana; carril 9: control negativo de la reacción.

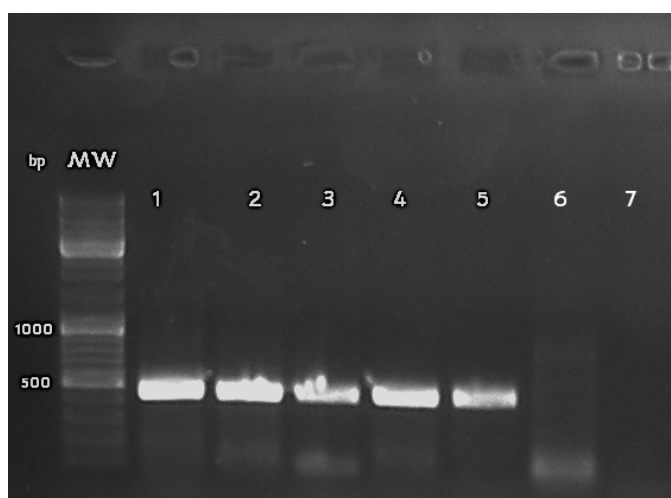


Figura 15: Resultados de RT-PCR: carril 1: *P. vulgaris* (var. *Emerite*); el carril 2: *P. vulgaris* (var. *Vitalis*); carril 3: *P. sativum*; carriles 4 y 5 controles positivos; carril 6: control negativo de planta sana; carril 7: control negativo de la reacción.

### 4.3. Susceptibilidad de distintos cultivares de judías

En la Tabla 3 se hace referencia a la sintomatología que ha inducido LCV-SP en una batería de distintas variedades de *P. vulgaris*, y por ende, las distintas susceptibilidades.

Los síntomas típicos incluían clorosis internervial en las hojas medias y bajas de la planta, hojas débiles y acartonadas, pero, además, algunas especies mostraban frutos deformados y semillas engrosadas. Estos últimos síntomas son los más severos, y los observamos en 4 variedades distintas de judías (Maravilla de Venecia, Emerite, Buenos aires y Amethyst) (Figuras 16, 17 y 18).

Tabla 3: batería de distintos cultivares de judía y sus síntomas.

Huéspedes	Familia	Nombre común	Número de plantas inoculadas	RT-PCR	Síntomas
<i>Phaseolus vulgaris</i> (var. <i>Emerite</i> )	Fabaceae	Judía Emerite	5	+	Cl, D
<i>Phaseolus vulgaris</i> (var. <i>Buenos aires</i> )	Fabaceae	Judía Buenos aires	10	+	Cl, D
<i>Phaseolus vulgaris</i> (var. <i>Amethyst</i> )	Fabaceae	Judía Amethyst	10	+	Cl, D
<i>Phaseolus vulgaris</i> (var. <i>Darwf</i> )	Fabaceae	Judía enana	5	+	Cl
<i>Phaseolus vulgaris</i> (var. <i>Maravilla de Venecia</i> )	Fabaceae	Judía Maravilla de Venecia	5	+	Cl
<i>Phaseolus vulgaris</i> (var. <i>Rocquencourt</i> )	Fabaceae	Judía Rocquencourt	5	+	Cl
<i>Phaseolus vulgaris</i> (var. <i>Vitalis</i> )	Fabaceae	Judía Vitalis	5	+	Cl

Cl: clorosis, D: deformación de fruto, CS: clorosis suave; AS: asintomático.



Figura 16. A: engrosamiento de las semillas en judía var. Buenos aires. B: deformación de la vaina en judía var. Buenos aires.





Figura 17. A: Engrosamiento de la semilla y deformación de la vaina en judía var. Emerite. B: engrosamiento de la semilla y deformación de la vaina en forma de gancho en judía var. Maravilla de Venecia.



Figura 18. A: Engrosamiento de la semilla en judía var. Amethyst. B: deformación de la vaina en forma de gancho en judía var. Amethyst.

#### 4.4. Ensayo de la eficacia de transmisión del virus

El uso de un solo ejemplar de *B. tabaci* para determinar la eficacia de transmisión (Tablas 4 y 5) ha sido considerado lo más apropiado para comparar los resultados de transmisión, en lugar de usar grupos de moscas (Valverde et al., 2004). Suponiendo que todas las plantas que componían los grupos de cuatro, estuvieran infectadas con el virus, el porcentaje de eficacia de transmisión sería del 40% en el caso de una mosca, y del 59,7% en el caso de dos. Por el contrario, si en los grupos de cuatro solo una de las plantas que los componen resultara infectada, el porcentaje sería del 10% para una mosca, y del 14,92% para dos.



Tabla 4: Porcentajes de la eficacia de transmisión de *B. tabaci* para LCV-SP

N <sup>o</sup> de adultos de <i>B. tabaci</i>	% Máximo de plantas de judía var. Emerite infectadas	% Mínimo de plantas de judía var. Emerite infectadas
1	40	10
2	59,7	14,92

En la siguiente tabla (Tabla 5) se pueden observar los distintos porcentajes de eficacia de transmisión de distintos crinivirus, y como lidera LCV-SP esta lista. Un ejemplo es BnYDV que evolutivamente es muy cercano a LCV-SP, y que como se puede comprobar tiene un porcentaje de eficacia mayor al de LCV original de Estados Unidos, 35% frente a 0 y 2.9%, pero menor al de esta nueva cepa de LCV, por lo que la nueva cepa de LCV ha ganado en eficacia.

Tabla 5: Eficacia de transmisión en distintos crinivirus.

Virus	Vector	Hospedador	Eficacia de transmisión de una sola mosca (%)	Referencias
LCV-SP	<i>B. tabaci Q</i>	<i>P. vulgaris</i>	40	Este estudio
BnYDV	<i>B. tabaci Q</i>	<i>P. vulgaris</i>	35	Martín et al. (2010)
LCV-CA	<i>B. tabaci B</i>	<i>L. sativa</i>	0	Duffus et al. (1996)
LCV	<i>B. tabaci A</i>	<i>L. sativa</i>	2,9	Duffus et al. (1996)
SPCSV	<i>B. tabaci Q</i>	<i>Ipoemoea nil</i>	15	Sim et al. (2000)
LIYV	<i>B. tabaci A</i>	<i>L. sativa</i>	22	Duffus et al. (1986)
CYSDV	<i>B. tabaci</i>	<i>C. melo</i>	3	Celix et al. (1996)
ToCV	<i>B. tabaci B</i>	<i>Physalis wrightii</i>	18	Wintermantel & Wisler (2006)
TICV	<i>T. vaporariorum</i>	<i>P. wrightii</i>	8	Duffus et al. (1996)

\*LCV-SP, Lettuce chlorosis virus-SP; BnYDV, Bean yellow disorder virus; LCV-CA, Lettuce chlorosis virus; SPCSV, Sweetpotato chlorotic stunt virus; LIYV, Lettuce infectious yellow virus; CYSDV, Cucurbit yellow stunting disorder virus; ToCV, Tomato chlorosis virus; TICV, Tomato infectious chlorosis virus.

Tras los resultados de la hibridación molecular (Figura 19) pudimos comprobar que de los cuatro individuos que conformaban un grupo, más de la mitad resultaban positivas para LCV-SP, por lo que el porcentaje de eficiencia de transmisión estaría más próximo al máximo de eficacia que al mínimo dados en la Tabla 4.

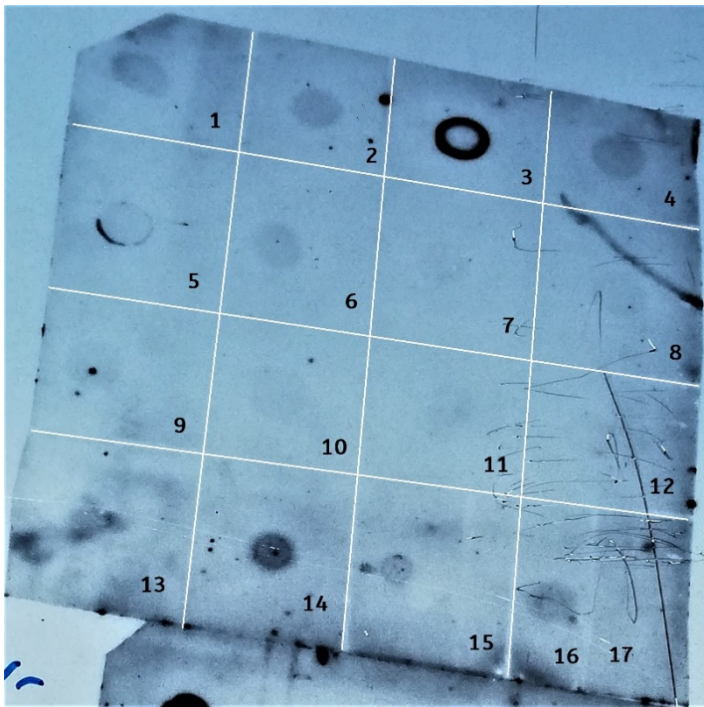


Figura 19: Resultados de la hibridación molecular. 1-4 judía (var. Emerite) alimentada con un adulto de *B. tabaci* con síntomas de LCV-SP. 5-8 judía (var. Emerite) alimentada con un adulto de *B. tabaci* con síntomas de LCV-SP. 9-12 judía (var. Emerite) alimentada con un adulto de *B. tabaci* sin síntomas de LCV-SP. 13-16 control positivo de LCV-SP. 17 control negativo.

## 5. DISCUSIÓN

LCV-SP es un virus que pertenece al género *Crinivirus*, de la familia Closteroviridae, conocidos porque causan enfermedades de gran importancia económica. Los crinivirus han emergido recientemente como grandes patógenos en el mundo de la agricultura. El principal motivo es que su vector de transmisión, la mosca blanca, es muy polífago y está ampliamente distribuida por las zonas templadas de todo el mundo (Tzanetakis et al., 2013). En los últimos 20 años ha habido un incremento en el número de nuevas especies de crinivirus identificadas, que deja ver que los miembros de este género representan una amenaza emergente en todo el mundo (Segundo et al., 2004). Los miembros del género *Crinivirus* han sido descritos como el agente causal de importantes daños en la horticultura como *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV)

(Okuda et al., 2010) CYSDV, y BPYV en cucurbitáceas, o *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), y ToCV en tomate. En otras ocasiones, han sido un problema subyacente, estando detrás de grandes epidemias, incluso no siendo reconocidos en ellas. Algunos ejemplos de esto son *Strawberry pallidosis associated virus* (SPaV), principal promotor de la disminución de la fresa (*Fragaria virginiana*), y PYVV. Esto es debido a que los crinivirus pueden ser asintomáticos pasando desapercibidos o por otros agentes como hongos o déficit de nutrientes (Tzanetakis et al., 2013).

Durante este estudio utilizamos poblaciones de *B. tabaci* virulífera con las que realizamos inoculaciones controladas en las siguientes familias: solanáceas (*S. lycopersicum*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* var. Xanthi y *N. tabacum* var. Samsun), en cucurbitáceas (*C. melo*, *C. pepo*, *C. sativus*, *C. lanatus*) y en apiáceas (*D. carota*). La mayoría de ellas especies hortícolas de gran importancia para el sector económico de Andalucía, resultaron negativas en reacciones de amplificación de LCV-SP mediante RT-PCR. Este resultado coincide con los huéspedes que afectan a otra raza del mismo virus, LCV-CA, no descrita en Europa, y con los descritos para el único crinivirus que afecta a leguminosas, BnYDV. A pesar de ello, algunas especies hortícolas presentaban síntomas de amarilleos (Tabla 2), los cuales se pueden confundir con requerimientos nutricionales u otros factores bióticos y abióticos. Por otro lado, de todas las especies de leguminosas analizadas, solamente la soja (*G. max*) resultó no ser huésped de LCV-SP, aunque presentó síntomas de amarilleo, probablemente debidos al daño directo que le causaba *B. tabaci* al alimentarse de la planta. El resto de las especies estudiadas de la familia de las leguminosas, *P. sativum* (var. Jumbo), *P. vulgaris* L. (var. Buenos aires), *P. vulgaris* L. (var. Amethyst), *P. vulgaris* L. (var. Maravilla de Venecia), *P. vulgaris* L. (var. Vitalis), *P. vulgaris* L. (var. Rocquencourt), *P. vulgaris* L. (var. Darwf), *Vigna unguiculata* y *L. culinaris*, presentaron síntomas típicos de LCV-SP, y dieron positivo en la reacción de amplificación mediante RT-PCR. La severidad de los síntomas dependió de la variedad de la especie y las condiciones de crecimiento. En general, los síntomas comenzaban con una clorosis en las hojas basales y medias, con un verde más intenso en los nervios principales, además de debilidad y acartonamiento de las hojas. En algunos cultivares de judías, como "Buenos aires", "Maravilla de Venecia", "Emerite" y "Amethyst", se observó, además de los síntomas en planta, malformación del fruto y engrosamiento de

la semilla. En especial, las variedades Maravilla de Venecia y Amethyst presentaban una curvatura de la vaina, llegando a alcanzar forma de ganchillo, despreciándose el valor comercial del fruto. Por lo que podemos apreciar en la sintomatología, unas variedades de judía son más susceptibles a LCV-SP que otras.

Muchos miembros del género *Crinivirus* presentan un estrecho rango de huéspedes como es el caso de SPaV que infecta a la fresa (Tzanetakis & Martín, 2004), o PYVV que afecta a la patata (Salazar et al., 2000). Sin embargo, otros crinivirus presentan un amplio abanico de huéspedes, como BPYV (Johnstone, 1987) que infecta a especies pertenecientes a 12 familias, entre las que se encuentran la fresa (familia Rosaceae) y la remolacha azucarera (familia Amaranthaceae) (Tzanetakis et al., 2013), o LIYV que infecta a especies de plantas de 15 familias distintas afectando a cucurbitáceas como el melón, y apiáceas como la zanahoria (Duffus et al., 1986; Duffus et al., 1996). Otras especies de crinivirus tienen un rango de huéspedes más estrecho, como es el caso de ToCV que infecta a especies en 7 familias, entre estas especies el tomate, la patata y el pimiento (Wintermantel & Wisler, 2006; Tzanetakis et al., 2013), o BnYDV, que está restringido a la familia de las leguminosas (Martín et al., 2010). Otros crinivirus han incrementado su rango de huéspedes. Este es el caso de CYSDV, restringido inicialmente a los miembros de la familia de las cucurbitáceas, e incapaz de infectar a especies de otras familias como las solanáceas o compositáceas (Celix et al., 1996). Sin embargo, en 2009 su gama de huéspedes se extendió a miembros de 8 familias, incluyendo a *L. sativa* y *P. vulgaris* (Wintermantel et al., 2009). En este estudio, se han descrito 3 especies nuevas a las que afecta LCV-SP, *V. unguiculata*, *L. cullinaris* y *P. sativum* todas ellas pertenecientes a la familia de las leguminosas, probablemente esto se deba a que LCV-SP es un virus recombinante entre la cepa californiana LCV-CA y BnYDV. El virus presenta alta homología a LCV-CA excepto en las dos proteínas 3' del ARN1, que son de BnYDV (p6 y p26). La presencia en LCV-SP de las proteínas P6 y P26 de BnYDV pueden haber determinado un cambio de huéspedes en LCV (Ruiz et al., 2018). El hecho de que estos cultivos sean susceptibles a LCV-SP, podría traer consigo importantes repercusiones económicas, ya que se podría ver afectada la producción de las leguminosas de grano (190.000 toneladas anuales en España) (MAPAMA, 2017). Es importante resaltar la existencia de huéspedes asintomáticos, como es el caso del guisante, que podría actuar

como reservorio del virus, o bien presentar síntomas cuando se encuentre en infecciones mixtas con otros virus como se ha descrito con anterioridad (Tzanetakis et al., 2013).

La existencia de *G. globosa* como huésped y posible fuente de inóculo es de vital importancia debido a su utilización como planta ornamental. Este hecho puede dar cabida a la posibilidad de que el virus entrara a España desde Estados Unidos mediante esta vía. Según el *Reglamento Técnico de Control de la Producción y Comercialización de los materiales de reproducción de plantas ornamentales y de las plantas ornamentales R.D. 200/2000 de 11.02.00*, las plantas ornamentales están catalogadas como “sin denominación”. Esto quiere decir que todo el material de vivero que se comercialice tiene que estar sano y sustancialmente libre, al menos por observación visual, de cualquier plaga o enfermedad que pueda afectarle. Por lo que basándonos en esta normativa, las plantas ornamentales no tendrían que pasar por controles de laboratorio. Al no tener que pasar por los controles de sanidad, salvo los visuales, es posible poder introducir, inconscientemente, LCV-SP en cualquier país miembro de la Unión Europea (Chomé, 2008). Incluso llegado el punto en el que se llevara a cabo un análisis sanitario, LCV-SP no se encuentra entre las virosis catalogadas como “graves” o de “cuarentena” (European Commission, 2018). Mayores controles deberían quizá tenerse en cuenta para evitar la entrada de posibles enfermedades que comprometan el adecuado desarrollo de nuestra agricultura.

En cuanto a la eficacia de transmisión, de 60 experimentos de transmisión usando una sola mosca virulífera, 24 plantas fueron infectadas, obteniéndose una eficiencia del 40%, mientras que, de 67 experimentos usando dos moscas, se obtuvieron 36 plantas positivas, lo cual revela una eficacia del 59.7 %. Comparado con otros patosistemas (Tabla 5), la eficacia de transmisión obtenida en LCV-SP es mucho mayor que las encontradas para otros crinivirus como BnYDV, ToCV, CYSDV, LIYV, SPCSV y TICV. En comparación con LCV, el virus inicial, esta cepa descrita en España es mucho más eficaz en la transmisión, ya que los porcentajes son 2.9% (LCV transmitido mediante *B. tabaci* A) frente al 40% de LCV-SP (Tablas 4 y 5). Este aumento en la eficacia de transmisión podría estar relacionado con el cambio de huésped de LCV, y por consiguiente con la naturaleza recombinante de LCV-SP, por lo que el virus habría

obtenido una ventaja evolutiva, aumentando su eficacia de transmisión. La presencia de LCV-SP muestra el papel de la recombinación como una fuente de variabilidad genética que actúa como fuerza impulsora de la evolución dentro del género *Crinivirus*, un género emergente.

## 6. CONCLUSIONES

- La *G. globosa* es una eficiente fuente de inóculo que podría haber sido la puerta de entrada del virus a Europa.
- *P. sativum*, *L. cullinaris* y *V. unguiculata* forman parte de las especies de leguminosas no descritas hasta el momento y que pertenecen al rango de huéspedes de la nueva cepa.
- Las variedades Amethyst, Buenos aires y Maravilla fueron las más susceptibles a LCV-SP. Por el contrario la judía variedad Vitalis es la menos susceptible a este virus, ya que sus síntomas fueron los más leves y los frutos no presentaron malformaciones, al contrario de lo que sucedía en las variedades anteriormente mencionadas.
- La eficacia de transmisión de LCV-SP es mayor que la de otros crinivirus cercanos filogenéticamente. Este hecho podría estar relacionado con la naturaleza recombinante de LCV-SP, pudiendo haber ganado eficiencia en la recombinación con BnYDV.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Accotto, G.P., Navas-Castillo, J., Noris, E., Moriones, E., Louro, D. 2000. Typing of *Tomato yellow leaf curl virus* in Europe. *Plant Pathology*, 106; 179-186.
- Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Daubert, S., Koonin, E.V., Rowhani, A. 2012. Genomic and bio-logical analysis of Grapevine leafroll- associated virus 7 reveals a possible new genus within the family Closteroviridae. *Virus Research*, 163; 302–309.
- Brown, J.K., Bird, J., Frohlich, D.R., Rosell, R.C., Bedford, I.D., Markham, P.G. 2005. The relevance of variability within the *Bemisia tabaci* species complex to epidemics caused by Subgroup III geminiviruses. . In: *Bemisia '95: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. ED: Gerling, D., Mayer, R.T., Brown, J.K., Bird, J., Frohlich, D.R., Rosell, R.C., Bedford, I.D., Markham, P.G., Wimborne, UK: Intercept publications, 77-92.
- Brown, JK. 2010. *Bemisia*: phylogenetic biology of the *Bemisia tabaci* sibling species group. In: *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. ED: Stansly, P.A., Naranjo S.E. Dordrecht-Heidelberg-London-New York: Springer, 31-67.
- Caciagli, P.C. 2001. Whitefly-Borne viruses in Continental Europe. In: *Virus–Insect–Plant Interactions*. ED: K.F. Harris, O.P. Smith, J.E. Duffus., San Diego, USA: Academic Press, 14; 279-287.
- Celix, A., Lopez-Sese, A., Almarza, N., Gomez-Guillamon, M.L., Rodríguez-Cerezo, E. 1996. Characterization of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, a *Bemisia tabaci*-transmitted closteriovirus. *Phytopathology*, 86; 1370-1376.
- Chomé, P.M. 2008. Normativa vigente en plantas de vivero. La calidad y la seguridad del sector bajo un marco normativo. *Horticultura Extra*, 8-21.
- Crespo, O., Janssen, D., García, C., Ruiz, L. 2017. Biological and Molecular Diversity of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Spain. *Plant Disease*.
- De Barro P.J., Driver F., Trueman J.W., Curran J. 2000. Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. *Molecular phylogenetic Evolution*, 16; 29-36.

- Duffus, J. E., Liu, H.-Y., Wisler, G. C., & Li, R. (1996). Lettuce chlorosis virus-A new whitefly-transmitted closterovirus. *European Journal of Plant Pathology*, 591-596.
- Duffus, J.E., Larsen, R.C., Liu, H.Y. 1986. *Lettuce infectious yellows virus-A new type of whitefly-transmitted virus*. *Phytopathology*, 76; 97-100.
- Duffus, J.E., Liu, H.Y., Wisler, G.C., Ruhui, Li. 1996. *Lettuce chlorosis virus- A new whitefly-transmitted closterovirus*. *European Journal of Plant Pathology*, 102; 591-596.
- EFSA Panel on plant health, 2013.
- Elorrieta, M. A., Janssen, D., Ruiz, L. 2015. Principales enfermedades víricas de los cultivos hortícolas bajo plástico de Almería. La Mojonera: Coexphal.
- European Commission, 2018.
- Green, M.R., Sambrook, J. 2012. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ivars, P., Alonso, M., Borja, M., Hernández, C. 2004. Development of a non-radioactive dot-blot hybridisation assay for the detection of *Pelargonium flower break virus* and *Pelargonium line pattern virus*. *Springer*, 110; 275-283.
- Janssen, D., Martín, G., García, M.C., Cuadrado, I.M. 2011. *El virus del desorden amarillo de la judía y su repercusión agroeconómica*. *Phytoma*, 20-25.
- Janssen, D., Ruiz, L. 2016. Amarillos de las cucurbitáceas. In: *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides*. Sociedad Española de Fitopatología. ED: Ayllón, M. A., Cambra, M., Llave, C., & Moriones, E., España: Sociedad Española de Fitopatología, 16; 439-451.
- Janssen, D., Simon, A., Crespo, O., Ruiz, L. 2017. Genetic Population Structure of *Bemisia tabaci* in Spain Associated with *Tomato Leaf Curl New Delhi Virus*. *Plant Protect. Science*, 53 (1); 25-31.
- Johnstone, G.R. 1987. *Beet pseudoyellows closterovirus*. *Plant Viruses online; Descriptions and lists from the VIDE database*.
- King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. 2011. *Virus Taxonomy classification and nomenclature of viruses*. Elsevier, 987-1001.



- Kiss, Z. A., Medina, V., & Falk, B. W. 2013. Crinivirus replication and host interactions. *Frontiers in Microbiology*, 1-11.
- MAPAMA, 2017
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Hu, J.S., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Martin, R.R., Minafra, A., Namba, S. and Vetten, H.J. 2012. The Positive Sense Single Stranded RNA Viruses. In: *Taxonomy classification and nomenclature of viruses*. ED: King, A.M., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. London, UK: Elsevier ELSEVIER, 2; 987-1001.
- Martín, G., Cuadrado, I.M., Jansen, D. 2010. *Bean yellow disorder virus*. *Insect science*, 1-7.
- Okuda M, Okazaki S, Yamasaki S, Okuda S, Sugiyama M. 2010. Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus *Crinivirus*. *Phytopathology*, 100; 560–566.
- Ruiz García, L., Simón-Martínez A., García-García M.C., Janssen D. 2014. El virus de la clorosis de la lechuga en cultivos de judía (LCV-SP). *La Mojonera: Servifapa*.
- Ruiz, L., Simón, A., García, C., Velasco, L., Janssen, D. 2018. First natural crossover recombination between two distinct species of the family *Closteroviridae* leads to the emergence of a new disease. *PLOS ONE*, 13 (9): 1-18.
- Ruiz, L., Simón, A., García, M.C., Janssen, D. 2014. First Report of *Lettuce chlorosis virus* Infecting Bean in Spain. *Plant Disease*, 98 (6); 857-857.
- Segundo, E., Martín, G., Cuadrado, I.M., Janssen, D. 2004. A new yellowing disease in *Phaseolus vulgaris* associated with a whitefly-transmitted virus. *Plant Pathology*, 53; 517.
- Sim, J., Valverde, R.A., Clark, C.A. 2000. Whitefly transmission of *Sweet potato chlorotic stunt virus*. *Plant Disease*, 84; 1250.
- Simón, A. 2017. *Biología y epidemiología de Tomato leaf curl New Delhi begamovirus en España*. *Universidad de Almería*, 1; 48-54.
- Starr, F., Starr, K. 2008. *Gomphrena globosa* (flowers and leaves). Maui, Walmart Kahului.

- Teng, X., Wan, F.H., Chu, D. 2010. *Bemisia tabaci* biotype Q dominates other biotypes across China. *Flat Entomology*, 93; 363-368.
- Tzanetakis IE, Martin RR, Wintermantel WM. 2013. Epidemiology of criniviruses: An emerging problem in world agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 4; 1–15.
- Tzanetakis IE, Martin RR. 2004. Complete nucleotide sequence of a strawberry isolate of *Beet pseudoyellows virus*. *Virus Genes*, 28; 239–246
- Valverde, R.A., Sim, J., Lotrakul, P. 2004. Whitefly transmission of sweetpotato viruses. *Virus Research*, 100; 123-128.
- Velasco Arjona, L. 2015. Los virus en los cultivos hortícolas protegidos del sureste español desde una perspectiva histórica. [Interempresas.www.interempresas.net/Horticola/Articulos/133293-virus-en-cultivos-hortícolas-protegidos-del-sureste-español-desde-perspectiva-historica.html](http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/133293-virus-en-cultivos-hortícolas-protegidos-del-sureste-español-desde-perspectiva-historica.html)
- Wintermantel, W.M., Hladky, L.L., Cortez, A.A., Natwick, E.T. 2009. A new expanded host range of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* includes three agricultural crops. *Plant Disease*, 93; 685-690.
- Wintermantel, W.M., Wisler, G.C. 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease*, 90; 814-819.
- Wisler GC, Duffus JE, Liu HY, Li RH. 1998. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Disease*, 82; 270–280.
- Wisler, GC, Duffus, JE. 2001. Transmission properties of whitefly-borne criniviruses and their impact on virus epidemiology. In: *Virus–Insect–Plant Interactions*. ED: K.F. Harris, O.P. Smith, J.E. Duffus., San Diego, USA: Academic Press 15; 293–308.
- Zhang, S.B., Zhang, D.Y., Liu, Y., Luo, X.W., Du, J. 2017. First report of *Lettuce chlorosis virus* infecting tomato in China. *Plant Disease*, 101 (5); 846.
- Zhao, X., Zhu, M., Wu, Q., Zhang, J., Xu, Y., Tao, X. 2017. Complete genome sequence of a *Lettuce chlorosis virus* isolate from China and genome recombination/rearrangement analysis. *Springer*, 63 (3): 751-754.

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1

#### **-EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN PLANTAS (Accotto et al., 2000 adaptado).**

- 1.- Pesar 0.2g de tejido vegetal, introducirlos en un tubo de eppendorf de base redonda, y añadir dos bolas de acero. Rotular los tubos con rotulador permanente.
- 2.- Añadir 500 µl de buffer de extracción de PCR (1:10) (TRIS HCL pH 8 0.1 M, EDTA 0.05 M, ClNa 0.5 M, CB Mercaptoetanol), y homogeneizar con ayuda de la máquina "TissueLyser".
- 3.- Añadir al tubo 200 µl de SDS 10%. Agitar en el vórtex.
- 4.- Centrifuga: 12.000 rpm----5min-----4°C. Poner siempre el eppendorf en la misma posición. (Generalmente se coloca la visagra hacia fuera de la centrifuga, el precipitado queda en la pared de la visagra).
- 5.- Transferir a otro tubo 500 µl y poner en la estufa a 65°C durante 5 min.
- 6.- Añadir 150 µl de Ack5 M. Agitar en el vórtex.
- 7.- 10 min en hielo.
- 8.- Centrifuga: 13.000 rpm-----10min-----15°C.
- 9.- Tomar 500 µl de sobrenadante y transferirlos a otro tubo.
- 10.- Añadir 500 µl de Isopropanol.
- 11.- Agitar suave (un volteo con la mano).
- 12.- Centrifuga: 14.000 rpm-----10min-----4°C.
- 13.- Desechar sobrenadante.
- 14.- Añadir 150 µl de Etanol al 70%.
- 15.- Centrifuga: 14.000 rpm-----5min-----4°C.
- 16.- Desechar sobrenadante con ayuda de una micropipeta de 200 µl para secar el pellet.

17.- Se deja secar sobre un papel de filtro limpio.

18.- Resuspender en 50 µl de Agua M.Q. estéril.

## **ANEXO 2**

**-PROTOCOLO DE RT-PCR (Crespo et al., 2016).**

- **REACCIÓN RT**

Todos los reactivos y procesos se hacen en hielo

MIX 1:

-ARN.....2 µl

-Primer low.....2 µl x nº muestras

-AGUA.....8.5 µl x nº muestras

Volumen final Mix 1.....12.5 µl

Desnaturalizar 2 min a 85°C, y a la mezcla añadir:

MIX 2

-Buffer RT.....4 µl x nº muestras

-DTT.....2 µl x nº muestras

-dNTPs (10 mM).....1 µl x nº muestras

- Retrotranscriptasa (MLV-AMV).....0.5 µl x nº muestras

Volumen final Mix 2 .....7.5 µl

Volumen Mix 1 + Mix 2... ..20 µl

Transcripción inversa durante 60 min a 42°C

### PCR DE LA REACCION DE RT

-ADNc (obtenido de la RT).....2 µl

Mix

-Buffer (5x).....5 µl x nº muestras

-MgCl<sub>2</sub> (25mM).....1.25 µl x nº muestras

-dNTPs (10mM).....0.5 µl x nº muestras

-Primer up (100ng/ µl).....2 µl x nº muestras

-Primer low (100ng/ µl).....2 µl x nº muestras

-Taq-polimerasa (5 U/ µl).....0.5 µl x nº muestras

-H<sub>2</sub>O.....11.75 µl x nº muestras

Volumen del Mix.....23 µl

Volumen final.....25 µl

\*La reacción se ha llevado cabo con la enzima Go taq flexi ADN polimerasa (Promega, M7805)

### **ANEXO 3**

**-PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN** (Ivars et al., 2004).

**\*Preparación del tampón citrato 50mM, pH 8,5**

-Vertemos 170 ml de H<sub>2</sub>O destilada en una probeta, y añadimos 2,94 g/200ml de Citrato de sodio. Reajustamos en el phmetro con NaOH hasta llegar a los 200 ml.

**\*Extracción de ácidos nucleicos**

-Pesar 0.2g de tejido vegetal, introducirlos en un tubo de eppendorf de base redonda, y añadir dos bolas de acero. Rotular los tubos con rotulador permanente. Homogeneizamos con el uso de la máquina TissueLyser.

-Añadimos 200 µl de buffer de citrato.

-Centrifugamos a 8000 rpm durante 5 minutos. Ponemos en hielo.

Acabada la extracción de ácidos nucleicos de los grupos de cuatro de judía Emerite, se vertieron 2 µl en una membrana de nylon previamente cuadrículada, quedando sobre la membrana las gotas de la extracción.

Una vez realizadas estas aplicaciones, se mantuvieron las membranas a temperatura ambiente hasta que se secaron, y posteriormente, se fijaron exponiéndolas a la luz UV. Siendo este paso el último antes de someterlas a la hibridación.

#### \*PROCESADO DE LA MEMBRANA DE NYLON (HM)

La hibridación Molecular se realizó de acuerdo al protocolo indicado por Marco et al., 2003:

1. Para la hibridación se empleó la solución para sondas de RNA (5XSSC, 2% Blockingreagent, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02% SDS, H<sub>2</sub>O y 50% formamida). Las membranas se prehibridaron durante 2 horas en un horno de hibridación a 68 °C.
2. Pasado este tiempo, se añadió la sonda con ARN complementario a diversas regiones del genoma del virus que se pretende determinar, previamente desnaturalizada a 85-90°C durante 2-3 minutos, y se hibridaron durante toda la noche las membranas con la sonda marcada con digoxigenina (DIG).
3. Terminada la hibridación se realizaron sucesivos lavados, dos veces con una solución que contenía 2XSSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada vez, y dos veces con 0.1XSSC, 0.1% SDS a 68°C, durante 15 minutos cada vez.
4. Tras esto, las membranas se lavaron dos veces con el tampón de lavado (0.1 M ácido málico, 0.15 M NaCl, pH=7,5 (ajustado con NaOH), 3% Tween 20) durante 5 minutos cada vez y después se incubaron 30 minutos en tampón de bloqueo (0.1 M Ácido málico 0.15 M NaCl, pH=7,5 (ajustado con NaOH), 1% Blockingreagent).

5. El antisuero Anti-DIG-AP, se diluyó 1:10000 en tampón de bloqueo y se incubaron las membranas en esta solución durante 30 minutos.
6. Pasado este tiempo se lavaron dos veces con un tampón de lavado durante 15 minutos cada vez,
7. Finalmente, se equilibró con el tampón de detección (0.1 M Tris-HCL, 0.1 M NaCl, pH=9,5) durante 5 minutos.
8. La detección se realizó por quimioluminiscencia, para ellos se incubaron las membranas durante 5 minutos en el sustrato CSPD a dilución 1:100 en tampón de detección. El exceso de líquido se eliminó tanto como fue posible y las membranas se sellaron en una bolsa de plástico.
9. Finalmente, las membranas se expusieron a películas de autorradiografía durante distintos intervalos de tiempo. Las películas se revelaron, se lavaron con agua, se fijaron, se volvieron a lavar y se dejaron secar a temperatura ambiente.