



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGRARIA

TRANSMISIÓN DE BEGOMOVIRUS POR
MOSCA BLANCA EN PLANTAS
HORTÍCOLAS

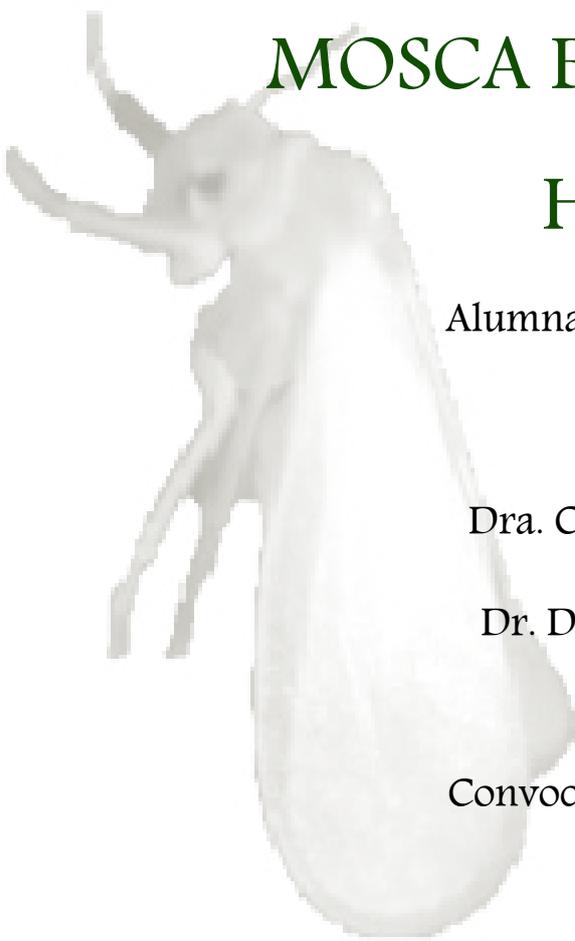
Alumna: María Nela García Espinosa

Directores:

Dra. Carmen Vargas García (UAL)

Dr. Dirk Janssen (IFAPA, La Mojonera)

Convocatoria: Septiembre 2015



Índice

1. Agradecimientos.....	1
2. Resumen	2
3. Introducción.....	3
4. Materiales y métodos.....	10
4.1. Material vegetal.....	10
4.2. Poblaciones de Mosca blanca y virus.....	11
4.3. Detección molecular de ToLCNDV.....	11
4.3.1. Extracción de ácidos nucleicos totales a partir del material vegetal.....	11
4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	12
4.3.3. Hibridación molecular con sondas genéticas no radiactivas.....	13
4.4. Parámetros de Transmisión de ToLCNDV.....	16
4.4.1. Eficiencia de transmisión.....	16
4.4.2. Tiempo mínimo de inoculación por alimentación.....	17
5. Resultados.....	18
5.1. Detección de ToLCNDV.....	18
5.2. Parámetros de transmisión	20
6. Discusión	22
6.1. Técnicas analíticas utilizadas en la detección	22
6.2. Parámetros de infección. Eficiencia y tiempo de inoculación.....	24
7. Conclusiones.....	29
8. Bibliografía.....	30

1. Agradecimientos

Gracias a todas las personas que han hecho posible la realización de este Trabajo Fin de Máster. Gracias a mis directores, el doctor Dirk Janssen y la doctora Carmen Vargas, por la paciencia y la dedicación que han tenido conmigo. A mis compañeros de laboratorio por su cariño y su atención. En especial entre ellos, a la doctoranda Almudena Navarro, por su incansable apoyo y por enseñarme no solo técnicas y protocolos, sino a trabajar en equipo, a buscar soluciones a todos los problemas que surjan, a ser perseverante y no desanimarme.

Y por último, a mis padres, hermanos y amigos, sobre todo a Alicia, Cornelio, Lourdes y María por saber tratarme con paciencia y apoyarme en todo momento.

Gracias

2. Resumen

La aparición de un fitovirus exótico en un nuevo territorio representa siempre una amenaza para los cultivos locales. Si no se controla adecuadamente la situación y confluyen los factores adecuados, se pueden alcanzar cotas catastróficas en cuanto a pérdidas en cultivos. La clave para controlar el progreso de este escenario reside en el conocimiento y caracterización del patógeno y la infección.

La aparición más reciente en España es un begomovirus aislado por primera vez en India, *Tomato leaf curl New Delhi Virus*, ToLCNDV. Este virus afecta principalmente a cucurbitáceas, aunque también se ha detectado en solanáceas.

Considerando todas las vertientes que intervienen en un proceso infeccioso, destaca en cuanto a importancia el conocimiento del proceso de la transmisión del virus. Una transmisión efectiva depende de numerosos parámetros procedentes de la relación que se establece entre el huésped, el vector y el virus, así como de condiciones ambientales. En el presente trabajo se midieron dos parámetros, la eficiencia de la transmisión y el tiempo de inoculación, averiguando así, respectivamente, el número mínimo de vectores virulíferos necesarios y el menor periodo de tiempo que un número determinado de estos debe alimentarse del hospedador para que se produzca una transmisión exitosa y un hospedador sano desarrolle la infección. Para asegurar este hecho, se realizó una inspección visual en busca de síntomas, seguido de la identificación del genoma viral en el huésped por PCR o hibridación molecular con sondas genéticas no-radioactivas.

Los ensayos presentados sugieren que la transmisión de ToLCNDV es tremendamente eficaz, siendo capaz de provocar infecciones con una sola mosca, con tiempos de inoculación realmente breves.

3. Introducción

Debido a unas buenas condiciones ambientales y climatológicas, la agricultura española es un sector consolidado, muy amplio y diverso, que ha llegado a ser un potente motor de la economía, debido sobre todo a un alto volumen de exportaciones (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2006).

A nivel autonómico, en Andalucía el sector hortofrutícola cobra una gran importancia, alcanzándose en 2012 un total de 115.191 hectáreas de cultivo (53% de la superficie nacional) y produciéndose 5.18 millones de toneladas (el 37% del valor de la producción nacional) (Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Secretaría de Agricultura y Alimentación. Junta de Andalucía, 2015a). Desde otra perspectiva, Andalucía está considerada como la principal zona suministradora de productos hortofrutícolas de la Unión Europea. Tan solo en 2014 se exportaron a la UE28 un total de 3.526.669 toneladas de frutas y hortalizas, exportaciones que alcanzaron un valor de 3.493 millones de € (Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Secretaría de Agricultura y Alimentación. Junta de Andalucía, 2015a).

Dentro de los productos hortofrutícolas, el tomate es el cultivo líder, tanto en superficie como en producción y exportación. Sin embargo, se observa mayor crecimiento en la producción de calabacín, en el cual se han incrementado tanto las hectáreas dedicadas, como el volumen producido (Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía, 2012). Aun así, el tomate sigue siendo el producto hortofrutícola exportado por excelencia en Andalucía, observándose durante los últimos años un incremento, tanto en el volumen como en el valor de las exportaciones, alcanzándose en 2014 las 627.420 toneladas, con un valor de 658 M€ (Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía, 2015b).

La misma tendencia puede observarse en el cultivo de calabacín, con una facturación menor, aunque significativa, que asciende hasta las 240.340 toneladas con un valor de 161 M€ en 2014 (Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía. (2015b).

Una de las principales limitaciones para el sector de la producción agrícola es la existencia de enfermedades y plagas que afectan a los cultivos, depreciando el producto y disminuyendo el volumen de producción (Navas-Castillo *et al.*, 2011).

Desde los inicios de la agricultura, esta ha estado ligada a plagas y enfermedades. Sin embargo, debido a factores humanos y ambientales, como la introducción de la agricultura intensiva o el establecimiento de rutas de comercio que permiten la circulación de productos vegetales alrededor del mundo, se ha propiciado el movimiento de fitopatógenos y la emersión de estos en ambientes foráneos (Rojas & Gilbertson, 2008).

La gravedad de la aparición de fitopatógenos foráneos en un ambiente reside en la vulnerabilidad de la población de posibles hospedadores, que no han co-evolucionado con el virus y pueden, por tanto, ser tremendamente sensibles. Por otro lado, también existen factores vinculados a la transmisión, ya que el éxito de la infección dependerá en gran parte de la versatilidad que muestre el vector y su capacidad de adaptación al entorno, además de unas condiciones ambientales favorables (Vurro *et al.*, 2010). Estas interacciones descritas entre el fitopatógeno exógeno y el ambiente en el que se ha introducido deben ser caracterizadas y estudiadas, ya que la protección de los cultivos y producciones agrícolas, depende de su pronta identificación y conocimiento para el establecimiento medidas correctoras que limiten los daños (Vurro *et al.*, 2010).

En las últimas décadas, se ha vivido en el sureste español una situación que concuerda con lo descrito anteriormente. El modelo de cultivo se ha modificado, implantándose el cultivo intensivo bajo plástico. Este hecho ha venido acompañado de la aparición de nuevas plagas y enfermedades (Velasco, 2015). Concretamente, se ha observado un claro incremento de las virosis transmitidas por a la mosca blanca. Este hecho dio comienzo en los 90, cuando se detectó el primer virus cuyo vector era la mosca blanca, el crinivirus *Beet pseudo-yellow virus* (BPYV). Hasta entonces, la mosca blanca, especie autóctona ligada a los cultivos de la cuenca mediterránea, había limitado sus daños a los causados como insecto succionador de savia (Velasco, 2015).

Este acrecentamiento de las virosis causadas por mosca blanca ha sido favorecido por el incremento de la población de esta, debido a factores como el control deficiente y la aparición de dos biotipos del vector, B y Q, especialmente eficaces en la transmisión (Velasco, 2015). Según encuestas realizadas a empresarios del sector hortícola de Almería en 2008, casi un 50% de las incidencias declaradas durante las campañas se debían a la aparición de diferentes virosis, de las cuales, más de la mitad fueron calificadas como “situación muy preocupante” o “catastrófica” (Conserjería de Agricultura y Pesca. Dirección general de planificación y análisis de mercados. Junta de Andalucía, 2009).

El virus que estudia este trabajo, *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), transmitido por mosca blanca, es la especie de aparición más reciente en España. Se detectó por primera vez en un cultivo de calabacín (*Cucurbita pepo* L.) situado en la comunidad de Murcia en septiembre de 2012, y cursaba con los síntomas típicos de una infección por begomovirus, es decir, rizado del nervio, hinchazón de las venas y mosaico clorótico. En mayo del año siguiente, se detectaron los mismos síntomas en un cultivo de calabacín de la provincia de Almería (Juárez *et al.*, 2015). Ya en septiembre

del año siguiente, fue detectado un cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) bajo plástico que mostraba los mismos síntomas que se habían descrito para calabacín: moteado clorótico y distorsión venosa en hojas intermedias, bajas y apicales. Este hecho supuso la confirmación que el aislado de ToLCNDV también contemplaba al tomate como hospedador (Ruiz *et al.*, 2015).

Actualmente este virus se encuentra dentro de los avisos de la Junta de Andalucía, ya que “no se considera una plaga de especial relevancia según la base de datos de la EPPO”, pero “al ser una primera detección en Europa, y debido a sus riesgos, deben extremarse todas las medidas propuestas de control y erradicación en las explotaciones afectadas” (Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía. Delegación territorial de Almería, 2013) .

Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) fue descrito por primera vez en la India a mediados de los 90 por Padidam *et al.* (Borah & Dasgupta, 2012), y se incluyó en la familia *Geminiviridae*, virus comúnmente conocidos como Geminivirus, que recoge un grupo de fitovirus cuyo material genómico está constituido por una (o más) cadena de ADN sencilla y circular, encapsulados en partículas proteicas que forman una estructura similar a dos icosaedros casi idénticos unidos (Briddon & Stanley, 2009). Los vectores de transmisión son exclusivamente insectos y entre sus hospedadores se cuentan dicotiledóneas y monocotiledóneas (Briddon & Stanley, 2009). La familia de los Geminivirus cuenta con 4 géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topovirus* y *Begomovirus*.

En el género de los Begomovirus (acrónimo de *Bean golden mosaic virus*), se encaja el virus ToLCNDV. Este género resulta el más relevante de la familia de los *Geminivirus*, ya que en las dos últimas décadas estos virus han emergido y se han

revelado como uno de los mayores causantes de problemas en cultivos agrícolas a escala mundial (Navas-Castillo *et al.*, 2011). Basándose en su organización genómica, la diversidad genética y la distribución geográfica se ha dividido a los begomovirus en dos grandes grupos:

- Begomovirus del “Viejo Mundo”. En este grupo se encuentran virus localizados en África, Asia, Europa y Australia. En su mayoría tienen genomas monopartitos que suelen acompañarse de pequeños fragmentos de ADN simple circular llamados satélites (Briddon *et al.*, 2010).
- Begomovirus del “Nuevo Mundo”. A este grupo pertenecen begomovirus que fueron descubiertos en América y que, a diferencia de los begomovirus del Viejo Mundo, cuentan con genomas bipartitos y carecen de satélites. Su organización genómica consiste en 2 cadenas de ADN simple y circular, conocidas como ADN-A y ADN-B. Ambas cadenas se complementan y necesitan para el desarrollo sistémico de la virosis en el huésped (Briddon *et al.*, 2010).

En el caso concreto de ToLCNDV, se ha reportado que esta especie es bipartita con ADN-A y ADN-B, perteneciendo a los begomovirus del “Nuevo Mundo”. Sin embargo, se ha descrito que puede contener satélites que incrementa la severidad de los síntomas (Sivalingam & Varma, 2012).

Una de las causas que han propiciado que los begomovirus sean uno de los géneros de fitovirus más emergentes en el mundo es su vector de transmisión, *Bemisia tabaci* Gennadius (familia *Aleyrodidae* y orden *Hemiptera*), conocida como mosca blanca. Se identifican como insectos pequeños, de aproximadamente unos 2 mm, con cuerpo y alas blanquecinas recubiertos por polvo ceroso.



Figura 1. Izq.: Ejemplares de *Bemisia tabaci*.
Der.:Ninfa

Estos insectos, actualmente se han expandido por casi todo el mundo, actuando como especie invasora (Oliveira *et al*, 2001). El gran éxito como plaga mundial de la mosca blanca reside en varios factores. En primer lugar, la aparición de los biotipos mencionados arriba, B y Q, más eficaces en transmisión, tasa de reproducción y resistencia a fitosanitarios, debido a la presión humana (EPPO/CABI, 2015). Y, por otro lado, la capacidad de adaptación a diferentes ambientes y el carácter altamente polífago que posee, incluyendo a más de 600 especies de diferentes familias hospedadoras (Oliveira *et al.*, 2001).

Uno de los aspectos más destacados en las infecciones por virus son los síntomas, tanto por las pérdidas que suponen, obviamente, como por la identificación (si fuese posible) de la infección. En general, los síntomas causados por fitovirus son diversos, ya que dependen de la respuesta de la planta hospedadora a la invasión. Por tanto, el patrón sintomático que pueden mostrar las plantas a una infección dependerá tanto del virus (capacidad de movimiento y acumulación en los tejidos del huésped), como del hospedador. En este último caso, influye tanto el estado de desarrollo en el que se ha producido la infección, como de la morfología y especie (Briddon & Stanley, 2009; Markham *et al.* 1994).

Aun cuando las infecciones víricas son difíciles de diagnosticar por simple observación, hay una serie de síntomas considerados característicos de ToLCNDV, como son moteado clorótico y fruncido del nervio en las hojas (se produce el “enrollamiento” desde el ápice, curvándose hacia abajo), y con menor frecuencia

también pueden mostrar clorosis internervial o mosaico clorótico. En el caso de los frutos, muestran una piel rugosa y áspera. Cuanto más temprana es la infección más gravemente se ve afectada la planta (Juárez *et al.*, 2015; Ruiz, *et al.*, 2015; Chakraborty, 2009).

Otro de los factores importantes, por no decir crucial tanto en las infecciones víricas como en cualquier tipo de patología, es el conocimiento profundo de la epidemiología de la enfermedad y las vías de transmisión del patógeno, ya que permiten establecer las bases de la primera línea de protección de los cultivos frente a dicho patógeno. En concreto, la transmisión de begomovirus por la mosca blanca aún no está esclarecida del todo, y parece depender de la estrecha relación que vincula al vector, al hospedador y al virus durante el proceso.

Se ha descrito que este género de fitovirus se transmite de una manera persistente y circulativa, es decir, tras una primera infección, y tras el acceso del vector al floema del hospedador infectado, las partículas víricas introducidas en el insecto permanecen durante un tiempo determinado, llamado de latencia, circulando por el aparato digestivo y los tejidos de la mosca hasta las glándulas salivales, donde se acumulan (Ghanim, 2014; Rosen *et al.*, 2015). Pasado este tiempo de latencia, el vector se considera infectivo y el virus será transmitido a más huéspedes sanos a través del estilete en el proceso de alimentación del insecto (Rosen *et al.*, 2015), durante un tiempo que puede abarcar desde semanas hasta la vida completa del vector (dependiendo de la especie viral y la composición de la población del vector) (Ghanim, 2014). Se desconocen aún muchas de las rutas moleculares, receptores y genes que actúan en el proceso (Rosen *et al.*, 2015).

La relación virus-vector-planta establecida durante la transmisión de ToLCNDV en España aún es, en ciertos aspectos, una incógnita; muchos agricultores afirman haber visto pocos o ningún vector en cultivos de calabacín afectados; en otros cultivos como el tomate, sorprende la aparición de síntomas del virus solo en condiciones de mucha presión por el vector. En el presente Trabajo, como objetivo principal se estudiará en dos de los especies hospedadoras, el tomate y el calabacín, dos de los parámetros que determinan el proceso infectivo: la eficacia de la transmisión, y el tiempo de inoculación, que delimita el tiempo que debe permanecer alimentándose un vector virulífero de un hospedador sano para transmitir el virus y provocar el desarrollo de una infección.

4. Materiales y métodos

4.1. Material vegetal

Se utilizaron los cultivares Marmande (HM. Clause, Francia) y Victoria F1 (Ramiro Arnedo, S.A., España) de tomate (*Solanum lycopersicum*) y calabacín (*Cucurbita pepo*), respectivamente. Las semillas fueron sembradas en bandejas de alveolos utilizando una mezcla de turba y vermiculita en proporción 3:1, adicionada del volumen adecuado de agua de forma previa a la siembra. Las plántulas fueron trasplantadas en la fase de segunda hoja verdadera a maceteros de 7,5 cm Ø. Alternativamente, las semillas se sembraron en tacos de lana de roca (Grodan®), cubiertas con vermiculita. Las plántulas fueron cultivadas en cámaras de cultivo bajo las siguientes condiciones: un fotoperiodo de 16 horas de luz y 25 °C (día), y 8 horas de oscuridad y 18 °C (noche), con una humedad relativa de 60-70%.

4.2. Poblaciones de mosca blanca y virus

Una población de *Bemisia tabaci* libre de virus fue producida sobre plantas de judía (*Phaseolus vulgaris*) dentro de una caja insectario, mantenida en una cámara de cultivo con temperatura y humedad reglada. Para estudiar los parámetros de infección se generó una población de *B. tabaci*, infectada con ToLCNDV, cultivando las poblaciones sanas durante al menos 40 días sobre plantas de calabacín infectadas con el virus. Periódicamente, dichas plantas fueron analizadas con objeto de asegurar la presencia de ToLCNDV y ausencia de otros virus transmisibles por mosca blanca, y susceptibles de infectar tomate y calabacín, las especies objeto de estudio, tales como *Cucumber vein yellowing virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, y *Tomato yellow leaf curl virus*. Las poblaciones se incubaron en cámaras de cultivo en las mismas condiciones de fotoperiodicidad, temperatura y humedad relativa descritas anteriormente.

4.3. Detección molecular de ToLCNDV

Se realizó la detección del virus en extractos de ADN procedentes de plantas de calabacín y tomate. Dicha detección se efectuó mediante PCR en el caso de emplear directamente los extractos de ADN vegetal, y mediante hibridación molecular con sondas genéticas marcadas con digoxigenina, cuando se obtuvieron improntas de savia de plantas.

4.3.1. Extracción de ácidos nucleicos totales a partir de material vegetal

Fragmentos de 0,2 g de hoja de planta fueron homogeneizados en 2 mL de tampón de extracción (Tris-HCl, pH, 0,1M, EDTA 0,05M, NaCl 0,5M y mercaptoetanol (0,14%) utilizando un Polytron® (PT2100, Kinematica, Lucerna, Suiza). Seguidamente se

añadieron 200 µL de SDS al 10% y, tras mezclar en vórtex, se trasvasó el material a un tubo eppendorf. Este preparado se centrifugó durante 5 min a 12.000 rpm y 4 °C. Se transfirieron 500 µL del sobrenadante en un microtubo eppendorf, que se incubó a 65 °C durante 5 min. A continuación, se incorporaron 150 µL de acetato potásico 5 M y se mezcló en vórtex. La mezcla se mantuvo 10 min en hielo y posteriormente se centrifugó 10 min a 13.000 rpm y 4°C. Tras la separación, se transfirieron 500 µL de sobrenadante a un nuevo microtubo eppendorf, donde además se añadieron 500 µL de isopropanol. La mezcla se agitó de manera suave y posteriormente se desechó el sobrenadante. Por último, se lavó el precipitado de ácidos nucleicos con 150 µL de etanol al 70% y tras desecar, se resuspendió el material en 50 µL de agua MiliQ autoclavada.

4.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir de los extractos de ADN, la detección del virus se llevó a cabo mediante amplificación por PCR y posterior elucidación del producto de PCR en electroforesis en gel de agarosa. Dicha amplificación se hizo con 2 µL de extracto de ADN, 5 µL de Buffer 5x, 0,5 µL de dNTP's (10 mM), 0,5 µL de Taq polimerasa, 11,75 µL de H₂O, 1,25 µL de MgCL₂ (25mM), y 2 µL de cada cebador, en un volumen de reacción total de 25 µL.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la detección de ToLCNDV por PCR.

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Tamaño de amplicón (pb)	Genoma
GemCP-V	AGCACAGCCACGGTGAAGAAC	350	ADN-A
GemCP-C	TTTCATCCTTCGACAGAGTTC		
PLB1v2040	AATACACGCGTAAGGAAATATGT	450	ADN-B
PCRc154	AGTCATGGGCTAGCAGATCG		

Se dispusieron tres controles: positivo, negativo y blanco. El primero consistió en una muestra que anteriormente hubiera sido analizada e identificada como positiva, el segundo en un extracto de ADN de plantas sanas, y el tercero en una muestra en la que se substituyó con agua el extracto de ADN.

Tabla 2. Valores de los ciclos del termociclador.

Ciclo	Temperatura	Duración	Repetición
Desnaturalización inicial	95 °C	2'	1x
Desnaturalización	95 °C	30''	35x
Anillamiento	55 °C	30''	
Elongación (*)	72 °C	50''	
Elongación final	72 °C	5'	1x

Tabla 3. Reactivos utilizados en la PCR realizada para elaborar la sonda.

Buffer	10 µL
MgCl ₂	2,5 µL
Cebador up	2 µL
Cebador low	2 µL
dNTPS (digoxigenina)	5 µL
H ₂ O	26 µL
ADN	2 µL
Taq	0,5 µL

Una vez terminada la reacción de PCR, las muestras amplificadas fueron sometidas a electroforesis durante 40 min con un voltaje de 100 V en gel de agarosa (1%), con TAE (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2) como tampón. En el gel también se incorporó el intercalante *Midori Green*® Advance M64 (Cultek, Madrid, España), que

se coloca entre las bases del ADN, funcionando como fluoróforo y permitiendo elucidar las muestras en el gel por exposición a luz UV.

4.3.3. Hibridación molecular con sondas genéticas no radiactivas

El virus ToLCNDV, además de por PCR en extractos de ADN, también fue detectado por hibridación en improntas de savia de plantas. Esta técnica se llevó a cabo

con sondas generadas a partir de dNTPs marcados con una molécula (digoxigenina) que actúa de antígeno para el anticuerpo que posibilita la detección. Para su obtención, considerando que el objetivo de la hibridación era la detección del virus ToLCNDV, se utilizaron cebadores que amplificasen tanto ADN-A como B. Para elaborar la sonda, se eligió la pareja de cebadores más adecuada y una muestra anteriormente diagnosticada como positiva, y se realizó una PCR con los reactivos expuestos en la Tabla 3. A la vez que la sonda, se realizó una PCR estándar, que actuó como control positivo. Para el marcaje de la sonda utilizada en esta técnica de detección, se realizó una PCR convencional con Dig Labelling dNTPs (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) y las parejas de cebadores descritos anteriormente para detección de ambos genomas. El protocolo de hibridación se ejecutó en tres fases principales: hibridación, lavados y revelado.

1.- Hibridación

Sobre una membrana de nylon cargada positivamente para el bloqueo de ácidos nucleicos (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts) se generó una impronta de las muestras analizadas, presionando un corte del tallo u hoja sobre la membrana. Además de las muestras, se depositó un control positivo (material infectado), un control negativo (material sano) y controles de la sonda. Una vez realizada la impronta, la membrana se selló, manteniéndola bajo luz UV durante 10 s. En ese momento, la membrana se sometió a un tratamiento de pre-hibridación, consistente en una inmersión en 5 mL de buffer de hibridación durante 2 h a 55 °C. A continuación, se realizó la hibridación propiamente dicha, en la que la membrana se incubó con la sonda a 55 °C toda la noche.

Tabla 4. *Composición de tampones utilizados en Hibridación Southern*

Buffer Blocking 10%	10 g Blocking Reagent 100 mL de Tampón Maleico
Buffer de Hibridación	50% Formamida 5x SSC Buffer Blocking al 2% 0,1M N-Laurylsarcosina 0,02% SDS Enrasar con H ₂ O
20 X SSC	3 M NaCl 0,3 M Citrato sódico 2- hidrato
T1-Tampón Maleico	0,1 M Ácido Maléico 0,15 M de NaCl, pH 7,5
T3-Tampón de Detección	0,1 M Tris-Cl 0,1 M NaCl

2.- Lavados

Tras finalizar el proceso de hibridación, se procedió a realizar la etapa de lavado, utilizando distintos tampones de lavado (Tabla 3) ejecutada en condiciones de agitación y, en caso de ser necesario, temperatura, llevándose a cabo entonces el proceso en horno de hibridación.

- i. 2 lavados con 50 mL de una solución al 2% de SSC y 0.1% SDS durante 5 min.
- ii. 2 lavados con 50 mL de una solución al 0.1% de SSC y 0.1% de SDS durante 15 min y a 68 °C.
- iii. Lavado con 50 mL de tampón de lavado T1 + 0.3% de Tween 20 durante 5 min.
- iv. Lavado con 50 mL de tampón de lavado T2 (1% de solución bloqueante (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) en tampón de lavado T1) durante 30 min.

- v. Lavado con 50 mL de tampón de lavado T2 + anti-DIG-AP (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) en proporción 1 μ L:10mL durante 30 min.
- vi. 2 lavados con 50 mL de tampón de lavado T1 + 0.3% de Tween 20 durante 15 min.
- vii. Lavado con 50 mL de tampón de equilibrado T3 durante 5- min.
- viii. Lavado con 1 mL de dilución 1:100 con el sustrato quimioluminiscente CDP Star® (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) en tampón de equilibrado T3 durante 2 min.

3.- Revelado

La membrana hibridada fue envuelta en papel de film transparente e introducida en un Hypercassette (AmershamBioscience, Little Chalfont, Reino Unido). Posteriormente, en la cámara de revelado se incorporó la película en el Hypercassette junto a las membranas y se dejó en exposición durante diferentes tiempos, 15 min, 2 h o toda la noche. Transcurrido el periodo de exposición, la película se incubó durante 2 min en soluciones de revelado y fijación.

4.4. Parámetros de Transmisión de ToLCNDV

Se estudió la eficiencia de transmisión y el tiempo mínimo de alimentación necesario para infectar ToLCNDV en plántulas de calabacín y de tomate mediante *B. tabaci*.

4.4.1. Eficiencia de transmisión

Plántulas de tomate de la variedad Marmande (12 días) y plántulas de calabacín de la variedad Victoria F1 (14 días) fueron tratadas con 1, 2, 5, o 20 adultos de *B. tabaci* durante 24 h. Se realizaron veinte repeticiones por cada cantidad de moscas blancas. Se

dispusieron las plántulas en bolsas con cierre hermético, en las que se posteriormente se introdujeron las moscas infectadas a través de una abertura temporal. Las bolsas utilizadas tenían orificios que permitiesen la transpiración de la planta, evitando así la formación de agua de condensación que tiende a limitar el movimiento de las moscas y, por tanto, disminuir la capacidad infectiva, pero no la salida de los insectos. Una vez transcurrido el periodo de 24 h, se extrajeron las plántulas de las bolsas y se eliminaron las moscas blancas por aplastamiento, y tratamiento con un insecticida, Confidor® (Bayer AG, Leverkusen, Alemania) disuelto en agua (en proporciones 1 mL: 1 L), asegurando así la total eliminación de los insectos. Las plántulas se incubaron en cámaras de condición climática controlada. En el caso del calabacín, este suele desarrollarse tras 9 días, mientras que los tomates, un cultivo el periodo post-infección se prolonga algunos días más. La evaluación de infección se realizó mediante la observación de síntomas y por análisis molecular.

4.4.2. Tiempo mínimo de inoculación por alimentación

Se dispusieron adultos de *B. tabaci* virulíferos sobre plántulas de tomate de la variedad Marmande (12 días) y plántulas de calabacín de la variedad Victoria F1 (14 días). La duración de los periodos de alimentación fue de 5 min, 15 min, 30 min, 60min, 6 h, 15 h y 24 h. Se realizaron diez repeticiones por cada duración de tiempo, y 20 moscas por repetición. Para los tiempos entre 5 min y 1 h se dispusieron las plántulas en bolsas con cierre hermético en las que se posteriormente se introdujeron las moscas infectadas a través de una abertura temporal. Para los tiempos entre 6 y 24 h, se utilizaron bolsas con orificios que permitiesen la transpiración de la planta, como se ha descrito anteriormente. Una vez transcurridos los tiempos de alimentación, se extrajeron las plántulas de las bolsas y se eliminaron las moscas blancas por aplastamiento y tratamiento con Confidor. Posteriormente, se mantuvieron las plántulas en cámaras a la

espera del desarrollo del proceso infeccioso, efectuándose la evaluación de infección de forma similar a la descrita en el apartado 4.4.1.

5. Resultados

5.1. Detección de ToLCNDV

La técnica de PCR resultó efectiva a la hora de detectar y amplificar ToLCNDV en muestras tanto de calabacín como de tomate. En la Figura 2 se muestran los geles de las amplificaciones del virus realizadas en extractos de plantas de estas dos especies infectadas por ToLCNDV, y efectuadas en las diluciones seriadas 1/10 del extracto de material genético. En estas últimas se observa el nivel de sensibilidad obtenido, que permite detectar el virus cuando se encuentra presente en baja concentración.

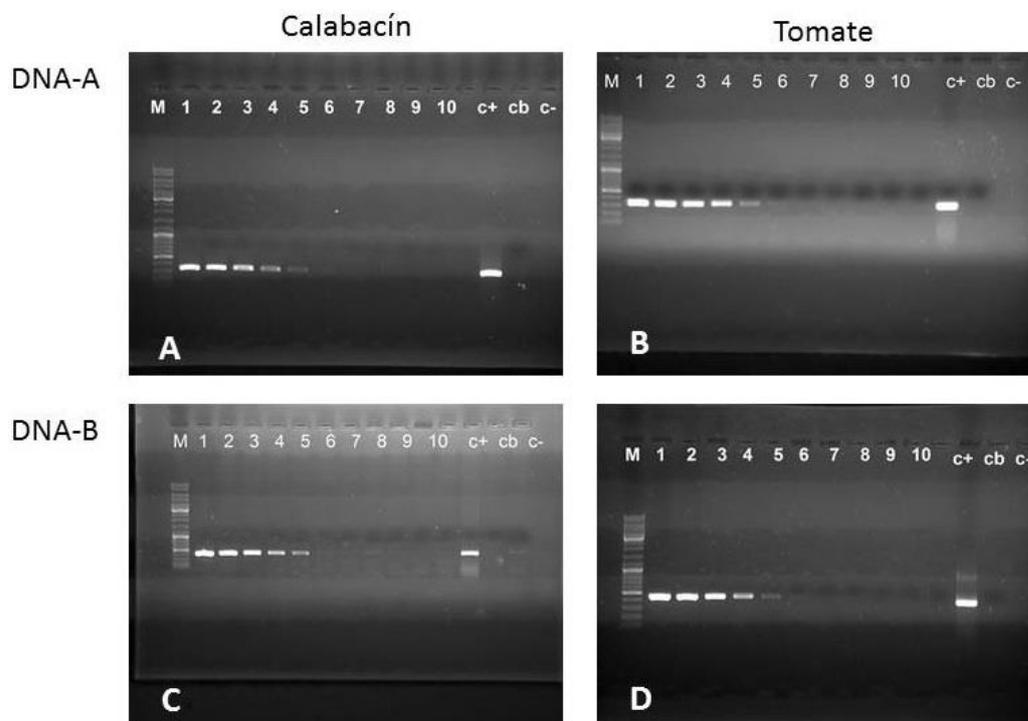


Figura 2. Geles de las muestras amplificadas por PCR de ToLCNDV en diluciones en serie 1/10. La foto A muestra la amplificación de DNA-A de ToLCNDV en calabacín, la foto B idéntico proceso pero utilizando una muestra de tomate, y C y D muestran las amplificaciones del DNA-B del mismo virus en calabacín y tomate respectivamente. C+= Control positivo; Cb=Control blanco; C-=Control sano; M=Marcador molecular (100pb)

También se puede apreciar en la Figura 2 como se consiguieron amplificaciones a partir de muestras con controles positivos, mientras que, como era de esperar, no se observó amplificación alguna a partir de extractos de plantas sanas (control negativo), ni en la muestra carente de extracto de material vegetal (control blanco). Estos resultados avalan la bondad de la técnica empleada y la exactitud de los resultados obtenidos en el ensayo.

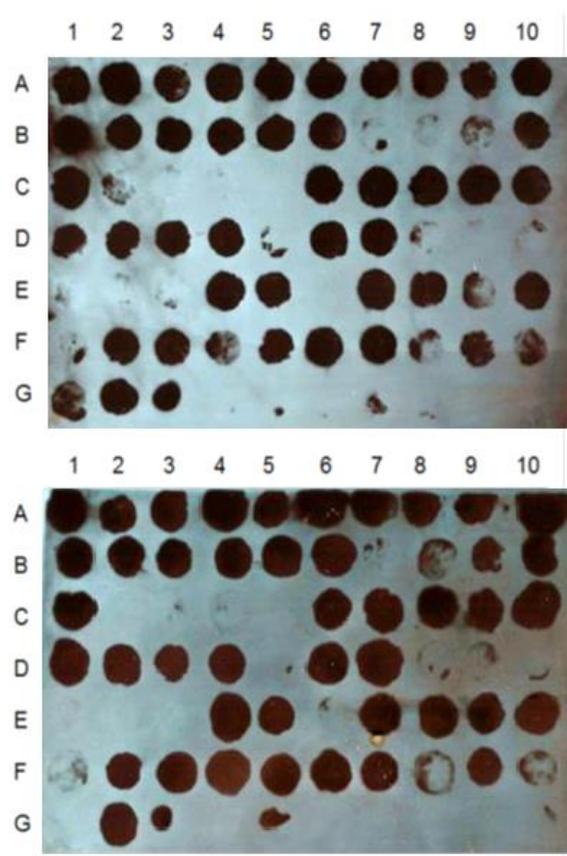


Figura 3. Hibridación molecular de muestras de calabacín durante los ensayos realizados con ToLCNDV usando sondas que hibridan con DNA-A (foto superior) y con DNA-B (Foto inferior). Como control positivo se utilizaron improntas de calabacín infectado (posición G2) y un plasmido conteniendo el genoma de DNA-A y DNA-B (posición G3). Como control negativo se imprimaron plantas sanas (posición G4).

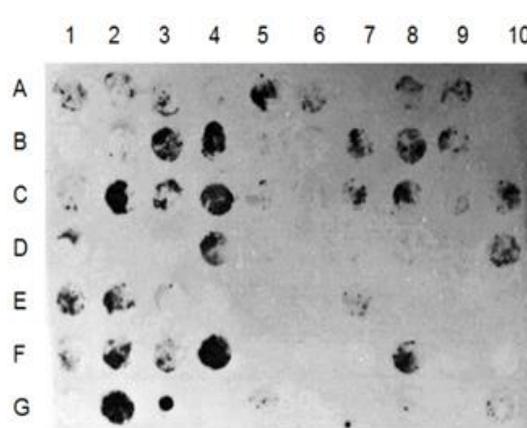


Figura 4. Hibridación molecular de muestras de tomate utilizando sondas de DNA-A de ToLCNDV. Como control positivo se improntó una planta infectada (posición G2) y un plasmido conteniendo plasmido conteniendo el genoma de DNA-A y DNA-B (posición G3). Como control negativo se utilizaron improntas de plantas sanas (posición G4).

La hibridación molecular con sondas genéticas no-radioactivas fue igualmente utilizada de manera exitosa. La Figura 3 muestra el resultado de sondas homólogas a

secuencias de DNA-A y DNA-B en calabacín. Se observa que las improntas de la mayoría de las muestras hibridaron de manera similar con ambas sondas, sugiriendo la correlación de ambos genomas en el desarrollo de la infección en plantas de calabacín, por lo que para la detección se puede utilizar ambas sondas indistintamente. La hibridación molecular también fue aplicada con éxito sobre improntas de tomate (Figura 4), observándose reacción positiva en los controles positivos y ausencia de reacción en los controles sanos.

5.2. Parámetros de transmisión

Grupos de 20 plántulas de calabacín, cv. Victoria F1 (HM. Clause, Francia), y tomate, cv. Marmande (Ramiro Arnedo, S.A., España), fueron inoculadas con ToLCNDV mediante la alimentación de entre 1 y 20 adultos de *B. tabaci* virulíferos, siendo evaluada la infección mediante observación de la expresión de síntomas típicos del virus, y confirmada mediante PCR de extractos de ADN totales. Tan solo un adulto de *B. tabaci* fue suficiente para infectar casi la totalidad de las plantas de calabacín ensayadas con ToLCNDV (19/20), y todas las plántulas (20/20) resultaron infectadas cuando se emplearon en el ensayo entre 2-20 moscas blancas. En cambio, ninguna de las plántulas de tomate se infectó tras alimentación de uno o dos adultos de *B. tabaci*. Fueron necesarias entre cinco y veiente moscas blancas para transmitir el virus a 3 y 6 plántulas de un total de veinte respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5 *Números de plantas infectadas con ToLCNDV (total= 20)*

Especie	Números de adultos de <i>B. tabaci</i>			
	1	2	5	20
Calabacín	19	20	20	20
Tomate	0	0	3	6

Los resultados obtenidos en el ensayo de determinación del tiempo de inoculación se representan en la Tabla 6. Tras observación de síntomas y de análisis de las plántulas por PCR e hibridación con sondas marcadas con digoxigenina, se comprobó que, en el caso del calabacín como hospedador, con tan solo 5 min de alimentación con 20 moscas blancas virulíferas por plántula, la mitad de las plantas resultaron infectadas, alcanzándose el máximo número de plántulas infectadas en el tiempo de inoculación de 15 min. El incremento del tiempo de inoculación generó siempre elevadas proporciones de plántulas infectadas. Los datos sugieren, por tanto, una transmisión altamente eficaz.

Tabla 6. Número de plántulas (total = 10) infectadas tras alimentación con *B. tabaci* durante diferentes tiempos de duración

Tiempo de inoculación	Tomate	Calabacín
24 h	6	10
16 h	8	9
6 h	4	8
60 min	7	10
30 min	3	10
15 min	5	9
5 min	4	5
0 min	0	0

Sin embargo, en el caso de tomate, las tasas de infección fueron más bajas. Con tiempos de 5–30 minutos de alimentación, entre tres y cinco plántulas de diez resultaron infectadas; y para tiempos de 1–24h, 4 y 8 de un total de 10 fueron las plántulas afectadas.

6. Discusión

6.1. Técnicas analíticas utilizadas en la detección

Las infecciones causadas por begomovirus, género al cual pertenece ToLCNDV, frecuentemente originan importantes enfermedades emergentes, que ocasionan graves daños y cuantiosas pérdidas en cultivos hortícolas a nivel mundial (Boulton, 2003; Kaur *et al.*, 2014). Por tanto, se impone un mejor conocimiento de su composición genética y comportamiento biológico, además de los mecanismos de interacción con su insecto vector, para facilitar el desarrollo de estrategias de control eficaces y duraderas. Es decir, un diagnóstico correcto permite desarrollar y evaluar estrategias para el control de la enfermedad.

Para estudiar diferentes aspectos de la biología y epidemiología del virus son necesarias una alta especificidad y sensibilidad en cuanto a la detección del virus en la planta hospedadora. Sumadas a las técnicas clásicas de diagnóstico de virosis y a la caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus, las técnicas de identificación de ácidos nucleicos virales, tales como la hibridación molecular con sondas no radioactivas o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico de diversos virus humanos, animales y vegetales (Mackay *et al.*, 2002). Factores tales como su alta sensibilidad y reproducibilidad sin apenas procesamiento de la muestra, así como su bajo coste hacen de estas últimas técnicas analíticas una herramienta rutinaria para el conocimiento y manejo de los virus.

En el caso del ToLCNDV, la técnica ELISA, a pesar de ser la más utilizada por su sencillez y coste en la detección de numerosos virus, está limitada por la disposición

de antisueros comerciales, que no son monoclonales, los más fiables y específicos y que ofrecen resultados más fáciles de interpretar.

En el presente trabajo, para la detección de ToLCNDV se ha utilizado tanto el diagnóstico por PCR como por hibridación molecular. En el caso del diagnóstico por PCR, las dos parejas de cebadores elegidas han funcionado correctamente para detectar el virus, tanto en calabacín como en tomate. Otros autores han desarrollado y utilizado cebadores degenerados (AV494/AC1048) para detectar begomovirus (Wyatt & Brown, 1996). Sin embargo, su utilidad queda en entredicho, ya que han resultado incapaces de detectar virus como TYLCSV, presentes en los invernaderos de España (Accotto *et al.*, 2000).

En cuanto a hibridación, en este Trabajo se han podido producir sondas genéticas marcadas con digoxigenina y utilizarlas para la detección del virus ToLCNDV en improntas de savia de calabacín y tomate. La técnica de hibridación molecular lleva un par de décadas desarrollada y sigue siendo interesante para la detección de virus en planta, ya que permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras. No obstante, resulta menos sensible que la detección por PCR (Miller y Martin, 1988). Se ha descrito que esta técnica produce óptimos resultados en detección de virus ADN como son los begomovirus (Czosnek *et al.*, 1988).

Las técnicas que detectan los ácidos nucleicos virales (Hull, 1993; Hull y Al-Hakim, 1998) son un complemento a las técnicas serológicas, ya que detectan distintas partes del virus. Las sondas utilizadas en las hibridaciones moleculares pueden representar diversas partes del genoma o éste al completo, lo cual ofrece posibilidades para el estudio de las relaciones taxonómicas entre virus. Además, con estas técnicas ha sido posible el diagnóstico de satélites y viroides, que al carecer de proteínas

estructurales propias, son indetectables por técnicas serológicas. Estas técnicas son también imprescindibles, por su mayor sensibilidad, cuando la concentración de virus en planta es muy baja, pero significativa desde el punto de vista fitopatológico. (Anderson y Young, 1985; Arnott *et al.*, 1975; Czosnek *et al.*, 1990). En resumen, el desarrollo de estas técnicas de diagnóstico molecular suministra una valiosa herramienta para la detección temprana y precisa de begomovirus en plantas, por lo que durante los últimos años numerosos estudios han centrado su objetivo en el diseño de sondas específicas, validación y comparación de estas técnicas de diagnóstico en laboratorios dedicados al estudio etiológico y molecular de fitovirus. (Davino *et al.*, 2007. Montreal *et al.*, 2005).

6.2. Parámetros de infección: Eficiencia y tiempo de inoculación

Este trabajo avala el postulado de que las especies que actúan como hospedadoras se comportan de manera diferente en cuanto al desarrollo de la infección por ToLCNDV. Así lo confirman los ensayos realizados, según los cuales, la eficiencia de la transmisión del virus difiere de forma importante en función de la especie vegetal utilizada. En este sentido, se detectó una eficiencia de casi el 100% de transmisión del virus-agente con una sola mosca en plantas de calabacín. Este resultado se asemeja a lo descrito recientemente para este virus en un ensayo realizado con un aislado procedente de berenjena, donde se constató una eficiencia del 90% con una sola mosca en planta de calabaza (Sohraba *et al.*, 2014). Para otros begomovirus, como el monopartito TYLCV, o el bipartito *Squash leaf curl virus*, se han publicado resultados similares, siendo un solo ejemplar de mosca blanca capaz de infectar plantas de tomate después de un tiempo de adquisición del virus de 24 h, con una eficiencia de la transmisión del 100% de las

plantas expuestas al vector cuando se incrementó el número de insectos hasta 5-15 (Cohen *et al.*, 1983, 1989; Czosnek *et al.*, 2001).

Sin embargo, en nuestros ensayos fueron necesarias al menos cinco moscas blancas para infectar el 15% de las plántulas de tomate y 20 moscas para infectar el 30%. Aunque con valores algo superiores a los resultados descritos en el presente trabajo, Sohraba *et al.* (2014) también observaron tasas de infección más bajas, entre un 50-60%, cuando se utilizaron plantas de tomate como hospedadoras del virus aislado a partir de berenjena.

Comparando ambos hospedadores, la eficiencia en tomate es bastante inferior a la observada en calabacín, y posiblemente sea necesaria una mayor cantidad de partículas virales para llegar alcanzar los mismos porcentajes de infección que en otras especies sensibles.

El supuesto de que la especie hospedadora influya en el desarrollo de la infección se confirmó con el segundo de los ensayos realizados, ya que ambas especies se comportaron de una manera diferente en cuanto al tiempo de inoculación por alimentación. Así, en calabacín se observó que cinco minutos son suficientes para que la mosca blanca infecte a la planta, alcanzándose después de 15-30 min el 100% de infección sobre la población.

En tomate también se observaron plantas infectadas tras cinco minutos de inoculación. Sin embargo, para alcanzar mayores tasas de infección (sin llegar nunca al 100%) fueron necesarios tiempos más largos, concretamente horas en lugar de minutos. Estos resultados ratificaron los observados en el caso de la eficiencia, según los cuales con una población de 20 moscas por plántula, tampoco se llegó al 100% de infección.

El resultado obtenido en el tiempo de inoculación para el calabacín contrasta con datos descritos en bibliografía para un grupo de begomovirus llamados *Tomato leaf curl diseases*, entre los que se encontraría incluido ToLCNDV. Dichos estudios indican un tiempo mínimo de inoculación de 30 min (Chakraborty, 2009). De forma general, se aceptan tiempos de inoculación entre 10-60 minutos para begomovirus (Rosen *et al.*, 2015), o incluso rangos más restringidos, como los mostrados por la especie representativa de los begomovirus, TYLCV, que varían entre 15-30 minutos (Ghanim, 2014).

Estas diferencias entre los datos observados en la bibliografía y los obtenidos en el ensayo podrían deberse a un factor que intervenga en la transmisión, ya sea el vector, el hospedador o las condiciones en las que se produce la transmisión. En el caso de factores dependientes del vector, el uso de diferentes biotipos de la mosca blanca como vector virulífero o elementos como la edad o el género de la población, podrían afectar de forma considerable la tasa de transmisión (Ghanim, 2014). Así, en un ensayo realizado con el begomovirus monopartito *Tomato leaf curl virus Bangalore* (ToLCV-Ban4) se determinó mayor eficiencia de transmisión para una sola hembra de mosca blanca (un 95%) que para un solo ejemplar macho (25%) (Muniyappa *et al.*, 2000). Similares diferencias entre hembras y machos se han constatado para otros begomovirus como es el caso del denominado virus *Chino del tomate* (Idris *et al.*, 2001).

Basándonos en los resultados obtenidos, se podría estimar que en la eficiencia de la transmisión del virus en calabacín (cercana al 100%) el sexo del vector no es un factor de influencia. Sin embargo, no se puede descartar que si ejerza dicha influencia en la transmisión en tomate, como ocurre en el citado caso de ToLCV-Ban4. En todo caso, es probable que en el caso de ToLCNDV, los factores dependientes del vector, el

insecto, sean predominantes a la hora de asegurar la eficacia de la transmisión (Rosen *et al.*, 2015).

Los resultados aquí descritos explican en parte las situaciones advertidas en invernaderos de Almería desde la entrada el virus en España. Productores de calabacín informaban de la aparición de infecciones por ToLCNDV sin advertir apenas presencia de mosca blanca. Estas observaciones dispararon las especulaciones sobre la transmisibilidad del virus por semilla como posible origen de las infecciones en los cultivos. Sin embargo, y teniendo en cuenta que aún no se ha escrito la transmisión de begomovirus por semilla, es más plausible que las infecciones observadas en calabacín hayan sido provocadas por transmisión desde el vector, dada la eficacia que presenta el virus en este sentido, ya que basta con una sola mosca que se alimente durante 5 minutos.

En cuanto a tomate, durante el otoño de 2013 se observó la aparición de nuevos síntomas en este tipo de cultivo (Homo agrícola, 2013). El presente trabajo confirma que el tomate puede actuar como hospedador de ToLCNDV (Ruiz *et al.*, 2015), y a pesar de que la transmisión en esta especie es menos eficiente, los tiempos de inoculación están dentro del rango de tiempo descrito para otros begomovirus. Posiblemente, la menor eficiencia de transmisión y los mayores tiempos de inoculación necesarios para infectar a tomate, explican por qué no existe gran alarma por este virus en sus cultivos. Recientemente, un trabajo realizado en invernaderos de Murcia ha establecido lo difícil que resulta proteger cultivos de tomate frente a virus como TYLCV mediante mallas excluyentes de mosca blanca, estableciendo una clara diferencia entre virus de transmisión persistente (como los begomovirus) y semi-persistente (como los crinivirus). (Velasco *et al.*, 2008). La transmisión semi-persistente conlleva que el vector vaya perdiendo el virus conforme pasa el tiempo alimentándose;

esto puede ser cuestión de un par de días, ya que el virus no pasa el tracto alimentario sino que permanece a nivel de estilete y en la parte inicial de tracto alimentario. La transmisión persistente implica que el virus atraviesa el tracto y migra hacia las glándulas salivares, desde donde es inyectado en la plantas durante la alimentación. El vector suele ser infectivo de por vida (persistente). Los estudios de Velasco *et al.* (2008) mostraron que virus transmitidos de manera semi-persistente pueden ser controlados en cultivos de tomate basándose en medidas físicas (mejor cerramiento del invernadero). Sin embargo, para controlar el virus de cuchara, TYLCV, la exclusión del vector tiene que ser absoluta, y requiere de invernaderos mejor equipados y con mayor grado de aislamiento.

Nuestros resultados sugieren que, siempre y cuando se apliquen las herramientas de control biológico y aislamiento físico, se podrían proteger los cultivos de tomate frente a ToLCNDV, en vista de la menor eficiencia de transmisión y el mayor tiempo de inoculación necesarios para que *B. tabaci* infecte a las plantas. Sin embargo, dada la alta eficiencia de transmisión y el reducido tiempo de inoculación de ToLCNDV en calabacín, este cultivo demanda especial cuidado; posiblemente, sea necesario optimizar las técnicas de control biológico en este cultivo de poca duración, y se deban utilizar todos los medios posibles para proteger las plantas frente la mosca blanca, por ejemplo cubriendo las plantas con una manta térmica, sobre todo en la fase inicial del cultivo.

7. Conclusiones

1. Técnicas de detección molecular como la PCR y la hibridación molecular con sondas genéticas han sido aplicadas con éxito tanto en calabacín como en tomate.
2. La eficacia de transmisión del virus ToLCNDV se encuentra altamente influida por la especie vegetal que actúe como hospedadora. Así, el calabacín muestra una alta sensibilidad en comparación al tomate, que requiere la presencia de una mayor población del vector.
3. El tiempo de inoculación también queda determinado por la especie hospedadora, de manera que periodos de minutos bastan para que la planta de calabacín se vea infectada, mientras que en el caso del tomate han de transcurrir horas.
4. El virus ToLCNDV supone un riesgo potencial para el cultivo del calabacín, especie sobre la que muestra capacidad para provocar graves daños.

8. Bibliografía

- Accotto, G., Navas-Castillo, J., Noris, E., Moriones, E., & Louro, D. (2000). Typing of Tomato Yellow Leaf Curl Viruses in Europe. *European Journal of plant pathology*, 106(2), 179-186.
- Aguilera, A.M. (2013). *Noticias sobre el ToLCNDV*. Recuperado de: <http://elhocinoadra.blogspot.com.es/2013/10/noticias-sobre-el-tolcndv-una-de-cal-y.html>
- Anderson, M. & Young, B. (1985). Quantitative filter hybridization. En Hames, B. & Higgins, S. *Nucleic acid hybridization: A practical approach*. (pp. 73-111). Oxford, UK: IRL Press.
- Arnott, S., Chandrasekaran, R. & Selsing, E. (1975). The variety of polynucleotide helices. En *Structure and conformation of nucleic acids and protein-nucleic acid interactions*. (577-596) Baltimore: University Park Press.
- Borah, B. K., & Dasgupta, I. (2012). Begomovirus research in India: A critical appraisal and the way ahead. *Journal of biosciences*, 37(4), 791-806.
- Boulton, I.M. (2003). Geminiviruses: major threats to world agriculture. *Annals of applied biology*, 142(2) 143.
- Briddon, R. & Stanley, J. (2009) Geminiviridae. En *Encyclopedia of life sciences (ELS)* John Wiley & Sons, Ltd:Chichester
- Briddon, R. W., Patil, B. L., Bagewadi, B., Nawaz-ul-Rehman, M. S., & Fauquet, C. M. (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 97.
- Chakraborty, S. (2009). Tomato leaf curl viruses from India. Van Regenmortel, M. H., & Mahy, B. W. (Eds.). *Desk Encyclopedia of Plant and fungal virology*, 339-347. Spain : Academic Press.
- Cohen, S., Duffus, J.E., Larsen, R.C., Liu, H.Y. & Flock, R.A. (1983). Purification, serology, and vector relationships of Squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology*, 73, 1669-1673.
- Conserjería de Agricultura y Pesca. Dirección general de planificación y análisis de mercados. Junta de Andalucía. (2009) *Estadísticas e informes. Caracterización de la situación financiera del sector hortícola de Almería 2007/08*. Recuperado de: <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/servicios/estadisticas/estudios-e-informes/agricultura/cultivos-hortícolas-protegidos/hortalizas/caracterizacion-situacion-financiera-almeria-2007-08.html>
- Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Secretaría de Agricultura y Alimentación. Junta de Andalucía. (2015a) *Estadísticas e informes. El sector Agrario y Pesquero en Andalucía*. Recuperado de: <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/servicios/estadisticas/estudios-e-informes/el-sector-agrario-en-andalucia.html>
- Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía. (2015b) *Comercio Exterior. Exportaciones e Importaciones Agroalimentarias*. Recuperado de: <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/servicios/estadisticas/estadisticas/agrarias/comercio-exterior/index.html>
- Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía. (2012) *Anuarios de estadísticas agrarias y pesqueras de Andalucía*. Epígrafes 5.6 Hortalizas. Recuperado de: <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturay>

esca/portal/servicios/estadisticas/estadisticas/
agrarias/anuario/anuario_estadisticas.html

Conserjería de Agricultura, Pesca y
Desarrollo Rural. Junta de Andalucía.
Delegación territorial de Almería. (2013)
*Ficha fitopatológica del Virus del rizado de
Nueva Delhi*. Recuperado de:
[http://www.juntadeandalucia.es/agriculturay
esca/raif/fichas_fitopatologicas/index.html](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturay
esca/raif/fichas_fitopatologicas/index.html)

Czosnek, B., Czosnek, H., Navot, N. &
Laterrot, H. (1990). Geographical distribution
of tomato yellow leaf curl virus. A first
survey using a specific DNA probe.
Phytopathologia.mediterranea. 29: 1-6.

Czosnek, H., Ber, R., Navot, N., Zamir, D.,
Antignus, Y. & Cohen, S. (1988). Detection
of tomato yellow leaf curl virus in lysates of
plants and insects by hybridization with a
viral DNA probe. *Plant disease*, 72(11), 949-
951.

Czosnek, H.G., Ghanim, M., Rubistein, G.,
Morin, S., Fridman, V. & Zeidan, M. (2001).
Whiteflies: Vectors, and victims (?), of
geminiviruses. *Advances in virus research*,
57, 291-322.

Davino, S., Davino, M. & Accotto, G. P.
(2007). A single-tube PCR assay for
detecting viruses and their recombinations
that cause tomato yellow leaf curl disease in
the Mediterranean basin. *Journal of
virological methods* 147(1), 93-98.

EPPO/CABI. (2015) *Data Sheet on
Quarantine Pests. Bemisia tabaci*.
Recuperado de:
[http://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/
Bemisia_tabaci/BEMITA_ds.pdf](http://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/
Bemisia_tabaci/BEMITA_ds.pdf)

Ministerio de Agricultura, Pesca y
Alimentación. (2006) *Hechos y cifras de la
agricultura, la pesca y la alimentación en
España*. Capitulo IX. Superficies y
producciones agrícolas. (8º edición) Madrid.

Ghanim, M. (2014). A review of the
mechanisms and components that determine
the transmission efficiency of *Tomato yellow
leaf curl virus* (Geminiviridae; *Begomovirus*)
by its whitefly vector. *Virus research*, 186,
47-54.

Hull, R. & Al-Hakim, A. (1988). Nucleic
acid hybridization in plant virus diagnosis
and characterization. *Trends in
biotechnology*, 6(9), 213-218.

Hull, R. (1993). Nucleic acid hybridization
procedures. En Matthews, R.E.F. *Diagnosis
of plant virus diseases* (pp. 253-271). Florida:
CRC Press.

Idris, A.M., Smith, S.E. & Brown, J.K.
(2001) Ingestion, transmission and
persistence of Chino del tomate virus
(CdTV), a New World begomovirus, by Old
and New World biotypes of the whitefly
vector *Bemisia tabaci*. *Annals of applied
biology*. 139, 145-154.

Juárez, M., Tovar, R., Fiallo-Olivé, E.,
Aranda, M. A., Gosálvez, B., Castillo, P. &
Navas-Castillo, J. (2015). First detection of
tomato leaf curl New Delhi virus infecting
zucchini in Spain. *Plant disease* 98(6), 857.

Kaur, H., Yadav, C. B., Alatar, A. A., Faisal,
M., Jyothsna, P., Malathi, V. G., & Praveen,
S. (2014). Gene expression changes in tomato
during symptom development in response to
leaf curl virus infection. *Journal of plant
biochemistry and biotechnology*, 24, 1-8.

Mackay, I.M., Arden, K.E. & Nitsche, A.
(2002). Real-Time PCr in virology. *Nucleic
acids research*. 30(6), 1292-1305.

Markham, P. G., Bedford, I. D., Liu, S., &
Pinner, M. S. (1994). The transmission of
geminiviruses by *Bemisia tabaci*. *Pesticide
Science*, 42(2), 123-128.

Miller, S. A. & Martin, R. R. (1988)
Molecular Diagnosis of Plant Disease.

- Annual Review of phytopathology*, 26(1), 409-432.
- Cohen, S., Duffus, J.E. & Liu, H.Y., (1989) Acquisition, interference, and retention of cucurbit leaf curl viruses in whiteflies. *Phytopathology* 79(1) 109-113.
- Monreal Vargas, C.T., Alpuche Solís, A.G. & Argüello Astorga, G.R. (2005) *Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas*. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11627/187>
- Muniyappa, V., Venkatesh, H.M., Ramappa, H.K., Kulkarni, R.S., Zeidan, M., Tarba, C. Y., Ghanim, M. & Czosnek, H. (2000) Tomato leaf curl from Bangalore (ToLCV-Ban4): sequence comparison with Indian ToLCV isolates, detection in plants and insects, and vector relationships. *Archives of Virology* 145(8), 1583-1598.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., & Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual review of phytopathology*, 49, 219-248.
- Oliveira, M. R. V., Henneberry, T. J., & Anderson, P. (2001). History, current status, and collaborative research projects for Bemisia tabaci. *Crop protection*, 20(9), 709-723.
- Rojas, M. R., & Gilbertson, R. L. (2008). Emerging plant viruses: a diversity of mechanisms and opportunities. *Plant virus evolution* (pp. 27-51). Springer Berlin Heidelberg.
- Rosen, R., Kanakala, S., Kliot, A., Pakkianathan, B. C., Farich, B. A., Santana-Magal, N., Elimelech, M., Kontsedalov, S., Lebedev, G., Cilia, M. & Ghanim, M. (2015). Persistent circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *Current opinion in virology*. 15, 1-8.
- Ruiz, L., Simón, A., Velasco, L., García, C., & Janssen, D. (2015). First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting tomato in Spain. *Plant disease*, 99(6), 894.
- Sivalingam, P. N., & Varma, A. (2012). Role of betasatellite in the pathogenesis of a bipartite begomovirus affecting tomato in India. *Archives of virology*, 157(6), 1081-1092.
- Sohraba, S.S., Karim, S., Varma, A., Azhara, E.I., Abuzenadaha, A.M. & Mandal, B. Sap transmission of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting sponge gourd in northern India. *Journal of plant interactions*. 9, 241-248.
- Velasco, L. (2015). *Los virus en los cultivos hortícolas protegidos del sureste español desde una perspectiva histórica*. Recuperado de: <http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/133293-virus-en-cultivos-hortícolas-protegidos-del-sureste-español-desde-perspectiva-histórica.html>
- Velasco, L., Simón, B., Janssen, D. & Cenís J.L. (2008). Incidences and progression of tomato chlorosis virus disease and tomato yellow leaf curl virus disease in tomato under different greenhouse covers in southeast Spain. *Annals of applied biology*. 153, 335-344.
- Vurro, M., Bonciani, B., & Vannacci, G. (2010). Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: impact on agriculture and socio-economic consequences. *Food security*, 2(2), 113-132.
- Wyatt, S. D. & Brown, J. K. (1996). Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86(12), 1288-1293.

**Figura1.Izq.*

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/com
mons/0/01/Bemisia_tabaci_from_USDA_1.jp
g.](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/01/Bemisia_tabaci_from_USDA_1.jpg)

**Figura1.Der.*

[http://escalera.bio.ucm.es/usuarios/ea/sesion
es.php?sesion=23&bloque=1](http://escalera.bio.ucm.es/usuarios/ea/sesion.es.php?sesion=23&bloque=1)