



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Detección y Caracterización de Virus
Epidemiológicamente Relevantes
en Cultivos de Tomate y Cucurbitáceas**

D^a Covadonga Torre Guardiola
2019



ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Detección y caracterización de virus epidemiológicamente relevantes en cultivos de tomate y cucurbitáceas

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor con
Mención Industrial por la Universidad de Murcia

Covadonga Torre Guardiola

2019

Directores de la Tesis:

Dr. Miguel A. Aranda Regules

Profesor de Investigación CEBAS-CSIC

Dr. Jesús Agüero González

Responsable I+D+I Abiopep S.L.

Dra. Yolanda Hernando Saiz

Directora IRP de Abiopep S. L.

Tutor de la Universidad de Murcia:

Dr. Miguel A. Aranda Regules

Profesor de Investigación CEBAS-CSIC

Índice

Índice de Contenidos

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen i

Acrónimos v

Introducción 1

1. Los virus como patógenos de plantas **3**

2. Principales métodos para la detección y diagnóstico de virus de plantas **4**

2.1. Métodos convencionales 4

2.1.1. Observación de síntomas 4

2.2.2. Pruebas de infectividad o bioensayos 5

2.2. Métodos serológicos 6

2.3. Métodos basados en ácidos nucleicos 7

2.3.1. Hibridación molecular 7

2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes 8

2.3.3. PCR o RT-PCR en tiempo real 9

2.3.4. Amplificación isoterma 11

2.3.5. Secuenciación nucleotídica 13

3. Variabilidad y evolución de virus de plantas **15**

3.1. Mecanismos de variación genética 15

3.2. Mecanismos que determinan la estructura genética de las poblaciones virales 18

4. Transmisión de virus por semilla **19**

5. Principales virosis de tomate **22**

6. Principales virosis de cucurbitáceas **23**

7. Virus estudiados en esta tesis **24**

7.1. Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV 24

7.2. Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV 28

7.3. Squash mosaic virus, SqMV 30

7.4. Melon necrotic spot virus, MNSV 32

Objetivos 37

Capítulo I. Caracterización de begomovirus muestreados durante epidemias agresivas de rizado amarillo en variedades de tomate portadoras del gen Ty-1 **41**

I.1. Introducción	43
I.2. Materiales y métodos	44
I.2.1. Muestras	44
I.2.2. Extracción de ADN y detección de geminivirus mediante PCR	46
I.2.3. Secuenciación	46
I.2.3.1. Secuenciación masiva (<i>High throughput sequencing</i> , HTS)	46
I.2.3.2. Clonaje y secuenciación de tipo Sanger	47
I.2.4. Análisis de las secuencias	48
I.2.4.1. Análisis de las secuencias obtenidas en los muestreos de 2015 y 2016	48
I.2.4.2. Análisis de las secuencias obtenidas en el muestreo de 2017	50
I.2.5. Clon infectivo	50
I.2.6. Ensayo de acumulación	51
I.2.7. Análisis estadístico	54
I.3. Resultados	54
I.3.1. Epidemias agresivas de TYLCV en cultivos de tomate resistente durante 2015 - 2016 en Murcia	54
I.3.1.1. Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas	54
I.3.1.2. Análisis filogenético de los aislados murcianos muestreados durante 2015 – 2016	59
I.3.1.3. Preparación del clon agroinfectivo pTYLCV-Mu15	66
I.3.1.4. Comparación de TYLCV-Mu15 con TYLCV-IS76	66
I.3.2. Epidemias agresivas de TYLCV en cultivos de tomate resistente durante 2017 en Almería	71
I.4. Discusión	74
I.5. Bibliografía	80

Capítulo II. Puesta a punto de la técnica de RT-qPCR TaqMan para la detección de tres virus de cucurbitáceas transmitidos por semilla **87**

II.1. Introducción	89
II.2. Materiales y métodos	90
II.2.1. Material vegetal	90
II.2.2. Preparación de las muestras y extracción de ARN	90
II.2.3. Diseño de sondas e iniciadores	91
II.2.4. Preparación de plásmidos y rectas patrón	93
II.2.4.1. Síntesis de ADN complementario (ADN _c) mediante transcripción reversa (RT) y PCR	93

II.2.4.2. Clonaje	94
II.2.4.3. Transcripción y generación de rectas patrón para los tres virus	95
II.2.5. Análisis por RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) con sonda en un solo paso (One-step)	96
II.2.6. Protocolo ELISA de doble sándwich (DAS_ELISA)	97
II.2.7. Sensibilidad y Especificidad	98
II.2.8. Bioensayo	98
II.3. Resultados	99
II.3.1. Obtención y evaluación de lotes de semilla infectados	99
II.3.2. Diseño y evaluación de un ensayo de RT-qPCR en un solo paso con sonda TaqMan para CGMMV, SqMV y MNSV	101
II.3.2.1. Diseño de combinaciones de iniciadores y sonda	101
II.3.2.2. Eficiencia	102
II.3.2.3. Sensibilidad analítica	103
II.3.2.4. Especificidad analítica	105
II.3.2.5. Evaluación de un ensayo “dúplex” con un control endógeno como control de calidad de la muestra	106
II.3.3. Estudio comparativo entre DAS-ELISA y RT-qPCR con sonda TaqMan en semilla infectada con CGMMV y SqMV	107
II.3.3.1. Evaluación en lotes de semilla	107
II.3.3.2. Análisis comparativo de DAS-ELISA frente a RT-qPCR/sonda en diluciones seriadas de un lote de semilla infectado	108
II.3.4. Bioensayo	109
II.3.4.1. Test de inoculación	109
II.3.4.2. Ensayo de germinación en lotes de semilla infectados con CGMMV	110
II.4. Discusión	111
II.5. Bibliografía	116
Conclusiones generales	121
Bibliografía	125
Anexo	153

Índice de Figuras

Introducción

Figura 1. Diferentes síntomas inducidos por virus de plantas.....	3
Figura 2. Tipos de ELISA.....	7
Figura 3. Tecnología TaqMan.....	11
Figura 4. Amplificación en círculo rodante (RCA).....	13
Figura 5. Estructura del virión y organización genómica de TYLCV.....	25
Figura 6. Estructura del virión y organización genómica de CGMMV.....	28
Figura 7. Estructura del virión y organización genómica de SqMV.....	30
Figura 8. Estructura del virión y organización genómica de MNSV.....	33

Capítulo I

Figura 9. Detección de geminivirus mediante PCR y resultados del RCA/RFLP.....	57
Figura 10. Análisis de identidad por pares a partir de genomas completos de TYLCV.....	58
Figura 11. Análisis filogenéticos a partir de genomas completos de TYLCV.....	61
Figura 12. Alineamiento de la región intergénica de distintos aislados de TYLCV.....	62
Figura 13. Análisis filogenético a partir de secuencias parciales de TYLCV-IL.....	63
Figura 14. Análisis Bayesiano a partir de genomas completos de TYLCV, excluyendo regiones recombinantes.....	65
Figura 15. Síntomas en plantas de tomate susceptibles y resistentes inoculadas con los clones infectivos TYLCV-IS76, pTYLCV-Mu15 y TYLCV-IL en infección simple y en infecciones mixtas.....	67
Figura 16. Medidas de plantas de tomate susceptibles y resistentes inoculadas con los clones infectivos en infección simple y mixta, medidas a 30 dpi.....	69
Figura 17. Acumulación de ADN viral en plantas susceptibles y resistentes inoculadas con los clones infectivos en infección simple y mixta, medidas a 10 y 30 dpi.....	70
Figura 18. Diagrama ilustrando el evento de recombinación de las secuencias de TYLCV-IS76 de Almería secuenciadas en 2017.....	72

Figura 19. Análisis filogenético de secuencias parciales de TYLCV para identificar el evento de recombinación de las secuencias de TYLCV-IS76 de Almería secuenciadas en 2017	74
--	----

Capítulo II

Figura 20. Alineamientos de secuencias generados para CGMMV, SqMV y MNSV.....	92
Figura 21. Síntomas de plantas inoculadas con CGMMV, SqMV y MNSV	100
Figura 22. Estimación del tiempo óptimo de lectura para los análisis de DAS-ELISA, obtenido para CGMMV, SqMV y MNSV	101
Figura 23. Rectas patrón realizadas por RT-qPCR/sonda, obtenidas a partir de transcritos <i>in vitro</i> de CGMMV, SqMV y MNSV	103
Figura 24. Análisis de sensibilidad realizados por RT-qPCR/sonda en hoja y semilla infectadas con CGMMV, SqMV y MNSV	104
Figura 25. Análisis de especificidad realizados por RT-qPCR/sonda en hoja y semilla infectadas con CGMMV, SqMV y MNSV	106

Índice de Tablas

Introducción

Tabla 1. Métodos de diagnóstico certificados para la identificación de virus en semilla	21
--	----

Capítulo I

Tabla 2. Resumen del muestreo realizado localizaciones de Murcia y Almería en plantas de tomate resistentes con síntomas atribuibles a TYLCV	45
Tabla 3. Diseño del experimento de acumulación para la evaluación del clon infectivo obtenido en este trabajo	52
Tabla 4. Iniciadores y condiciones de la qPCR	54
Tabla 5. Resultados de HTS de las muestras de 2015	56
Tabla 6. Análisis de diversidad nucleotídica	66
Tabla 7. Resultados del análisis del RDP (<i>Recombination detection program</i>)	72

Capítulo II

Tabla 8. Iniciadores y sondas utilizados	93
Tabla 9. Valores obtenidos en la RT-qPCR dúplex	107
Tabla 10. Comparación de la sensibilidad obtenida por RT-qPCR/sonda y DAS-ELISA en lotes de semilla	108
Tabla 11. Comparación de la sensibilidad obtenida por RT-qPCR/sonda y DAS-ELISA en la detección de CGMMV y SqMV en diluciones seriadas de extractos de semillas infectadas	109

Resumen

El tomate y las cucurbitáceas se encuentran entre las hortalizas cultivadas más importantes y España es uno de sus principales productores mundiales. Las virosis suponen una seria amenaza para estos cultivos y pueden llegar a producir importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Dada la dificultad para controlar las enfermedades virales, es esencial disponer de técnicas de detección adecuadas que permitan, no sólo monitorizar el desarrollo de una enfermedad, sino implementar adecuadamente medidas preventivas y de contención. El empleo de variedades resistentes y la utilización de material vegetal libre de virus se encuentran entre las principales medidas de protección contra las virosis. En este contexto se ha desarrollado el trabajo de esta tesis, que está estructurada en dos capítulos.

En el primer capítulo se describe un estudio epidemiológico en torno a brotes epidémicos agresivos atribuibles a la enfermedad del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) en plantas de tomate portadoras de los genes de resistencia a TYLCV, realizado durante los años 2015 y 2016 en Murcia y durante el año 2017 en Almería. Utilizando técnicas de secuenciación masiva (2015) y clonaje y secuenciación de tipo Sanger (2016 y 2017), se determinaron un total de 28 secuencias de TYLCV completas. Los análisis filogenéticos realizados mostraron que todas las secuencias obtenidas pertenecían a aislados de TYLCV de la cepa Israel (TYLCV-IL). Un primer análisis realizado con las secuencias de 2015 y 2016 mostró la existencia de dos grupos de aislados, uno emparentado con aislados de la cepa Israel antiguos en la zona, y otro grupo, de reciente introducción, emparentado con aislados recombinantes marroquíes, denominados TYLCV-IS76. Un clon infectivo generado a partir de una de las secuencias de este segundo grupo fue utilizado en un ensayo de eficacia biológica frente a TYLCV-IS76, en el que se observó que en infección mixta predominó IS76, mientras que en infección simple el aislado murciano aventajó al recombinante. En el análisis de las secuencias de 2017, se identificó por primera vez la presencia de aislados del tipo de TYLCV-IS76, siendo la única evidencia de aislados recombinantes de este tipo identificados fuera de Marruecos.

En el segundo capítulo de esta tesis se describe la puesta a punto de la técnica de RT-qPCR combinada con sondas TaqMan para la detección de 3 virus de cucurbitáceas transmitidos por semilla, el virus del mosaico jaspeado verde del pepino (cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV; familia *Virgaviridae*, género

Tobamovirus), el virus del mosaico de la calabaza (squash mosaic virus, SqMV; familia *Secoviridae*, género *Comovirus*) y el virus de las manchas necróticas del melón (melon necrotic spot virus; familia *Tombusviridae*, género *Gammacarmovirus*), y su comparación con la técnica de ELISA, que es la principal técnica utilizada en los análisis de certificación. Con esta técnica se pudo detectar a los tres virus con una gran sensibilidad y especificidad, abriendo la posibilidad a la realización de análisis múltiples. La comparación con la técnica ELISA, realizada únicamente con semillas infectadas con SqMV y CGMMV, mostró una sensibilidad superior, a nivel de lote de semilla y a nivel de límite de detección, demostrándose su idoneidad para la utilización en análisis de semilla.

En conjunto, los resultados de esta tesis han permitido, por un lado, proporcionar información sobre la situación actual de las epidemias de TYLCV en España, y, por otro lado, diseñar un método rápido y sensible para la detección de 3 virus transmitidos por semilla en cucurbitáceas, abriendo la posibilidad de su implementación en futuros programas de certificación.

Acrónimos

ACRÓNIMOS DE VIRUS

ACMV	African cassava mosaic virus Virus africano del mosaico de la mandioca
BPYV	Beet pseudoyellows virus Virus del falso amarilleo de la remolacha
CABYV	Cucumber aphid-borne yellows virus Virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones
CGMMV	Cucumber green mottle mosaic virus Virus del mosaico verde jaspeado del pepino
CLBV	Citrus leaf blotch virus Virus del manchado foliar de los cítricos
CLCuBuV	Cotton leaf curl Burewala virus Virus del rizado de la hoja de algodón de Burewala
CMV	Cucumber mosaic virus Virus del mosaico del pepino
CVYV	Cucumber vein yellowing virus Virus de las venas amarillas del pepino
CYSDV	Cucurbit yellow stunting disorder virus Virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas
LBVaV	Lettuce big-vein associated virus Virus asociado a las venas gruesas de la lechuga
MCMV	Maize chlorotic mottle virus Virus del moteado clorótico del maíz
MiLBV	Mirafiori lettuce big-vein virus Virus de las venas gruesas de la lechuga Mirafiori
MNSV	Melon necrotic spot virus Virus de las manchas necróticas de melón
PEBV	Pea early browning virus Virus del oscurecimiento precoz del guisante
PepMV	Pepino mosaic virus Virus del mosaico del pepino dulce
PMMoV	Pepper mild mottle virus Virus moteado atenuado del pimiento

PPV	Plum pox virus
PPV	Virus de la Sharka
PRSV	Papaya ringspot virus
	Virus de las manchas anulares de la papaya
PSbMV	Pea seed-borne mosaic virus
	Virus del mosaico del guisante transmitido por semilla
SqMV	Squash mosaic virus
	Virus del mosaico de la calabaza
STV	Southern tomato virus
	Virus meridional del tomate
TICV	Tomato infectious chlorosis virus
	Virus de la clorosis infecciosa del tomate
TMV	Tobacco mosaic virus
	Virus del mosaico del tabaco
ToBRFV	Tomato Brown rugose fruit virus
	Virus de las rugosidades marrones del fruto de tomate
ToCV	Tomato chlorosis virus
	Virus de la clorosis del tomate
ToLCNDV	Tomato leaf curl New Delhi virus
	Virus del rizado de la hoja de tomate de Nueva Delhi
ToMV	Tomato mosaic virus
	Virus del mosaico del tomate
ToTV	Tomato torrado virus
	Virus del "torrao" del tomate
TSWV	Tomato spotted wilt virus
	Virus del bronceado del tomate
TYLCAxV	Tomato yellow leaf curl Axarquía virus
	Virus del rizado amarillo del tomate Axarquía
TYLCMaV	Tomato yellow leaf curl Málaga virus
	Virus del rizado amarillo del tomate Málaga
TYLCSV	Tomato yellow leaf curl Sardinia virus
	Virus del rizado amarillo del tomate especie Sardinia
TYLCV	Tomato yellow leaf curl virus
	Virus del rizado amarillo del tomate
TYLCV-Bou	TYLCV cepa Boushehr

TYLCV-IL	TYLCV cepa Israel
TYLCV-Ir	TYLCV cepa Iran
TYLCV-IS76	TYLCV recombinante IS76
TYLCV-Kah	TYLCV cepa Kahnootj
TYLCV-Ker	TYLCV cepa Kerman
TYLCV-Mld	TYLCV cepa Mild
TYLCV-Om	TYLCV cepa Oman
WMV	Watermelon mosaic virus Virus del mosaico de la sandía
ZYMV	Zucchini yellow mosaic virus Virus del mosaico amarillo del calabacín

OTRAS ABREVIATURAS

°C	Centígrado
µg	Microgramo
µl	Microlitro
A _{405nm}	Medida de absorbancia a 405 nm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN _C	ADN complementario
ADN _{mc}	ADN de cadena sencilla
ARN	Ácido ribonucleico
ARN _{mc}	ARN de cadena sencilla
ARN _r	ARN ribosomal
ARN _{SG}	ARN subgenómico
ARN _t	ARN de transferencia
BLAST	Basic local alignment search tool
CP	Proteina de la cápside (<i>Capsid protein</i>)
CPL	Proteina grande de la cápside
CPS	Proteina pequeña de la cápside
Ct	Ciclo umbral
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
Da	Dálton
DAS-ELISA	ELISA tipo sándwich indirecto (<i>Double antibody sandwich -ELISA</i>)
ddNTPs	Didesoxinucleótidos

DEPC	Dietilpirocarbonato
d_N	Número de sustituciones en posición no sinónima
dNTP	2'-desoxinucleósido trifosfato
dpi	Días post-infiltración/ Días post-inoculación
d_S	Número de sustituciones en posición sinónima
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (Enzyme-linked immunosorbent assay)</i>
EPPO	Organización europea y mediterránea de protección vegetal (<i>European and Mediterranean Plant Protection Organization</i>)
FAM	6-carboxifluoresceína
fg	Femtogramo
FRET	Transferencia de energía por resonancia (<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>)
h	Hora
Hel	Helicasa
HPD	Densidad de probabilidad más alta (<i>Highest probability density</i>)
HTS	Secuenciación masiva (<i>High throughput sequencing</i>)
Hz	Hercio
i.e.	<i>Id est</i>
IC-PCR	PCR con inmunocaptura
ICTV	<i>Comité internacional para la taxonomía de virus (International comitee for virus taxonomy)</i>
IDT	Integrated DNA technologies
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ISHI	International Seed Health Initiative
ISTA	International Seed Testing Association
kb	kilobase
L	Litro
LAMP	Amplificación isoterma mediada por bucle (<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>)
LB	Caldo de cultivo Luria (<i>Luria Broth</i>)
LBVD	Enfermedad del engrosamiento de las venas de la lechuga (<i>Lettuce big-vein disease</i>)

LD	Límite de detección
L-Rep	Proteína larga asociada a la replicación
M	Molar
MCMC	Método Monte Carlo usando cadenas de Markov (<i>Markov Chain Monte Carlo</i>)
mg	Miligramo
min	Minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MP	Proteína de movimiento (<i>Movement protein</i>)
N	Normal
N. A.	No analizado
NASBA	Amplificación de ácidos nucleicos basada en secuencia (<i>Nucleic acid sequence-based amplification</i>)
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
ND	No determinado
ng	Nanogramo
NGS	Secuenciación de próxima generación (<i>Next generation sequencing</i>)
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
NS	No secuenciado
nt	Nucleótido
ORF	Marco de lectura abierto (<i>Open reading frame</i>)
pb	par(es) de bases
PBST	Tampón fosfato salino suplementado con Tween 20 (<i>Phosphate Buffered Saline supplemented with Tween 20</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pg	Picogramo
pMol	Picomol
Pro	Proteasa
PTGS	Silenciamiento génico post transcripcional (<i>Post-transcriptional gene silencing</i>)
PVP	Polivinilpirrolidona
qPCR	PCR cuantitativa
qRT-PCR	PCR cuantitativa con transcripción reversa
R ²	Coefficiente de correlación de la recta

RCA	Amplificación en círculo rodante (<i>Rolling circle amplification</i>)
RDP	Recombination detection program
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
Ren	Proteína potenciadora de la transcripción (<i>Replication enhancer protein</i>)
Rep	Proteína iniciadora de la replicación
RFLP	Fragmento de restricción de longitud polimórfica (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR con transcripción reversa (<i>Reverse transcription-PCR</i>)
s	Segundo
SDT	Sequence demarcation tool
SIM	Medio de sulfuro indol para la motilidad (<i>Sulfide Indole Motility</i>)
SMRT	Secuenciación en tiempo real de una molécula individual (<i>Single molecule real time</i>)
S-Rep	Proteína corta asociada a la replicación
TAE	Tris-acetato-EDTA
TrAP	Proteína activadora de la transcripción (<i>Transcription activation protein</i>)
TYLCD	Enfermedad del rizado amarillo del tomate (<i>Tomato yellow leaf curl disease</i>)
U	Unidad
UTR	Región no codificante (<i>Untranslated region</i>)
VAST	Transmisión por semilla asistida por el vector (<i>Vector-assisted seed transmission</i>)
VPg	Proteína viral unida al genoma
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Introducción

1. Los virus como patógenos de plantas

Los virus son parásitos intracelulares obligados ya que dependen del metabolismo de la célula a la que infectan. Las partículas virales están formadas por una o varias cadenas de ácidos nucleicos que, normalmente, aparecen envueltas en una capa protectora de naturaleza proteica denominada cápside. Para la replicación de su material genético utilizan enzimas codificadas por su genoma y la maquinaria celular de su huésped generando copias de sí mismos y variantes con cambios nucleotídicos como producto del proceso de replicación (Hull, 2014). Los virus se pueden transmitir verticalmente a la descendencia de su huésped u horizontalmente entre huéspedes mediante vectores o por contacto mecánico. Fuera de su huésped, los virus son inactivos, por lo que necesitan de un agente externo, ya sea de otros organismos o del ambiente, para su diseminación (Gergerich y Dolja, 2006).



Figura 1. Diferentes tipos de síntomas inducidos por virus de plantas. **A**, enfermedad del engrosamiento de las venas de la lechuga (lettuce big-vein disease, LBVD) causada por lettuce big-vein associated virus, LBVaV (género *Varicosavirus*) y lettuce big-vein Mirafiori virus, LBVV (género *Ophiovirus*). **B**, síntomas del virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones (cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV). **C**, síntomas del virus de la sharka (plum pox virus, PPV).

Cuando un virus infecta a una planta se producen una serie de alteraciones fisiológicas que pueden resultar en la aparición de los síntomas de la enfermedad, que pueden variar desde una reducción del tamaño de la planta, deformaciones foliares o amarillos, hasta decoloraciones, mosaicos, necrosis o alteraciones en el fruto, entre otros (Figura 1). Los virus de plantas suponen una seria amenaza para una amplia gama de cultivos a nivel mundial, ya que pueden causar una reducción significativa de la calidad y el rendimiento de los cultivos afectados, lo que conlleva importantes pérdidas económicas. Las pérdidas económicas causadas por virus son las segundas en importancia, comparadas con las causadas por otros patógenos (Loebenstein, 2009).

El control de las enfermedades virales es complicado, no sólo por la compleja dinámica epidemiológica de las mismas, sino también por la rápida dispersión de los virus y por su gran capacidad evolutiva. Además, hasta la fecha, no existen compuestos antivirales directos que se puedan utilizar en agricultura. Estudiar el ciclo biológico de los virus es esencial para el diseño de estrategias efectivas y duraderas para controlar los daños causados por éstos. Para ello es imprescindible disponer de técnicas de detección adecuadas que, además, puedan permitir monitorizar la dispersión de los virus, facilitando el diseño de medidas preventivas y de contención.

2. Principales métodos para la detección y el diagnóstico de virus de plantas

2.1. Métodos convencionales

Se pueden identificar dos tipos de métodos diagnósticos considerados como métodos convencionales: la observación de síntomas y las pruebas de infectividad, conocidas también como bioensayos.

2.1.1. Observación de síntomas

La observación de síntomas en campo se podría considerar como una primera fase en la detección o diagnóstico de un virus. Existen determinados síntomas (amarilleos, deformaciones foliares, lesiones necróticas, etc.) que pueden proporcionar una idea orientativa de la posible etiología viral. Éstos no suelen ser suficientemente específicos para dar un diagnóstico definitivo ya que enfermedades causadas por virus distintos pueden cursar con síntomas similares. Igualmente, distintos aislados de una misma especie viral pueden inducir síntomas diversos. Además, las infecciones mixtas pueden enmascarar los síntomas o desarrollar una sintomatología distinta a la que presente la infección simple. Igualmente, puede haber otros patógenos o factores abióticos que produzcan una sintomatología similar y dificulten el diagnóstico (Cambra, Pallás y Bertolini, 2016). Se trata de un método aproximativo que necesita de otros métodos más específicos para su confirmación.

2.1.2. Pruebas de infectividad o bioensayos

Este tipo de pruebas se basan en la transmisión desde una planta infectada a una planta susceptible, bien de la misma especie o de una distinta. Las principales pruebas de infectividad son la inoculación en plantas indicadoras y los ensayos de transmisión por semilla.

Bioensayos con plantas indicadoras: este tipo de ensayos fueron los primeros que se emplearon para el diagnóstico de virus. Con este tipo de pruebas se pueden detectar virus mediante inoculación mecánica, injerto o transmisión por plantas parásitas como la *Cuscuta* ssp. (Browning, 2009). Numerosas especies de plantas han sido descritas como indicadores (Hull, 2014), las cuales son susceptibles a una amplia gama de virus y son capaces de producir síntomas característicos. Este tipo de ensayos son importantes, sobre todo cuando se requiere una caracterización de las propiedades biológicas de un virus o cuando nos encontramos ante una enfermedad de origen desconocido (Cambra, Pallás y Bertolini, 2016).

Bioensayos de transmisión por semilla: Los bioensayos de transmisión por semilla se utilizan no sólo para detectar si un patógeno está presente sino para comprobar su viabilidad. Se pueden distinguir dos tipos de protocolos en la transmisión por semilla: los bioensayos de transmisión en los que se prepara un extracto a partir de un lote de semilla y se utiliza para inocular plantas indicadoras, y los ensayos de germinación, que consisten en germinar las semillas en el medio adecuado y observar si las plántulas están infectadas. Los ensayos de germinación permiten calcular la tasa de transmisión por semilla de un patógeno y, además, determinar si la presencia de éste afecta a la viabilidad de la semilla. Este tipo de ensayos tienen una gran importancia en los programas de certificación y cuarentena, pues las semillas son uno de los principales vehículos de dispersión de patógenos a nivel global.

Las principales limitaciones o inconvenientes que presentan los bioensayos son su coste elevado, ya que requiere de instalaciones y espacio suficiente para el mantenimiento de las plantas en condiciones controladas, y el tiempo de duración de los ensayos, que puede variar desde unos días hasta varios meses, según la especie indicadora utilizada.

2.2. Métodos serológicos

Los métodos serológicos se basan en la interacción antígeno-anticuerpo. De entre ellos, el ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) es el más utilizado. El método más sencillo es el ELISA directo. Éste se basa en la inmovilización de la proteína antigénica sobre un soporte (pocillo de microplaca) y su posterior detección con anticuerpos específicos (denominados anticuerpos primarios) que llevan conjugada una enzima con la capacidad de hidrolizar un sustrato que producirá una reacción colorimétrica (Figura 2). Si se emplean anticuerpos primarios no conjugados, se necesita un segundo anticuerpo, conocido como anticuerpo secundario, que es un anticuerpo específico para la especie animal en la que se ha producido el anticuerpo primario (normalmente ratón o conejo) y es el que lleva la enzima conjugada. A este método se le conoce como ELISA indirecto (Figura 2). Existe un tipo de ELISA, el denominado tipo sándwich, en el que el antígeno se une a un anticuerpo (denominado anticuerpo de captura) previamente adsorbido al soporte. Según el tipo de anticuerpo utilizado para la detección se puede distinguir entre el sándwich directo o el indirecto (Figura 2). El ELISA es un método semicuantitativo, pues la acumulación del sustrato coloreado es proporcional a la cantidad de antígeno. De los distintos tipos de ELISA que se utilizan (Figura 2), los de tipo sándwich son los más sensibles ya que el antígeno es inmovilizado de forma específica por el anticuerpo de captura y no tiene que competir con el resto de proteínas del extracto en el tapizado del soporte. La técnica ELISA se caracteriza por ser una técnica sencilla de realizar, sensible y fiable. La posibilidad de una automatización parcial del procedimiento (*i.e.* la utilización de espectrofotómetro), así como el uso de microplacas de 96 pocillos, permiten analizar gran cantidad de muestras y lo convierte en una técnica adecuada para el análisis a gran escala (Albrechtsen, 2006).

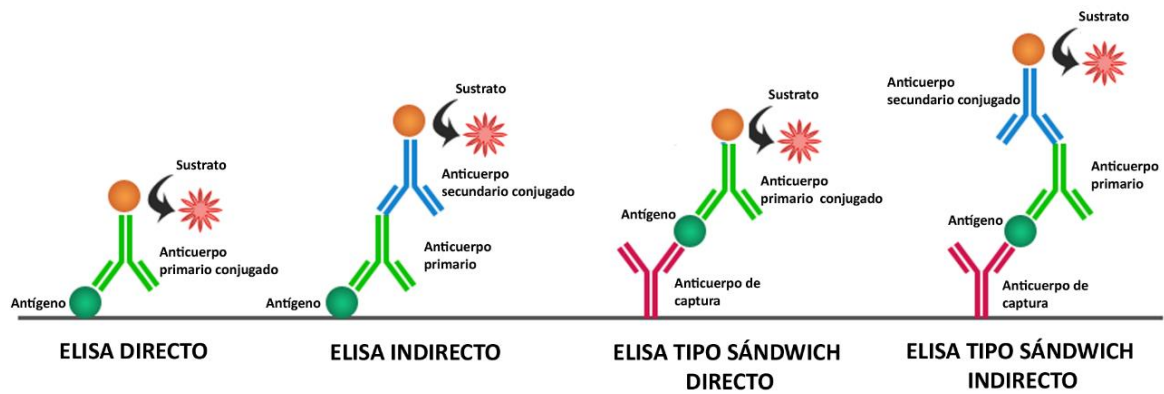


Figura 2. Tipos de ELISA.

Desde que se utilizó por primera vez en virología vegetal (Clark y Adams, 1977), se ha convertido en una de las técnicas de rutina fundamentales en el laboratorio y es una de las principales técnicas utilizadas para el diagnóstico y detección de virus para los programas de mejora, análisis de cuarentena y programas de certificación sanitaria.

2.3. Métodos basados en ácidos nucleicos

2.3.1. Hibridación molecular

Esta técnica se basa en la complementariedad de bases de los ácidos nucleicos y en su capacidad para formar híbridos estables. Consiste en la síntesis de una secuencia de ADN (mediante PCR) o ARN (transcripción *in vitro*) monocatenario, complementaria al genoma del virus (sonda), que suele marcarse, bien con isótopos radiactivos (^{32}P) o con marcaje no radiactivo, como la digoxigenina, y que hibrida con ácidos nucleicos de la muestra, fijados en un soporte (generalmente, una membrana de nylon o nitrocelulosa), lo que permite la detección del virus (Más *et al.*, 1993; Dietzgen, Zeyong y Teycheney, 1994; Rubio *et al.*, 2003; Galipienso *et al.*, 2004; Barbarossa, Loconsole y Vovlas, 2007). Las aplicaciones más comunes de la hibridación molecular son el *dot-blot* (Pallás, Más y Sánchez-Navarro, 1998) y el *tissue-print* (Más y Pallás, 1995). Como ventajas, este método es rápido, sencillo de realizar y reproducible, pues se parte de material clonado. Presenta una sensibilidad intermedia entre la técnica ELISA y la PCR (Sanchez-Navarro *et al.*, 1998; Nikolaeva, 2017). Además, permite analizar distintos virus de forma simultánea (James *et al.*, 2006), lo que es importante para las muestras de campo donde las infecciones mixtas son bastante frecuentes. Para este objetivo se pueden seguir dos métodos: el uso de mezclas de sondas (Saldarelli, 1996; Sánchez-

Navarro *et al.*, 1999; Minutillo, Mascia y Gallitelli, 2012) y la síntesis de sondas (Herranz *et al.*, 2005; Peiró, Pallás y Sánchez-Navarro, 2012; Sánchez-Navarro, Cooper y Pallás, 2018).

Las llamadas matrices de ADN o *arrays* se desarrollaron basadas en la técnica de la hibridación molecular, maximizando su potencial. Las micromatrices o *microarrays* (Boonham, Tomlinson y Mumford, 2007) y las macromatrices o *macroarrays* (Agindotan y Perry, 2008) permiten fijar un gran número de sondas de captura a un soporte, pero su alto coste y su menor sensibilidad frente a otras técnicas que emplean ácidos nucleicos (Boonham, Tomlinson y Mumford, 2007) ha hecho que se pierda el interés como técnica de diagnóstico y detección, siendo las técnicas de secuenciación masiva su mejor alternativa (Cambra, Pallás y Bertolini, 2016).

2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes

La PCR se basa en la producción de múltiples copias *in vitro* de un fragmento ADN determinado mediante el uso de pequeñas secuencias flanqueantes (iniciadores) y la acción de polimerasas de ADN termoestables. Desde su descubrimiento (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988), se ha convertido en la técnica de cabecera de los laboratorios de biología molecular. La mayoría de virus vegetales, que poseen genomas de ARN, precisan de un paso inicial de transcripción reversa (*Reverse transcription*, RT), donde el ARN se convierte en ADN_c y sirve de molde para la PCR (RT-PCR). La RT-PCR se ha convertido en el método de referencia para la detección de virus de plantas. Las principales ventajas de esta técnica son su rapidez, su especificidad y su sensibilidad. Debido a esa gran sensibilidad, la presencia de diferentes compuestos en los extractos vegetales puede tener un efecto inhibitorio y llegar a producir falsos negativos. Se ha observado que la introducción de controles endógenos puede ayudar a la visualización de este problema (Mumford *et al.*, 2006; López *et al.*, 2009). También pueden producirse falsos positivos debido a posibles uniones inespecíficas de los iniciadores, así como contaminaciones de ADN por el proceso de manipulación (Mumford *et al.*, 2006).

Los iniciadores son pequeñas secuencias de 15 a 40 pb que flanquean ambos extremos del fragmento amplificado. De su diseño no sólo depende la eficiencia del proceso, sino también su especificidad. Existe una gran cantidad de información de secuencias parciales y completas para los distintos virus, disponibles en las bases de

datos (GenBank[®], perteneciente *al National Center for Biotechnology Information*, NCBI (Bethesda, MD, USA)) que permiten seleccionar las regiones adecuadas para el diseño de los iniciadores, eligiéndose regiones conservadas capaces de discriminar entre especies virales o capaces de identificar familias enteras (Zheng *et al.*, 2010; Lotos *et al.*, 2014; Luria *et al.*, 2017).

Generalmente, la visualización de los resultados de la PCR se realizaba utilizando geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, pero debido a su peligrosidad, se ha sustituido por otros tintes menos tóxicos como el GelRed[®] o MIDORI^{Green}.

Además de la PCR convencional, se han desarrollado diversas modalidades de PCR, entre las que encontramos la PCR o RT-PCR múltiple, que permite la detección simultánea de 2 o más virus en una misma reacción (Gambino y Gribaudo, 2006; Zhao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Pallás, Sánchez-Navarro y James, 2018); la PCR anidada (Olmos *et al.*, 1999) y la PCR cooperativa (Olmos, Bertolini y Cambra, 2002; López *et al.*, 2009), que utilizan dos parejas de iniciadores, una pareja interna y otra externa, para amplificar la molécula diana, y que presentan una sensibilidad hasta 1000 superior que la PCR convencional (Cambra, Pallas y Bertolini, 2016); la PCR con inmunocaptura (IC-PCR), que combina la capacidad de la unión específica antígeno-anticuerpo con la PCR permitiendo concentrar los viriones a partir de un extracto vegetal y realizar la PCR en un mismo tubo (Wetzel *et al.*, 1992); y la PCR digital (Vogelstein y Kinzler, 1999), que es capaz de fraccionar la mezcla de PCR en múltiples de particiones hasta llegar a una o unas pocas copias de ADN/ARN diana, permitiendo la cuantificación de la muestra sin necesidad de recta patrón (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2015; Quan, Sauzade y Brouzes, 2018).

2.3.3 PCR o RT-PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa (qPCR), permite monitorizar y cuantificar la amplificación de un fragmento de ADN diana en un mismo proceso. Se basa en la utilización de fluorocromos cuya emisión es medida por el termociclador en tiempo real, lo que posibilita su cuantificación (Wittwer, Ririe y Rasmussen, 1998; Mumford *et al.*, 2006). Esta técnica es una de las técnicas más sensibles y, además, permite un ahorro de tiempo considerable ya que no requiere de

manipulación posterior, reduciéndose así el riesgo de contaminación y falsos positivos (Mumford *et al.*, 2006).

Los dos principales sistemas de fluorescencia utilizados en la PCR en tiempo real son las sustancias intercalantes al ADN de doble cadena (ADN bicatenario, ADN_{BC}) y las sondas específicas marcadas con fluoróforos. Dentro de las sustancias intercalantes, el fluoróforo más utilizado es el SYBR Green, que se une de forma inespecífica a cualquier cadena de ADN_{BC}, por lo que tiene el inconveniente de que puede detectar amplificaciones inespecíficas y generar falsos positivos.

La utilización de sondas marcadas es la alternativa y, dentro de esta modalidad, las sondas basadas en la tecnología TaqMan es la más extendida (Holland *et al.*, 1991). Esta tecnología se basa en la incorporación en la reacción de una sonda de entre 25-30 pb marcada con un fluoróforo en el extremo 5' (*reporter*) y con un desactivador de la fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3', que está diseñada para hibridar con la secuencia diana entre la pareja de iniciadores. Cuando la sonda está intacta no se produce emisión de fluorescencia ya que el desactivador la absorbe por transferencia de energía por resonancia (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET). Durante el paso de amplificación, la Taq polimerasa degrada la sonda debido a su actividad exonucleasa 3'-5' separando al fluoróforo del desactivador y eliminando el efecto de éste, de tal manera que la señal fluorescente se hace detectable (Figura 3). Como sólo se emite fluorescencia si se produce hibridación con la secuencia diana, se incrementa mucho la especificidad y sensibilidad de la PCR, limitándose así la emisión de señales inespecíficas. Esta técnica se ha convertido en una de las técnicas de referencia para el diagnóstico y detección y, para virus de plantas, no es una excepción, donde no sólo se emplea en tejidos vegetales, sino también en vectores (Boonham *et al.*, 2002; Saponari, Manjunath y Yokomi, 2008; Noris y Miozzi, 2015). Debido a sus características, la tecnología TaqMan permite la posibilidad de marcar sondas con distintos fluoróforos y hacer análisis multiplex de hasta 5 virus (Osman *et al.*, 2007; Mortimer-Jones *et al.*, 2009; López-Fabuel *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2017).

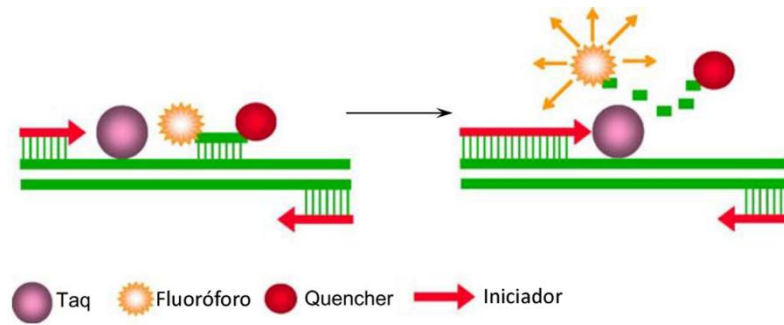


Figura 3. Tecnología TaqMan. La sonda hibrida en la secuencia diana; la señal del fluoróforo está bloqueada por el *quencher*. Durante la amplificación, la sonda se hidroliza por la actividad exonucleasa 3'-5' de la taq polimerasa y se produce la emisión de fluorescencia. Extraído de Mumford et al., 2006.

Existen otras tecnologías basadas en el uso de sondas marcadas, las balizas moleculares (*molecular beacon*) y las sondas tipo *Scorpion*. Se basan en estructuras de tipo horquilla en cuyos extremos se encuentran el fluoróforo y el desactivador. Al hibridarse con la secuencia diana, la estructura en horquilla se rompe y se produce la emisión de fluorescencia (Eun y Wong, 2000; Thelwell *et al.*, 2000). Estas técnicas son menos empleadas en protocolos de diagnóstico y detección.

Uno de los inconvenientes de la PCR en tiempo real es el coste de los aparatos, pese a que han sufrido un abaratamiento notable desde sus inicios (Albrechtsen, 2006). Aun así, por su sensibilidad, se ha convertido en una de las principales técnicas de referencia diagnósticas y su uso es cada vez más común.

2.3.4. Amplificación isoterma

Al igual que en la PCR, estos métodos se basan en la amplificación por extensión realizada por una polimerasa utilizando iniciadores específicos, pero a diferencia de ésta, todo el proceso se realiza a una misma temperatura (Boonham *et al.*, 2014). Los principales métodos de amplificación isoterma son, por una parte, la amplificación de ácidos nucleicos basada en secuencia (*Nucleic acid sequence-based amplification*, NASBA), utilizada para la amplificación de moléculas de ARN (Compton, 1991; Malek, Sooknanan y Compton, 1994) y la amplificación isoterma mediada por bucle (*Loop-mediated isothermal amplification*, LAMP), utilizada para amplificar moléculas de ADN (Notomi *et al.*, 2015), aunque también se ha adaptado para amplificar ARN (Fukuta *et al.*, 2003). Ambas técnicas destacan por su rapidez y eficiencia, alcanzando niveles de amplificación del orden de 10^9 copias en una hora (López *et al.*, 2009; Notomi *et al.*, 2015), así como por su gran sensibilidad, equiparable a la de la qPCR (Varga y James,

2006; Olmos, Bertolini y Cambra, 2007). El principal inconveniente a destacar es el complicado diseño de los iniciadores de la técnica LAMP, pero hay disponibles programas informáticos que ayudan a su diseño (Yadav y Khurana, 2016).

Mención especial requiere la técnica de amplificación isoterma denominada Amplificación en círculo rodante (*Rolling circle amplification*, RCA) ya que supuso un gran avance en el diagnóstico y la caracterización de virus de ADN circular y en plantas ha sido fundamental para el estudio de los begomovirus y sus moléculas satélites asociadas, así como para los nanovirus (Jeske, 2018). Se trata de una técnica de amplificación de ADN circular que se basa en la utilización de la polimerasa del bacteriófago *phi29*. Tiene la ventaja de que no requiere la utilización de iniciadores específicos y lo que suele utilizarse son hexámeros inespecíficos. La técnica consiste en la unión al azar de estos iniciadores inespecíficos de tal manera que la polimerasa empieza a amplificar la secuencia de ADN y, en las cadenas nuevas que se van generando, se vuelven a unir más iniciadores, formándose múltiples puntos de amplificación que resultan en la generación de múltiples copias en tándem (Figura 4) (John et al., 2009). Es un procedimiento que suele durar varias horas y cuyo producto final se puede visualizar fácilmente en un gel de agarosa. Una de las ventajas principales de la RCA, en comparación con otras técnicas, es su capacidad de detectar moléculas circulares de ADN sin tener ningún conocimiento *a priori* de su presencia. En el diagnóstico de rutina, los productos de RCA se pueden digerir con diferentes enzimas para generar un patrón de restricción (*Restriction fragment length polymorphism*, RFLP) y posterior secuenciación de los fragmentos obtenidos (Haible, Kober y Jeske, 2006; Paprotka et al., 2010). También se pueden utilizar enzimas de restricción de corte único en el genoma del virus, liberándose copias de genoma completa linealizadas que pueden ser clonadas para su caracterización mediante secuenciación, así como para la generación de clones infectivos de forma rápida y sencilla (Inoue-Nagata et al., 2004; Bang et al., 2014). El RCA también ha demostrado ser muy útil para el enriquecimiento de las muestras en ADN circular, previo a la realización de secuenciación masiva, directamente (Hagen et al., 2012; Fontenele et al., 2017; Torre et al., 2018), o seguido de un RFLP, que se conoce como circómica (Wyant et al., 2012; Jeske et al., 2014).

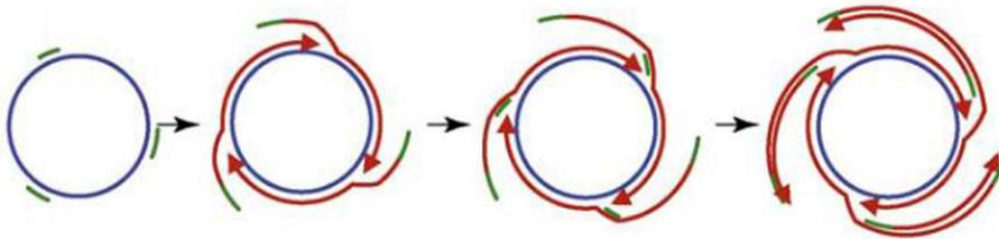


Figura 4. Amplificación en círculo rodante. Los iniciadores hibridan de forma inespecífica en la molécula de ADN circular (paso 1). Amplificación de la polimerasa y desplazamiento de la secuencia (paso 2). Incorporación de iniciadores a la secuencia amplificada generándose múltiples puntos de amplificación (pasos 3 y 4).

2.3.5. Secuenciación nucleotídica

Las técnicas de secuenciación son las más precisas y específicas ya que determinan directamente el código genético del organismo analizado. Son, además, la base de la caracterización molecular, pues la comparación de la secuencia obtenida con las secuencias depositadas en las bases de datos permite identificar taxonómicamente al organismo analizado. Existen dos técnicas de secuenciación nucleotídica, según se tenga o no información previa del organismo:

Secuenciación tipo Sanger. Esta técnica se conoce como secuenciación de primera generación y se basa en la síntesis de una cadena de ADN complementaria a otra utilizada como molde, en presencia de una ADN polimerasa, un iniciador, los cuatro desoxinucleótidos que componen la cadena y cuatro didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados, que al carecer de grupo hidroxilo en el extremo 3', interrumpen la reacción de síntesis (Sanger, Nicklen y Coulson, 1977). Esta técnica se considera como la técnica de secuenciación base en cualquier laboratorio de biología molecular y se utiliza, sobre todo, para la caracterización molecular de un organismo a partir de un fragmento amplificado por PCR o RT-PCR, por lo que se tiene un conocimiento previo del género o la especie del organismo secuenciado. Como ventajas, hay que destacar que es una técnica rápida, relativamente económica y ofrece la mayor longitud de lectura de las técnicas de secuenciación que se han venido utilizando, llegando a longitudes fiables superiores a las 800 pb. El principal inconveniente es que es necesaria una amplificación de la secuencia y su correcta separación por tamaños, previa a la secuenciación (Olmos, Yuste y Bertolini, 2016).

Secuenciación masiva (*High throughput sequencing*, HTS). Esta técnica, acoplada a análisis bioinformáticos más o menos complejos, permite la determinación

de una secuencia completa o parcial del genoma de los virus (o viroides) de una muestra, sin ningún conocimiento *a priori* (Boonham *et al.*, 2014). Por tanto, sirve tanto para el diagnóstico y detección, como para el descubrimiento de nuevos virus. Según la metodología utilizada, existen diversas plataformas para la secuenciación masiva. En primer lugar, están las plataformas que forman parte de la denominada secuenciación de segunda generación, también conocida como secuenciación de próxima generación (*Next generation sequencing*, NGS). Las plataformas que han sido más utilizadas en NGS son la secuenciación 454 (Roche Diagnostics), Illumina y SOLiD (Applied Biosystems) (Radford *et al.*, 2012), la cual ha empezado a ser reemplazada desde 2016 por la plataforma Ion Torrent (Radford *et al.*, 2012; Adams y Fox, 2016). La plataforma Illumina se basa en la unión de los fragmentos de ADN sobre un soporte de vidrio con iniciadores complementarios a los adaptadores. La secuenciación se realiza por un procedimiento llamado “amplificación por puente” (www.illumina.com) y la incorporación de nucleótidos se detecta por fluorescencia, de un modo similar al método de Sanger, pero los ddNTPs son reversibles, por lo que puede seguirse elongando la cadena. Esta es la plataforma NGS más utilizada en virología vegetal (Olmos, Yuste y Bertolini, 2016).

Un inconveniente de las técnicas de NGS es que generan lecturas cortas, de entre 100- 700 pb, y un gran volumen de datos (Barba, Czosnek y Hadidi, 2014). Afortunadamente, existen diversos programas informáticos y se están desarrollando diversas *pipelines* para el procesado de los datos (Ho y Tzanetakis, 2014; Flygare *et al.*, 2016; Baizan-Edge *et al.*, 2019), entre las que se encuentra VirusDetect (Ling *et al.*, 2016), específico para el análisis de virus, por lo que es una herramienta muy importante en virología vegetal (Bernal-Vicente *et al.*, 2018; Nisbet *et al.*, 2019).

Las técnicas de secuenciación más recientes son las denominadas de tercera (Pacific Biosciences, www.pacificbiosciences.com) y de cuarta generaciones (MinION, de Oxford Nanopore, nanoporetech.com/products/minion), que se caracterizan por la secuenciación en tiempo real de moléculas individuales (*Single molecule real time*, SMRT). A diferencia de las técnicas de NGS producen longitudes de lectura mucho mayores, desde 5.000 pb el sistema de Pacific Biosciences (Barba, Czosnek y Hadidi, 2014), hasta las 150.000 pb del sistema MinION (Laver *et al.*, 2015), lo que las convierte en tecnologías rápidas, obteniéndose lecturas completas en un solo día (Barba, Czosnek y Hadidi, 2014). El sistema MinION ha sido evaluado recientemente sobre distintas

muestras vegetales, avalando su posible futuro como herramienta diagnóstica de rutina (Chalupowicz *et al.*, 2019).

3. Variabilidad y evolución de virus de plantas

El estudio de los mecanismos evolutivos y la variabilidad genética de los virus es esencial para comprender su epidemiología, diseñar herramientas de diagnóstico específicas y desarrollar estrategias durables y eficientes para el control de enfermedades (Rubio, Guerri y Moreno, 2013). Durante el proceso de replicación, los virus de plantas pueden generar individuos que difieren genéticamente de los parentales. Se generan, por tanto, poblaciones genéticamente heterogéneas en las que la distribución de las variantes genéticas puede cambiar con el tiempo. A este proceso se le denomina evolución (García-Arenal y Fraile, 2008).

3.1. Mecanismos de variación genética

Las fuerzas principales que modelan la evolución de los virus, generando variación genética, son la mutación, la recombinación y, en menor medida, la pseudorecombinación (García-Arenal, Fraile y Malpica, 2003; Pagán y García-Arenal, 2018).

La **mutación** se define como un error que ocurre durante el proceso de replicación de los ácidos nucleicos, ya sea por delección, inserción o sustitución de uno o varios nucleótidos, resultando en un cambio en la secuencia (Pita y Roossinck, 2008). Cuando se habla de mutación se distinguen dos términos: la tasa de mutación y la frecuencia de mutación. La tasa de mutación se refiere a la fidelidad de la copia durante la replicación, mientras que la frecuencia de mutación se refiere a las mutaciones fijadas en la población (Domingo y Holland, 1994; Peck y Luring, 2018). La tasa de mutación de los virus de ARN de cadena sencilla (o monocatenario, ARN_{mc}), los más abundantes entre los virus de plantas, varía entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones/ sitio/ ciclo de replicación (Duffy, Shackelton y Holmes, 2008; Sanjuán y Domingo-Calap, 2016). Para los virus de ADN de cadena sencilla (o monocatenario, ADN_{mc}) se han determinado tasas de mutación que varían entre 10^{-5} y 10^{-6} mutaciones/ sitio/ ciclo de replicación (Duffy, Shackelton y Holmes, 2008; Sanjuán y Domingo-Calap, 2016), determinándose para los geminivirus tasas de mutación similares a las de otros virus de animales de ADN_{mc}, con

el mismo tipo de replicación de su genoma (Arguello-Astorga *et al.*, 2007). En términos filogenéticos, se define como tasa de sustitución nucleotídica al número de mutaciones fijadas (por selección natural o deriva génica) por sitio nucleotídico y por unidad de tiempo (normalmente, por año). La tasa de sustitución comprende un producto complejo de cuatro factores: la tasa de mutación subyacente, el tiempo de generación, el tamaño poblacional efectivo y la eficacia biológica, con las mutaciones ventajosas fijadas más rápidamente que las neutras (Duffy, Shackelton y Holmes, 2008).

Una de las posibles explicaciones para la elevada tasa de mutación de los virus de ARN es que las ARN polimerasas carecen de actividad correctora durante el proceso de replicación (Domingo y Holland, 1997; Drake y Holland, 1999). Resulta sorprendente que las tasas de sustitución sean similares para virus de ARN y begomovirus (Duffy y Holmes, 2008, 2009), que son virus de ADN que carecen de genes que codifican ADN polimerasas y dependen de la maquinaria enzimática del huésped (Gutierrez, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999), lo que sugiere que la actividad correctora de pruebas de las polimerasas puede que no sea el único factor que influye sobre la tasa de mutación (Duffy, Shackelton y Holmes, 2008). Aunque las tasas de mutación puedan ser similares para algunos virus, por ejemplo, los de ARN, la frecuencia de mutación puede variar mucho de un virus a otro (Roossinck, 1997). La mutación es uno de los principales mecanismos generadores de variabilidad, pero hay que tener en cuenta que la mayoría de mutaciones suelen ser deletéreas o neutras en los muy compactos genomas de los virus de plantas (Malpica *et al.*, 2003; Hillung, Cuevas y Elena, 2015).

La **recombinación** es el proceso por el cual se produce el intercambio de fragmentos de secuencias nucleotídicas entre diferentes variantes genéticas durante el proceso de replicación (García-Arenal, Fraile y Malpica, 2003). Es un mecanismo importante para la generación de nuevos genomas distintos y la posible adquisición de ventajas selectivas respecto a sus parentales, pudiendo así incrementar su ventaja adaptativa (Fernández-Cuartero *et al.*, 1994) o generar variantes capaces de superar las resistencias de los cultivos (Miras *et al.*, 2014). Además, puede actuar como mecanismo de reparación de mutaciones adversas (Nagy y Simon, 1997). Se puede distinguir entre recombinación homóloga, cuando ocurre entre dos virus relacionados en puntos coincidentes entre ambos, o recombinación no homóloga, cuando ocurre entre virus no relacionados (virus de ARN) o cuando se producen reorganizaciones, deleciones o

duplicaciones en el genoma (virus de ADN) (Simon-Loriere y Holmes, 2011; Lefeuvre y Moriones, 2015). En cualquier caso, para que se produzca la recombinación, ambos virus implicados deben coinfectar la misma célula.

En los virus de ARN, la recombinación es un fenómeno frecuente entre los retrovirus, pararetrovirus y en los virus de ARN de cadena positiva, sin embargo, es poco frecuente en virus de ARN de cadena negativa (Nagy, 2008). Para los geminivirus, virus de ADN_{mc} circular de cadena positiva, la recombinación ha desempeñado (y desempeña) un papel fundamental en su evolución (Rojas *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2011). Se han propuesto tres factores que podrían contribuir de forma significativa a la recombinación en estos virus: i) la frecuencia de infecciones mixtas; ii) los elevados niveles de replicación y iii) el incremento de la gama de huéspedes del vector (Padidam, Sawyer y Fauquet, 1999). Se podrían resumir en dos el efecto de la recombinación en poblaciones de geminivirus: i) en primer lugar, la generación de variantes con modificaciones en la gama de huéspedes (Monci *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2013; García-Arenal *et al.*, 2015); ii) en segundo lugar, la generación de variantes capaces de superar las resistencias de los cultivos, como por ejemplo el virus africano del mosaico de la mandioca (african cassava mosaic begomovirus, ACMV), o el virus del rizado de la hoja de algodón de Burewala (cotton leaf curl Burewala virus, CLCuBuV) (Zhou *et al.*, 1997, 1998; Patil y Fauquet, 2009; Briddon *et al.*, 2014). Al igual que ocurre con las mutaciones, la mayoría de las formas recombinantes no prosperan. Únicamente los recombinantes que poseen combinaciones favorables puede que superen a los virus parentales y prevailezcan en la población (Lefeuvre y Moriones, 2015).

La **pseudorecombinación**, también llamada reordenamiento genético, ocurre cuando tiene lugar un intercambio de segmentos genómicos entre virus con genomas segmentados. Existen ejemplos que evidencian fenómenos de pseudorecombinación tanto en virus de ARN (Codoñer *et al.*, 2005; Rodelo-Urrego, García-Arenal y Pagán, 2015), como de ADN (Briddon *et al.*, 2010) En el caso de los virus de ADN, la pseudorecombinación ocurre principalmente en los que poseen genomas bipartitos (Harrison, 2002; Silva *et al.*, 2014). Se ha observado que en geminivirus, este mecanismo no sólo es capaz de generar especies nuevas (Saunders *et al.*, 2002), sino que puede dar lugar a variantes más virulentas (Chakraborty *et al.*, 2008).

3.2. Mecanismos que determinan la estructura genética de las poblaciones virales

La distribución de las variantes genéticas generadas debido a mutaciones o intercambios genéticos (recombinación y pseudorecombinación) en las poblaciones virales depende principalmente de dos procesos evolutivos: la selección y la deriva genética (García-Arenal, Fraile y Malpica, 2002; Acosta-Leal *et al.*, 2011).

La **selección** es un proceso direccional por el cual la frecuencia de las variantes genéticas mejor adaptadas a un determinado ambiente incrementan su frecuencia en la población (selección positiva), mientras que aquellas menos eficientes disminuyen (selección negativa o purificadora) (García-Arenal, Fraile y Malpica, 2003). Los fenómenos de selección se pueden asociar a cualquier aspecto del ciclo viral, incluyendo características estructurales y funcionales (Chare y Holmes, 2004; Rico *et al.*, 2006; Hasiów-Jaroszewska, Fares y Elena, 2014). La dirección de la presión selectiva suele calcularse mediante la diferencia entre el número de sustituciones en posición no sinónima (d_N) y el número de sustituciones en posición sinónima (d_S), d_N-d_S . Si d_N-d_S es positiva se trata de selección positiva, si es negativa, selección negativa (o purificadora) y si es igual a 0, selección neutra (Nei y Gojodorit, 1986). La mayoría de los estudios realizados sobre virus de plantas revelan que la principal fuerza selectiva que actúa sobre ellos es la selección negativa o purificadora (Gomez *et al.*, 2009; Pagan y Holmes, 2010), siendo más probables los cambios sinónimos que los no sinónimos (García-Arenal, Fraile y Malpica, 2002). Normalmente, suele darse selección positiva en variantes capaces de superar resistencias (Fraile *et al.*, 2011) o como mecanismos de adaptación para la infección en distintos huéspedes (Fraile *et al.*, 2011).

La **deriva genética** ocurre como consecuencia de una selección aleatoria de genotipos de una generación a la siguiente, sin tener en cuenta su eficacia, y se produce cuando la población no es lo suficientemente grande para que se transmita toda la variabilidad a la descendencia (Pagán, 2018). La deriva génica ocurre cuando se produce una reducción drástica de la población, lo que se conoce como un *cuello de botella* (Macdonald, 2004). Los cuellos de botella pueden derivar en una variante de la deriva genética denominada *efecto fundador*, que consiste en el inicio de una nueva población a partir de un número reducido de genotipos elegidos al azar de la población parental,

lo que resulta en una disminución de la diversidad entre la población y un incremento entre poblaciones (García-Arenal, Fraile y Malpica, 2003). Asociado a los cuellos de botella puede ocurrir que el tamaño de la población efectiva se reduzca por debajo del umbral necesario para la transmisión de genotipos adaptados, lo que llevaría a una pérdida de la eficacia biológica de la población. Este fenómeno se conoce como *trinquete de Müller* (Muller, 1964; de la Iglesia y Elena, 2007).

4. Transmisión de virus por semilla

Las semillas son propágulos resultantes de la reproducción sexual de las plantas que contienen en su interior al embrión que, al germinar en condiciones adecuadas, dará lugar a un nuevo individuo. Son, por tanto, un vehículo por el cual una especie vegetal se perpetúa en el tiempo. Se ha descrito que alrededor del 90 % de los cultivos destinados a alimentación se propagan por semilla, por lo que las pérdidas causadas por los patógenos transmitidos por semilla, incluidos los virus, son de gran importancia (Maude, 1996). Las semillas son importantes vehículos de transmisión de patógenos y, en muchos casos, suelen actuar como foco de infección primario en patógenos transmitidos por semilla. En lo que a virus se refiere, se han descrito hasta 231 enfermedades de virus y viroides que se transmiten por semilla (Sastry, 2013), lo que corresponde, aproximadamente, al 18 % de los virus de plantas (Mink, 1993; Johansen, Edwards y Hampton, 1994). La tasa de transmisión por semilla no es, por sí sola, un buen indicador de significación ecológica, pero se sabe que una baja transmisión por semilla, junto con una eficiente dispersión secundaria mediante vectores, puede resultar en la introducción de virus a nuevas áreas y provocar importantes epidemias (Johansen, Edwards y Hampton, 1994). Además de la diseminación a partir del foco primario de infección, otros efectos importantes de la transmisión de virus por semilla son: i) las semillas sirven de nexo de supervivencia del virus entre las temporadas de cultivo y ii) el movimiento internacional de semillas debido al comercio y al intercambio de germoplasma utilizado en los programas de mejora puede contribuir a la dispersión de patógenos hacia áreas previamente libres de los mismos (Sastry, 2013).

La presencia de un virus en una semilla no garantiza su transmisión. Esta facultad distingue a los virus que son transportados (y, por tanto, detectables) en semillas pero que no infectan a las plántulas que germinan a partir de esas semillas (Allarangaye *et al.*,

2006; Prabha, Baranwal y Jain, 2013), de los virus transmitidos por semilla que sí que infectan a las plántulas que germinan de las semillas. La transmisión por semilla ocurre principalmente a través de la previa infección del tejido embrionario, ya sea desde el tejido materno (Maule y Wang, 1996) o a través del polen (Isogai *et al.*, 2015). El otro tipo de transmisión es la contaminación externa, es decir, el virus infecta los tejidos externos de la semilla, pero no al embrión. Este tipo de transmisión se ha observado en tobamovirus, donde la transmisión ocurre por la transmisión mecánica del virus por micro heridas producidas durante la germinación o debido al trasplante (Lecoq y Desbiez, 2012; Dombrovsky y Smith, 2017). Un caso especial de transmisión por semilla de un virus localizado en la cubierta es el del virus de las manchas necróticas de melón (melon necrotic spot virus, MNSV), cuya transmisión se produce ayudado por el vector *Olpidium bornovanus* (Campbell, Wipf-Scheibel y Lecoq, 1996).

Dado que no existen tratamientos directos para las virosis, gran parte del esfuerzo se centra en la toma de medidas para evitar su dispersión, sobre todo en la aplicación de tratamientos de desinfección de las semillas y en el análisis de los lotes de semilla. Para la desinfección de semillas a gran escala se aplican principalmente dos tratamientos: la desinfección química, que se suele realizar para eliminar patógenos localizados en el exterior (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007; Pradhanang, 2009) y los tratamientos térmicos, que sirve para la inactivación de patógenos que se encuentran tanto en el exterior como en el interior (Kim *et al.*, 2003; Herrera-Vásquez *et al.*, 2009). La otra medida importante para evitar la dispersión de semillas infectadas es la detección de los lotes infectados. En este contexto, la existencia de programas de certificación fitosanitaria y de cuarentena es crucial para garantizar la existencia de lotes semillas libres de virus (Morrison, 1999). Actualmente, dos organismos, el ISHI (*International Seed Health Initiative*) y, principalmente, el ISTA (*International Seed Testing Association*), disponen de protocolos de referencia para la detección de diversos patógenos transmitidos por semilla que se utilizan en laboratorios de certificación de todo el mundo (Sastry, 2013; Parker y Sanjeev, 2017). De los 39 protocolos disponibles en ambos organismos, únicamente 9 se corresponden con virus (Tabla 1).

Tabla 1. Métodos de diagnóstico certificados para la identificación de virus en semilla

Virus (Acrónimo)	Tamaño muestral Submuestra x nº de submuestras	Diagnóstico
Virus del mosaico del tabaco (TMV)	3.000 250 x 12	Bioensayo: lesión local DAS-ELISA RT-PCR/qRT-PCR
Virus del mosaico del tomate (ToMV)	3.000 250 x 12	Bioensayo: lesión local Opcional: RT-PCR/qRT-PCR
Virus moteado atenuado del pimiento (PMMoV)	3.000 250 x 12	Bioensayo: lesión local DAS-ELISA Opcional: RT-PCR/qRT-PCR
Virus del mosaico verde jaspeado del pepino (CGMMV)	2.000 100 x 20	DAS-ELISA Opcional: RT-PCR/qRT-PCR
Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV)	3.000 250 x 12	Bioensayo: infección sistémica en <i>N. benthamiana</i> Opcional: RT-PCR/qRT-PCR
Virus del mosaico de la calabaza (SqMV)	2.000 100 x 20	Bioensayo: Test de germinación DAS-ELISA Opcional: RT-PCR/qRT-PCR
Virus de las manchas necróticas de melón (MNSV)	2.000 100 x 20	DAS-ELISA Opcional: RT-PCR/qRT-PCR
Virus del mosaico del guisante transmitido por semilla (PSbMV)	2.000 100 x 20	DAS-ELISA
Virus del oscurecimiento precoz del guisante (PEBV)	2.000 100 x 20	DAS-ELISA

En cuanto a los métodos de diagnóstico de referencia que se emplean normalmente para la detección de virus en semilla, la técnica ELISA ha sido el principal método utilizado ya que se puede implantar fácilmente en los laboratorios y permite analizar gran cantidad de muestras (Albrechtsen, 2006). Uno de los inconvenientes del ELISA es la sensibilidad, que es inferior a otras técnicas diagnósticas. Otro de los inconvenientes de técnicas diagnósticas como el ELISA, y otras técnicas moleculares, es la incapacidad de discernir la viabilidad de los virus detectados por esta técnica. Por este

motivo, otro de los métodos que se emplea en los análisis de semillas es el bioensayo o test de germinación, que fue el primer método diagnóstico que se utilizó en el análisis de semillas (Albrechtsen, 2006). Actualmente se sigue utilizando, ya sea como método principal, como es el caso de la detección de tobamovirus en semillas de tomate (ISTA, 2019), o como método complementario, como la prueba de germinación para los lotes de semilla positivos para el virus del mosaico de la calabaza (squash mosaic virus, SqMV) (ISTA, 2017).

Se está realizando un esfuerzo considerable en el desarrollo de técnicas que permitan una mayor sensibilidad (Parker y Sanjeev, 2017). Entre las técnicas más sensibles utilizadas de rutina en el laboratorio está la PCR cuantitativa basada en el uso de sondas tipo TaqMan (punto 3.3.3). En Australia occidental, donde el virus del mosaico del pepino (cucumber mosaic virus, CMV) causa estragos en los cultivos de altramuza (*Lupinus angustifolius*) ya está implementada como método de detección (Jones, 2001). Además, ha sido empleada con éxito para la detección de otros virus transmitidos por semilla (Ling, Wechter y Jordan, 2007; Zhang *et al.*, 2011) y su uso para la detección de virus de cucurbitáceas transmitidos por semilla se analiza en el capítulo 2 de esta tesis. Se ha analizado también el uso de las técnicas de HTS como herramienta diagnóstica en semillas (Fox *et al.*, 2015), pero dadas las características de esta tecnología, la puesta a punto de los parámetros necesarios para su validación como técnica diagnóstica (sensibilidad, especificidad, etc.) es diferente a la de las otras técnicas (Adams *et al.*, 2018; Maree *et al.*, 2018) y todavía se encuentra en vías de desarrollo (Roehorst *et al.*, 2018). Por tanto, la mejor opción a corto plazo parece ser la tecnología TaqMan.

5. Principales virosis de tomate

Con una producción en 2017 de unos 182 millones de toneladas, el tomate (*Solanum lycopersicum*) se sitúa en décima posición en lo que a producción total de cultivos se refiere (FAOSTAT, 2017). España es uno de los principales productores de tomate, situándose novena en el ranking mundial de producción con un total de 5.163.466 Tm (FAOSTAT, 2017). El tomate es susceptible a diversas patologías causadas por hongos, nematodos, bacterias, fitoplasmas, virus y viroides (Jones *et al.*, 2014). Las enfermedades causadas por virus son de gran importancia para el tomate y se han descrito hasta 139 especies virales para las que es susceptible (Brunt *et al.*, 1996), de las

cuales se podrían identificar 8 como las de mayor importancia: el virus del mosaico del pepino dulce (pepino mosaic virus, PepMV), transmitido principalmente por contacto y cuyo síntoma más importante es la maduración irregular de los frutos, conocida como “marmolado” (Spence *et al.*, 2006); el virus de la clorosis del tomate (tomato chlorosis virus, ToCV) y el virus de la clorosis infecciosa del tomate (tomato infectious chlorosis virus, TICV), relacionados con los amarillos del tomate (Hanssen y Lapidot, 2012; Alfaro-Fernández *et al.*, 2013), que junto con el virus del “torrao” del tomate (tomato torrado virus, ToTV), son transmitidos por moscas blancas, ya sea indistintamente por el género *Trialeurodes* y la especie *Bemisia tabaci* (ToCV y ToTV), o por *Trialeurodes* únicamente (TICV) (Duffus, Liu y Wisler, 1996; Wisler *et al.*, 1998; Verbeek *et al.*, 2007; Amari *et al.*, 2008); el virus del bronceado del tomate (tomato spotted wilt virus, TSWV), transmitido por tisanópteros (Pappu, Jones y Jain, 2009) y capaz de infectar a más de 1000 especies vegetales (Parrella *et al.*, 2003); CMV, transmitido por pulgones (Gallitelli, 2000), es el virus con mayor gama de huéspedes, afectando a más de 1200 especies (Jacquemond, 2012), es capaz de producir la muerte de las plantas cuando incorpora un ARN satélite, necrogénico, provocando efectos devastadores (Jordá *et al.*, 1992); el virus de las rugosidades marrones del fruto de tomate (tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV), un tobamovirus emergente capaz de superar el gen de resistencia *Tm-2²* (Luria *et al.*, 2017); y el virus del rizado amarillo del tomate o virus de la hoja cuchara del tomate (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV), que trataré más extensamente en el punto 7.1. de esta introducción.

6. Principales virosis de cucurbitáceas

Las cucurbitáceas se encuentran entre las hortalizas cultivadas más importantes a nivel mundial. Las principales especies cultivadas son: el pepino (*Cucumis sativus* L.), el melón (*Cucumis melo* L.), la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), el calabacín (*Cucurbita pepo* L.) y la calabaza (*Cucurbita máxima* Duch. y *Cucurbita moschata* Duch.) (Robinson y Decker-Walters, 1997). A nivel mundial, China es el principal productor de cucurbitáceas (FAOSTAT, 2017). España se sitúa entre los 10 países que más producen para el melón y pepino y entre los 20 primeros para sandía, calabacín y calabaza (FAOSTAT, 2017). Las enfermedades causadas por virus representan un importante problema para el cultivo de cucurbitáceas. Se han descrito

hasta 70 especies de virus que afectan este tipo de cultivos, y se ha descrito la transmisión por semilla en 12 de ellas en al menos uno de sus huéspedes (Lecoq y Katis, 2014). Diversas prospecciones realizadas en España (Kassem *et al.*, 2007; Luis-Arteaga *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015; Crespo *et al.*, 2018) han mostrado que los principales virus que afectan a los cultivos de cucurbitáceas son: CMV (ver más arriba); el virus de las manchas anulares de la papaya (papaya ringspot virus, PRSV), el virus del mosaico de la sandía (watermelon mosaic virus, WMV) y el virus del mosaico amarillo del calabacín (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), transmitidos por pulgones y cuyos daños se incrementan cuanto más temprana es la edad del cultivo afectado (Blua y Perring, 1989; Alonso-Prados, Fraile y Garcia-Arenal, 1997; Pirone y Harris, 2003); el virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones (cucurbit aphid-borne yellows virus, CaBYV), transmitido por pulgones (Lecoq *et al.*, 1992), produce una de las virosis de mayor incidencia en España (Kassem *et al.*, 2007); el virus del falso amarilleo de la remolacha (beet pseudoyellows virus, BPYV), transmitido por la mosca *Trialeurodes vaporariorum* (Duffus, 1965), cuya disminución en incidencia en España, en contraposición al incremento del virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas (cucurbit yellow stunting disorder virus, CYSDV) parece deberse al desplazamiento de *T. vaporariorum* por parte de *B. tabaci*, vector de este segundo virus (Wisler *et al.*, 1998; Berdiales *et al.*, 1999); el virus de las venas amarillas del pepino (cucumber vein yellowing virus, CVYV), transmitido por *B. tabaci* (Ruiz *et al.*, 2006; Gil-Salas *et al.*, 2012); el virus del rizado de la hoja de tomate de Nueva Delhi (tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV), un virus emergente en España (Juárez *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2015; Fortes *et al.*, 2016); el virus del mosaico verde jaspeado del pepino (cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV); SqMV y MNSV, que trataré en más detalle en los puntos 7.2 al 7.4 de esta introducción.

7. Virus estudiados en esta tesis

7.1. Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV

TYLCV forma parte de un complejo de hasta 10 especies distintas que causan la enfermedad del rizado amarillo del tomate (tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) (Díaz-Pendón *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2015; Mabvakure *et al.*, 2016). Esta enfermedad causa importantes daños en las áreas productoras de tomate de todo el mundo, sobre

todo en la cuenca mediterránea y en muchas áreas tropicales y subtropicales, produciendo pérdidas en los cultivos que en muchos casos pueden alcanzar el 100 % (Moriones y Navas-Castillo, 2000). Estos virus pertenecen al género *Begomovirus*, el mayor género dentro de la familia *Geminiviridae*, pues incluye más de 200 especies (Brown *et al.*, 2012). De entre ellos, TYLCV es una de las especies más extendidas y mejor estudiadas y, según algunos autores, se encuentra en la tercera posición dentro de los 10 virus de plantas más importantes (Scholthof *et al.*, 2011). TYLCV incluye 7 cepas distintas de las cuales Mild (Mld) e Israel (IL) son las prevalentes en la cuenca mediterránea (Lefeuvre *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2015).

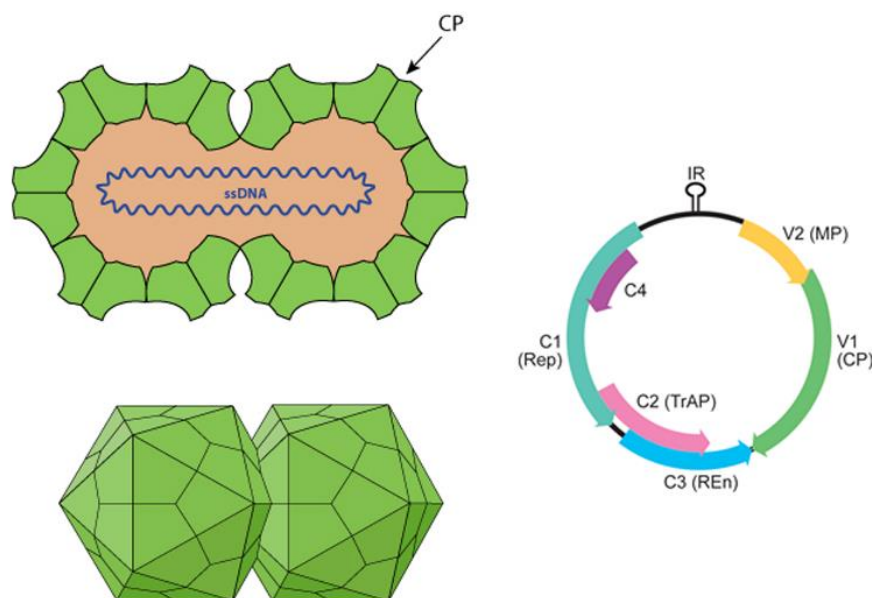


Figura 5. Estructura del virión de TYLCV (Izquierda) y organización genómica de TYLCV (derecha).

El material genético de TYLCV, al igual que el resto de geminivirus, se encapsida en viriones que forman una estructura de dos icosaedros incompletos unidos de unos 18-20 nm de diámetro y 30 nm de largo (Hesketh *et al.*, 2018). El genoma de TYLCV está compuesto por una molécula de ADN circular de cerca de 2,8 kb que incluye 6 marcos de lectura abiertos (*open reading frames*, ORFs), dos en sentido positivo de la secuencia y cuatro en sentido complementario (Figura 5) (Navot *et al.*, 1991; Gronenborn, 2007). Esos ORF codifican, en sentido positivo: la proteína de la cápside (V1/CP), esencial para la dispersión del virus, pues está implicada en la interacción virus-vector (Bridson *et al.*, 1990); y la proteína del movimiento (V2/MP), que es también un factor de

patogenicidad, pues inhibe la respuesta de silenciamiento génico post transcripcional (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) (Gronenborn, 2007; Zhang *et al.*, 2012). En sentido complementario, codifican: la proteína iniciadora de la replicación (C1/Rep) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999); un factor de transcripción (C2/TrAP), que también interfiere en las rutas de silenciamiento (Trinks *et al.*, 2005; Raja *et al.*, 2008); una proteína potenciadora de la transcripción (C3/Ren), implicada en la replicación y además potencia la acumulación de moléculas de ADN viral monocatenario y bicatenario durante la infección, influyendo indirectamente en la extensión de la expresión de los síntomas (Gronenborn, 2007); y la proteína C4, que parece estar implicada, junto a la proteína V2, en el movimiento viral y en la inhibición del PTGS (Gronenborn, 2007). Además, el genoma contiene una región intergénica de unos 200 nucleótidos que contiene el origen de replicación, así como los promotores para la transcripción de V1/ V2 y de C1/ C4, en sentido complementario (Gronenborn, 2007). TYLCV, al igual que todos los geminivirus, se replica en el núcleo de la célula infectada mediante un mecanismo denominado replicación en círculo rodante (*rolling circle replication*) (Stenger *et al.*, 1991; Gutierrez, 1999).

El modo de transmisión de TYLCV es principalmente mediante la mosca blanca *Bemisia tabaci*, que transmite al virus de manera persistente y circulativa (Gronenborn, 2007). Recientemente se ha descrito su transmisión por semilla en distintos huéspedes (Kil *et al.*, 2016, 2017, 2018). La distribución global de este virus está directamente relacionada con la de su vector (Seal, Van den Bosch y Jeger, 2006). Las primeras observaciones de plantas de tomate con síntomas atribuibles a TYLCV se hicieron a finales de los años treinta en Israel y fue en 1964 cuando se descubrió su etiología viral (Antignus y Cohen, 1994; Cohen y Antignus, 1994). Desde ahí se extendió rápidamente a diversos países de África, Oriente Medio y repúblicas del lejano oriente (Czosnek y Laterrot, 1997); Europa (Louro, 1996; Navas-Castillo *et al.*, 1997; Accotto *et al.*, 2003; Botermans *et al.*, 2009); Caribe y Centroamérica (Ramos, 1996; Barboza *et al.*, 2014); China (Wu, Dai y Zhou, 2006); Sudamérica (Zambrano *et al.*, 2007) y Australia (Van Brunschot *et al.*, 2010), entre otros.

Aunque el huésped principal es el tomate, TYLCV es capaz de infectar otras especies hortícolas como la judía o el pimiento, así como a un gran número de plantas ornamentales y silvestres, en las que en algunos casos produce infecciones

asintomáticas (Cohen y Antignus, 1994; Jordá *et al.*, 2007; Díaz-Pendón *et al.*, 2010). Entre los síntomas asociados con esta enfermedad están el enrollamiento de las hojas hacia arriba (acucharado), la deformación de los folíolos, la clorosis internervial y en los márgenes de los folíolos, el porte erecto de las plantas y su menor talla debido al acortamiento de los entrenudos. Destaca también el aborto floral, que provoca que las plantas afectadas en una edad temprana no produzcan frutos o que las plantas afectadas en una etapa más avanzada sufran una abrupta disminución de la producción (Picó, Díez y Nuez, 1996; Hanssen y Lapidot, 2012).

Se ha empleado mucho esfuerzo en tratar de controlar TYLCV y el empleo de variedades resistentes parece ser la mejor alternativa para ello. El tomate es altamente susceptible a los virus que inducen TYLCD, por lo que todos los esfuerzos en encontrar genes de resistencia se han centrado en especies silvestres emparentadas con él (Picó, Díez y Nuez, 1996; Lapidot *et al.*, 2001). Se han mapeado hasta 6 genes de resistencia a TYLCV (*Ty1-Ty6*), todos ellos procedentes de especies silvestres (Butterbach *et al.*, 2014). De entre todos ellos, *Ty-1* es el más utilizado en variedades comerciales. Este gen fue identificado en *Solanum chilense*, accesión LA1969 (Zamir *et al.*, 1994), y su mapeo reciente ha demostrado que alélico con *Ty-3* (*S. chilense*, accesión LA 1932) (Ji, Schuster, y Scott, 2007). *Ty-1/Ty-3* codifican ARN polimerasas dependientes de ARN y el mecanismo de resistencia parece estar basado en el silenciamiento génico transcripcional asociado a un incremento en la metilación del genoma viral (Verlaan *et al.*, 2013; Butterbach *et al.*, 2014). Los trabajos realizados en mejora vegetal han mostrado que, en plantas portadoras de genes de resistencia, la replicación viral ocurre, aunque a mucho menor nivel que en plantas susceptibles (Michelson, Zamir, y Czosnek, 1994; Pérez de Castro, Díez, y Nuez, 2005). Debido a esto podemos decir que en el mercado tenemos plantas parcialmente resistentes a TYLCD (Glick, Levy y Gafni, 2009). La introgresión de nuevos genes de resistencia en líneas comerciales (Pereira-Carvalho *et al.*, 2015), así como la pirimidación de genes (Tabein *et al.*, 2017), parecen ser estrategias prometedoras en el avance para conseguir mejores fuentes de resistencia a esta enfermedad.

7.2. Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV

CGMMV pertenece al género *Tobamovirus*, dentro de la familia *Virgaviridae*. De los cuatro tobamovirus conocidos que infectan cucurbitáceas éste es el de mayor importancia económica y tiene una mayor distribución (Crespo *et al.*, 2017). Como el resto de los tobamovirus, los viriones presentan forma de varilla de unos 300-310 nm de longitud, por unos 18 nm de diámetro. El genoma está compuesto por una cadena de ARN monocatenario de sentido positivo de unos 6,4 kb, que presenta una estructura de tipo cap (m^7G^5pppNp) unida covalentemente en el extremo 5' y en el extremo 3', unos plegamientos que le confieren una estructura de tipo ARN_t. El genoma contiene 4 ORFs que codifican 4 proteínas (Figura 6): El ORF 1 codifica una proteína que termina en un codón ámbar, denominada proteína corta asociada a la replicación (S-Rep); el ORF 2 codifica a la proteína larga asociada a la replicación (L-Rep) y se sintetiza mediante lectura a través del codón ámbar (*read-through*). Esta proteína, junto con la S-Rep son necesarias para la replicación viral; el ORF 3 solapa con los nucleótidos terminales del ORF 2 y codifica la proteína del movimiento y el ORF 4, que solapa con el extremo terminal del ORF 3, codifica la proteína de la cápside (Ugaki *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 2012). Las proteínas encargadas de la replicación se sintetizan a partir del ARN genómico y, tanto la MP como la CP, se sintetizan a partir de ARNs subgenómicos (ARN_{SG}) co-terminales en su extremo 3' (Ishibashi e Ishikawa, 2016).

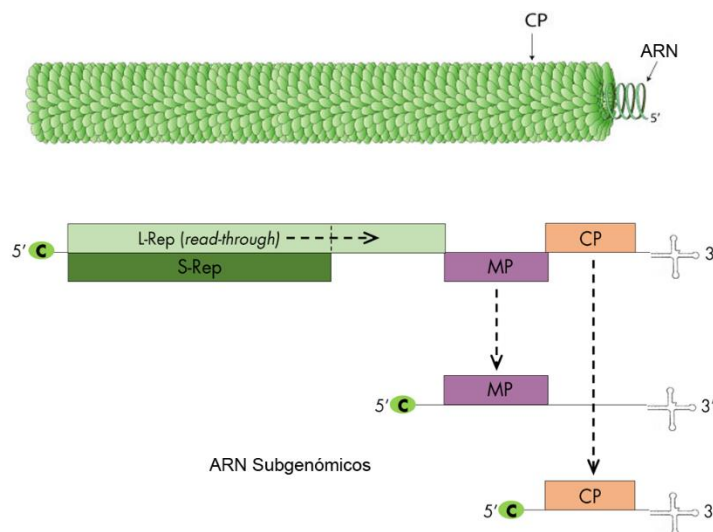


Figura 6. Estructura del virión (arriba) y organización genómica de CGMMV.

Este virus es muy estable y puede transmitirse mecánicamente con el manejo del cultivo y con el contacto entre plantas (Lecoq y Desbiez, 2012). También puede transmitirse mediante injerto y a través del suelo, por contacto con raíces infectadas o directamente de suelos contaminados, pues se ha visto que el virus puede permanecer viable varios meses en condiciones de almacenamiento (Varveri, Vassilakos y Bem, 2002; Li, Liu y Gu, 2016). Se ha determinado su transmisión horizontal a través de polen contaminado y se ha visto, en condiciones experimentales, que las abejas contribuyen a su dispersión por esta vía (Liu *et al.*, 2014; Darzi *et al.*, 2018). Una de sus principales vías de transmisión es a través de semillas infectadas (descrito en el punto 4 de esta introducción) en un rango de transmisión variable que va desde el 3-44 % para CGMMV (Faris-Mukhayyish y Makkouk, 1983; Shim *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2011). La transmisión por semilla es una de las razones para explicar la amplia distribución de este virus (Dombrovsky, Tran-Nguyen y Jones, 2017). CGMMV fue descrito en Inglaterra en 1935 (Ainsworth, 1935) y desde entonces se ha extendido a otras partes del mundo como Australia (Tesoriero *et al.*, 2016), Canadá (Ling, Li y Zhang, 2014), Estados Unidos (Tian *et al.*, 2014), Grecia (Varveri, Vassilakos y Bem, 2002), Israel (Antignus *et al.*, 1990) o Corea (Kim *et al.*, 2003), entre otros, y es, además, uno de los pocos virus, junto a TSWV y CMV descritos en la Antártida (Polischuk *et al.*, 2007). En cuanto a la variabilidad de CGMMV, existen diversos aislados que se diferencian según su susceptibilidad, gama experimental de huéspedes y sintomatología (Mandal, Mandal y Varma, 2008). En España se detectó CGMMV por primera vez en 1991 (Celix, 1996) y estudios posteriores realizados sobre la variabilidad del virus muestran la existencia de dos tipos de aislados, de origen europeo y de origen asiático (Crespo *et al.*, 2017).

CGMMV infecta a un gran número de especies vegetales de hasta 9 familias diferentes pero la transmisión por semilla ocurre solamente en cucurbitáceas (Dombrovsky, Tran-Nguyen y Jones, 2017). La sintomatología que se observa en plantas varía en función del aislado y la especie vegetal infectada, así como según las condiciones ambientales y el estadio de la planta, siendo más grave cuanto más joven sea la planta afectada. En pepino produce moteados verdes característicos en las hojas jóvenes y también puede producir deformaciones foliares, reducción del crecimiento de la planta e incluso llegar al colapso. En sandía produce también moteados y mosaicos en las hojas jóvenes y puede desarrollar lesiones necróticas en tallos y pedúnculos. En otras

especies de cucurbitáceas puede incluso producir infecciones asintomáticas (Dombrovsky, Tran-Nguyen y Jones, 2017). Los frutos también suelen verse afectados y se producen deformaciones, moteados externos y, en el interior, también suelen observarse decoloraciones y deterioros, resultando en frutos sin valor comercial (Boubourakas *et al.*, 2004).

8.4. Squash mosaic virus, SqMV.

SqMV pertenece al género *Comovirus*, familia *Secoviridae*. Su material genético se compone de dos moléculas de ARN_{mc} de sentido positivo que se encapsida dando lugar a viriones icosaédricos de aproximadamente 30 nm de diámetro. Ambas moléculas de ARN se encapsidan en viriones separados (Figura 7). Tanto el ARN-1 como el ARN-2 presentan una proteína VPg unida covalentemente al extremo 5' y una cola poli-A en el extremo 3'. El ARN-1, con una longitud de 5,9 kb se traduce en una única poliproteína que es procesada, dando lugar a 5 dominios: la proteína P1A, encargada de regular el procesamiento del resto de la poliproteína; una ARN helicasa (Hel); la proteína VPg; una proteasa (Pro) y la RdRp. El ARN-2, de 3,6 kb, también se traduce en una poliproteína que da lugar a la proteína de movimiento (MP); a la proteína grande de la cápside (CPL) y la proteína pequeña de la cápside (CPS) (Goldbach y Wellink, 1996; Sanfaçon *et al.*, 2012).

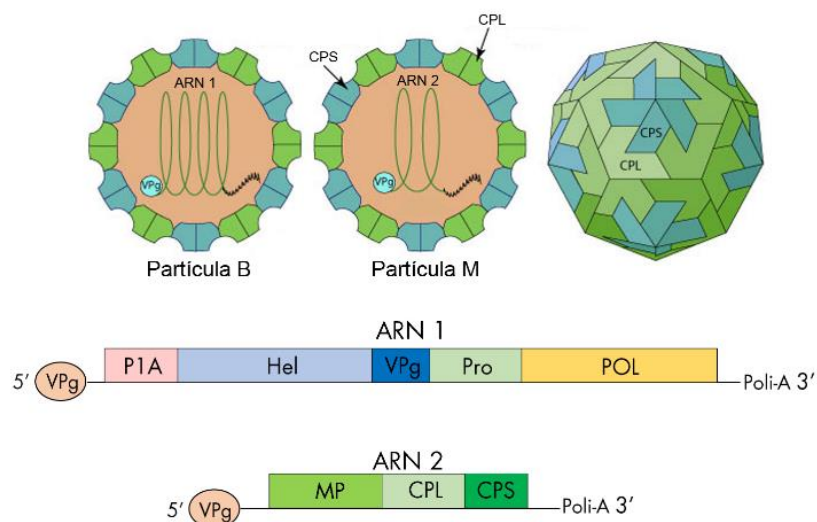


Figura 7. Estructura del virión (arriba) y organización genómica de SqMV (abajo).

Este virus se transmite mediante coleópteros de las familias *Chrysomelidae* y *Coccinellidae* de forma semipersistente (Gergerich y Scott, 1996; Tolin, Langham y Gergerich, 2016). Igualmente es capaz de transmitirse mecánicamente tanto en condiciones de laboratorio como en campo, debido a las prácticas agrícolas (Lecoq, Piquemal, Michel, & Blancard, 198 Lecoq *et al.*, 1988). También puede transmitirse por semilla. En semilla, SqMV se localiza tanto en la cubierta como en el embrión, pero la transmisión semilla-plántula sólo se produce cuando el embrión está infectado (Alvarez, 1978). Diversos trabajos realizados sobre la tasa de transmisión en semillas para distintas cucurbitáceas han mostrado un rango de porcentajes extremadamente amplio en melón, pues se han observado, según el lote, porcentajes de transmisión que van desde el 0 % hasta el 93 % (Rader, Fitzpatbick y Hildebrand, 1947; Nelson y Knuhtsen, 1973; Alvarez, 1978; Faris-Mukhayyish y Makkouk, 1983); del 1,5 % en sandía y, entre el 0,06-4,5 % en calabaza (Nelson y Knuhtsen, 1973). También se ha descrito la transmisión por semilla en plantas de *Chenopodium*, con porcentajes del 20 % para *C. quinoa* y del 23 % para *C. murale* (Lockhart, 1985).

La enfermedad causada por SqMV fue detectada por primera vez en 1934 en California, pero no fue hasta 1934 cuando se identificó SqMV como agente causal (Freitag, 1941; Kendrick, 1934). Este virus también ha sido detectado en diversos países como Nueva Zelanda (Thomas, 1973), Grecia (Avgelis y Katis, 1989), Cuba (Manso y Gonzalez, 1990), Marruecos (Lockhart, 1985), República Checa (Svoboda y Leisova-Svobodova, 2011), Trinidad (Chinnaraja *et al.*, 2016) y Australia (Maina, Edwards y Jones, 2017). Los primeros estudios sobre la diversidad genética de este virus, basados en análisis serológicos, sintomatología y gama de huéspedes, determinaron la existencia de dos serotipos y seis biotipos (Knuhtsen y Nelson, 1968; Nelson y Knuhtsen, 1973). Estudios posteriores basados en el análisis de secuencias han determinado la existencia de tres genotipos diferentes que comparten porcentajes de identidad nucleotídica entre el 84-89 % entre ellos (Haudenshield y Palukaitis, 1998; Li *et al.*, 2015).

SqMV infecta principalmente a cucurbitáceas aunque también puede infectar algunas especies del género *Chenopodium* y, experimentalmente, a algunos géneros de las familias *Umbelliferae*, *Hydrophyllae* y *Leguminosae* (Freitag, 1956). El tipo de sintomatología depende de la cepa y del huésped infectado, pero los síntomas más

característicos incluyen: mosaico, bandeado pronunciado de venas, manchas cloróticas de diversa intensidad, deformaciones foliares e incluso filimorfismos. En los frutos también se observan síntomas como deformaciones, mosaicos, aparición de protuberancias y reducción del desarrollo, que impiden su comercialización (Melgarejo *et al.*, 2010).

7.4. Melon necrotic spot virus, MNSV

MNSV es la especie tipo del género *Gammacarmovirus*, dentro de la familia *Tombusviridae* (Riviere y Rochon, 1990; Adams *et al.*, 2016). Los viriones muestran una estructura icosaédrica de unos 30 nm de diámetro (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979). Su genoma está compuesto por una molécula de ARN_{mc} de aproximadamente 4,3 kb que carece de estructura tipo 5'-cap (m⁷G⁵pppNp) y de 3'-poli-A, y que contiene 5 ORFs que codifican 5 proteínas (Figura 8). El ORF1 codifica la proteína p29 y finaliza en un codón ámbar; p29 parece tener un papel como factor de virulencia (Genovés, Navarro y Pallás, 2006); el ORF2 (p89) se traduce a partir del mismo marco de lectura que el ORF1 mediante *read-through* y codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Junto con la p29 son esenciales para la replicación viral (Riviere y Rochon, 1990); los ORF3 (p7A) y 4 (p7B) forman parte del bloque de dos genes y son proteínas de movimiento; el ORF5 codifica para la proteína de la cápside. Los dos primeros ORFs se traducen a partir del ARN genómico mientras que los ORF restantes se traducen a partir de ARN_{SG} 3' co-terminales (Riviere y Rochon, 1990).

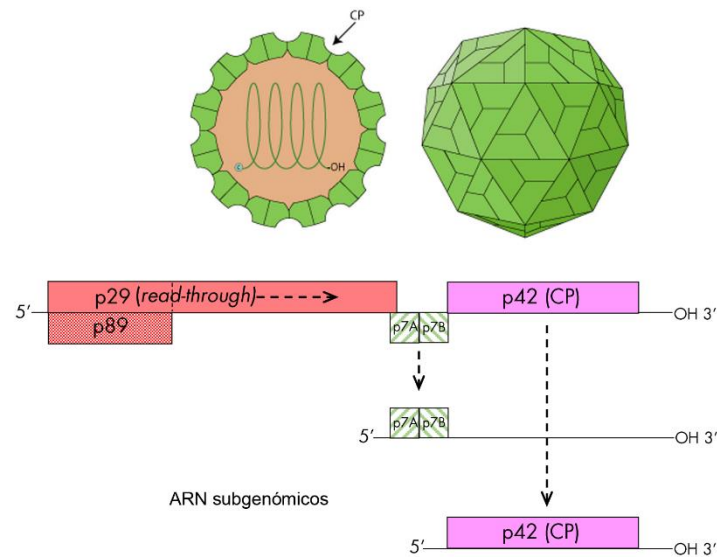


Figura 8. Estructura del virión (arriba) y organización genómica de MNSV (abajo).

Este virus puede transmitirse mecánicamente en condiciones experimentales y en condiciones naturales durante la poda y, posiblemente, por contacto entre las hojas (Blancard, Lecoq y Pitrat, 2000). Los tipos de transmisión más importantes son a través de semilla y por el hongo *Olpidium bornovanus*. En cuanto a la transmisión por semilla, se ha observado que el virus se puede localizar tanto en el exterior de la semilla como en el endospermo, pero no llega a infectar al embrión (Campbell et al., 1996). El hongo *Olpidium bornovanus* juega un papel muy importante en este tipo de transmisión por lo que en 1996 se acuñó el término de “Transmisión por semilla asistida por el vector” (*Vector-assisted seed transmission, VAST*) (Campbell, Wipf-Scheibel y Lecoq, 1996). Campbell y col. (1996) observaron que, aunque en ausencia del hongo hubiera cierto porcentaje de transmisión semilla-plántula (0,1-0,04 %), la presencia del vector incrementaba notablemente la tasa de transmisión, obteniéndose porcentajes superiores al 50 %. Trabajos anteriores al conocimiento del papel del hongo en la transmisión de MNSV mostraron porcentajes de transmisión muy variables, con valores oscilando entre el 1-22,5 % (Gonzalez-Garza et al., 1979; Avgelis, 1985). En la transmisión por semilla mediada por el vector se ha descrito el término “adquisición *in vitro*” (Campbell, Sim y Lecoq, 1995) por el cual el virus es adsorbido por la superficie de la zoospora del hongo y, al infectar éste penetrando por las raíces de la planta, introduce al virus.

MNSV fue detectado por primera vez en Japón en 1966 (Kishi, 1966). Posteriormente se ha detectado en diversos países como Estados Unidos (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979), Grecia (Avgelis, 1985), Reino Unido (Tomlinson y Thomas, 1986), Italia (Tomassoli *et al.*, 1999), Túnez (Yakoubi *et al.*, 2008) y China (Gu *et al.*, 2008), entre otros. Recientemente se ha detectado en Brasil (Moura *et al.*, 2018). En España fue detectado por primera vez en 1984 en Almería (Martínez de Salinas *et al.*, 1987) y, posteriormente, se extendió a otras zonas productoras de la península (Juárez, Ortega y Jorda-Gutierrez, 1994). Recientemente se ha detectado, por primera vez, un aislado capaz de causar síntomas agresivos en sandía (Ruiz *et al.*, 2016). En nuestro país se han detectado dos aislados capaces de superar la resistencia conferida por *nsv*, MNSV-N y MNSV-264, siendo este último el primer virus descrito capaz de superar una resistencia genética como consecuencia de un evento de recombinación en una región no codificante de su genoma (Díaz *et al.*, 2004; Miras *et al.*, 2014). No hay muchos trabajos publicados sobre la variabilidad de MNSV. Los primeros estudios de variabilidad se realizaron basándose en análisis serológicos, sintomatología y gama de huéspedes (Herrera-Vásquez, 2009). Un estudio realizado sobre la diversidad genética de este virus ha mostrado la existencia de tres grupos. Uno que relaciona aislados europeos y latinoamericanos (EU-LA), otro que agrupa aislados japoneses que afectan a melón (JP melon) y un tercer grupo que engloba aislados japoneses que afectan a sandía (JP watermelon) (Herrera-Vásquez *et al.*, 2010).

La gama de huéspedes de MNSV se limita a algunas especies de cucurbitáceas, aunque experimentalmente es capaz de producir lesiones necróticas en *Gomphrena globosa* (*Amaranthaceae*) y en dos especies de solanáceas, *Nicotiana benthamiana* y *N. clevelandii* (Gonzalez-Garza *et al.*, 1979; Avgelis y Katis, 1989). La enfermedad causada por MNSV está asociada con diversos síntomas: manchas cloróticas en las hojas, síntoma que se conoce comúnmente como “cribado”; también produce necrosis en los nervios de las hojas inferiores o intermedias, el denominado “enrejado”; lesiones necróticas en el cuello y tallo, siendo a veces el único síntoma de la enfermedad (Cuadrado, Gomez y Moreno, 1993). Los frutos también pueden verse afectados, observándose síntomas como cribado, decoloración de la pulpa y reducción del contenido en azúcares (Lecoq y Katis, 2014). Cuando las plantas se ven afectadas a una edad temprana, a veces no muestran síntomas, pero se reduce su tamaño y no suelen ser productivas. Cuando se

infectan después del cuajado de los frutos, suelen marchitarse y morir. En ocasiones puede aparecer un marchitamiento súbito que termina con la muerte de las plantas, un síndrome que se ha denominado “colapso del melón” (Cuadrado, Gómez y Moreno, 1993).

Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido el uso y la puesta a punto de diferentes técnicas para la caracterización y el diagnóstico de virus de plantas. Se ha centrado en virosis que afectan a tomate y cucurbitáceas, dos de los principales cultivos de hortalizas en España y a nivel mundial.

Los objetivos específicos de esta tesis han sido:

Identificación mediante HTS y caracterización molecular de virus de DNA asociados a brotes epidémicos agresivos de TYLCD en plantas portadoras de genes de resistencia *Ty-1/Ty-3*.

Análisis epidemiológicos y evaluación de la eficacia biológica de los virus caracterizados en el objetivo anterior, en particular en comparación con el virus recombinante TYLCV-IS76 recientemente identificado en Marruecos.

Puesta a punto de la técnica de RT-qPCR con sondas TaqMan para detectar CGMMV, MNSV y SqMV en semillas de cucurbitáceas, así como su comparación con la técnica DAS-ELISA.

Capítulo I

Caracterización de begomovirus muestreados durante epidemias agresivas de rizado amarillo en variedades de tomate portadoras del gen *Ty-1*

I.1. Introducción

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) es una de las más devastadoras en cultivos de tomate de la cuenca mediterránea, así como de muchas áreas tropicales y subtropicales, llegando a causar pérdidas en los cultivos de hasta el 100 % (Picó, Díez y Nuez, 1996; Hanssen y Lapidot, 2012). En España, la enfermedad se identificó por primera vez en 1992 y su agente causal no fue identificado hasta el año siguiente, mostrando que la epidemia estaba causada por aislados de la especie *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) (Noris *et al.*, 1994). Cuatro años después, en 1997, se detectaron los primeros brotes causados por aislados de la especie *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), de la cepa Mild (TYLCV-Mld) (Navas-Castillo *et al.*, 1997, 2000). En 2003 se identificó por primera vez la presencia de aislados de la cepa Israel de TYLCV (TYLCV-IL) (Morilla *et al.*, 2003), aunque un estudio posterior mostró que aislados de esta cepa habían estado presentes en campo desde 1999 (García-Andrés *et al.*, 2007). La coexistencia en campo de estos virus pudo llevar, probablemente, a la aparición de las dos especies recombinantes descritas en España: *Tomato yellow leaf curl Málaga virus* (TYLCMaV), recombinante entre TYLCSV y TYLCV-Mld, descrita en 2002, pero presente desde 1999 (Monci *et al.*, 2002) y *Tomato yellow leaf curl Axarquía virus* (TYLCAxV), recombinante entre TYLCSV y TYLCV-IL que apareció por primera vez en el año 2000 (García-Andrés *et al.*, 2006). Diversos trabajos realizados sobre la estructura genética de los virus asociados a esta enfermedad en España han sugerido que TYLCV-IL ha podido desplazar completamente al resto de agentes implicados en TYLCD en tomate, estableciéndose éste como el virus dominante y representativo en las epidemias españolas en este cultivo (Sánchez-Campos *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2002; Font *et al.*, 2007).

Los principales mecanismos de variación genética en los virus son, principalmente, la mutación y la recombinación (García-Arenal, Fraile y Malpica, 2003). Para los geminivirus, la recombinación parece haber sido un mecanismo fundamental para la generación de nuevas con características biológicas únicas (Lefevre y Moriones, 2015). En este contexto, un nuevo recombinante entre TYLCV y TYLCSV, denominado TYLCV-IS76, ha sido recientemente descrito en Marruecos asociado al cultivo de tomates resistentes (*Ty1/Ty3*) que mostraban síntomas de TYLCD. Desde su aparición,

probablemente coincidiendo con el uso generalizado de las variedades de tomate *Ty-1/Ty-3*, fue incrementando su frecuencia respecto a sus parentales hasta que en 2012 los había reemplazado completamente (Belabess *et al.*, 2015). Los análisis de la acumulación de virus en condiciones experimentales en plantas de tomate resistentes y susceptibles mostraron que TYLCV-IS76 era capaz de acumularse en mayor concentración que sus parentales, lo que podría proporcionar una explicación para lo observado en campo (Belabess *et al.*, 2016).

En los últimos años se han estado observando síntomas agresivos de TYLCD en plantas portadoras del gen de resistencia *Ty-1/Ty-3* en cultivos de tomate en Murcia, similares a los descritos en Marruecos (Belabess *et al.*, 2015). Esto ha motivado la realización de este trabajo, en el que se ha realizado la identificación y caracterización molecular de los virus asociados a esos brotes agresivos, tras un muestreo de dos años consecutivos (2015 y 2016) en parcelas de Águilas y Mazarrón. Además, se ha realizado una evaluación de la eficacia biológica de los virus caracterizados comparándolos con el virus recombinante recientemente descubierto en Marruecos (TYLCV-IS76) y se ha complementado el trabajo con la caracterización de un brote agresivo de TYLCD, también asociado a plantas de tomate resistente, ocurrido en Almería en 2017.

I.2. Materiales y métodos

I.2.1. Muestreos

Se muestrearon plantas de tomate resistentes que mostraban síntomas agresivos atribuibles a TYLCV. Entre 2015 y 2016 los muestreos se realizaron en Águilas y Mazarrón, las zonas productoras de tomate más importantes de la Región de Murcia. En 2015 los muestreos se llevaron a cabo en 5 parcelas de cada zona geográfica, tomándose 2 muestras por parcela (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen del muestreo realizado en este estudio.

Parcela	Nº muestras	Cultivar ^a	Nombre ^c	Año	Localización	Ref. GenBank
1	2	ND ^b	Mu 1.1 MZ:15; Mu 1.2 MZ:15	2015	Mazarrón	MH644786
2	2	Boludo	Mu 2.1 MZ:15; Mu 2.2 MZ:15	2015	Mazarrón	MH644787 MH644788
3	2	ND	Mu 3.1 MZ:15; Mu 3.2 MZ:15	2015	Mazarrón	MH680947 MH680948
4	2	ND	Mu 4.1 MZ:15; Mu 4.2 MZ:15	2015	Mazarrón	MH680949
5	2	ND	Mu 5.1 MZ:15; Mu 5.2 MZ:15	2015	Mazarrón	MH680950
1	2	Patriarca	Mu 1.1 AG:15; Mu 1.2 AG:15	2015	Águilas	MH680951
2	2	Boludo	Mu 2.1 AG:15; Mu 2.1 AG:15	2015	Águilas	NS ^d
3	2	Cecilio	Mu 3.1 AG:15; Mu 3.2 AG:15	2015	Águilas	MH680952 MH680953
4	2	Boludo	Mu 4.1 AG:15; Mu 4.2 AG:15	2015	Águilas	MH680954 MH680955
5	2	Patriarca	Mu 5.1 AG:15; Mu 5.2a AG:15; Mu 5.2b AG:15	2015	Águilas	MH680956 MH680957 MH680958
1	5	Jawara	Mu 1 MZ:16	2016	Mazarrón	MH644782
2	5	Boludo	Mu 2 MZ:16	2016	Mazarrón	MH644783
3	5	Boludo, Duratom	Mu 3 MZ:16	2016	Mazarrón	MH644784
4	5	Ramyle, Boludo	Mu 4 MZ:16	2016	Mazarrón	MH644785
1	5	Jawara, Patriarca	Mu 1 AG:16	2016	Águilas	MH644778
2	5	Boludo, Jawara	Mu 2 AG:16	2016	Águilas	MH644779
3	5	Myla	Mu 3 AG:16	2016	Águilas	MH644780
4	5	Grandoly	Mu 4 AG:16	2016	Águilas	MH644781
1	6	ND	Alm 1:17	2017	Almería	MH931766
2	6	ND	Alm 2:17	2017	Almería	MH931767
3	6	ND	Alm 3:17	2017	Almería	MH931768
4	6	ND	Alm 4:17	2017	Almería	MH931769
5	4	ND	Alm 5:17	2017	Almería	MH931770

^a Plantas resistentes con síntomas de TYLCV. ^b ND: no determinado. ^c Las muestras se nombran, para los muestreos de 2015 y 2016, como *Mu parcela número localización: año*; para el muestreo de 2017, como *Alm parcela: año*. En negrita, las muestras caracterizadas mediante RCA-NGS. ^d NS: no secuenciado

En 2016 se volvió a muestrear en las mismas zonas, aunque en este caso el número de parcelas muestreadas fue 4 por zona geográfica y se tomó un total de 5 muestras por parcela (Tabla 2). En 2017 los muestreos fueron realizados en Almería. Se muestreó un total de 5 parcelas en la zona de Campohermoso y se tomaron 6 muestras por parcela, salvo en la parcela 5, que se tomaron 4 muestras (Tabla 2). Las muestras se

tomaron de la parte más joven de cada planta y el material vegetal fue congelado a -80°C hasta su análisis.

I.2.2. Extracción de ADN y detección de geminivirus mediante PCR

La extracción de ADN de las muestras se realizó mediante el método de Doyle (Doyle, 1991). Brevemente, en un tubo de 1,5 ml, se pusieron 0,06 g de hoja y se le añadieron 600 µl de tampón de extracción CTAB (NaCl 5 M; Tris-HCl 1 M, pH 8; EDTA 0,5 M, pH 8 y 2 % peso/volumen CTAB) y dos bolas de tungsteno. El material vegetal se trituró en un TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Alemania) a 30 Hz durante 2 min. A continuación, se incubaron las muestras a 65 °C durante 30 min y posteriormente se añadió 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitó hasta emulsionar la mezcla, que posteriormente se centrifugó durante 15 min a 5.000 rpm. Se tomó la fase acuosa y se mezcló con 500 µl de isopropanol frío. Las muestras se centrifugaron a continuación durante 10 min a 13.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El ADN precipitado se lavó con 200 µl de etanol al 70 % y finalmente se disolvió en 50 µl de H₂O estéril. Los extractos obtenidos se guardaron a -20 °C hasta su uso.

La detección de geminivirus en esos extractos de ADN se hizo por PCR, utilizando iniciadores degenerados que amplifican un fragmento de la CP de 580 pb (Accotto *et al.*, 2000). La amplificación se realizó en un termociclador Bio Rad (Bio Rad T100™ Thermal Cycler) y las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 53 °C y 18 s a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C. La PCR se realizó usando la enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU) y cada reacción contenía, 1 X GoTaq® flexi buffer, 1 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador y 1 U/µl de la polimerasa en un volumen final de 25 µl. Para la PCR se utilizó 50 ng de ADN y los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0).

I.2.3. Secuenciación

I.2.3.1. Secuenciación masiva (*High throughput sequencing*, HTS)

Se secuenciaron por HTS los extractos de las muestras correspondientes al muestreo de 2015. Como paso previo a la secuenciación, se procedió a un enriquecimiento de las muestras en ADN circular mediante la técnica de amplificación

en círculo rodante (*Rolling circle amplification*, RCA) (Haible, Kober y Jeske, 2006). Esta técnica utiliza la polimerasa del fago *Phi29* (TempliPhi; GE Healthcare, Chicago, Illinois, EEUU) e iniciadores inespecíficos para amplificar moléculas de ADN circular. El procedimiento consistió en: para cada muestra, se preparó una mezcla de 5 μl de *sample buffer* y 0,6 μl de ADN, previamente diluido a una concentración final de 500 ng/ μl , que se desnaturalizó a 95 °C durante 3 min, tras lo cual se enfrió en hielo previo a la adición de 5 μl de *reaction buffer* y 0,2 μl de *enzyme mix*. Esta mezcla se incubó entre 18-20 h a 30 °C y, posteriormente, se paró la reacción incubando 10 min a 68 °C. Los productos de amplificación se comprobaron en un gel de agarosa al 0,7 % en tampón TAE. Los productos amplificados por RCA fueron utilizados directamente para su secuenciación por NGS. Éstos se enviaron a StabVida (Monte da Caparica, Portugal), donde tras comprobar la integridad y calidad del ADN, prepararon las librerías utilizando el kit de Illumina Nextera XT kit y secuenciaron con un aparato Illumina-Miseq, dando lugar a lecturas pareadas de 300 pb (Illumina, Inc., San Diego, California, EEUU). El análisis bioinformático de los datos generados fue realizado mediante la plataforma CLC Genomics 8.5.1 (CLCbio, Boston, Massachusetts, EEUU).

1.2.3.2. Clonaje y secuenciación tipo Sanger

El clonaje y la secuenciación usando el método de Sanger fue la metodología empleada para la secuenciación de los productos de RCA obtenidos de los extractos de las muestras correspondientes al muestreo de Murcia de 2016 y al de Almería de 2017. Para ello, los productos de RCA se digirieron con *NcoI* o *SacI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EEUU), que son enzimas de restricción que poseen sitios de corte único en el genoma de TYLCV. Para la digestión, 2 μl del producto de RCA se mezclaron con 1 X del buffer de la enzima, 20 U de la enzima y agua hasta un volumen final de 10 μl . La reacción se incubó durante 1 h a 37 °C y los productos de digestión resultantes se purificaron, tras separarlos electroforéticamente en geles de agarosa al 1 %, con el kit UltraClean® DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsband, California, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la purificación, los productos de digestión se clonaron en vectores pGEM®-5Zf (+) (Promega) digeridos con las mismas enzimas y defosforilados (Antarctic phosphatase, New England Biolabs) para prevenir su religación. Los productos de ligación fueron introducidos en *Escherichia coli*

Stellar™ Competent Cells (Clontech, Mountain View, California, EEUU) y se seleccionaron colonias tras cultivar las bacterias a 37 °C en LB sólido suplementado con ampicilina (100 mg/L) y solución IPTG/X-gal (Chromomax™. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Tras cultivar las bacterias 37 °C en medio líquido suplementado con ampicilina (100 mg/L), los plásmidos se extrajeron utilizando el kit Gene JET Plasmid Miniprep Kit (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante y se mandaron a secuenciar. La secuenciación se realizó utilizando los iniciadores de M13, así como iniciadores internos específicos diseñados a partir de los aislados secuenciados en 2015.

I.2.4. Análisis de las secuencias

Para los análisis de las secuencias obtenidas en este trabajo, a partir de las mismas se realizó primeramente una búsqueda de secuencias completas en la base de datos del NCBI (National Centre for Biotechnology Information), utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990).

I.2.4.1. Análisis de las secuencias obtenidas en los muestreos de 2015 y 2016

Se realizó un cálculo del porcentaje de identidad nucleotídica por pares de secuencias utilizando el programa SDT v1.2 (Muhire, Varsani y Martin, 2014). En este análisis se incluyeron secuencias de las 7 cepas que componen la especie TYLCV y una secuencia de un aislado español de la especie TYLCSV.

Con las secuencias obtenidas de estos muestreos y secuencias representativas de las cepas de TYLCV, se generó un set de 60 secuencias completas que fue editado a mano y alineado con la herramienta MUSCLE, incluida en MEGA7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016). Además, se generó un segundo set de secuencias con las obtenidas en estos muestreos que también se editó y alineó con MEGA7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016). Se realizó un análisis filogenético con ambos sets de secuencias para el que se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) con el modelo TN93+G (Tamura-Nei) (Tamura y Nei, 1993) elegido como mejor modelo de sustitución nucleotídica según MEGA7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016) y un bootstrap de 1000. Estos árboles se editaron utilizando el programa TreeGraph2 (Stöver y Müller, 2010), donde las ramas con un bootstrap inferior al 50 % se colapsaron.

Se realizó un alineamiento adicional con secuencias parciales españolas disponibles en las bases de datos (García-Andrés *et al.*, 2007) y las secuencias obtenidas en estos muestreos, utilizando MEGA7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016). Con este set de 61 secuencias se realizó otro análisis filogenético en el que se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con el modelo T92+G (Tamura-3 parámetros) (Tamura, 1992) elegido en este caso como mejor modelo de sustitución nucleotídica por MEGA7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016) y un bootstrap de 1000. Con el mismo modelo de reconstrucción filogenética, se construyó un árbol de secuencias parciales incluyendo únicamente las secuencias determinadas entre 2015 y 2016.

Como parte de la reconstrucción filogenética de estas secuencias se realizó un análisis Bayesiano utilizando el programa Beast v.1.8.4 (Bouckaert *et al.*, 2014). Se construyó un set de 54 secuencias que incluía las 14 secuencias de los aislados de TYLCV-IS76 obtenidas por Belabess y col. (2015) (Belabess *et al.*, 2015), todas ellas depuradas para eliminar la región recombinante. Para cada secuencia, el año de recolección fue anotado para el análisis. Como modelo de sustitución para el análisis se eligió el mismo que utilizado para el de máxima verosimilitud, el modelo Tamura-Nei TN93 + G (Tamura y Nei, 1993). Como reloj molecular se utilizó una distribución *log-normal* no correlacionada relajada y como modelo demográfico, se utilizó el de tamaño de población constante. La ejecución de la MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*, Método Monte Carlo usando cadenas de Markov) se creó con 70 millones de pasos en la cadena de Markov y muestreando cada 7000 pasos. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa Tracer (Rambaut *et al.*, 2018). El árbol resultante se construyó utilizando la aplicación *tree Annotator* (disponible en el paquete BEAST) y editada utilizando el programa FigTree v1.4.3.

En el análisis de estas secuencias también se incluyó un cálculo de las distancias genéticas entre y dentro de las poblaciones. Éstas se estimaron aplicando el método Kimura de 2-parámetros (Kimura, 1980) implementado en MEGA7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016). El cálculo de la ratio de sustituciones sinónimas y no sinónimas entre pares de secuencias se realizó aplicando el método de Pamilo-Bianchi-Li (Li, 1993; Pamilo y Bianchi, 2017). Para ambos cálculos, el error estándar asociado se calculó con el método del bootstrap con 500 réplicas.

También se realizó un análisis para encontrar posibles patrones de recombinación en las secuencias obtenidas con el programa RDP3 (Martin *et al.*, 2015), utilizando los parámetros seleccionados por defecto en el mismo.

I.2.4.2. Análisis de las secuencias obtenidas en el muestreo de 2017

Para el análisis filogenético de las secuencias obtenidas en el muestreo de 2017 en Almería, se construyeron árboles a partir de secuencias parciales en los que se incluyeron, además de las secuencias de 2017, parte de secuencias obtenidas en Murcia en los muestreos de 2015 y 2016, secuencias de TYLCV-IL extraídas de la base de datos, incluyendo dos aislados recombinantes TYLCV-IS76 (refs. LN831187 y LN812978) y la secuencia de un aislado español de TYLCSV (ref. KC953604). Se construyeron árboles de máxima verosimilitud utilizando el método de Hasegawa-Kishino- Yano+ G (Hasegawa, Kishino y Yano, 1985), elegido como mejor modelo de sustitución nucleotídica y un bootstrap de 1000. Al igual que en el resto de análisis filogenéticos realizados, aquellas ramas con un valor de bootstrap inferior al 50 % se colapsaron. Además, se realizó un análisis filogenético de secuencias completas con las mismas secuencias y siguiendo la metodología descritos en el apartado I.2.4.1.

Se realizó un análisis de patrones de recombinación con el programa RDP3, con los parámetros fijados por defecto (Martin *et al.*, 2015). También se utilizó el programa PlotSimilarity para la localización de los posibles eventos de recombinación.

I.2.5. Clon infectivo

Se encargó a Genscript Inc. (Piscataway, New Jersey, EEUU) la síntesis de una secuencia con 1,1 copias de la secuencia Mu 5.2b AG:15 (Tabla 5) obtenida en 2015, que fue introducida en el vector binario pBIN61. Esta construcción se utilizó para transformar *Agrobacterium tumefaciens*, cepa GV3101. El clon obtenido se denominó pTYLCV-Mu15. Para ensayar si el clon era infectivo se utilizaron dos métodos: agroinoculación directamente desde las colonias crecidas en placa y agroinfiltración a partir de cultivo líquido. Para el primer método, se crecieron las bacterias transformadas en LB sólido suplementado con kanamicina y rifampicina (ambas a 50 mg/L) durante 48 h a 28 °C. Una vez crecidas las bacterias, se tomaron de 2-4 colonias con un palillo de madera y se extendieron en la superficie a inocular. Con una aguja hipodérmica se

pinchó la zona 3-5 veces para introducir las bacterias en la planta. Las inoculaciones se realizaron en la base del tallo (corona), zona media del tallo y base de las hojas (Navot *et al.*, 1991). Para el segundo método, a partir del cultivo sólido descrito anteriormente, se realizó un precultivo (3-5 ml) en medio YEB con kanamicina y rifampicina (ambas a 50 mg/L) que se dejó en agitación a 28 °C toda la noche. Este precultivo se pasó a un matraz con el mismo medio líquido y se creció en agitación a 28 °C hasta la densidad óptica deseada (0,6-0,8). El cultivo crecido se centrifugó a 4.000 rpm durante 15 min y se resuspendió a la misma densidad óptica (0,6-0,8) en medio SIM suplementado con acetosiringona (200 µM) y se dejó en agitación unas 4 h a 25 °C, previo a la agroinfiltración. La agroinfiltración con medio líquido se realizó de dos maneras: siguiendo el esquema de la agroinoculación en medio sólido (inyección) y mediante la agroinfiltración en el envés de las hojas. El clon infectivo se evaluó con la agroinoculación de tomates de la variedad MoneyMaker (susceptible) y se utilizó un total de 24 plantas, de las cuales 10 se agroinocularon a partir de cultivo sólido, 10 se agroinfiltraron a partir de cultivo líquido y se dejaron 4 plantas sin inocular como controles negativos. Los experimentos de agroinoculación se realizaron en cámaras de crecimiento de plantas, con unas condiciones de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, a una temperatura de 25 ± 2 °C y una humedad relativa del 80 %.

I.2.6. Ensayo de acumulación

Los clones utilizados en este experimento fueron: el clon murciano pTYLCV-Mu15, descrito anteriormente, un clon de TYLCV-IS76 obtenido a partir de la secuencia de referencia LN812978 y un clon de TYLCV-IL, preparado a partir de la secuencia de referencia AM40920. Ambos fueron clonados en pCAMBIA 0380 e introducidos en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 MP90, tal y como describe Belabess y col. (2016) (Belabess *et al.*, 2016). Los clones se utilizaron tanto en infección simple como en infección mixta, utilizándose el clon TYLCV-IL como control. La preparación de los inóculos se realizó tal y como se describe en Belabess y col. (2016) (Belabess *et al.*, 2016). Para el experimento se utilizaron un total de 92 plantas, de las cuales 44 pertenecían a la variedad resistente *Pristyla* (*Ty1*) y 48 a una línea susceptible isogénica (Gautier Semeces®). La agroinoculación se realizó una semana después de ser plantadas, siguiendo el esquema de la Tabla 3, mediante la agroinfiltración de los cotiledones. Las

plantas agroinoculadas se colocaron en una cámara de crecimiento, con unas condiciones de 14 h de luz a 26 ± 2 °C y 10 h de oscuridad a 24 ± 2 °C e irrigadas con agua fertilizada con la solución 15:10:30 N: P: K + oligoelementos, hasta la finalización del experimento. Para minimizar los efectos de la posición en la cámara sobre los distintos tratamientos, las plantas se dispusieron de manera aleatoria.

Tabla 3. Diseño del experimento de acumulación.

Cultivar	Tratamiento ^a	Nº plantas infectadas
Pristyla (Ty-1/ty-1)	Mu15	11
	IL	6
	IS76	6
	Mu15+IS76	12
	IL+IS76	6
	Mock ^b	3
Susceptible (ty-1/ty-1)	Mu15	11
	IL	7
	IS76	7
	Mu15+IS76	8
	IL+IS76	12
	Mock ^b	3

^aLos tratamientos corresponden a: TYLCV-Mu15 (Mu15), TYLCV-IL (IL) and TYLCV-IS76 (IS76), en infección simple; TYLCV-Mu15+TYLCV-IS76 (Mu15+ IS76) and TYLCV-IL+TYLCV-IS76 (IL+IS76), en infección mixta. ^b Plantas agroinoculadas con el vector pCAMBIA 0380, vacío.

Las plantas se muestrearon a 10 y 30 días post-infiltración (dpi). Se identificó la hoja adulta más joven y de ésta se tomó una muestra de la región central de cada foliolo (cinco discos por planta). La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de Dellaporta y col. (1983) (Dellaporta, Wood y Hicks, 1983), con las modificaciones descritas en Urbino y col. (2013) (Urbino *et al.*, 2013).

La acumulación de virus se midió mediante qPCR. Para ello se utilizaron tres parejas de iniciadores para los tres virus inoculados y se incluyó una pareja para detectar el gen que codifica el ARN ribosomal 25S, que se utilizó como control endógeno para la normalización de las extracciones, previa a la cuantificación (Tabla 4). Se realizaron diluciones 1:100 a partir de las extracciones de ADN total que fueron las que se utilizaron para la cuantificación por qPCR. Cada reacción contenía 2 X de buffer LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Basilea, Suiza), 10 X de la pareja de iniciadores, 2 µl de la dilución de la muestra y agua hasta un volumen final de 10 µl. Las qPCR se realizaron en

placas de 384 pocillos en un termociclador LightCycler 480 (Roche) y se analizaron dos réplicas técnicas por muestra. Las concentraciones de las parejas de iniciadores utilizadas fueron de 800 nM para las parejas que amplifican a TYLCV-IL y de 300 nM para las parejas que amplifican a TYLCV-IS76, tal y como se describen en Belabess y col. (2016). Se determinó la concentración óptima para la pareja que amplifica el ADN de TYLCV-Mu15, que resultó ser también de 300 nM. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 10 s a 95 °C, 40 s a 63 °C para TYLCV-IL y TYLCV-Mu15 y 20 s a 60 °C para TYLCV-IS76 y 25S, y 15 s a 72 °C. Se realizaron rectas patrón a partir de diluciones seriadas de los plásmidos en base 10 para los tres clones (IL, Mu15 e IS76), que abarcaron un rango de concentraciones de entre 10^9 y 10^2 copias. La conversión de nanogramos de ADN a número de copias se calculó a partir del peso molecular medio de un par de bases (660 Da) y de la longitud del transcrito (número de bases, N_b), según la siguiente fórmula: $N.^\circ \text{ de copias}/\mu\text{l} = \text{ng de plásmido} \times (10^3 \text{ pg}/1\text{ng}) \times (1\text{pmol}/660 \text{ pg}) \times (1/N_b) \times 6,023 \times 10^{23} \text{ moléculas}/\text{mol} \times (1 \text{ mol}/10^{12} \text{ pmol})$.

Los datos de fluorescencia obtenidos fueron analizados con el programa LinReg (Ruijter *et al.*, 2009). Este programa calcula la concentración inicial de la diana por muestra (N_0) a partir del umbral de fluorescencia para cada diana (F_t), la media de la eficiencia de la PCR (E_{mean}) y el número de ciclos necesarios para alcanzar ese umbral (C_t), según la siguiente fórmula: $N_0 = F_t / E_{mean}^{C_t}$. A partir de los valores N_0 de las diluciones seriadas de las rectas patrón, mediante la ecuación de la recta obtenida tras representar los datos obtenidos de $\text{Log } N_0$ frente a $\text{Log } N.^\circ \text{ copias}$, se pudo transformar los valores de fluorescencia de las muestras analizadas en datos cuantificables (cantidad de virus/muestra).

Tabla 4. Iniciadores y condiciones de la qPCR empleadas en el ensayo de acumulación.

Clon (Ref. GenBank)	Iniciador	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)	Temperatura (°C)	Referencia
TYLCV-IL (AM409201)	IL_fw	AATGGCTATTTGGTAATTTTCG	146	63	Belabess et al., 2016
	IL_rev	CGTCTGTGGAACCCCTCG			
TYLCV-IS76 (LN812978)	IS76_fw	CCGATAAAGTAGTAGGCCCTACGCA	135	60	Belabess et al., 2016
	IS76_rev	AGTGGGTCCCACATATTGCAAGAC			
pTYLCV-Mu15 (MH680958) ^a	Mu_fw	AATGGCTATTTGGTAATTTTCG	146	63	Este trabajo
	Mu_rev	CGTCTGTGGAACCCCTAG			
Gen ARNr 25S ^b	25S_fw	AGAACTGGCGATGCGGGATG	161	60	Belabess et al., 2016
	25S_rev	GTTGATTGCGGAGGTGAGTTGT			

^a Mismos iniciadores que para TYLCV-IL, pero el reverso está modificado (letra en negrita). ^b Gen endógeno de tomate para la normalización de la concentración de ADN de las muestras.

I.2.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statgraphics plus 5.1 (Manugistics, Inc, Rockville, Maryland, EEUU). Para establecer la significación estadística de los datos de acumulación de virus entre tratamientos a 10 y 30 dpi, expresados como logaritmo de N.º de copias, y las medidas de las plantas realizadas a 30 dpi, se utilizó el test de Kluskal-Wallis. Para establecer la significación estadística de las diferencias entre tratamientos para un mismo clon (infección simple y mixta), se utilizó el test de Wilcoxon.

I.3. Resultados

I.3.1. Epidemias agresivas de TYLCV en cultivos de tomates resistentes durante 2015-2016 en Murcia

I.3.1.1. Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas

A finales del verano de 2015 se observó un brote inusualmente agresivo atribuible a TYLCD en diversas parcelas de Águilas y Mazarrón (Murcia). Las variedades de tomate cultivadas en esas parcelas eran portadoras de los genes de resistencia a TYLCV *Ty-1/Ty-3*. Sin embargo, los síntomas de las plantas coincidían con síntomas agresivos descritos para esta enfermedad, incluyendo acortamiento de entrenudos, arrellado, acucharado de las hojas y mosaicos amarillos acentuados. Esto motivó la realización de muestreos en las zonas afectadas para determinar la presencia de TYLCV; así se obtuvieron 20 muestras, dos por cada parcela de cada una de las zonas (Tabla 2).

Se extrajo ADN de esas muestras y en un ensayo preliminar mediante PCR, todas resultaron positivas para geminivirus (datos no mostrados). Se decidió enriquecer las preparaciones en ADN circular mediante la técnica de replicación en círculo rodante (*Rolling circle replication*, RCA) y enviar a secuenciar el ADN preparado mediante secuenciación de última generación (*High throughput sequencing*, HTS).

Se enviaron a secuenciar 2 productos de RCA por parcela, haciendo un total de 20 productos de RCA. Las 20 genotecas secuenciadas produjeron entre 3.092 y 31.436 lecturas con un tamaño medio por lectura de 300 pb. Para el mapeo de las secuencias se utilizaron como referencia los genomas de aislados de TYLCV de Reunión, Marruecos, España y Japón (números de referencia del GenBank: AM409201, LN846615, LN846614, AJ0489258 y AB192965, respectivamente). Se obtuvieron entre 26 y 8.560 lecturas mapeadas por genoteca, que cubrían entre el 79 y el 100 % de los genomas de referencia utilizados (Tabla 5) con unos valores promedio de profundidad de cobertura entre 2 y 693. En total, de los 20 productos de RCA enviados a secuenciar se pudieron determinar 15 secuencias consenso, 7 de Mazarrón y 8 de Águilas, de entre 2.780 y 2.782 nucleótidos (Tabla 2) correspondientes a genomas completos de TYLCV. Un análisis mediante BLASTn de estas secuencias reveló una similitud nucleotídica igual o superior al 98 % con otras secuencias de TYLCV pertenecientes a la cepa Israel (TYLCV-IL). Además, las secuencias obtenidas también se mapearon contra secuencias de satélites de geminivirus, y el resultado fue negativo. Según los criterios de demarcación para los geminivirus establecidos por el Comité internacional para la taxonomía de virus (*International comitee for virus taxonomy*, ICTV), que establecen la demarcación de especie en el 91 % y la de cepa en el 94 % (Brown *et al.*, 2015), deberíamos clasificar las secuencias determinadas como pertenecientes a aislados de la cepa Israel.

Tabla 5. Resultados de HTS para las muestras recolectadas en 2015^a.

Muestra	Nº de lecturas ^b	Lecturas mapeadas	Cobertura promedio	% de la referencia cubierto ^c
Mu 1.1 MZ:15	20.962	63	5,03	97
Mu 2.1 MZ:15	19.394	64	5,5	100
Mu 2.2 MZ:15	19.822	7895	642	100
Mu 3.1 MZ:15	20.322	26	1,93	79
Mu 3.2 MZ:15	18.328	1901	152,44	100
Mu 4.2 MZ:15	43.27	44	3,59	92
Mu 5.2 MZ:15	13.452	358	358	100
Mu 1.1 AG:15	12.424	2202	203,86	100
Mu 3.1 AG:15	31.354	8560	693,27	100
Mu 3.2 AG:15	22.558	133	10,13	95
Mu 4.1 AG:15	253	2218	156,49	100
Mu 4.2 AG:15	20.269	1775	128,37	100
Mu 5.1 AG:15	17.316	1983	163,93	100
Mu 5.2a AG:15	16.302	3848	332,42	100
Mu 5.2b AG:15 ^d	16.302	2471	199,45	100

^a Análisis bioinformático realizado con la plataforma *CLC Genomics 8.5.1 workbench*. ^b Lecturas pareadas. ^c Porcentaje de la secuencia de referencia cubierto durante el ensamblaje *de novo*. ^d Muestra utilizada para la construcción del clon infectivo TYLCV-Mu15.

En 2016 se repitió una situación epidemiológica similar, lo que motivó la realización de un segundo muestreo. Se tomaron 40 muestras de 8 parcelas, todas procedentes de plantas con marcados síntomas de TYLCD (Tabla 2). A partir de las muestras recolectadas se extrajo ADN que fue analizado por PCR para confirmar la presencia de geminivirus (Figura 9, A), obteniéndose un 85 % de muestras positivas. Como para 2015, se amplificó ADN circular mediante RCA. La digestión de los productos de RCA con las enzimas *NcoI* y *SacI* (Figura 9, B) y posterior clonaje y secuenciación fue la estrategia seguida para la determinación de las secuencias en este segundo muestreo. Se determinó la secuencia de un clon por cada parcela muestreada, 4 de Águilas y 4 de Mazarrón, un total de 8 clones. Tras su secuenciación, el análisis mediante BLASTn de las secuencias obtenidas proporcionó resultados similares al año anterior: un porcentaje de identidad nucleotídica superior al 98 % con otras secuencias de TYLCV pertenecientes a la cepa Israel, por lo que también deberían clasificarse las secuencias determinadas en 2016 como pertenecientes a esta cepa.

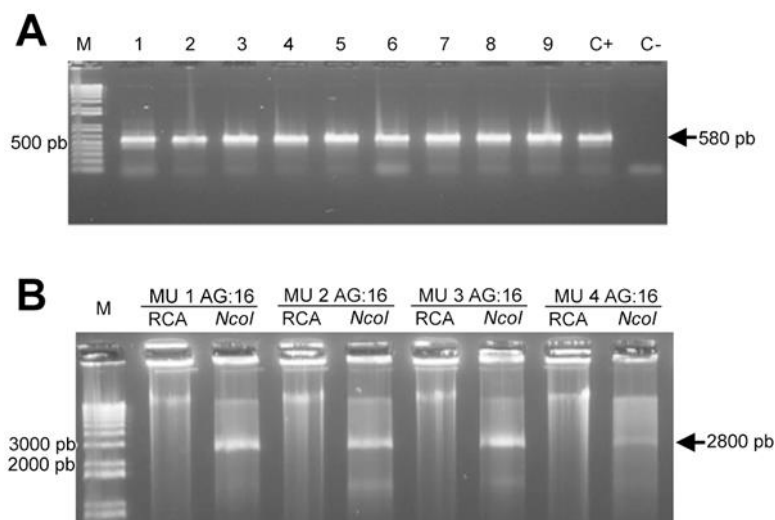


Figura 9. A, PCR para la detección de geminivirus utilizando los cebadores degenerados descritos por Accotto et al. (2000). Las calles 1 a 9 corresponden a muestras sintomáticas recolectadas en Mazarrón en 2016. Las calles C+ y C- corresponden a los controles positivo y negativo, respectivamente. **B,** Amplificaciones en círculo rodante (*Rolling circle amplification*, RCA) y digestión de los productos usando el enzima de restricción *NcoI*, correspondientes a las muestras recolectadas en Águilas en 2016 utilizadas para el clonaje y secuenciación descrito en el texto. La calle M corresponde, en ambos paneles, al marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

A partir de las secuencias determinadas en 2015 y 2016 se decidió realizar un análisis de identidad por pares utilizando el programa SDT v1.2 (Muhire, Varsani y Martin, 2014). Además de estas secuencias, se incluyeron otras de cepas que componen la especie TYLCV: Israel (refs. AJ489258, EF060196, KC953602, LN846613, LN846614, AB116629), Mild (refs. AF071228, AJ519441), Iran (ref. AJ132711), Kahnooj (ref. EU635776), Kerman (ref. GU076442), Boushehr (ref. GU076454), Oman (ref. FJ956700), así como una secuencia de la especie Sardinia (ref. KC953604). Los resultados de este análisis indican que los aislados secuenciados en este trabajo comparten porcentajes de identidad nucleotídica entre el 97,2 % y el 99,8 % (Figura 10). Al compararlos con el resto de secuencias incluidas en el análisis, se observó que los mayores porcentajes de identidad los tenían con las secuencias pertenecientes a la cepa Israel, con unos valores entre el 97,2 % y el 99,6 %, mientras que para el resto de secuencias, los porcentajes de identidad variaban entre el 77,1 % y el 78,6 % (Figura 10). Estos resultados confirman lo observado anteriormente, que las secuencias obtenidas en este trabajo pertenecen a aislados de TYLCV de la cepa Israel, al tener un porcentaje de homología superior al

criterio de demarcación descrito por el ICTV del 94 % descrito para las cepas de begomovirus.

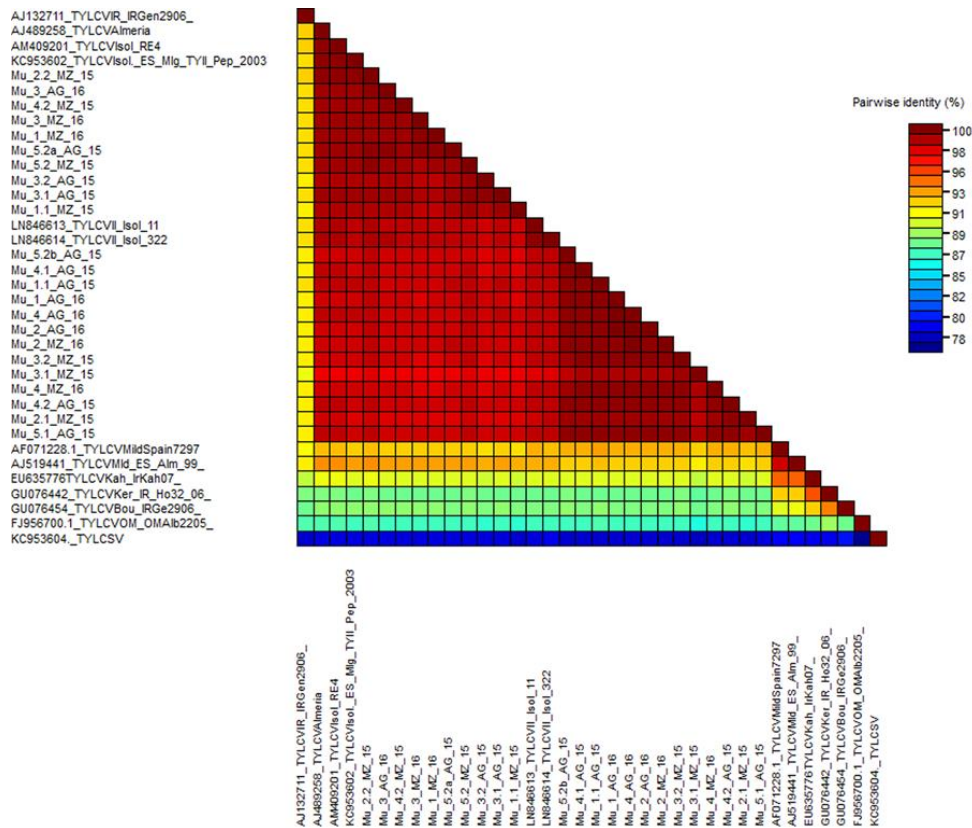


Figura 10. Matriz de color construida con el programa SDT v1.2. del análisis de identidad por pares a partir de genomas completos de Tomate yellow leaf curl virus (TYLCV). Se incluyen las muestras secuenciadas en este trabajo y secuencias representativas de las distintas cepas de TYLCV. Tomate yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) fue utilizado como fuera de grupo. TYLCV-II: Tomate yellow leaf curl virus cepa Israel; TYLCV-Om: Tomate yellow leaf curl virus cepa Oman; TYLCV-Mld: Tomate yellow leaf curl virus cepa Mild; TYLCV-Kah: Tomate yellow leaf curl virus cepa Kahnooj; TYLCV-Bou: Tomate yellow leaf curl virus cepa Boushehr; TYLCV-Ker: Tomate yellow leaf curl virus cepa Kerman y TYLCV-Ir: Tomate yellow leaf curl virus cepa Iran.

Un resultado llamativo del análisis de SDT es la agrupación de los aislados secuenciados en dos grupos, aparentemente independientes del año y zona muestreados. Podemos hablar de un grupo de 10 aislados (Grupo 1) que incluye a Mu 2.2 Mz:15, Mu 1.1 Mz:15, Mu 5.2 Mz:15, Mu 3.2 Ag:15, Mu 3.1 Ag:15, Mu 4.2 Mz:15, Mu 3 Ag:16, Mu 5.2a Ag:15, Mu 1 Mz:16 y Mu 3 Mz:16, y un grupo de 13 aislados (Grupo 2) que incluye a Mu 3.1 Mz:15, Mu 3.2 Mz:15, Mu 2 Mz:16, Mu 4 Ag:16, Mu 2 Ag:16, Mu 1 Ag:16, Mu 2.1 Mz:15, Mu 4.2Ag:15, Mu 4 Mz:16, Mu 1.1 Ag:15, Mu 5.1 Ag:15, Mu 4.1 Ag:15 y Mu 5.2b Ag:15. Esta separación se basa en que al analizar los porcentajes de

identidad por pares se vio que éstos eran mayores dentro de cada grupo que entre los grupos: entre un 98,6 % y un 99,9 % para el primer grupo y entre un 98,6 % y 99,7 % para el segundo grupo mientras que entre ambos grupos los porcentajes observados eran de entre el 97,2 % y el 98,6 %. Estos datos concuerdan con un análisis basado en distancias genéticas, que permite estimar el grado de variación genética dentro y entre poblaciones (Nei, 1972). Las distancias genéticas entre pares de aislados se estimaron usando el método de Kimura de 2-parámetros. La distancia nucleotídica media entre aislados del Grupo 1 resultó de $0,005 \pm 0,0005$ y de $0,008 \pm 0,001$ para el Grupo 2, mientras que la distancia entre aislados de distintos grupos resultó de $0,012 \pm 0,001$.

En base a estos resultados podemos concluir que las epidemias agresivas observadas en Murcia en 2015 y 2016 en variedades resistentes de tomate estuvieron asociadas con aislados de TYLCV pertenecientes a la cepa Israel y que éstos pueden diferenciarse en dos grupos independientemente del año y zona geográfica muestreados. Las secuencias fueron depositadas en la base de datos del GenBank (NCBI) con las referencias MH644778-MH644788 y MH680947-MH680958 (Tabla 2).

I.3.1.2. Análisis filogenético de los aislados murcianos muestreados durante 2015-2016

Con el fin de entender el origen y la diversificación de TYLCV en Murcia durante 2015-2016, se realizó un análisis filogenético (Figura 11) de las secuencias completas determinadas más arriba. Un primer análisis en el que se incluían únicamente las secuencias de este trabajo mostró la existencia de dos ramas en el árbol que incluían aislados independientemente del año y zona geográfica muestreados (Figura 11, A), en concordancia con los resultados de los análisis de identidad por pares y de diversidad poblacional de más arriba. Con el objetivo de establecer la relación de parentesco de estas secuencias con otras depositadas en las bases de datos, se realizó un segundo análisis filogenético en el que se incluyeron tanto secuencias próximas de acuerdo con los resultados del análisis de BLASTn descrito más arriba, así como secuencias representativas de las distintas cepas de TYLCV y de otros aislados de TYLCV-MIld procedentes de la Península Ibérica (Figura 11, B). Con este análisis se pudo observar que las secuencias descritas en este trabajo se engloban dentro de la cepa Israel y que la separación en dos grupos observada anteriormente se sigue manteniendo. Las

secuencias del Grupo 2 parecían emparentadas a dos secuencias marroquíes (refs. LN846613 y LN846614) (Figura 11, B) descritas recientemente (Belabess *et al.*, 2015), obtenidas en la región de El Jadida (Marruecos). Este es un hecho destacable, ya que, en su trabajo, Belabess y col. (2015) describen un brote de rizado amarillo del tomate de síntomas agresivos en cultivares resistentes portadores del gen *Ty-1/Ty-3* y lo asocian con la aparición de un evento de recombinación en la región intergénica del genoma viral, responsable del intercambio de un fragmento de 76 nucleótidos de la especie TYLCSV por el correspondiente fragmento de TYLCV-IL, dando lugar al recombinante que estos autores han denominado TYLCV-IS76 (Belabess *et al.*, 2015). Aunque las secuencias con las que se emparentaba el Grupo 2 no eran recombinantes, para descartar un posible origen recombinante del Grupo 2, similar al que originó a TYLCV-IS76, se realizó un alineamiento con TYLCV-IS76 y TYLCSV en la región de recombinación (Figura 12) así como un análisis de las secuencias mediante el programa RDP4 para identificar posibles eventos de recombinación. Con ambos análisis se determinó la ausencia de eventos de recombinación en los aislados caracterizados en este estudio.

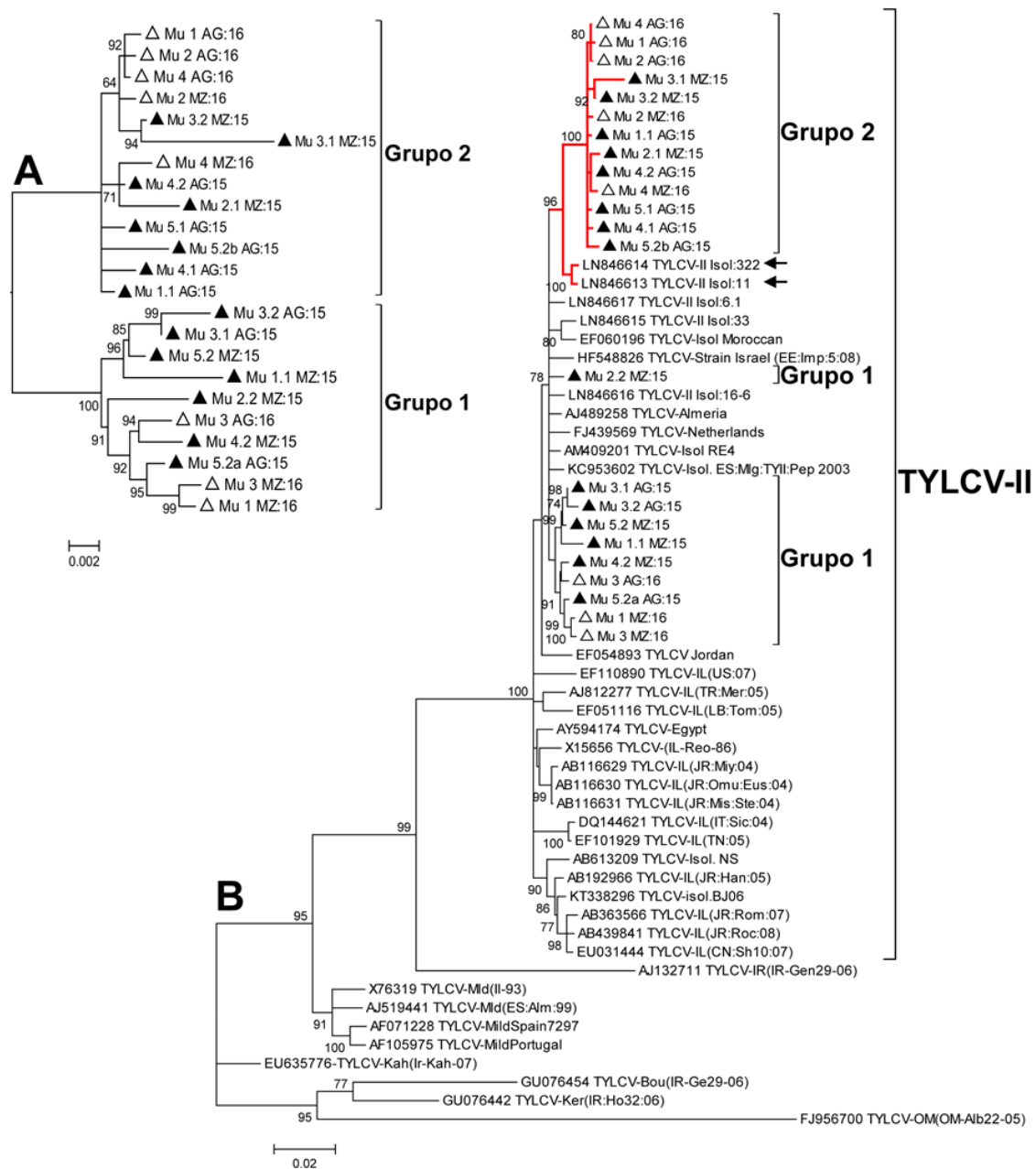


Figura 11. Análisis filogenéticos a partir de genomas completos de Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). Los árboles fueron construidos usando el método de máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) con el modelo Tamura-Nei+G y un bootstrap de 1000. Las ramas con un porcentaje de bootstrap inferior al 50 % se colapsaron; el árbol muestra valores de bootstrap superiores al 70 %. Los símbolos corresponden a: triángulos vacíos, secuencias de este trabajo obtenidas en 2015; triángulos negros, secuencias de este trabajo obtenidas en 2016. Las secuencias de este trabajo están resaltadas como Grupo 1 y Grupo 2. **A**, árbol construido con las secuencias de este trabajo. **B**, árbol construido a partir de secuencias de la cepa Israel y las secuencias de este trabajo, en el que se incluyen secuencias representativas de las otras cepas que componen la especie TYLCV. En este árbol aparece resaltada la rama correspondiente a la cepa Israel. Las flechas marcan las secuencias descritas por Belabess y col. (2015) emparentadas con el Grupo 2. En rojo, resaltada la rama que incluye al grupo 2 y las secuencias marroquíes emparentadas.

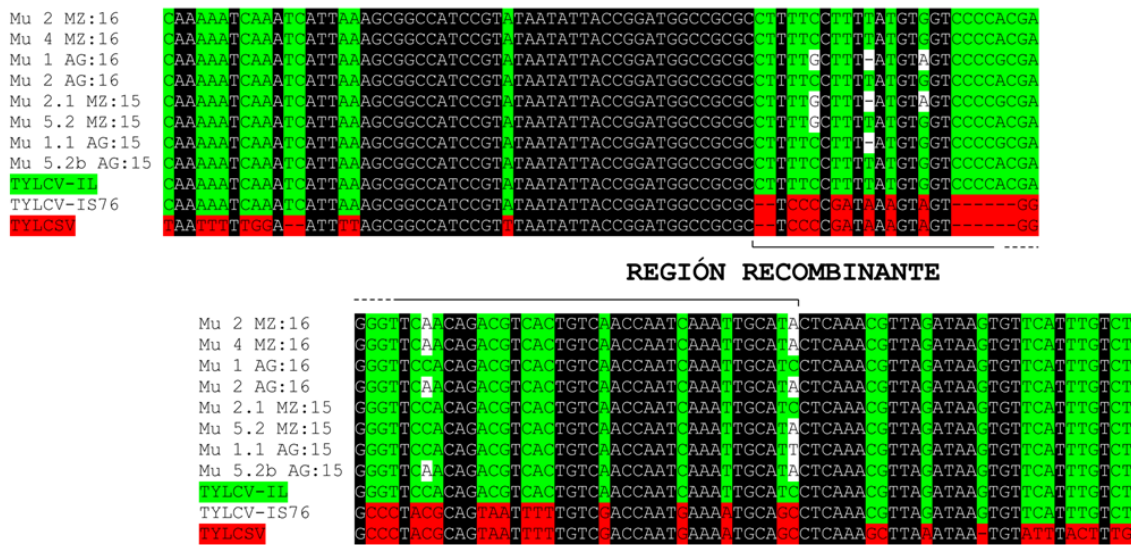


Figura 12. Alineamiento de la región intergénica de Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) donde se encuentra el evento de recombinación descrito por Belabess y col. (2015) para los aislados recombinantes TYLCV-IS76. Aparecen resaltadas en negro las partes conservadas en todas las secuencias y en verde o rojo las correspondientes a TYLCV y TYLCSV, respectivamente. La línea delimita la región recombinante. En el alineamiento se incluyen parte de las secuencias obtenidas en este trabajo pertenecientes al Grupo 2. Secuencias utilizadas en el alineamiento: TYLCV-IL: Tomato yellow leaf curl virus cepa Israel (ref. LN846614); TYLCV-IS76: Tomato yellow leaf curl virus recombinante IS76 (ref. LN831187) y TYLCSV: Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (ref. KC953604).

Con el fin de estudiar si la situación observada en el campo podía atribuirse a la introducción de una nueva variante del virus distinta a lo que había predominado en campo en años anteriores, se realizó un nuevo análisis filogenético incluyendo secuencias determinadas a partir de muestras de Murcia obtenidas en años anteriores por otros autores y depositadas en bases de datos. Las secuencias eran parciales y comprendían un fragmento de aproximadamente 780 pb que incluye parte del 5' del ORF de la Rep (incluyendo un fragmento de la región solapante del ORF C4), la región intergénica completa y parte del 5' del ORF V2 (incluyendo un fragmento solapante del 5' de la CP). En primer lugar, se estudió si el uso de secuencias parciales (Figura 13, A) reproducía los resultados obtenidos con las secuencias completas (Figura 11, A), incluyendo en el análisis sólo a las secuencias murcianas de 2015-16. Como puede observarse, las topologías de los árboles de las Figuras 11, A y 13, A son similares, con los mismos aislados apareciendo en las mismas ramas, dando validez a esta aproximación. Cuando se incluyeron en el análisis las secuencias de aislados españoles antiguos (García-Andrés *et al.*, 2007), se observó que mientras que el Grupo 1 aparecía emparentado en una rama con la mayoría de aislados españoles antiguos, el Grupo 2 aparecía en una rama independiente (Figura 13, B). Estos análisis sugirieron que en las

epidemias observadas en Murcia en 2015 y 2016 coexistían aislados de los dos grupos, los del Grupo 1 habrían estado presentes desde hace tiempo mientras que los del Grupo 2, estrechamente relacionados con los aislados de El Jadida (Figura 11, B), habrían evolucionado o aparecido en la zona recientemente.

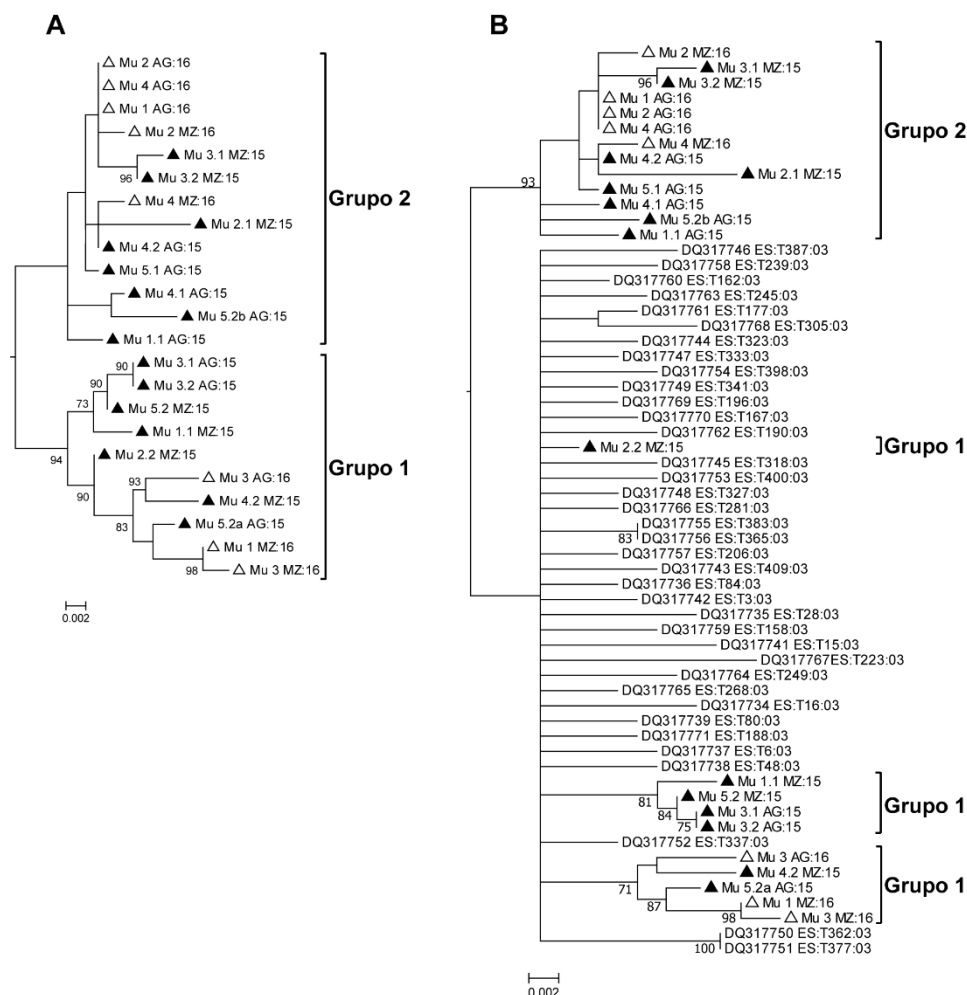


Figura 13. Análisis filogenético a partir de secuencias parciales de Tomato yellow leaf curl virus cepa Israel (TYLCV-IL) que corresponde a la región intergénica y parte del extremo 5' de la Rep y de V2 tal y como describe García-Andrés y col. (2007). Los árboles fueron construidos con el método de máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) con el modelo Tamura-3 parámetros+G y un bootstrap de 1000. Los símbolos corresponden a: triángulos vacíos, secuencias de este trabajo obtenidas en 2015; triángulos negros secuencias de este trabajo obtenidas en 2016. Señalados como Grupo 1 y Grupo 2, las secuencias de este trabajo. **A**, árbol construido con las secuencias de este trabajo. **B**, árbol construido con las secuencias de este trabajo y secuencias obtenidas en España en 2003 (García-Andrés *et al.*, 2007). Las secuencias de Murcia de 2003 se corresponden con los números de referencia de la base de datos del GenBank: DQ317757 a DQ317777.

Se realizó un análisis Bayesiano para datar la diversificación de los aislados TYLCV obtenidos en Murcia en 2015-16 y los aislados marroquíes (Figura 14). Se siguió el mismo enfoque que en Belabess y col. (2015), incluyendo a los aislados recombinantes TYLCV-IS76, así como otras secuencias seleccionadas de la base de datos (Belabess *et al.*, 2015). El fragmento derivado de TYLCSV de los recombinantes TYLCV-IS76 fue excluido del alineamiento, así como el fragmento correspondiente del resto de aislados. La tasa de sustitución media estimada fue de $5,75 \times 10^{-4}$ sust/sitio/año, con una densidad de probabilidad más alta al 95 % (*highest probability density*, HPD) que iba desde $3,66 \times 10^{-4}$ a $7,94 \times 10^{-4}$, datos que concuerdan con otros estudios realizados para TYLCV (Duffy y Holmes, 2008). Los resultados obtenidos mostraron que el Grupo 2 y los aislados marroquíes de El Jadida compartieron un ancestro común reciente hace aproximadamente 7,1 años (con una HPD al 95 % de entre 4,4 y 12 años) (nodo B). La edad para el ancestro común más reciente del grupo que comprende a los aislados TYLCV-IS76 junto con el Grupo 2 y los aislados de El Jadida (nodo A), fue estimada en 13,2 años (con una HPD al 95 % de entre 9 y 17,8 años). El escenario evolutivo de mayor parsimonia (*i.e.* aquel que necesita el número mínimo de eventos de recombinación) es el siguiente: un evento de recombinación para generar al antecesor de todos los recombinantes TYLCV-IS76 (ancestro A) y un evento de recombinación inversa que genera a un “no-recombinante” (ancestro B).

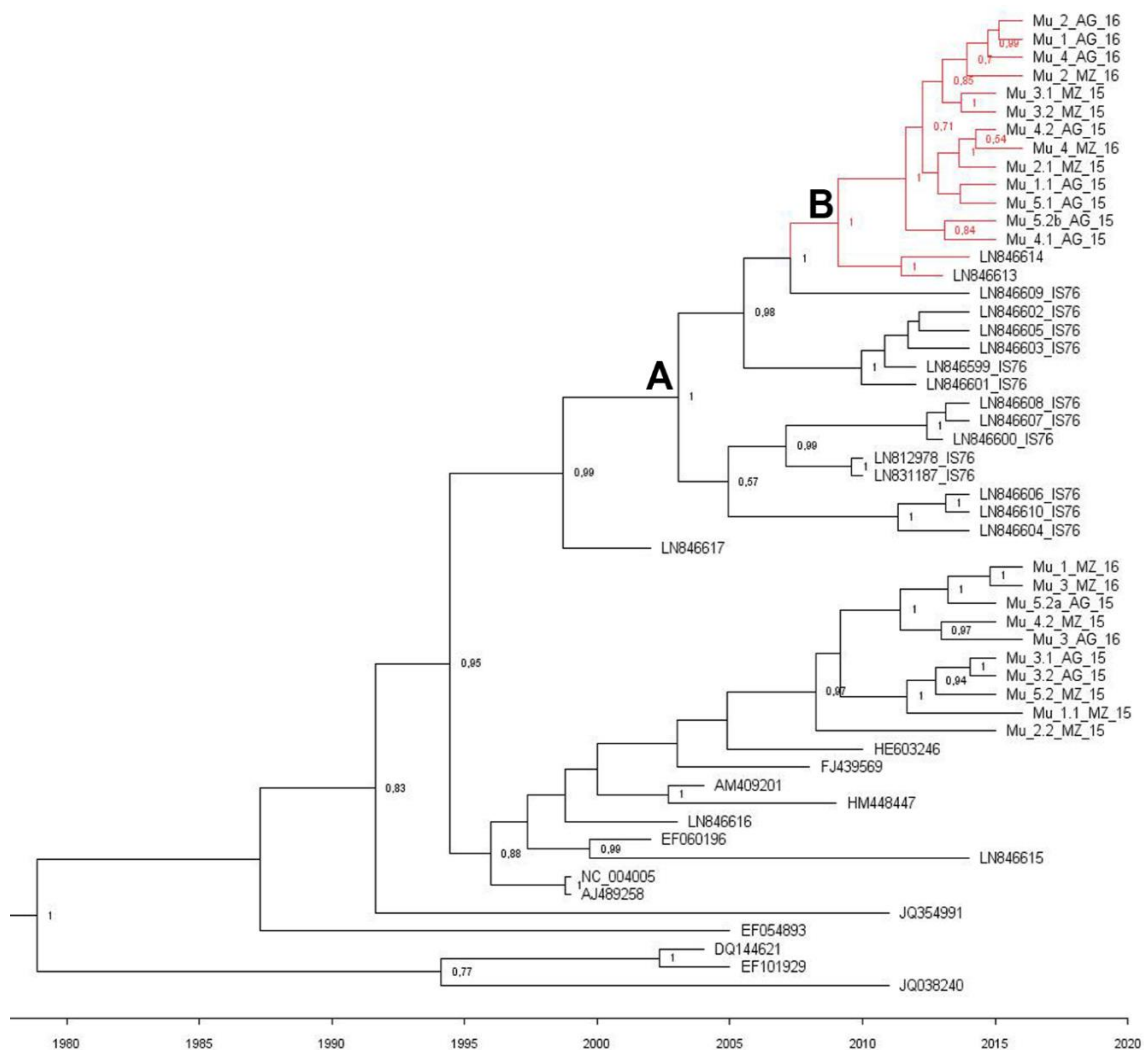


Figura 14. Análisis Bayesiano reconstruido a partir de las secuencias determinadas en este artículo y secuencias seleccionadas en las que la región recombinante de los aislados TYLCV-IS76 se ha excluido del alineamiento. Los valores de los nodos con una probabilidad posterior al 40 % no se muestran. Se muestra resaltada la rama en la que se señala al ancestro común más reciente (A) y que incluye al Grupo 2 y a los aislados marroquíes relacionados

Con el fin de intentar entender las causas de la aparente estructuración de la población de TYLCV en Murcia, se llevó a cabo un análisis de la dirección e intensidad de la selección que actúa sobre las diferentes regiones del genoma viral (Tabla 5). Mediante la estima del número de sustituciones sinónimas (d_s) y no sinónimas (d_n) entre pares de secuencias se puede determinar el coeficiente d_n-d_s . Si es positivo, sugiere que el gen se encuentra bajo selección positiva o diversificante. Si es negativo, da a entender que el gen se encuentra bajo selección negativa o purificante y si es igual a 1 el gen, se encuentra bajo selección neutra. En general, las diferencias d_n-d_s calculadas para los genes V1, V2, C1, C2 y C4 fueron negativas (Tabla 6), lo que sugiere que estos genes

estaban bajo selección negativa. Sin embargo, para el gen C3, el valor de la relación d_n-d_s fue de 0,008, lo que sugiere que este gen estaba sometido a selección positiva.

Tabla 6. Diversidad nucleotídica calculada para los distintos genes de TYLCV, utilizando el método Pamilo-Bianchi-Li. Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar.

Gen	d_n	d_s	$d_n - d_s$
V1	0,006 \pm 0,002	0,057 \pm 0,014	-0,051
V2	0,012 \pm 0,004	0,030 \pm 0,013	-0,018
C1	0,005 \pm 0,001	0,014 \pm 0,004	-0,009
C4	0,005 \pm 0,003	0,009 \pm 0,008	-0,004
C2	0,006 \pm 0,002	0,012 \pm 0,006	-0,006
C3	0,013 \pm 0,004	0,005 \pm 0,004	0,008

I.3.1.3. Preparación del clon agroinfectivo pTYLCV-Mu15

Se eligió la secuencia Mu 5.2b AG:15 (Tabla 5) como representativa del Grupo 2 para sintetizar un clon agroinfectivo. Para ello, se encargó a un proveedor la síntesis de 1,1 copias de la secuencia completa y este ADN se clonó en el plásmido binario pBin61. Para la evaluación del clon infectivo se agroinocularon tomates de la variedad Moneymaker (susceptible) utilizando dos métodos: i) agroinoculación directa desde las colonias crecidas en placa y ii) agroinfiltración a partir de cultivo líquido. Las plantas agroinoculadas a partir del cultivo en placa empezaron a mostrar síntomas a los 10 días post-infiltración (dpi), mientras que las plantas agroinfiltradas a partir de cultivo líquido no mostraron síntomas evidentes hasta 15 dpi. Comparativamente, estos síntomas eran menos pronunciados que los observados en las plantas inoculadas a partir de colonias. A partir de esas fechas, las plantas agroinoculadas mostraron los síntomas característicos de la enfermedad, incluyendo clorosis internervial, disminución del tamaño foliar y abarquillado foliar típico, así como reducción significativa del tamaño y crecimiento de las plantas inoculadas comparadas con los controles sin inocular. Por lo tanto, el clon preparado resultó infectivo; se ha denominado TYLCV-Mu15 al aislado correspondiente y pTYLCV-Mu15 al clon de ADN en el vector binario.

I.3.1.4. Comparación de TYLCV-Mu15 con TYLCV-IS76

De acuerdo con el escenario evolutivo descrito tras el análisis bayesiano, los aislados pertenecientes al Grupo 2 derivaron de TYLCV-IS76. En ese contexto, se espera que TYLCV-IS76 y los “recombinantes inversos” que generaron TYLCV, hayan coexistido

en los mismos ambientes cuando surgieron los segundos. Esto suscitó el interés de realizar un ensayo de comparación de eficacias biológicas en planta que enfrentara a TYLCV-IS76 con TYLCV-Mu15.

Los clones utilizados para este ensayo fueron pTYLCV-Mu15, un clon de TYLCV-IS76 preparado a partir de la secuencia de referencia LN812978 (Belabess *et al.*, 2016) y un clon de TYLCV-IL preparado a partir de la secuencia de referencia AM409201 (Pérfarres *et al.*, 2014), y se utilizaron tanto en infecciones simples como en infecciones mixtas. Para ello se utilizaron un total de 86 plantas de tomates resistentes y susceptibles. Además, se incluyeron 6 controles consistentes en tres plantas de cada cultivar inoculadas con un vector vacío (Mock). A partir de ahora se hará referencia a cada aislado prescindiendo de las siglas del virus, por lo que nos vamos a referir como IL, IS76 y Mu15 a las agroinoculaciones simples y como IL + IS76 y Mu15 + IS76 a las agroinoculaciones mixtas.

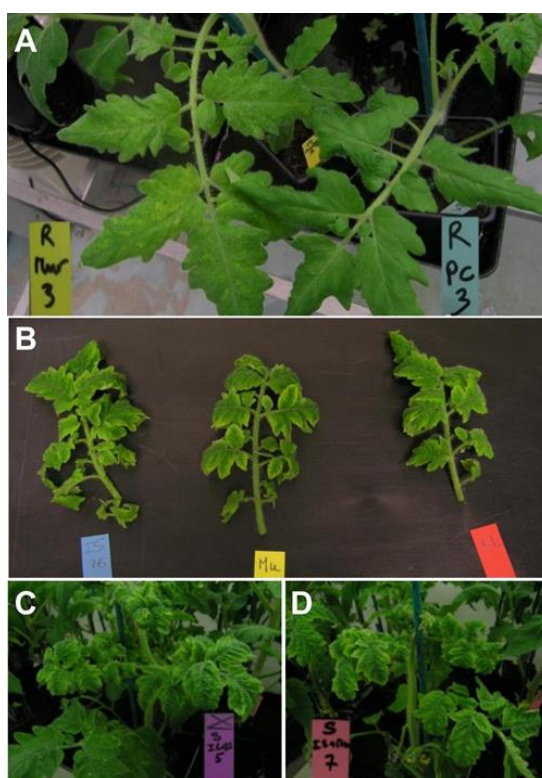


Figura 15. A, mosaico amarillo en foliolos de plantas de tomate variedad *Pristyla* (resistente, *Ty1/Ty-3*) agroinfiltradas con pTYLCV-Mu15 (izquierda) frente a las mismas plantas control, agroinfiltradas con un vector vacío (derecha) a 18 dpi. B, C y D: Expresión de síntomas en plantas susceptibles a 30 dpi. B, Comparación entre los tres clones por separado, de izquierda a derecha TYLCV-IS76, pTYLCV-Mu15 y TYLCV-IL. C y D, plantas con inoculaciones mixtas de TYLCV-IL + TYLCV-IS76 y pTYLCV-Mu15 + TYLCV-IS76, respectivamente.

A 10 dpi ya se observaban síntomas de la enfermedad en el 63 % de las plantas susceptibles inoculadas. A 18 dpi, el 100 % de plantas susceptibles inoculadas con las distintas variantes ya presentaba síntomas y se observó que algunas plantas resistentes inoculadas con IL (1 planta), Mu15 (2 plantas), IL + IS76 (1 planta) y Mu15 + IS76 (3 plantas) presentaban un ligero mosaico amarillo comparadas con los controles negativos (Figura 15, A). A la finalización del experimento, a 30 dpi, la expresión de los síntomas en plantas susceptibles observada para los tres clones era similar y no se apreciaban diferencias entre ellos ni en infección simple (Figura 15, B) ni en infección mixta (Figuras 15, C y D). En las plantas resistentes, a 30 dpi se observó una recuperación de los síntomas y en los nuevos brotes ya no se apreciaba el ligero mosaico amarillo que sí se apreció a 18 dpi. Además de la evaluación de síntomas, como parte de la evaluación fenotípica, se cuantificó el efecto de las agroinoculaciones sobre el tamaño de las plantas. Las medidas se tomaron a 30 dpi y para ello se midió la longitud del tallo desde los cotiledones hasta el ápice. Se observó gran diferencia entre las plantas susceptibles y las resistentes (Figura 16). En las plantas susceptibles no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, pero estas diferencias sí eran significativas con respecto a las plantas inoculadas con el vector vacío ($p= 0,03$). En las plantas resistentes, ni en infección simple ni en infección mixta, se observaron diferencias significativas respecto a las inoculadas con el vector vacío ($p= 0,19$).

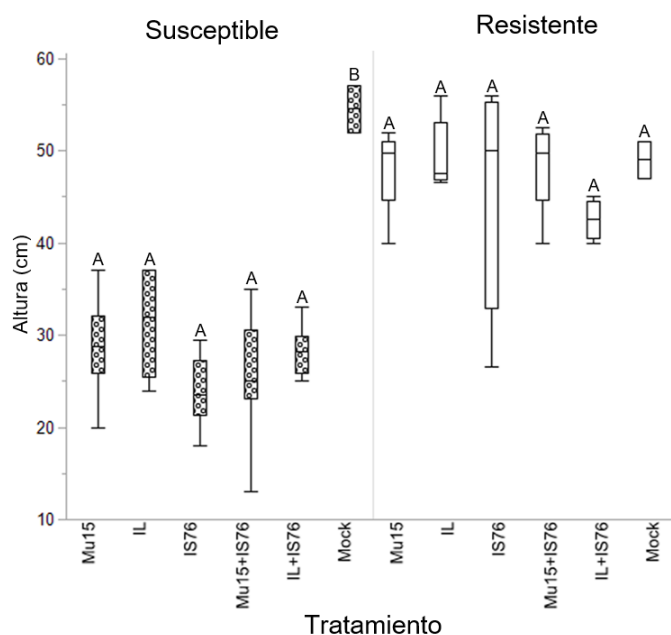


Figura 16. Medidas de altura (cm) de plantas resistentes y susceptibles realizadas a 30 dpi, comparando el efecto de los distintos tratamientos frente a las plantas control inoculadas con un vector vacío (Mock). En el diagrama de cajas se representa la mediana (línea), y los bordes de las cajas están delimitados por los cuartiles 25 % y 75 %. Las líneas representan el rango de los datos y los puntos corresponden a valores fuera de rango. Las letras mayúsculas representan las diferencias significativas (test de Kluskal-Wallis, $p < 0,05$), donde A y B representan los grupos con diferencias significativas. Tratamientos de agroinoculación, en infección simple Mu15 (clon pTYLCV-Mu15); IL (clon TYLCV-IL); IS76 (clon TYLCV-IS76). En infección mixta, Mu15 + IS76 (mezcla de pTYLCV-Mu15 y TYLCV-IS76) e IL + IS76 (mezcla de TYLCV-IL y TYLCV-IS76).

Para medir la acumulación de virus, se tomaron muestras a 10 y 30 dpi y la cuantificación se realizó por PCR a tiempo real igual que en Belabess y col. (2016). En plantas susceptibles, en las infecciones simples no se observaron diferencias significativas en la acumulación de virus a ninguno de los dos tiempos post-inoculación. En cambio, en las infecciones mixtas, ya desde 10 dpi, se observaron ciertas diferencias en los dos tratamientos y estas diferencias se hicieron significativas a 30 dpi, observándose una mayor acumulación de IS76 respecto a los otros dos clones. Esta diferencia fue particularmente acusada en el caso de la coinfección con Mu15 donde había plantas cuyos niveles de acumulación eran inferiores al umbral de detección (Figura 17, A). En plantas resistentes, en las infecciones simples se detectó una tendencia hacia una mayor acumulación de Mu15, que fue más evidente a 30 dpi: A 10 dpi Mu15 e IS76 se acumularon a niveles similares y significativamente mayores que IL, mientras que a 30 dpi Mu15 se acumuló a niveles significativamente mayores que los otros dos aislados (Figura 17, B), llegando a observarse niveles de acumulación hasta 10 veces mayores con respecto a IL. Sin embargo, esta tendencia revertió en las infecciones

mixtas, en las que la coinfección de IS76 con Mu15 resultó en una depresión de la acumulación de Mu15, con valores significativamente inferiores a 30 dpi (Figura 17, B). Este efecto de las infecciones mixtas sobre la acumulación de virus se analizó también comparando clones de virus a lo largo de todos los tratamientos: mientras que los niveles de acumulación de IS76 no presentaron diferencias significativas entre tratamientos a ninguno de los tiempos post-inoculación, independientemente de la variedad de tomate analizada, sí se observaron diferencias en cuanto a la acumulación de los otros dos clones entre tratamientos, sobre todo para Mu15, donde ya desde 10 dpi se observaron diferencias significativas tanto en plantas susceptibles como en plantas resistentes.

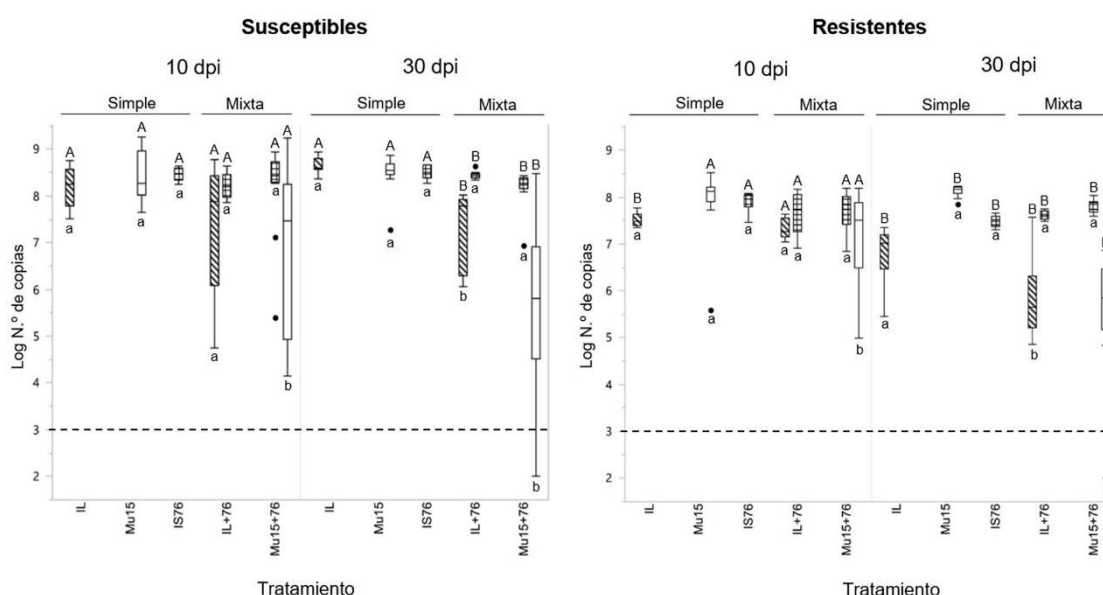


Figura 17. Datos de acumulación de ADN viral en plantas susceptibles (A) y resistentes (B) a 10 dpi y 30 dpi. Los datos de acumulación están expresados como logaritmo del número de copias. La línea representa el umbral positivo/negativo. En las cajas se representa la mediana (línea) y los bordes de las cajas están delimitados por los cuartiles 25 % y 75 %. Las líneas representan el rango de los datos y los puntos corresponden a valores fuera de rango. Las letras mayúsculas representan las diferencias significativas (test de Kluskal-Wallis $p < 0,05$) comparando la acumulación de los diferentes virus en infección simple y en infección mixta, donde A representa que no hay diferencias significativas y B representa las diferencias significativas. Las letras en minúscula indican las diferencias significativas (test de Wilcoxon, $p < 0,05$) para un mismo virus comparado en infección simple y en infección mixta, donde la letra a indica que no hay diferencias significativas mientras que la letra b indica las diferencias significativas. El patrón de las cajas corresponde a: blanco: TYLCV-Mu15; líneas oblicuas: TYLCV-IL; cuadrados: TYLCV-IS76. Tratamientos de agroinoculación, en infección simple Mu15 (clon pTYLCV-Mu15); IL (clon TYLCV-IL); IS76 (clon TYLCV-IS76). En infección mixta, Mu15 + IS76 (mezcla de pTYLCV-Mu15 y TYLCV-IS76) e IL + IS76 (mezcla de TYLCV-II y TYLCV-IS76).

En conjunto, en infección mixta TYLCV-Mu15 tiene un comportamiento similar al descrito por Belabess y col. (2016) para aislados de TYLCV-IL, observándose el mismo efecto de depresión en su acumulación frente a TYLCV-IS76 ya desde etapas tempranas

en la infección (10 dpi). En infección simple, en cambio, presenta un comportamiento similar a TYLCV-IS76, e incluso puede tener una ventaja competitiva en plantas resistentes ya que a 30 dpi presenta unos niveles de acumulación significativamente superiores.

I.3.2. Epidemias agresivas de TYLCV en cultivos de tomate resistentes durante 2017 en Almería

En 2017 se volvieron a realizar muestreos, esta vez en Almería y también en parcelas con variedades de tomate portadoras de los genes de resistencia a TYLCV *Ty-1/Ty-3* y que también presentaban síntomas agresivos atribuibles TYLCD. Se muestrearon 6 parcelas y se tomó un total de 33 muestras (Tabla 2). En este caso, también se realizó una PCR partir de los extractos de ADN de las muestras para confirmar la presencia de geminivirus con la que se obtuvo un 100 % de muestras positivas. Al igual que en el muestreo de Murcia de 2016, el clonaje y la secuenciación a partir de los productos de RCA digeridos con *NcoI* y *SacI*, fue la metodología seguida para la determinación de las secuencias de este muestreo, y se obtuvo un total de 5 clones de parcelas diferentes.

El análisis de sus secuencias mediante BLASTn mostró que todas las secuencias pertenecían a aislados de TYLCV-IL. Dos de los clones secuenciados, Alm 4:17 y Alm 5:17, presentaron un porcentaje de similitud nucleotídica del 99,7 % con el aislado español TYLCV-IL_Mu_5.1_AG:15 (ref. MH680956), obtenido en el muestreo de Murcia de 2015. A estos clones se les denominó, respectivamente, TYLCV-IL_1_ALM:17 y TYLCV-IL_2_ALM:17 y sus secuencias nucleotídicas fueron depositadas en la base de datos del NCBI (GenBank) con los números de referencia MH931769 y MH931770. Los otros tres clones, Alm 1:17; Alm 2:10 y Alm 3:17, sorprendentemente, presentaron porcentajes de similitud nucleotídica máximos del orden del 99,7 % con el aislado recombinante TYLCV-IL IS76 G2-6 (ref. LN846599). Se les denominó, tentativamente, TYLCV-IS76_1_ALM:17; TYLCV-IS76_2_ALM:17 y TYLCV-IS76_3_ALM:17, y sus secuencias nucleotídicas fueron depositadas en el GenBank con las referencias MH931766, MH931767 y MH931768.

Tabla 7. Resultados de un análisis de recombinación ^a realizado con secuencias caracterizadas en el muestreo de Almería 2017^b.

Recombinante	Evento de recombinación	Secuencias parentales		Método	Valor p
		Mayor	Menor		
TYLCV-IS76_1_ALM:17 (MH931766)				RDP	1,574 x 10 ⁻¹²
TYLCV-IS76_2_ALM:17 (MH931767)	2810-96	TYLCV-IL_1_ALM:17 (MH931769)	TYLCSV ES: Mur: TY2:Tom2011 (KC953604)	GENECONV	5,141 x 10 ⁻⁰⁸
TYLCV-IS76_3_ALM:17 (MH931768)				MaxChi Chimaera	8,170 x 10 ⁻⁰⁴ 1,202 x 10 ⁻⁰³

^a Se ha utilizado el paquete de programas RDP3 manteniendo los parámetros del programa por defecto.

^b Son los mismos resultados para las tres secuencias.

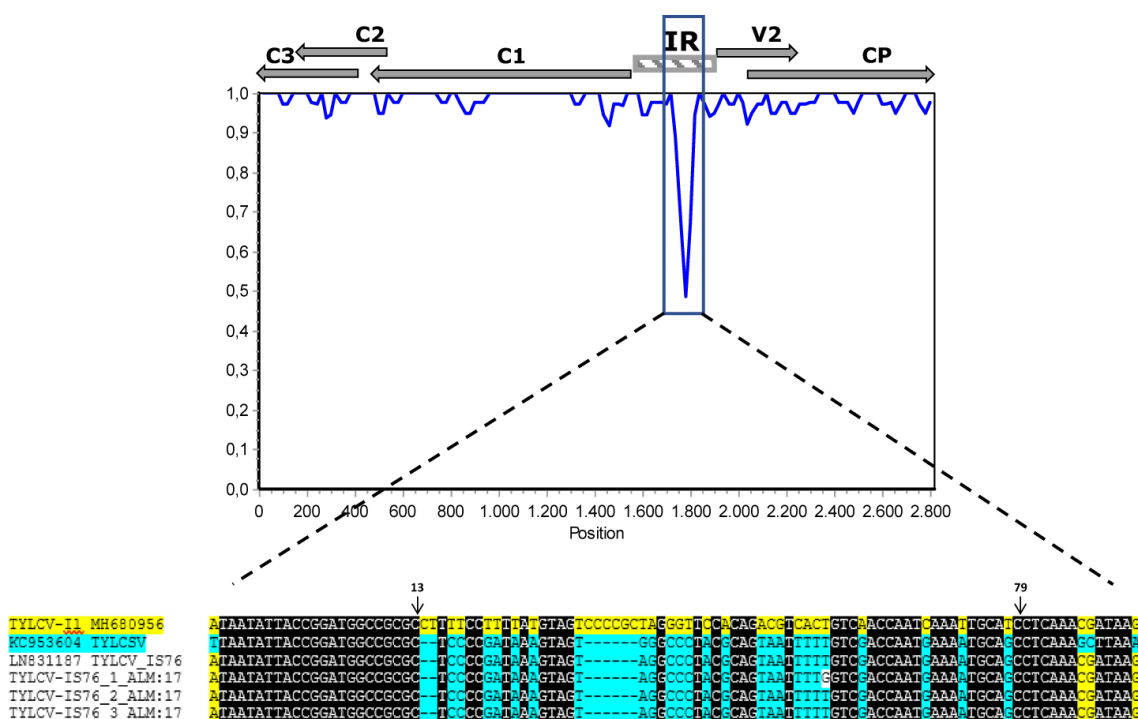


Figura 18. Diagrama realizado con el programa Plot similarity (Tamaño de ventana= 50 nts), comparando la secuencia de TYLCV-IS76 1 ALM:17 (ref. MH931766) con TYLCV-IL Mu 5,1 AG:15 (ref. MH680956). El genoma del virus está centrado para poder apreciarse el evento de recombinación. La región recombinante está recuadrada en negro en la figura y la región donde se produce el evento de recombinación se muestra debajo. En el alineamiento, las regiones conservadas en todas las secuencias se muestran en negro. Aquellas correspondientes a TYLCV o TYLCSV están resaltadas en amarillo o azul, respectivamente. Los números se corresponden con los nucleótidos, tomando como 1 el que se encuentra a continuación del nonanucleótido conservado en los geminivirus (TAATATTAC). Las secuencias empleadas para el alineamiento son: TYLCV-IL: Tomato yellow leaf curl virus cepa Israel (ref. MH680956); TYLCV-IS76: Tomato yellow leaf curl virus recombinante IS76 (ref. LN831187) y TYLCSV: Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (ref. KC953604). Las secuencias determinadas en este trabajo están nombradas como TYLCV-IS76_clon_ALM:17.

Un análisis realizado con el programa RDP4 confirmó la naturaleza recombinante de las secuencias de los clones MH931766-MH931768 (Tabla 6). Usando el programa Plot Similarity se pudo localizar el segmento recombinante entre los nucleótidos 13 y 79 (Figura 10). Como se comprobó mediante un alineamiento manual (Figura 10), este evento de recombinación coincidía con el observado en los aislados recombinantes TYLCV-IS76 (Belabess *et al.*, 2015). Para completar la caracterización de los clones obtenidos en este muestreo, se realizó un análisis filogenético en el que se incluyeron, además de las secuencias de estos cinco clones, parte de las secuencias de los muestreos de Murcia de 2015-16 y otras secuencias de la base de datos. Este análisis se realizó a partir de secuencias parciales, pues se separó la región correspondiente al evento de recombinación (Figura 11, A) del resto del genoma (Figura 11, B). Como puede observarse, en el árbol correspondiente al evento de recombinación, los aislados tipo TYLCV-IS76 secuenciados en Marruecos (LN812978 y LN831187) y los secuenciados en este trabajo (refs. MH931766-MH931768) se agrupan junto a la secuencia TYLCSV (Figura 11, A). Sin embargo, en el árbol correspondiente a la región no recombinante, los aislados tipo TYLCV-IS76 se agrupan junto al resto de aislados TYLCV-IL (Figura 11, B). Las secuencias no recombinantes identificadas en este muestreo de 2017 se agruparon junto al grupo de secuencias murcianas del que hemos denominado Grupo 2 en este trabajo (Figuras 19, A y B). Este hecho se confirmó con la realización de un segundo análisis filogenético, esta vez junto al resto de secuencias completas del punto 2 (datos no mostrados), lo que parece evidenciar un posible origen común.

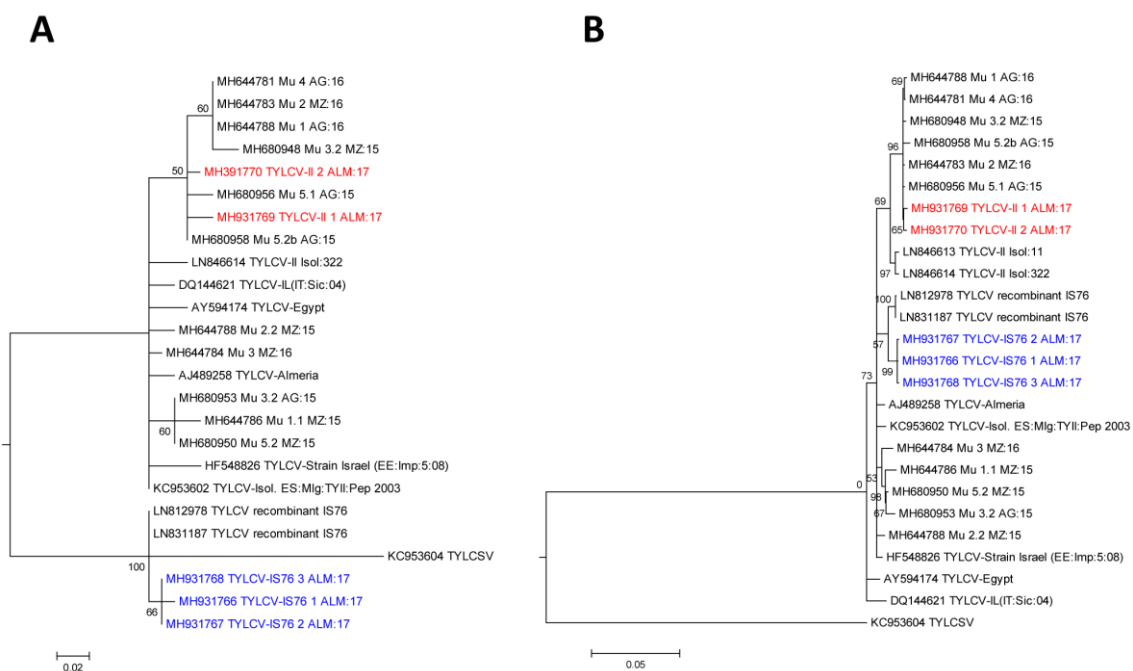


Figura 19. Análisis filogenético a partir de secuencias parciales. **A**, árbol que se corresponde con la secuencia donde se encuentra el evento de recombinación, correspondiente con TYLCSV. **B**, Árbol correspondiente con la secuencia no recombinante, TYLCV-IL. Resaltadas en rojo y azul las secuencias no recombinantes y recombinantes secuenciadas en este trabajo en 2017. Los árboles fueron construidos con el método de máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) con el modelo Hasegawa-Kishino-Yano y un bootstrap de 1000. Las ramas con valores de bootstrap inferiores al 50% están colapsadas.

I.4. Discusión

España es uno de los principales productores de tomate en el mundo, por lo que el estudio de una enfermedad tan devastadora como la causada por TYLCV es de gran importancia. El desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva ha supuesto un hito en el campo de la biología vegetal (Roossinck, 2017). Los estudios realizados para la identificación de begomovirus utilizando NGS demuestran que la combinación de la técnica de enriquecimiento de las muestras en ADN circular mediante el RCA, previa a la secuenciación, resulta la mejor opción a la hora de abordar esta técnica (Hagen *et al.*, 2012; Idris *et al.*, 2014). Hagen y col. (2012) mostraron, en una muestra artificialmente infectada con un clon infectivo de TYLCV, que con un enriquecimiento previo de las muestras lograban tener más de un 78 % de las lecturas correspondientes al virus, mientras que, en una muestra sin enriquecer, sólo una pequeña fracción correspondía a secuencias virales (0,07 %). Los inusuales síntomas agresivos observados en plantas resistentes en 2015 llevaron a elegir la secuenciación masiva como mejor opción a la hora de estudiar el problema. Con los resultados obtenidos concluimos que las

epidemias agresivas se asociaban con aislados de TYLCV de la cepa Israel. Descartamos la presencia de otras especies de geminivirus, como ToLCNDV, que ha sido recientemente descubierto infectando tomate en España (Ruiz *et al.*, 2015) así como la presencia de betasatélites, moléculas de ADN circular asociadas a begomovirus monopartitos, capaces de modular los síntomas que induce el virus auxiliar (Zhou, 2013). A modo comparativo, la estrategia seguida al año siguiente, frente a una situación epidemiológica similar, fue la del clonaje y secuenciación tipo Sanger, una técnica más rápida y económica que la secuenciación masiva. Con esta técnica llegamos a conclusiones semejantes a las obtenidas con la secuenciación masiva, pero la secuenciación masiva ha permitido descartar con mayor seguridad la implicación de otros virus y agentes subvirales de genomas de ADN circular, por lo que la combinación de ambas técnicas de una manera similar a lo que se ha hecho en este trabajo puede ser la solución más satisfactoria en casos parecidos.

Tanto el estudio de la diversidad nucleotídica poblacional como los análisis filogenéticos realizados apoyan la existencia de dos grupos de aislados de TYLCV-IL conformando las epidemias estudiadas en este trabajo. La agrupación observada de los aislados obtenidos, independientemente del año y áreas muestreados, parece indicar la presencia de una población donde coexisten ambos tipos de aislados. En el análisis filogenético realizado a partir de secuencias parciales, además pudimos concluir que uno de los grupos, el Grupo 1, por su relación filogenética con aislados españoles antiguos, pudo haber estado presente desde hace tiempo. Sin embargo, el Grupo 2, que aparece emparentado con aislados marroquíes recientemente descubiertos en la región de El Jadida, pudo ser el resultado de una introducción más o menos reciente. Los análisis realizados también sugieren que los aislados del Grupo 2 hayan podido derivar de los recombinantes marroquíes TYLCV-IS76 a través de un evento de recombinación inversa, como ya sugirió en su trabajo Belabess y col. (2015) para los aislados TYLCV de El Jadida (Belabess *et al.*, 2015). Se ha sugerido un posible escenario evolutivo en el que un evento de recombinación único pudo llevar a la aparición de TYLCV-IS76 y un evento posterior de recombinación inversa pudo ocurrir para generar el tipo TYLCV obtenido en El Jadida. Este escenario parece consistente con las observaciones de campo y los resultados experimentales que sugieren que la emergencia de los recombinantes TYLCV-IS76 es un evento raro (Belabess *et al.*, 2018). El tráfico de material infectado, así como los

movimientos del vector parecen ser los causantes de la amplia distribución de la enfermedad por todo el mundo (Seal, Jeger y Van den Bosch, 2006; Navas-Castillo, Fiallo-Olivé y Sánchez-Campos, 2011). Además, se ha observado en condiciones experimentales que frutos infectados son capaces de servir de inóculo para *Bemisia tabaci* (Delatte *et al.*, 2003). Dada la proximidad geográfica entre Marruecos y España y el comercio de importación de tomate entre ambos países, la introducción de un antepasado del Grupo 2 puede ser el origen más plausible para su aparición en España. La datación del ancestro común de los recombinantes marroquíes recién descubiertos, realizada por Belabess y col. (2015), sugiere que el ancestro más reciente pudo surgir en Marruecos a finales de los años 90 o principios de la década del 2000 (Belabess *et al.*, 2015). Dado que los aislados españoles anteriores a 2003 sólo se emparentan con el Grupo 1 identificado en este trabajo, la introducción de aislados similares al Grupo 2 pudo ocurrir en una fecha posterior y desde entonces haber convivido los dos tipos de aislados en campo.

El clon sintetizado en este trabajo resultó infectivo. Usando este clon se fue capaz de reproducir los síntomas de la enfermedad en plantas susceptibles, pero no se logró reproducir la enfermedad en plantas resistentes en nuestras condiciones experimentales, tal y como se observó en la evaluación fenotípica en el ensayo de acumulación donde, salvo un ligero mosaico observado a 18 dpi y una ligera reducción del tamaño en comparación con las plantas inoculadas con el vector vacío, no se logró reproducir la sintomatología agresiva observada en el campo. Es importante mencionar que se han obtenido resultados similares con el clon TYLCV-IS76 en otros ensayos, pues en condiciones experimentales tampoco pudieron observar la aparición de síntomas en plantas resistentes inoculadas (Belabess *et al.*, 2016). Experimentos llevados a cabo al evaluar los niveles de resistencia para distintos genotipos concluyen que factores como la presión de inóculo, la edad de la planta (Picó, Díez y Nuez, 1996), así como las altas temperaturas y la alta intensidad lumínica que ocurren en verano (Lapidot y Polston, 2006) ejercen efectos muy importantes, favoreciendo la expresión de los síntomas de la enfermedad.

Las condiciones climáticas también condicionan las poblaciones de vectores, que se ven favorecidas por las bajas precipitaciones, las altas temperaturas y la humedad (Seal, Van den Bosch y Jeger, 2006; Navas-Castillo, Fiallo-Olivé y Sánchez-Campos, 2011).

En los últimos años, en muchas áreas mediterráneas, la existencia de inviernos suaves y primaveras cálidas ha dado lugar a poblaciones inusualmente altas de *B. tabaci* antes de lo previsto. Además, las temperaturas de verano se han mantenido inusualmente altas durante largos periodos de tiempo. Es posible que, en estas condiciones, combinadas con esas mayores eficiencias de multiplicación observadas para TYLCV-Mu15 y TYLCV-IS76, sean responsables de los síntomas agresivos observados en los cultivos de tomates resistentes. Un experimento sometiendo a las plantas inoculadas a las condiciones que se dan en campo en verano sería interesante para corroborar esta hipótesis. Sin embargo, no se puede excluir la implicación de otros factores desconocidos, incluido el posible efecto de patógenos crípticos como el virus meridional del tomate (Southern tomato virus, STV) (Verbeek *et al.*, 2015; Puchades *et al.*, 2017).

En el ensayo de acumulación, al igual que ocurre en Belabess y col. (2016), el efecto depresor del aislado recombinante TYLCV-IS76 sobre el aislado TYLCV-IL en infecciones mixtas también se observó en las infecciones mixtas con TYLCV-Mu15 y, al igual que el aislado TYLCV-IL utilizado como control, empezó a hacerse significativo a 30 dpi (Belabess *et al.*, 2016). Cabe esperar, si se alargara el experimento en el tiempo, que el efecto depresor se incrementase hasta que TYLCV-Mu15 no pudiera ser detectado, tal y como observaron Belabess y col. (2016) para el clon TYLCV-IL al evaluar las plantas en infección mixta a 120 dpi. De hecho, Belabess y col. (2015; 2016) postularon que esa mayor acumulación observada experimentalmente se podría traducir en una selección positiva de ese tipo de aislados que ha llevado al desplazamiento de sus parentales en Marruecos. Además, esos autores sugirieron la posibilidad de que la capacidad de TYLCV-IS76 de ejercer ese efecto depresor sobre la acumulación de TYLCV-IL en infección mixta, podría depender de la región adquirida de TYLCV por recombinación (Belabess *et al.*, 2016). Otro resultado interesante del ensayo de acumulación se observó al analizar la acumulación en infección simple en plantas resistentes. TYLCV-Mu15 se acumuló de manera similar al recombinante y significativamente más que TYLCV-IL, a diferencia de lo observado en Belabess y col. (2016), donde ya desde etapas tempranas de la infección la acumulación de TYLCV-IS76 era significativamente superior. Además, se ha observado que esa diferencia de acumulación se incrementaba y a 30 dpi, los niveles de acumulación fueron significativamente superiores a los otros dos clones. Este hecho es particularmente interesante a la luz de los datos obtenidos al estimar las ratios

entre las sustituciones sinónimas y no sinónimas entre pares de aislados, donde el valor calculado para el gen C3 sugiere que la selección positiva está actuando sobre él. Este gen codifica una proteína denominada potenciador de la replicación, la cual influye en la expresión de los síntomas ya que incrementa la cantidad de ADN viral de cadena doble y sencilla (Gronenborn, 2007). Cabe la posibilidad de que las mutaciones en C3 sean las que contribuyan de manera determinante a mejorar la replicación del virus en las variedades de tomate que expresan las versiones de RDRs codificadas por *Ty-1/Ty-3* (Butterbach *et al.*, 2014). Para conocer si la mayor eficacia observada se debe a mutaciones en C3, sería interesante construir un clon quimérico con otro aislado de la especie Israel y analizar su acumulación en plantas resistentes.

Siguiendo el desarrollo de las epidemias agresivas de TYLCD en plantas resistentes, se realizó un tercer muestreo en el año 2017, esta vez en Almería. Ese año se percibió una inusual incidencia de la enfermedad, que llegó a ser de hasta el 20% en Níjar (RAIF, 2017). Mediante el análisis filogenético de las muestras, que al igual que en el muestreo de Murcia de 2016, fueron clonadas y secuenciadas por el método de Sanger, se identificó la presencia de dos tipos de aislados: aislados de tipo TYLCV-IL y aislados de tipo TYLCV-IS76. Hasta la fecha de realización de este trabajo es la única evidencia de este tipo de aislados recombinantes identificados fuera de Marruecos. Se han identificado recombinantes similares a TYLCV-IS76 en distintas regiones de Italia, pero con eventos de recombinación ligeramente mayores (Belabess *et al.*, 2015, 2016; Panno, Caruso y Davino, 2018; Granier *et al.*, 2019). Este tipo de recombinantes, denominados recientemente de forma genérica TYLCV-IS141 (Granier *et al.*, 2019), parece seleccionarse positivamente en plantas resistentes en condiciones experimentales, en detrimento de los recombinantes de tipo TYLCV-IS76 (Belabess *et al.*, 2018). Una de las hipótesis planteadas es que este tipo de aislados haya podido surgir en Italia con el uso de variedades resistentes, del mismo modo que emergió TYLCV-IS76 en Marruecos, aunque todavía no hay datos suficientes que apoyen esta hipótesis (Belabess *et al.*, 2018). Lo que sí parece claro es que la aparición de los aislados TYLCV-IS76 ha sido un evento único en la región de Souss (Marruecos) (Belabess *et al.*, 2015), bien por condiciones específicas de la zona o por mera casualidad (Belabess *et al.*, 2018). En ese contexto y, dado que los aislados no recombinantes encontrados mostraron estar emparentados filogenéticamente con aislados murcianos del denominado Grupo 2, se

refuerza la idea de que el tráfico de material infectado desde Marruecos parece estar contribuyendo al establecimiento de nuevas variantes de TYLCV en España.

La resistencia debida al gen *Ty-1/Ty-3* se basa en una reducción de la acumulación del ADN viral (Michelson, 1994). Se ha postulado que los tipos de resistencia basados en la reducción de la carga viral pueden conducir, por presión selectiva, a la proliferación de variantes virales con mayor capacidad de acumulación. La acumulación relativamente mayor del clon infectivo del Grupo 2 en infección simple podría explicar cómo los aislados no recombinantes de El Jadida podrían haberse mantenido en un entorno con aislados tipo TYLCV-IS76. Su mantenimiento pudo haber necesitado una baja presión de inóculo para limitar el porcentaje de plantas coinfectadas, donde TYLCV-IS76 ha mostrado mayor ventaja. Como sólo dos aislados de este tipo habían sido caracterizados anteriormente (Belabess *et al.*, 2015), no se sabía si aislados de este tipo son lo suficientemente competitivos como para incrementar su frecuencia en la naturaleza. El descubrimiento de aislados similares en España parece indicar que, al menos en las localidades muestreadas, estos supuestos recombinantes inversos son competitivos. Como la introducción accidental de un nuevo patógeno rara vez es masiva, es probable que los aislados del Grupo 2 hayan desplazado, hasta cierto punto, a los aislados de TYLCV residentes en España, a partir de una o muy pocas introducciones. Para corroborar esta hipótesis, sería interesante desarrollar un clon infectivo del Grupo 1 y comparar su eficacia biológica en planta con la del clon diseñado en este trabajo.

Con la aparición en España de aislados de TYLCV-IS76 cabe esperar, en el futuro, un eventual desplazamiento de los aislados TYLCV-IL residentes, en base a lo observado en este trabajo, así como en trabajos anteriores. Sin embargo, la situación podría ser más compleja, dada la presencia de los aislados del Grupo 2 y podría depender de la frecuencia en que ocurrieran infecciones mixtas (*i.e.* oportunidades de transmisión), ya que como hemos comprobado en este trabajo, los aislados de Grupo 2 parecen capaces de acumularse en concentraciones significativamente superiores en infecciones simples. La realización de muestreos en los próximos años será crucial para monitorizar esta posible nueva situación.

En resumen, los resultados aquí mostrados y discutidos sugieren que se están produciendo cambios en las poblaciones de virus asociadas a TYLCD en España, en las

que la propagación y posible reemplazo de virus y cepas implicadas en la enfermedad pueden dar lugar a patrones de interacción complejos con probables consecuencias epidemiológicas.

I.5. Bibliografía

- Accotto, G. P., Navas-Castillo, J., Noris, E., Moriones, E. y Louro, D.** (2000) «Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe», *European Journal of Plant Pathology*, 106(2), pp. 179-186. doi: 10.1023/A:1008736023293.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J.** (1990) «Basic local alignment search tool», *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp. 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Belabess, Z., Dallot, S., El-Montaser, S., Granier, M., Majde, M., Tahiri, A., Blenzar, A., Urbino, C., et al.** (2015) «Monitoring the dynamics of emergence of a non-canonical recombinant of Tomato yellow leaf curl virus and displacement of its parental viruses in tomato», *Virology*, 486, pp. 291-306. doi: 10.1016/j.virol.2015.09.011.
- Belabess, Z., Peterschmitt, M., Granier, M., Tahiri, A., Blenzar, A. y Urbino, C.** (2016) «The non-canonical tomato yellow leaf curl virus recombinant that displaced its parental viruses in southern Morocco exhibits a high selective advantage in experimental conditions», *Journal of General Virology*, 97(12), pp. 3433-3445. doi: 10.1099/jgv.0.000633.
- Belabess, Z., Urbino, C., Granier, M., Tahiri, A., Blenzar, A. y Peterschmitt, M.** (2018) «The typical RB76 recombination breakpoint of the invasive recombinant tomato yellow leaf curl virus of Morocco can be generated experimentally but is not positively selected in tomato», *Virus Research*, 243, pp. 44-51. doi: 10.1016/j.virusres.2017.10.002.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., et al.** (2014) «BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis», *PLoS Computational Biology*. Editado por A. Prlic, 10(4), p. e1003537. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003537.
- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C. F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., et al.** (2015) «Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons», *Archives of Virology*, 160(6), pp. 1593-1619. doi: 10.1007/s00705-015-2398-y.
- Butterbach, P., Verlaan, M. G., Dullemans, A., Lohuis, D., Visser, R. G. F., Bai, Y. y Kormelink, R.** (2014) «Tomato yellow leaf curl virus resistance by Ty-1 involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), pp. 12942-12947. doi: 10.1073/pnas.1400894111.
- Delatte, H., Dalmon, A., Rist, D., Soustrade, I., Wuster, G., Lett, J. M., Goldbach, R. W.,**

- Peterschmitt, M., et al.** (2003) «Tomato yellow leaf curl virus Can Be Acquired and Transmitted by Bemisia tabaci (Gennadius) from Tomato Fruit», *Plant Disease*, 87(11), pp. 1297-1300. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.11.1297.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. y Hicks, J. B.** (1983) «A plant DNA miniprep: Version II», *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), pp. 19-21. doi: 10.1007/BF02712670.
- Doyle, J.** (1991) «DNA Protocols for Plants», en *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 283-293. doi: 10.1007/978-3-642-83962-7_18.
- Duffy, S. y Holmes, E. C.** (2008) «Phylogenetic Evidence for Rapid Rates of Molecular Evolution in the Single-Stranded DNA Begomovirus Tomato Yellow Leaf Curl Virus», *Journal of Virology*, 82(2), pp. 957-965. doi: 10.1128/JVI.01929-07.
- Font, M. I., Rubio, L., Martínez-Culebras, P. V. y Jordá, C.** (2007) «Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain», *Virus Research*, 128(1-2), pp. 43-51. doi: 10.1016/j.virusres.2007.04.003.
- García-Andrés, S., Accotto, G. P., Navas-Castillo, J. y Moriones, E.** (2007) «Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin», *Virology*, 359(2), pp. 302-312. doi: 10.1016/j.virol.2006.09.030.
- García-Andrés, S., Monci, F., Navas-Castillo, J. y Moriones, E.** (2006) «Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature», *Virology*, 350(2), pp. 433-442. doi: 10.1016/j.virol.2006.02.028.
- García-Arenal, F., Fraile, A. y Malpica, J. M.** (2003) «Variation and evolution of plant virus populations», *International Microbiology*, 6(4), pp. 225-232. doi: 10.1007/s10123-003-0142-z.
- Granier, M., Tomassoli, L., Manglii, A., Nannini, M., Peterschmitt, M. y Urbino, C.** (2019) «First report of TYLCV-IS141, a Tomato yellow leaf curl virus recombinant infecting tomato plants carrying the Ty-1 resistance gene in Sardinia (Italy)», *Plant Disease*. Plant Disease, p. PDIS-09-18-1558. doi: 10.1094/pdis-09-18-1558-pdn.
- Gronenborn, B.** (2007) «The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Genome and Function of its Proteins», en Czosner, H. (ed.) *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for resistance*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 67-84. doi: 10.1007/978-1-4020-4769-5_5.
- Hagen, C., Frizzi, A., Gabriels, S., Huang, M., Salati, R., Gabor, B. y Huang, S.** (2012) «Accurate and sensitive diagnosis of geminiviruses through enrichment, high-throughput sequencing and automated sequence identification», *Archives of Virology*, 157(5), pp. 907-915. doi: 10.1007/s00705-012-1253-7.
- Haible, D., Kober, S. y Jeske, H.** (2006) «Rolling circle amplification revolutionizes

- diagnosis and genomics of geminiviruses», *Journal of Virological Methods*, 135(1), pp. 9-16. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.01.017.
- Hansen, I. M. y Lapidot, M.** (2012) «Major Tomato Viruses in the Mediterranean Basin», en Loebenstein, G. y Nikolaos, K. (eds.) *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 31-66. doi: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00002-6.
- Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T.** (1985) «Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA», *Journal of Molecular Evolution*. Springer-Verlag, 22(2), pp. 160-174. doi: 10.1007/BF02101694.
- Idris, A., Al-Saleh, M., Piatek, M., Al-Shahwan, I., Ali, S. y Brown, J.** (2014) «Viral Metagenomics: Analysis of Begomoviruses by Illumina High-Throughput Sequencing», *Viruses*, 6(3), pp. 1219-1236. doi: 10.3390/v6031219.
- Kimura, M.** (1980) «A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences», *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), pp. 111-120. doi: 10.1007/BF01731581.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K.** (2016) «MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets», *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp. 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Lapidot, M. y Polston, J. E.** (2006) «Resistance to Tomato yellow leaf curl virus in Tomato», en Loebenstein, G. y Carr, J. P. (eds.) *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 503-520. doi: 10.1007/1-4020-3780-5_23.
- Lefevre, P. y Moriones, E.** (2015) «Recombination as a motor of host switches and virus emergence: geminiviruses as case studies», *Current Opinion in Virology*, 10, pp. 14-19. doi: 10.1016/j.coviro.2014.12.005.
- Li, W.-H.** (1993) «Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution», *Journal of Molecular Evolution*, 36(1), pp. 96-99. doi: 10.1007/BF02407308.
- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. y Muhire, B.** (2015) «RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes», *Virus Evolution*, 1(1), pp. 1-5. doi: 10.1093/ve/vev003.
- Michelson, I.** (1994) «Accumulation and Translocation of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* Breeding Line Containing the L. chilense TYLCV Tolerance Gene Ty-1», *Phytopathology*, 84(9), p. 928. doi: 10.1094/Phyto-84-928.
- Monci, F., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. y Moriones, E.** (2002) «A Natural Recombinant between the Geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus Exhibits a Novel Pathogenic Phenotype and Is Becoming Prevalent in Spanish Populations», *Virology*, 303(2), pp. 317-326. doi: 10.1006/viro.2002.1633.
- Morilla, G., Antúnez, C., Bejarano, E. R., Janssen, D. y Cuadrado, I. M.** (2003) «A New Tomato yellow leaf curl virus Strain in Southern Spain», *Plant Disease*, 87(8), pp.

- 1004-1004. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.8.1004B.
- Muhire, B. M., Varsani, A. y Martin, D. P.** (2014) «SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation», *PLoS ONE*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0108277.
- Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M. y Moriones, E.** (2000) «Severe Yellowing Outbreaks in Tomato in Spain Associated with Infections of Tomato chlorosis virus», *Plant Disease*, 84(8), pp. 835-837. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.8.835.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E. y Sánchez-Campos, S.** (2011) «Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies», *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), pp. 219-248. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095235.
- Navas-Castillo, J., Sánchez-Campos, S., Díaz, J. A., Sáez-Alonso, E. y Moriones, E.** (1997) «First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Is in Spain: Coexistence of Two Different Geminiviruses in the Same Epidemic Outbreak», *Plant Disease*. The American Phytopathological Society, 81(12), pp. 1461-1461. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.12.1461B.
- Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M., Zamir, D. y Czosnek, H.** (1991) «Tomato yellow leaf curl virus: A whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component», *Virology*, 185(1), pp. 151-161. doi: 10.1016/0042-6822(91)90763-2.
- Nei, M.** (1972) «Genetic Distance Between populations», *The American Naturalist*, 106(949), pp. 283-292.
- Noris, E., Hidalgo, E., Accotto, G. P. y Moriones, E.** (1994) «High similarity among the tomato yellow leaf curl virus isolates from the West Mediterranean Basin: the nucleotide sequence of an infectious clone from Spain», *Archives of Virology*, 135(1-2), pp. 165-170. doi: 10.1007/BF01309774.
- Pamilo, P. y Bianchi, N. O.** (1993) «Evolution of the Zfx and Zfy genes: rates and interdependence between the genes.», *Molecular Biology and Evolution*, 10(2), pp. 271-281. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040003.
- Panno, S., Caruso, A. G. y Davino, S.** (2018) «The nucleotide sequence of a recombinant tomato yellow leaf curl virus strain frequently detected in Sicily isolated from tomato plants carrying the Ty-1 resistance gene», *Archives of Virology*. Springer Vienna, 163(3), pp. 795-797. doi: 10.1007/s00705-017-3674-9.
- Pérefarres, F., Thébaud, G., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Rimbaud, L., Hoareau, M., Reynaud, B. y Lett, J. M.** (2014) «Frequency-dependent assistance as a way out of competitive exclusion between two strains of an emerging virus», *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1781), p. 20133374. doi: 10.1098/rspb.2013.3374.
- Picó, B., Díez, M. J. y Nuez, F.** (1996) «Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus — a review», *Scientia Horticulturae*. ELSEVIER, 67(3-4), pp. 151-196. doi: 10.1016/S0304-4238(96)00945-4.

- Puchades, A. V., Carpino, C., Alfaro-Fernandez, A., Font-San-Ambrosio, M. I., Davino, S., Guerri, J., Rubio, L. y Galipienso, L.** (2017) «Detection of Southern tomato virus by molecular hybridisation», *Annals of Applied Biology*, 171(2), pp. 172-178. doi: 10.1111/aab.12367.
- RAIF** (2017) *Red de Alerta e Información Fitosanitaria de Andalucía*. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturapescayderosarrollorural/raif/graficas/almeria> (Accedido: 14 de diciembre de 2017).
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. y Suchard, M. A.** (2018) «Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7», *Systematic Biology*. Editado por E. Susko, 67(5), pp. 901-904. doi: 10.1093/sysbio/syy032.
- Roossinck, M. J.** (2017) «Deep sequencing for discovery and evolutionary analysis of plant viruses», *Virus Research*, 239, pp. 82-86. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.019.
- Rubio, L., Font, I., Jordá, C., Serra, J., Duran, N., Moreno, P. y Guerri, J.** (2002) *Incidencia de los virus del rizado amarillo del tomate en cultivos de tomate de la Comunidad Valenciana, España, Bol. San. Veg. Plagas*.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B. y Moorman, A. F. M.** (2009) «Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data», *Nucleic Acids Research*, 37(6), p. e45. doi: 10.1093/nar/gkp045.
- Ruiz, M. L., Simón, A., Velasco, L., García, M. C. y Janssen, D.** (2015) «First Report of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Tomato in Spain», *Plant Disease*. Plant Disease, 99(6), pp. 894-894. doi: 10.1094/PDIS-10-14-1072-PDN.
- Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Camero, R., Soria, C., Díaz, J. A. y Moriones, E.** (1999) «Displacement of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in Tomato Epidemics in Spain», *Phytopathology*, 89(11), pp. 1038-1043. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.11.1038.
- Seal, S. E., Van den Bosch, F. y Jeger, M. J.** (2006) «Factors Influencing Begomovirus Evolution and Their Increasing Global Significance: Implications for Sustainable Control», *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(1), pp. 23-46. doi: 10.1080/07352680500365257.
- Seal, S. E., Jeger, M. J. y Van den Bosch, F.** (2006) «Begomovirus Evolution and Disease Management», en *Advances in Virus Research*, pp. 297-316. doi: 10.1016/S0065-3527(06)67008-5.
- Stöver, B. C. y Müller, K. F.** (2010) «TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses», *BMC Bioinformatics*, 11(1), p. 7. doi: 10.1186/1471-2105-11-7.
- Tamura, K.** (1992) «Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases.», *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), pp. 678-687. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752.
- Tamura, K. y Nei, M.** (1993) «Estimation of the number of nucleotide substitutions in

the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.», *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), pp. 512-26. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.

Urbino, C., Gutiérrez, S., Antolik, A., Bouazza, N., Doumayrou, J., Granier, M., Martin, D. P. y Peterschmitt, M. (2013) «Within-Host Dynamics of the Emergence of Tomato Yellow Leaf Curl Virus Recombinants», *PLoS ONE*. Editado por B. A. Vinatzer, 8(3), p. e58375. doi: 10.1371/journal.pone.0058375.

Verbeek, M., Dullemans, A. M., Espino, A., Botella, M., Alfaro-Fernández, A. y Font, M. I. (2015) «First report of southern Tomato virus in tomato in the Canary Islands, Spain», *Journal of Plant Pathology*, 97(2), p. 392. doi: 10.4454/JPP.V97I2.038.

Zhou, X. (2013) «Advances in Understanding Begomovirus Satellites», *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), pp. 357-381. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-10.

Capítulo II

Puesta a punto de la técnica de RT-qPCR TaqMan para la detección de tres virus de cucurbitáceas transmitidos por semilla

II.1. Introducción

Dada la importancia de la detección de virus en semilla y las limitaciones de los métodos que se usan rutinariamente en la actualidad, se está realizando un esfuerzo considerable en el desarrollo y la mejora del diagnóstico en semilla, sobre todo en el desarrollo de técnicas que permitan una mayor sensibilidad en la detección (Parker y Sanjeev, 2017), especialmente porque la concentración de virus en semillas suele ser inferior a la de otros tejidos vegetales (Ling, Wechter y Jordan, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Dentro de las técnicas moleculares, una de las más sensibles es la RT-PCR a tiempo real basada en la tecnología TaqMan (Holland *et al.*, 1991). Esta tecnología, aunque requiere de cierto conocimiento técnico, no sólo aporta mayor sensibilidad, sino que permite un ahorro de tiempo considerable ya que no requiere de la manipulación posterior que se realiza en otros análisis moleculares, reduciéndose así el riesgo de contaminación y falsos positivos (Mumford *et al.*, 2006). El uso de sondas marcadas con diferentes fluoróforos permite analizar de forma simultánea más de un patógeno en una misma reacción, lo que permite una reducción del tiempo de análisis y del coste de los reactivos (Pallás *et al.*, 2009). Esto, junto con la notable reducción de costes que ha experimentado la tecnología TaqMan en los últimos años (Albrechtsen, 2006), convierte a esta técnica en un buen candidato para su incorporación en los protocolos de certificación de semillas.

De entre los protocolos de certificación para semillas, existe únicamente un protocolo para la detección de tres virus que afectan a cucurbitáceas, concretamente, el virus del mosaico verde jaspeado del pepino (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV), el virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) y el virus del mosaico de la calabaza (*Squash mosaic virus*, SqMV) (ISTA, 2014). Este protocolo se basa en el análisis por DAS-ELISA de muestras de 2000 semillas, divididas en 20 submuestras de 100 semillas. Recientemente se ha incluido un test de germinación para los lotes de semilla que resultan positivos para SqMV (ISTA, 2017). La importancia de estos tres virus como patógenos de cucurbitáceas se conoce desde hace bastante tiempo (Lovisolo, 1981; ver introducción general).

La necesidad de disponer de técnicas más rápidas y sensibles para el análisis de virus en semilla, junto con la importancia que tienen los cultivos de cucurbitáceas, sobre

todo en España, ha sido el punto de partida para la realización de este trabajo. El objetivo principal ha sido la puesta a punto de un protocolo de RT-qPCR basado en la tecnología TaqMan para la detección de CGMMV, SqMV y MNSV y su comparación con el protocolo oficial para su diagnóstico, que está basado en la técnica DAS-ELISA.

II.2. Materiales y métodos

II.2.1. Material vegetal

La obtención de lotes de semilla infectada para los tres virus se realizó, en condiciones experimentales, mediante la inoculación mecánica de 7 plantas por virus, siguiendo el siguiente esquema: i) se inocularon plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv. Marketmore 76; Ramiro Arnedo S.A.) con CGMMV-Alm08 (Número de accesión GQ411361); ii) plantas de melón (*Cucumis melo* L. subespecie *melo* cv. Piel de Sapo) (4) y alficoz (*Cucumis melo* var. *flexuosus*) (3) con MNSV-Mα5 (Número de accesión AY122286) (Díaz *et al.*, 2003); iii) plantas de calabacín (*Cucurbita pepo* L. cv. Black beauty) con SqMVPV-0581 (DSMZ GmbH. Braunschweig, Alemania). Se prepararon extractos de hojas infectadas en tampón fosfato 30 mM (pH 7,4), que se utilizaron para inocular mecánicamente los cotiledones de las distintas plantas, previamente espolvoreados con carborundo (tamaño de partícula, 0,037 mm). Las plantas se mantuvieron en invernadero, suplementadas con solución Hoagland hasta la maduración y recolección de sus frutos. Para separar las semillas de la pulpa después de su extracción, se mantuvieron en agua a temperatura ambiente durante dos días, lo que permitió la fermentación de la pulpa. Después de eso, las semillas se separaron enjuagando con agua del grifo, tras lo cual se dejaron secar completamente. Las semillas se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

II.2.2. Preparación de las muestras y extracción de ARN

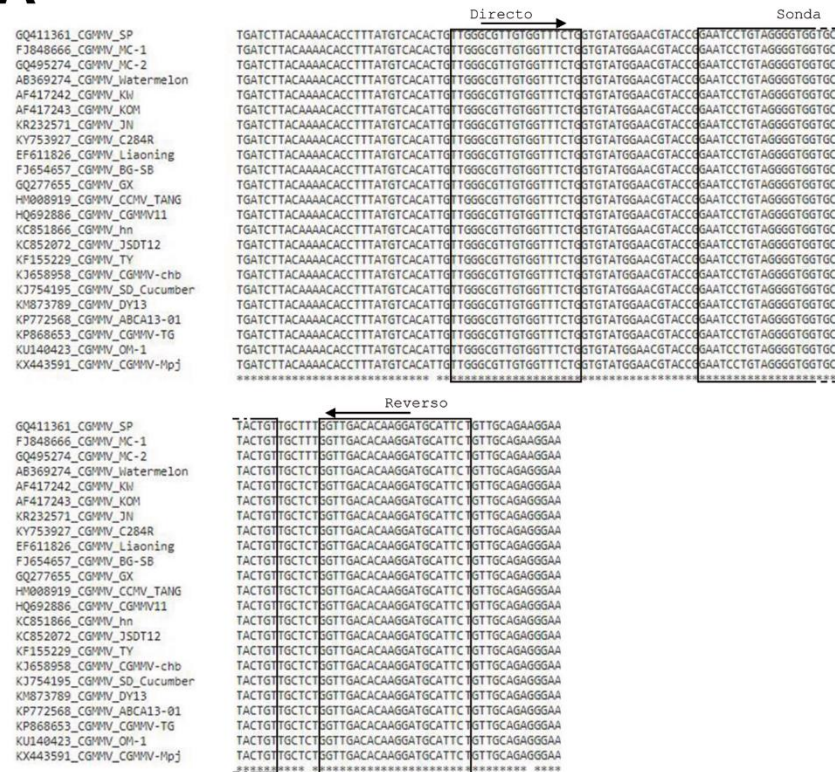
Se utilizaron tres métodos para el triturado de las semillas utilizadas en este trabajo: i) en la evaluación de semillas individuales, se trituraron en mortero congelándolas en nitrógeno líquido; ii) para los lotes pequeños de semilla, éstas se introdujeron en bolsas de extracción (Bioreba AG. Reinach, Suiza) y se machacaron en seco con un martillo; iii) para los lotes grandes de semilla (100 semillas o más) se utilizó un molinillo eléctrico. Para prevenir contaminaciones, tanto los morteros como el

molinillo se lavaron con NaOH 0,2 N y aclararon con agua entre los procesados. Las extracciones de ARN total (200 mg de material vegetal de semilla/hoja) se realizaron con el kit NucleoSpin® RNA plant (Macherey-Nagel GmbH & Co. Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

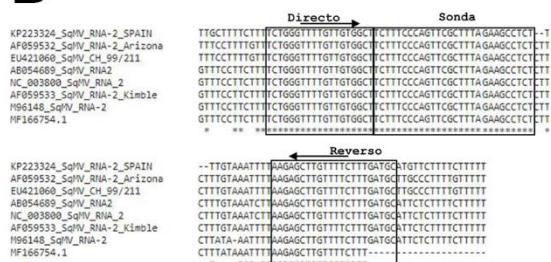
II.2.3. Diseño de sondas e iniciadores

Con el objetivo de diseñar iniciadores y sondas para uso diagnóstico, se seleccionaron regiones altamente conservadas para los tres virus (Figura 20). Para ello, se obtuvieron secuencias completas para los tres virus de la base de datos pública del NCBI (*National Centre for Biotechnology and Information*) con las que se realizaron alineamientos utilizando la herramienta ClustalW (Thompson, Higgins y Gibson, 1994) implementada en el programa MEGA7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016). Para el diseño de iniciadores y sondas se utilizó el programa Primer3 plus. Las propiedades de los iniciadores/sonda diseñados se analizaron con la herramienta Oligo Analyzer tool, de IDT (Integrated DNA Technologies, versión 3.1.1) y la especificidad se evaluó *in silico* con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Tool) disponible en el NCBI (Altschul *et al.*, 1990). Tanto los iniciadores como las sondas para los tres virus fueron sintetizados por la empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Skokie, Illinois, EEUU) y las sondas sintetizadas con el fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína) como reportero en el extremo 5' y presentaban dos moléculas desactivadoras de fluorescencia (*quencher*): una interna, denominada ZEN™, e Iowa Black® FQ, localizada en el extremo 3'. Además, en este trabajo se incluyó un set de iniciadores y sonda diseñado sobre una región del ARN ribosomal 18S altamente conservada en plantas (Osman *et al.*, 2007; Li, Berendsen y Ling, 2016), como control de calidad para evaluar la integridad del ARN de las extracciones. Como el objetivo era utilizar ese gen endógeno en una reacción dúplex para cada virus, la sonda se marcó con un fluoróforo distinto en su extremo 5', en este caso JOE. La información referente a los iniciadores y las sondas utilizados en este trabajo queda recogida en la Tabla 8.

A



B



C

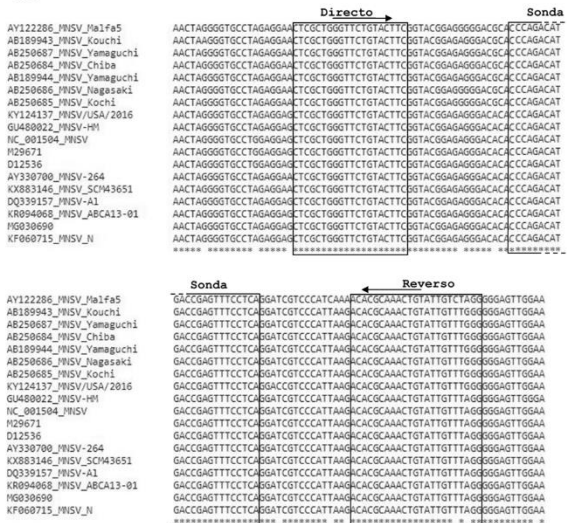


Figura 20. Alineamientos de secuencias generados para los tres virus estudiados en este trabajo, mostrando los iniciadores y sondas utilizados para los análisis de RT-qPCR. Resaltadas en recuadros, las secuencias de los iniciadores seleccionados. **A**, región altamente conservada dentro del gen que codifica la proteína de movimiento de CGMMV, seleccionado para el diseño de los iniciadores y sonda utilizados en este trabajo. La figura muestra 23 de las 62 secuencias disponibles en la base de datos del NCBI. **B**, alineamiento de la región 3' no codificante del ARN-2 de SqMV, que muestra los iniciadores y sonda diseñados por Li y col. 2016. **C**, región conservada dentro del gen que codifica la proteína p29 de MNSV seleccionado para el diseño de los iniciadores y sonda utilizados en este trabajo. La figura muestra 18 de las 27 secuencias disponibles en la base de datos del NCBI.

Tabla 8. Iniciadores y sondas utilizados en este trabajo.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Posición	Amplicón (pb)	Referencia
CGMMV. Transcripción (ORF de la MP)				
CG_T.fw	ATAGATGTCTCTAAGTAAGGT	4989-5009	685	Este trabajo
CG_T.rev	AGACTGCGACCTAGACCTATAAC	5651-5673		
CGMMV. RT-qPCR (ORF de la MP)				
CG_qPCR.fw	TTGGGCGTTGTGTTTCTG	5209-5227	90	Este trabajo
CG_qPCR.rev	AGAATGCATCCTTGTGTCAACC	5277-5298		
Sonda_CG	FAM-AATCCTGTA/ZEN/GGGGTGGTGCTACTGT-Black® FQ	5245-5270		
SqMV. Transcripción (ORF de la proteína pequeña de la cápside-3'UTR)				
Sq_T.fw	GGTRCAGCAGCTWGGAACTTA ^b	2684-2704	655	Este trabajo
Sq_T.rev ^a	GCATCAAAGAAAACAAGCTCTT	3317-3338		
SqMV. rt-qPCR (3'UTR)				
Sq_qPCR.fw	TCTGGGTTTTGTGTGGCT	3257-3275	82	Li, Berendsen y Ling, 2016
Sq_qPCR.rev	GCATCAAAGAAAACAAGCTCTT	3317-3338		
Sonda_Sq	FAM-TCTTCCCA/ZEN/GTTCGCTTTAGAAGCCTCT-Black® FQ	3276-3303		
MNSV. Transcripción (ORFs P29-P89)				
MN_T.fw	GGTGAGGAAATTGTGGTTGG	424-443	1523	Este trabajo
MN_T.rev	AACCCGAATTGTCTCCAGTG	1927-1946		
MNSV. rt-qPCR (ORF de la P89)				
MN_qPCR.fw	CTCGCTGGGTTCTGTACTTC	910-929	101	Este trabajo
MN_qPCR.rev	CCTAAACAATACAGTTTGCCTGT	988-1010		
Sonda_MN	FAM-CCCAGACAT/ZEN/GACCGAGTTTCTCA-Black® FQ	948-971		
18S rRNA. rt-qPCR				
18S rRNA.fw	GTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	364-383	70	Li, Berendsen y Ling, 2016
18S rRNA.rev	CTGCCTTCCTGGATGTGGTA	414-434		
Sonda_18S rRNA	JOE-CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG-Black® FQ	388-411		

^aMismo iniciador utilizado para la RT-qPCR / sonda; ^bMezclas de nucleótidos: R (A+G); W (A+T)

II.2.4. Preparación de plásmidos y rectas patrón

II.2.4.1. Síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa (RT) y PCR

Se obtuvo ADNc mediante transcripción reversa a partir de extracto de ARN total de hoja infectada para cada uno de los tres virus, utilizando el kit Expand™ Reverse

Transcriptase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania): para cada virus, se preparó una mezcla de 1 µg de ARN total junto a 40 pmol de su iniciador reverso (Tabla 1) y agua hasta un volumen final de 10,5 µl, que se desnaturizó durante 10 min a 65 °C. Transcurrido ese tiempo, tras enfriar en hielo, a cada reacción se le añadió 1 X del tampón Expand reverse transcriptase Buffer, 10 nM de DTT, 20 U de Recombinant RNasin® Ribonuclease inhibitor (Promega, Madison, WI, USA), 50 U de la enzima Expand Reverse Transcriptase y desoxinucleótidos a una concentración final de 1 mM cada uno, y se incubó a 43 °C durante 45 min. A partir del ADNc obtenido para los tres virus, se amplificaron por PCR fragmentos específicos para los tres virus que contenían la secuencia diana para los sets de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) utilizados en este trabajo (Tabla 8). La PCR se realizó utilizando el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche). Para cada reacción se preparó una mezcla que contenía ambos iniciadores a 300 nM, desoxinucleótidos a una concentración de 2 mM cada uno, 2 µl de ADNc y agua hasta un volumen final de 25 µl. Aparte, se preparó otra mezcla que contenía 1 X del tampón Expand High Fidelity buffer suplementado con MgCl₂ a una concentración final de 2,5 mM, 2,5 U de la enzima Expand High Fidelity enzyme mix y agua hasta un volumen final de 25 µl. Ambas mezclas se homogeneizaron y la amplificación se realizó en un termociclador Bio Rad (Bio Rad T100™ Thermal Cycler), que consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C; 10 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 53 °C (SqMV y CGMMV) o 55 °C (MNSV) y 45 s (SqMV y CGMMV) o 1 min (MNSV) a 72 °C; 20 ciclos con las mismas condiciones salvo en el paso de elongación a 72 °C, donde se añadió 5 s en cada ciclo al tiempo establecido para cada virus, y un paso final de elongación de 7 min a 72 °C. Los productos de amplificación obtenidos se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % en TAE (40 Mn Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0).

II.2.4.2. Clonaje

A partir del gel de comprobación de la PCR, las bandas de tamaño deseado se recortaron del gel y se purificaron utilizando el kit Gene clean® Turbo kit (MP Biomedicals, LLC, Illkirch, France), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN purificados se clonaron en vectores pGEM®-T easy (Promega) y los vectores resultantes fueron introducidos en *Escherichia coli* Stellar™ Competent Cells

(Clontech. Mountain View, California, USA). Las bacterias transformadas fueron seleccionadas mediante la resistencia a ampicilina y el método de selección de colonias blanco/azul debido a la presencia en el medio de X-Gal e IPTG. Tras cultivar las bacterias en medio líquido suplementado con ampicilina (100 mg/L), los plásmidos se extrajeron mediante miniprep, utilizando el kit Gene JET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific. Waltham, Massachusetts, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La orientación del inserto, así como la validación de la secuencia, se comprobaron mediante la secuenciación por el método de Sanger, utilizando los iniciadores M13 (StabVida. Monte da Caparica, Portugal).

II.2.4.3. Transcripción y generación de rectas patrón para los tres virus

Salvo para SqMV, donde se utilizaron los dos M13, se sintetizaron transcritos de ARN positivo de los virus a partir de productos de PCR sintetizados utilizando el iniciador M13 aguas arriba del promotor para la ARN polimerasa correspondiente (T7 o Sp6) y el iniciador reverso para cada virus (Tabla 8). La transcripción, bien con la polimerasa T7 (Promega) o Sp6 (New England Biolabs. Ipswich, Massachusetts, USA), se realizó en un volumen total de 20 µl, y cada reacción contenía 1 X Buffer, 10 nM de DTT (opcional para la reacción de Sp6); 1 nM de cada NTP; 20 U de Recombinant RNasin® Ribonuclease inhibitor (Promega), 20 U de ARN polimerasa (T7 o Sp6), 0,5-1 µg de ADN y agua hasta completar el volumen final. Las condiciones de reacción fueron de 2 h a 37 °C, seguido de la adición de 3 U de DNase I (New England Biolabs) dejándolas 15 min a 37 °C, para eliminar el ADN sobrante. Para eliminar restos de nucleótidos y proteínas, los transcritos fueron sometidos a una precipitación etanólica en la que se le añadía un 10 % en volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol puro y se centrifugó a 14.000 rpm a 4 °C durante 30 min, tras permanecer 2 h a -80 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 20 µl de agua tratada con DEPC y la concentración de ARN se midió espectrofotométricamente con un Nanodrop™ One (Thermofisher. Waltham, MA, USA).

A partir de los transcritos obtenidos, se prepararon rectas patrón para los tres virus a partir de diluciones seriadas en base 10 que abarcaban una concentración de entre 10^{10} y 10^0 copias del ARN viral, diluidas en ARN total sano a una concentración de 16 ng/µl. El ARN total de planta sana utilizado en las curvas eran extractos de ARN de semilla de pepino, en el caso de la curva de CGMMV, y de melón, para las curvas de

SqMV y MNSV. Finalmente, la conversión de nanogramos de transcrito de ARN a número de copias se calculó según la fórmula descrita en Olmos y col. (2005) (Olmos *et al.*, 2005) en la que se calcula la concentración de ARN_{MC} (pmol) a partir del peso molecular medio de un ribonucleótido (340 Da) y de la longitud del transcrito (número de bases, N_b): $pmol\ de\ ARN_{MC} = ng\ de\ transcrito \times (10^3\ pg/1\ ng) \times (1\ pmol/340\ pg) \times (1/N_b)$. Con la concentración calculada y el número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$ moléculas/mol) se calcula el número de copias: $N.^{\circ}\ de\ copias = pmol\ de\ ARN_{MC} \times 6,023 \times 10^{23}\ moléculas/mol \times (1\ mol/10^{12}\ pmol)$.

II.2.5. Análisis por RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) con sonda en un solo paso (One-step)

Las reacciones de RT-qPCR en un solo paso se realizaron utilizando el kit de KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR (KAPA Biosystems, Inc. Wilmington, MA, USA). Para cada reacción (pocillo), se añadió 2 X de KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (con una concentración final de $MgCl_2$ de 5 nM), 1 X de ROX High y 1 X de KAPA RT-mix, 200 nM de iniciadores y 200 nM de sonda. En los análisis de RT-qPCR en los que se utilizaba extractos de ARN total, éste se añadía a una concentración final de 100 ng mientras que en la evaluación de las rectas patrón, se añadieron 2 μ l de la dilución correspondiente. En cada caso, la mezcla se completaba con agua estéril hasta alcanzar un volumen final de reacción de 20 μ l. Para las pruebas con el endógeno, en las reacciones dúplex, además de los componentes anteriores, se añadieron los iniciadores y la sonda para la detección del ARN ribosómico 18S a una concentración de 200 nM y el volumen final de reacción fue de 25 μ l. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y las condiciones de reacción fueron: un paso de transcripción reversa de 5 min a 42°C, y una PCR compuesta de un ciclo de desnaturalización de 3 min a 95°C y 40 ciclos de amplificación de 95°C 3 s y 60°C 30 s. Para cada experimento realizado, además de controles positivos consistentes en extracciones de ARN total de planta infectada por cada uno de los virus, se incluyó, como controles negativos, reacciones sin muestra (agua) y extractos de ARN total sano de la matriz analizada en cada ocasión (hoja y/o semilla). Para el ensayo de la recta patrón se analizaron tres réplicas por punto de la recta y el ensayo se repitió tres veces. Para los

ensayos de sensibilidad y especificidad, se analizaron dos réplicas por muestra y cada análisis se repitió dos veces.

II.2.6. Protocolo ELISA de doble sándwich (DAS-ELISA)

En este trabajo se empleó la técnica de DAS-ELISA para la evaluación inicial de los lotes de semilla infectados obtenidos en este trabajo, así como para la evaluación comparativa la técnica de RT-qPCR/sonda, en la evaluación del límite de detección en lotes de semilla y en diluciones seriadas de lotes de semilla infectados.

Para esta técnica se emplearon anticuerpos policlonales comerciales: para SqMV y MNSV se emplearon anticuerpos de la marca comercial DSMZ a una dilución recomendada de 1:200; para CGMMV se emplearon anticuerpos de la marca LOEWE® (LOEWE® Biochemica GmbH. Sauerlach, Alemania), a una dilución recomendada de 1:1.000. Los distintos ensayos se realizaron en microplacas Nunc™ MicroWell™ de 96 pocillos (Thermo Scientific) y el procedimiento consistió en: se tapizaron las placas con el anticuerpo (IgG) diluido en tampón carbonato-bicarbonato a 50 nM (pH 9,6), suplementado con 0,02 % de Azida sódica y se dejó incubar durante 4 h a 37 °C; se lavaron las placas cuatro veces con tampón PBST (tampón fosfato 10 mM que contiene NaCl al 0,8 %, KCl y Azida sódica al 0,02 % y Tween-20 al 0,05 % , ajustado a pH 7,2) y se añadió el extracto vegetal preparado en una proporción peso: volumen de 1:10 con tampón de extracción (PBST+ 2 % de polivinilpirrolidona, PVP) y se dejó incubar toda la noche a 4 °C; tras lavar la placa con PBST (cuatro veces), se añadió el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina, diluido en tampón PBST suplementado con 2 % de PVP y 0,2 % de albúmina de huevo, y se dejó incubar durante 4 h a 37 °C; finalmente, tras lavar la placa con PBST (cuatro veces), se añadió el sustrato (p-nitrofenil-fosfato 1 mg/ml diluido en 10 % de dietanolamina suplementada con 0,02 % de azida sódica) y se dejó incubar 150 min a 37 °C para una lectura óptima. Los resultados se obtenían por medida de absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas Tecan Sunrise™ (Tecan Group Ltd. Männedorf, Suiza) y eran considerados positivos si el valor de absorbancia superaba en 2,5 veces el obtenido en el control sano. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, analizando dos réplicas por muestra.

II.2.7. Sensibilidad y Especificidad

La sensibilidad (*i.e.*, el límite de detección, LD) de la técnica de RT-qPCR con sonda para los tres virus se determinó de dos maneras: a partir de las rectas patrón de las diluciones de los transcritos generadas y empleando material vegetal infectado. En la determinación de la sensibilidad analítica a partir de material vegetal infectado se emplearon diluciones seriadas en base 10 de ARN total de hoja y semilla infectadas para CGMMV y SqMV. Para MNSV, el análisis de sensibilidad en material se realizó únicamente en hoja infectada.

En el ensayo de detección de virus en semilla (CGMMV y SqMV), se evaluó la sensibilidad comparada de las técnicas de RT-qPCR con sonda y DAS-ELISA tanto en lotes de semilla, como en diluciones seriadas de un lote de semilla. El ensayo de sensibilidad en lotes de semilla se realizó preparando tres lotes de semillas en los que una semilla infectada se introdujo en lotes de 100, 500 y 1.000 semillas sanas. Para el ensayo de diluciones seriadas de lotes de semilla infectados, se preparó, para cada virus, un machacado de un lote de 20 semillas infectadas en extracto de semilla sano y se realizaron diluciones seriadas en base 5.

Se analizó la especificidad de la técnica de RT-qPCR /sonda para determinar que no existían amplificaciones inespecíficas entre los tres virus analizados en este trabajo. Para ello se utilizaron extracciones de ARN total de hoja y semilla (SqMV y CGMMV) infectados por los distintos virus. En cada ensayo se incluyó, como controles negativos, extractos de ARN de semilla y hoja sanos de melón (MNSV y SqMV) y pepino (CGMMV), así como un control sin muestra.

II.2.8. Bioensayo

Para evaluar la viabilidad de los virus en los lotes de semilla infectada obtenidos en este trabajo, se realizaron dos bioensayos: i) ensayo de transmisión por inoculación mecánica a partir de extractos de semilla y ii) ensayo de germinación de semilla infectada. El bioensayo de transmisión consistió en la evaluación de tres lotes de semilla en proporción creciente de semilla infectada frente a semilla sana (1:10, 10:100 y 50:100), para cada virus: se prepararon extractos a partir de esos lotes utilizando el tampón de inoculación mecánica de virus del Q-Bank (Bonants, Edema y Robert, 2013) compuesto de tampón fosfato 0,02 M suplementado con PVP al 2 %. Previo a la

inoculación, los extractos se dejaron incubando 4 h a 4 °C. Para cada lote de semilla se utilizaron diez plantas de *Nicotiana benthamiana* en estadio de 4-5 hojas, 10 plantas de pepino y 10 plantas de melón, ambas en estadio de cotiledón. Las plantas se mantuvieron en invernadero durante la duración del experimento. Se realizó una evaluación primaria por DAS-ELISA de las hojas inoculadas de las plantas de *N. benthamiana* 6 días después de la inoculación (dpi), pero la evaluación final del experimento fue a 15 dpi. La evaluación a 15 dpi se realizó de dos maneras: evaluación de síntomas y evaluación por DAS-ELISA. El DAS-ELISA se realizó en hoja sistémica en grupos de 10 plantas.

El ensayo de germinación se realizó únicamente para las semillas infectadas con CGMMV. Se pregerminó en placa 90 semillas infectadas con CGMMV (3-4 días en oscuridad a 25 °C) y se dispusieron en macetas con una mezcla de turba: fibra de coco: perlita (8:4:1). Como controles positivos, se inocularon mecánicamente 5 plantas sanas de pepino tal y como se describe en el apartado 1. Como controles negativos, se dejaron otras 5 plantas de pepino sano sin inocular. Las plantas se mantuvieron en invernadero hasta la finalización del experimento. La evaluación de las plantas se realizó tal y como se describe en el protocolo ISTA 7-026 (ISTA, 2017): brevemente, las plantas se mantienen en invernadero hasta un estadio de 3-4 hojas, y se realiza la evaluación de síntomas, visual y por DAS-ELISA. La evaluación por DAS-ELISA se realiza individualmente en las plantas evaluadas y en pools para los controles.

II.3. Resultados

II.3.1. Obtención y evaluación de lotes de semilla infectados

Para la obtención de lotes de semilla infectada para cada uno de los 3 virus, se inocularon plantas de pepino, calabacín, y melón y alficoz con CGMMV, SqMV y MNSV, respectivamente. El 100 % de las plantas inoculadas con CGMMV y SqMV mostraron la sintomatología característica para estos virus (Figura 21, A y B). En cambio, únicamente las 3 plantas de alficoz inoculadas con MNSV mostraron síntomas sistémicos de la enfermedad (Figura 21, C) y, además, una de estas plantas colapsó y no produjo frutos. Se recolectaron frutos maduros, obteniéndose un total de 9 calabacines (SqMV), 48 pepinos (CGMMV) y 4 alficoces (MNSV), de los que se extrajeron sus semillas. Para evaluar si se habían obtenido lotes de semilla infectada, se procesó un grupo de 50

semillas por virus y se analizó por DAS-ELISA. Aunque los protocolos oficiales establecen un tiempo máximo de lectura en el ELISA de 2 horas tras la adición del sustrato (EPPO, 2015), en este análisis se incluyó, además, una estimación del tiempo óptimo de lectura (tiempo en el que se da la máxima la diferencia de absorbancia entre una muestra positiva y el control negativo) de la técnica. Para ello, utilizando como controles positivos extractos de hoja infectada, y de hoja sana como control negativo, se realizaron lecturas de absorbancia cada 30 minutos tras la adición del sustrato hasta los 210 minutos (Figura 22). Para SqMV se observaban valores de saturación ($A_{405nm} > 3$) desde los 90 minutos. Para CGMMV y MNSV, los valores de absorbancia en hoja infectada alcanzaron lecturas próximas a saturación ($A_{405nm} \approx 3-3.5$) a partir de 150 minutos (Figura 22, A y B). Se estableció, por tanto, un tiempo de lectura de 150 minutos como óptimo para los siguientes análisis de DAS-ELISA de este trabajo.

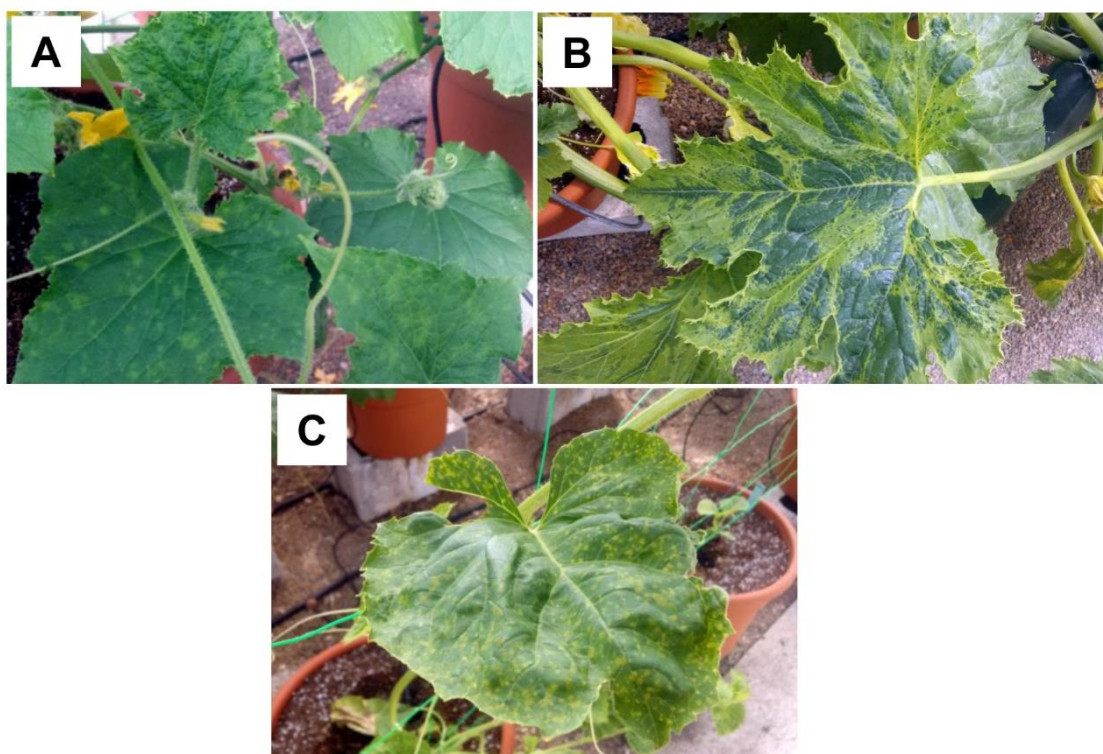


Figura 21. Síntomas de plantas infectadas con **A**, el virus del mosaico verde jaspeado del pepino, CGMMV; **B**, el virus del mosaico de la calabaza, SqMV; **C**, el virus de las manchas necróticas del melón, MNSV.

A este tiempo de medida optimizado y estableciendo como valor umbral positivo/ negativo 2,5 veces la absorbancia de un lote de semillas sano, se obtuvieron resultados positivos para los grupos de semillas analizados infectados con CGMMV

($A_{405\text{nm}}$ 1,446; absorbancia umbral: 0,198) y SqMV ($A_{405\text{nm}}$ 3,548; absorbancia umbral: 0,220). Para MNSV, sin embargo, no se obtuvieron semillas infectadas ($A_{405\text{nm}}$ 0,084; absorbancia umbral: 0,178).

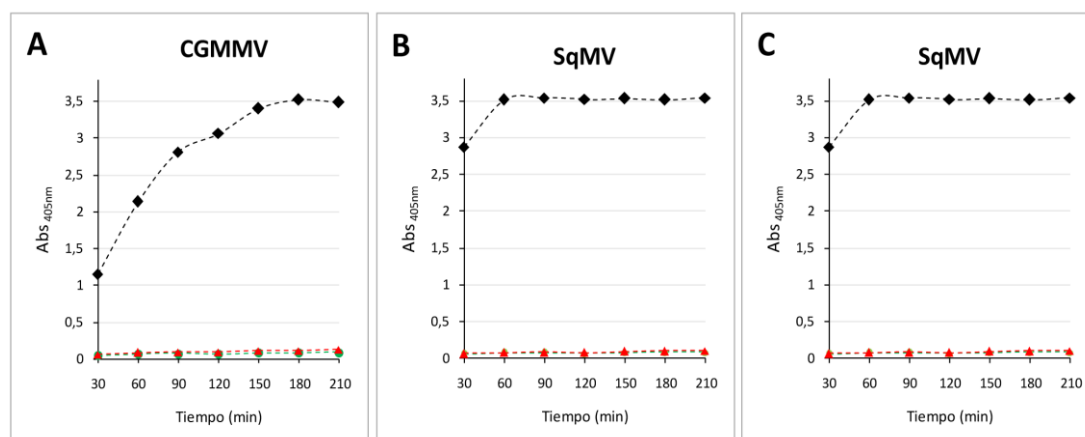


Figura 22. Estimación del tiempo óptimo de lectura para los análisis por DAS-ELISA, obtenidos para los tres virus estudiados en este trabajo, analizado en hoja infectada. Cada histograma muestra el valor de absorbancia medido a 405 nm ($Abs_{405\text{nm}}$) frente al tiempo de lectura. Los símbolos se corresponden con: rombos negros: hoja infectada; triángulos rojos: hoja sana; Círculos verdes: control sin muestra (tampón de extracción).

II.3.2. Diseño y evaluación de un ensayo de RT-qPCR en un solo paso con sonda TaqMan para CGMMV, SqMV y MNSV

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad en el protocolo de análisis en semillas existente para CGMMV, SqMV y MNSV, se realizó la puesta a punto de la técnica de RT-qPCR a tiempo real con sondas basadas en la tecnología TaqMan. En la puesta a punto de la técnica se evaluaron los siguientes parámetros: eficiencia, sensibilidad analítica y especificidad analítica.

II.3.2.1. Diseño de combinaciones de iniciadores y sonda

Para el diseño de iniciadores y sondas específicos se utilizaron secuencias completas de los virus disponibles en la base de datos del NCBI. Los iniciadores y sondas se diseñaron a partir de regiones altamente conservadas entre los aislados de cada virus. Para CGMMV, se realizó un alineamiento de 62 secuencias completas para este virus y se seleccionó una región del gen que codifica la proteína de movimiento completamente conservada en todos los aislados (Figura 20, A). Para la detección de SqMV, se utilizó el set de sonda e iniciadores diseñado previamente por Li y col. (2016) (Li, Berendsen y Ling, 2016), que amplifican un fragmento de la 3' UTR del RNA-2 del virus, tras

comprobar que estaba diseñado sobre una secuencia con un 100 % de similitud de secuencia para todos los aislados secuenciados hasta la fecha de realización de este trabajo (Figura 20, B). Para la detección de MNSV, se eligió una región del gen que codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN (p89), completamente conservada en 19 de los 27 aislados secuenciados hasta el momento (Figura 20, C).

II.3.2.2. Eficiencia

La idoneidad de la técnica se evaluó experimentalmente con diluciones seriadas de transcritos de ARN de concentración conocida, diluidos en extractos de ARN de planta sana, para generar rectas patrón para los tres virus. Para los tres virus, el coeficiente de correlación obtenido (R^2) fue superior a 0,998 (Figura 23), lo que indica un buen ajuste de los datos. Se calculó la eficiencia de amplificación de las sondas y cebadores utilizados en este trabajo a partir de la pendiente de las rectas, utilizando la siguiente fórmula: $\text{Eficiencia} = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1) \times 100$ (Pfaffl, 2001). Se obtuvieron unos valores de eficiencia de 99,05 % para CGMMV (correspondiente con un valor de pendiente de -3,345. Figura 23, A); del 85,24 % para SqMV (valor de pendiente de -3,439. Figura 23, B) y 95,34 % para MNSV (valor de pendiente de -3,735. Figura 23, C). La eficiencia de amplificación para los tres virus se calculó también utilizando extractos de material vegetal infectado. En el caso de CGMMV y SqMV, se calcularon a partir de diluciones realizadas sobre extractos de hoja y semilla infectadas. Las eficiencias calculadas fueron: para CGMMV, del 98,01 % en hoja y del 99,7 % en semilla; para SqMV, las eficiencias fueron del 86,2 % en hoja y del 84,0 % en semilla. Para MNSV, el valor de eficiencia de amplificación en material infectado se calculó únicamente sobre extracto de hoja infectada y ésta fue del 94,5 %.

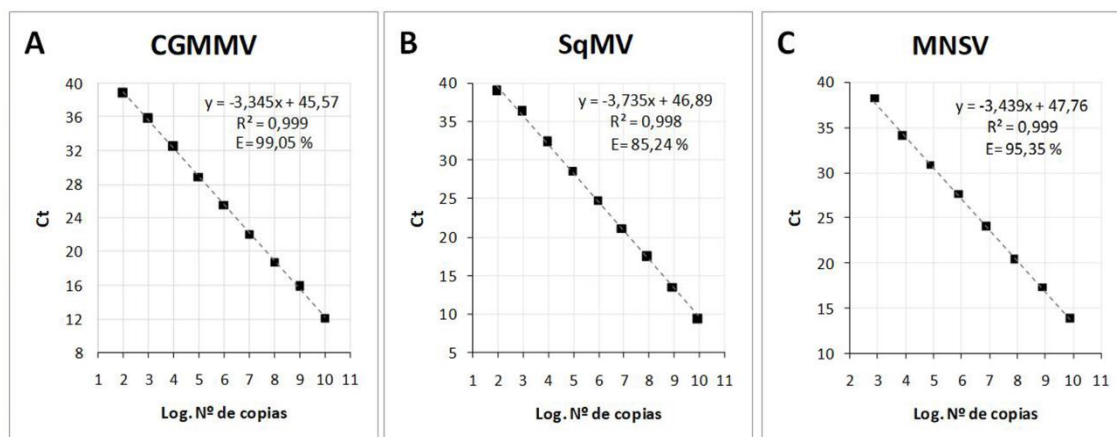


Figura 23. Rectas patrón generadas a partir de diluciones seriadas en base 10 de los transcritos *in vitro* generados para los tres virus estudiados en este trabajo, determinados por RT-qPCR/sonda. Las curvas están generadas representando los valores de ciclo umbral (Ct) frente al logaritmo del número de copias de ARN. El valor Ct representado para cada dilución se corresponde con el valor promedio obtenido de tres análisis independientes. Aparece indicado el valor de eficiencia (E) calculado a partir de la ecuación de la recta de cada curva. Los gráficos se corresponden con: **A**, virus del mosaico verde jaspeado del pepino, CGMMV; **B**, virus del mosaico de la calabaza, SqMV; **C**, virus de las manchas necróticas del melón, MNSV.

II.3.2.3. Sensibilidad analítica

La sensibilidad se define como la cantidad más pequeña de muestra problema que puede ser detectada. A partir de las rectas patrón realizadas con las diluciones en base 10 de los transcritos para los tres virus (Figura 23), se calculó el límite de detección teórico para los tres virus (número de copias de ARN viral detectable): para CGMMV el límite de detección teórico calculado fue de 96 copias de ARN viral, que equivalía a un Ct de 38,7; para SqMV fue de unas 97 copias de ARN viral, con un Ct de 38,5 y para MNSV, el límite de detección teórico fue de 740 copias de ARN viral, con un Ct de 38,2.

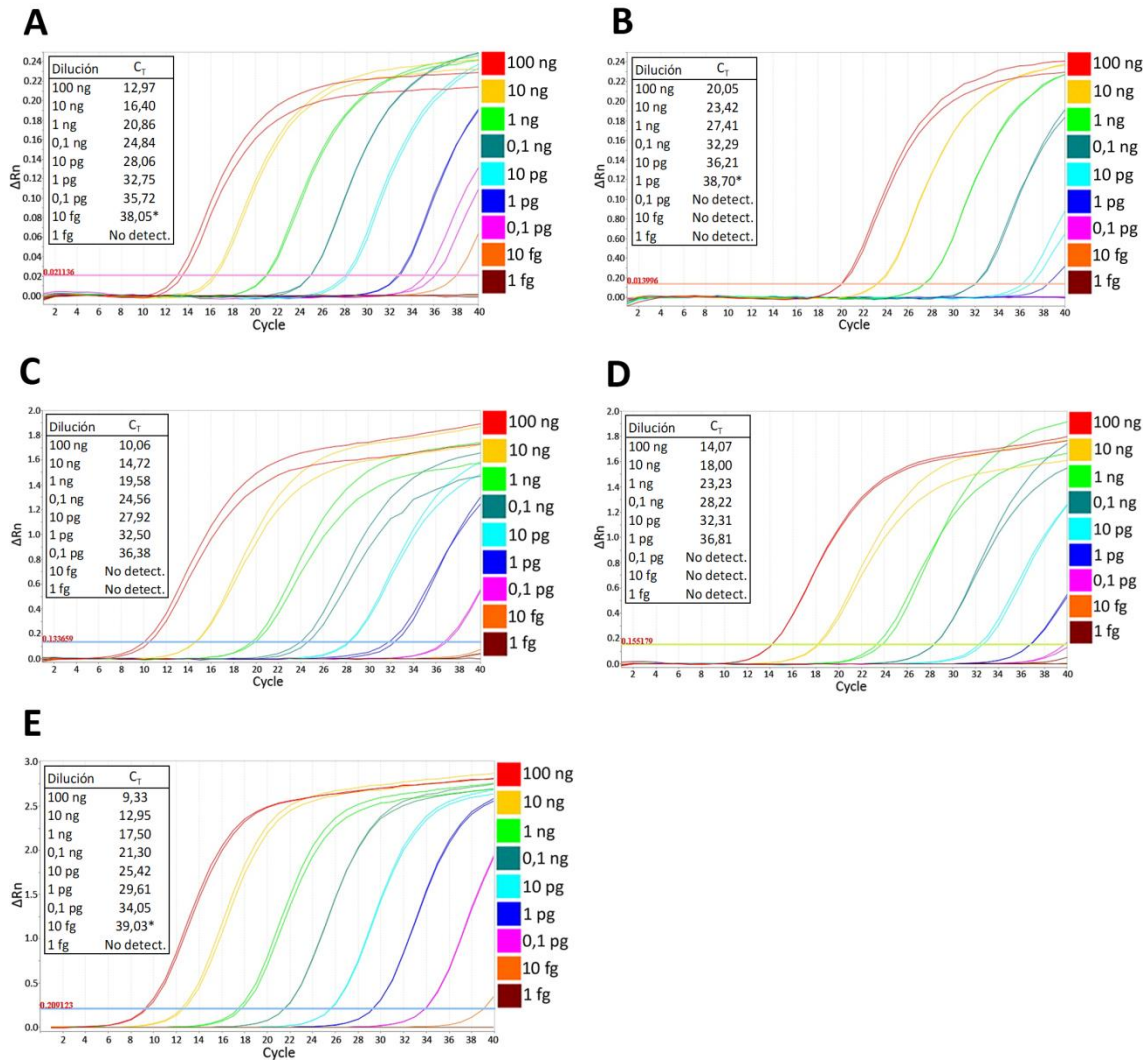


Figura 24. Análisis de sensibilidad realizados por RT-qPCR/sonda. Diagramas de amplificación mostrando el análisis realizado a partir de diluciones seriadas en base 10 de extractos de ARN obtenidos a partir de hoja (columna izquierda) y semilla (columna derecha) infectadas, para los tres virus estudiados en este trabajo, analizando dos réplicas para cada dilución. Cada diagrama muestra el valor de fluorescencia umbral (ΔR_n) frente al ciclo de amplificación (C_T) y las líneas horizontales marcan el límite umbral de la prueba. De izquierda a derecha, se representan las curvas de amplificación obtenidas para las distintas concentraciones de ARN de las diluciones seriadas analizadas, desde 100 ng/ μ l hasta 1 fg/ μ l. En cada diagrama se muestran los valores de amplificación umbral promedio (C_T) obtenidos de dos análisis independientes. Los asteriscos (*) significan que solo una de las réplicas produjo señal de amplificación, por lo que consideró como límite de detección a la última concentración que produjo señal de amplificación en todas las réplicas analizadas. Los diagramas de amplificación corresponden a: **A** y **B**, virus del mosaico verde jaspeado del pepino, CGMMV; **C** y **D**, virus del mosaico de la calabaza, SqMV; **E**, virus de las manchas necróticas del melón, MNSV.

La sensibilidad analítica se evaluó también sobre material vegetal infectado (extracto de ARN total). Para ello se realizaron diluciones seriadas en base 10 desde 100 ng/ μ l hasta 1 fg/ μ l y, en este caso, la sensibilidad o límite de detección (LD) se determinó en base a la mayor dilución capaz de generar una señal de amplificación detectable. Para

CGMMV y SqMV se evaluó tanto en semilla como en hoja infectada. En el ensayo de CGMMV se pudo detectar virus en hoja hasta una dilución de 10 fg/ μ l (Figura 24, A), aunque esto sólo se observó en una de las réplicas de uno de los ensayos, mientras que en el resto no fue así. De esta manera, se podría decir que el LD en hoja equivalía a una dilución de 0,1 pg/ μ l, con un C_T promedio de 35,72. En semilla, en cambio, el LD observado (Figura 24, B) se correspondía con una dilución de 10 pg/ μ l, con un C_T promedio de 36,21. En el ensayo de SqMV, se observó un LD en hoja infectada equivalente a una dilución de 0,1 pg/ μ l, con un valor C_T promedio de 36,38 (Figura 24, C). En semilla infectada, el LD determinado, con un C_T promedio de 36,81, se correspondía con una dilución de 1 pg/ μ l (Figura 24, D). Para MNSV, la evaluación de la sensibilidad analítica en material vegetal infectado se realizó únicamente en hoja. Se logró detectar virus hasta una dilución de 10 fg/ μ l, pero al igual que ocurrió con CGMMV, sólo se detectó en una de las réplicas de uno de los ensayos, por lo que el LD se estableció para la dilución 0,1 pg/ μ l, con un valor de C_T promedio de 34,05 (Figura 24, E).

II.3.2.4. Especificidad analítica

La especificidad se define como la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra. Como parte de la puesta a punto de la RT-qPCR también se evaluó su especificidad analítica. En este caso se evaluó la ausencia de reacción cruzada entre los tres virus analizados en este trabajo y para ello se utilizaron extractos de semilla y hoja infectados (Figura 25). Como se puede observar, únicamente se produjeron señales específicas para cada virus analizado mientras que, para los otros virus, así como para los controles negativos de planta sana y agua, no se produjo señal alguna. Este resultado sugiere una alta especificidad de las sondas analizadas, por lo que podrían utilizarse, en caso de marcarse con distintos fluoróforos, en análisis multiplex.

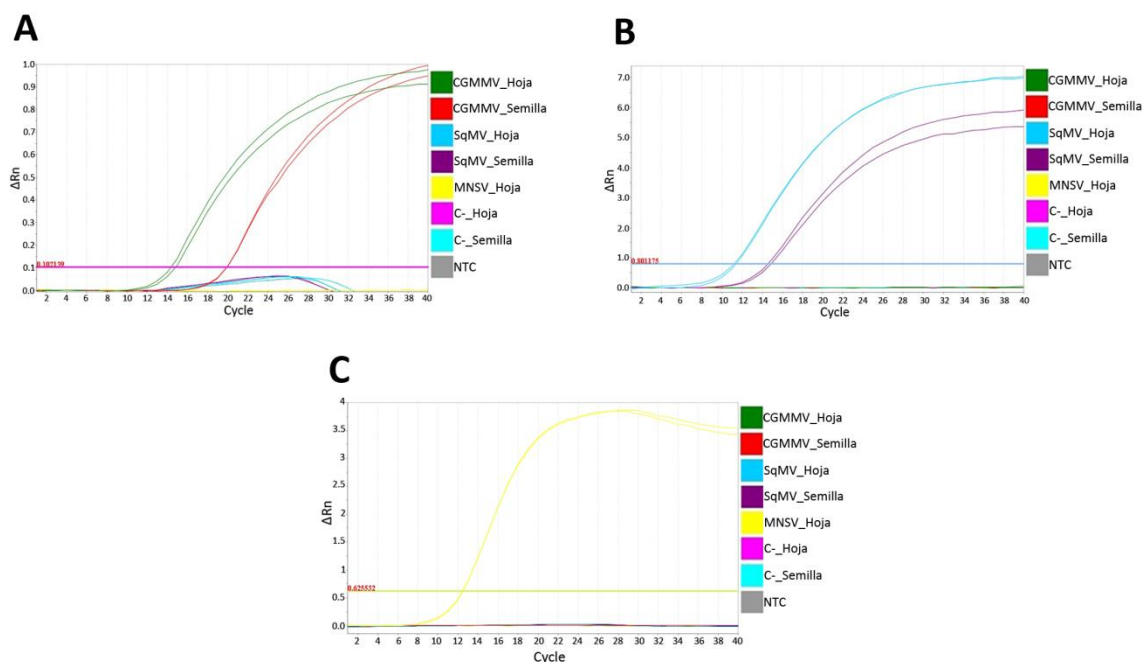


Figura 25. Análisis de especificidad realizados por RT-qPCR/sonda. Los análisis se realizaron utilizando extractos de ARN de hoja y semilla infectados con uno de los tres virus estudiados en este trabajo. Para cada análisis, se utilizaron extractos de ARN de hoja y semilla de planta sin inocular como controles negativos, así como un control sin muestra (NTC). Cada diagrama muestra el valor de fluorescencia umbral (ΔRn) frente al ciclo de amplificación (Ct) y las líneas horizontales marcan el límite umbral de la prueba. Los diagramas de amplificación corresponden a: **A**, virus del mosaico verde jaspeado del pepino, CGMMV; **B**, virus del mosaico de la calabaza, SqMV; **C**, virus de las manchas necróticas del melón, MNSV.

II.3.2.5. Evaluación de un ensayo “dúplex” con un control endógeno como control de calidad de la muestra

En una RT-qPCR, la integridad del ARN es esencial para realizar un diagnóstico fiable. Una muestra de ARN de mala calidad puede resultar en amplificación a ciclos altos o incluso no amplificar, lo que podría resultar en un falso negativo de estar el patógeno presente. En este trabajo se incluyó, como control endógeno de planta, al ARN ribosomal 18S y se evaluó su utilidad en ensayos dúplex para los tres virus. Se evaluó tanto en hoja (los tres virus) como en semilla infectada (CGMMV y SqMV) y en el ensayo también se incluyeron extractos de semilla y hoja sana, como controles negativos. Se obtuvieron valores de C_T altos (10,06-13,08) para el control endógeno, tanto en material vegetal infectado como en los controles negativos sanos, independientemente de la matriz y de la especie vegetal evaluadas (Tabla 9). Como contrapartida, se observó cierta señal de amplificación para el gen endógeno en el control negativo sin muestra (agua), en los ensayos para los tres virus, pero este ocurrió siempre a ciclos altos (>30).

Tabla 9. Valores de C_T^a obtenidos en los ensayos de RT-qPCR dúplex para la detección de cada uno de los tres virus analizados en este trabajo, utilizando el gen ARNr 18S.

	CGMMV		SqMV		MNSV	
	ARNr 18S	CGMMV	ARNr 18S	SqMV	ARNr 18S	MNSV
Semilla infectada	12,08 ± 0,23	20,25 ± 0,07	12,12 ± 0,27	15,14 ± 0,27	N.A. ^c	N.A.
Semilla sana	11,08 ± 0,04	No detectado ^b	10,74 ± 0,09	No detectado	10,06 ± 0,08	No detectado
Hoja infectada	11,90 ± 0,32	14,05 ± 0,18	12,95 ± 0,18	11,54 ± 0,11	11,04 ± 0,04	11,64 ± 0,09
Hoja sana	13,08 ± 0,11	No detectado	12,46 ± 0,18	No detectado	11,82 ± 0,19	No detectado
C-. Sin muestra	34,00 ± 0,18	No detectado	33,45 ± 0,085	No detectado	32,6 ± 0,21	No detectado

^a Valores de C_T promedio de dos repeticiones ± la desviación estándar; ^b No se detecta amplificación; ^c No analizado.

II.3.3. Estudio comparativo entre DAS-ELISA y RT-qPCR con sonda

Taqman en semilla infectada con CGMMV y SqMV

II.3.3.1. Evaluación en lotes de semilla

En el estudio comparativo de ambas técnicas se evaluó la capacidad de detectar una semilla infectada en un lote de semillas sanas. En primer lugar, se realizó un análisis en semillas individuales para estimar el porcentaje de semilla infectada de los lotes obtenidos en este trabajo. Para ello se eligieron veinte semillas al azar de cada lote (CGMMV y SqMV) y se analizaron por ambas técnicas. El análisis de DAS-ELISA realizado para CGMMV, con valor de absorbancia umbral de 0,268, mostró la existencia de un 70 % de semillas infectadas, en las que las semillas positivas mostraron rangos de absorbancia de entre 0,271 y 0,979 y las negativas, valores de absorbancia de entre 0,110 y 0,209. La evaluación por RT-qPCR/sonda realizada a partir de extractos de las mismas semillas, sin embargo, mostró un 100 % de semillas infectadas, con unos C_T entre 16,57 y 26,95. La comparación entre ambas técnicas mostró que los C_T obtenidos para las semillas que resultaron negativas para DAS-ELISA fueron similares a los de las semillas positivas, lo que parece indicar que posiblemente pudo ocurrir un problema en el desarrollo del DAS-ELISA. Para SqMV, la evaluación en semilla individual mostró un 100 % de semillas positivas en ambas técnicas, con unos rangos de absorbancia para el DAS-ELISA de entre 0,371 y 3,637 (absorbancia umbral: 0,273) y unos C_T correspondientes de entre 12,57 y 19,83. Podemos concluir, por tanto, que todas las semillas de los lotes cosechados en este trabajo son positivas para los respectivos virus.

Una vez establecido que todas las semillas de los lotes estaban infectadas, se prepararon tres lotes de semillas en las que la proporción “semilla infectada: semilla sana” fue de 1:100, 1:500 y 1:1.000. Con la evaluación por DAS-ELISA sólo se obtuvieron resultados positivos para los lotes de 1:100 para ambos virus, mientras que por RT-qPCR/sonda, incluso los lotes 1:1.000 proporcionaron resultados positivos para ambos virus (Tabla 10).

Tabla 10. Comparación de la sensibilidad obtenida por RT-qPCR/sonda y DAS-ELISA en lotes de semilla.

Sana: Infectada	CGMMV		SqMV	
	ELISA _{405nm} ^a	RT-qPCR/ sonda ^b	ELISA _{405nm}	RT-qPCR/ sonda
1: 100	(+) 0,40 ± 0,02	26,2 ± 0,09	(+) 2,9 ± 0,03	19,6 ± 0,11
1: 500	(-) 0,23 ± 0,04	29,5 ± 0,04	(-) 0,16 ± 0,01	24,6 ± 0,03
1: 1.000	(-) 0,10 ± 0,02	30,1 ± 0,10	(-) 0,09 ± 0,02	28 ± 0,05
Control sano	0,12 ± 0,05	No detectado	0,09 ± 0,02	No detectado

^aValores promedio de dos repeticiones, analizando dos réplicas por muestra ± desviación estándar. Lectura de absorbancia (405 nm) realizada a 150 min; ^bValores C_T promedio de dos repeticiones ± desviación estándar; ^cAmplificación no detectada

II.3.3.2. Análisis comparativo de DAS-ELISA frente a RT-qPCR/sonda en diluciones seriadas de un lote de semilla infectado

Se realizó un análisis comparativo de la sensibilidad de las técnicas de DAS-ELISA y RT-qPCR/sonda, utilizando diluciones seriadas de extractos de semilla infectada en extractos de semilla sana. A partir de una dilución 1:5 (peso: volumen, µg: ml) se realizaron diluciones en base 5 hasta una dilución final de 1:9.765.625 para ambos virus (Tabla 11). En la evaluación por DAS-ELISA, se obtuvieron resultados positivos hasta la dilución 1:125 para ambos virus (Tabla 11). Con la RT-qPCR/sonda, se logró detectar CGMMV hasta una dilución equivalente de 1:1.953.125 y SqMV hasta una dilución de 1:390.625 (Tabla 11). Con estos resultados podemos establecer que la técnica de RT-qPCR/sonda demostró ser del orden de 1.000 más sensible y 10.000 veces más sensible que el DAS-ELISA para SqMV y CGMMV, respectivamente.

Tabla 11. Comparación de la sensibilidad obtenida por RT-qPCR/sonda y DAS-ELISA en la detección de CGMMV y SqMV en diluciones seriadas a partir de un extracto de semillas infectadas.

Dilución (p:v)	CGMMV		SqMV	
	DAS-ELISA _{405nm} ^a	RT-qPCR/sonda ^b	ELISA _{405nm}	RT-qPCR/sonda
1:5	(+) 0,60 ± 0,10	19,41 ± 0,16	(+) 3,55 ± 0,02	18,94 ± 0,04
1:25	(+) 0,34 ± 0,03	20,23 ± 0,17	(+) 3,21 ± 0,04	20,17 ± 0,23
1:125	(+) 0,34 ± 0,04	22,33 ± 0,07	(+) 1,29 ± 0,02	22,22 ± 0,29
1:625	(-) 0,23 ± 0,02	24,77 ± 0,14	(-) 0,23 ± 0,01	24,51 ± 0,12
1:3,125	(-) 0,15 ± 0,01	27,46 ± 0,30	(-) 0,09 ± 0,01	29,75 ± 0,20
1:15,625	(-) 0,13 ± 0,02	31,6 ± 0,23	(-) 0,09 ± 0,01	32,98 ± 0,15
1:78,125	(-) 0,13 ± 0,01	32,46 ± 0,29	(-) 0,09 ± 0,01	35,12 ± 0,22
1:390,625	(-) 0,12 ± 0,002	36,44 ± 0,22	(-) 0,09 ± 0,01	38,11 ± 0,05
1:1,953,125	(-) 0,11 ± 0,004	37,4 ± 0,14	(-) 0,10 ± 0,02	No detectado
1: 9,765,625	(-) 0,12 ± 0,003	No detectado ^c	(-) 0,08 ± 0,02	No detectado
Control sano	0,13 ± 0,01	No detectado	0,09 ± 0,02	No detectado

^a Valores promedio de dos repeticiones, analizando dos réplicas por muestra ± desviación estándar. Lectura de absorbancia (405 nm) realizada a 150 min; ^b Valores C_T promedio de dos repeticiones ± desviación estándar; ^c Amplificación no detectada

II.3.4. Bioensayo

La infectividad de los virus detectados en los lotes de semilla obtenidos en este trabajo fue evaluada mediante un bioensayo. Se realizaron dos tipos de bioensayo: i) inoculación del extracto de semillas en plantas huésped, con el cual se evaluó la infectividad de ambos virus (CGMMV y SqMV) y ii) ensayo de germinación para CGMMV.

II.3.4.1. Test de inoculación

A partir de unos resultados previos de un bioensayo de inoculación mecánica de un lote comercial de semilla infectada con CGMMV (en proporción desconocida), se ideó este bioensayo cuyo propósito fue intentar determinar la sensibilidad de esta prueba utilizando tres lotes con distinta proporción de semilla sana frente a infectada (1:100; 10:100 y 50:100). Se inocularon 10 plantas de *Nicotiana benthamiana*, pepino y melón. La evaluación del bioensayo se realizó mediante DAS-ELISA y la absorbancia umbral se estableció en 2,5 veces el valor del control negativo sano. En la primera evaluación del bioensayo, que se realizó a 6 dpi, se analizaron individualmente las plantas de *N. benthamiana*. Con un valor de absorbancia umbral para el ensayo de SqMV de 0,275,

todas las plantas analizadas resultaron negativas con un rango de valores de absorbancia de entre 0,100 y 0,242 (absorbancia promedio: 0,137). Para CGMMV, con un valor umbral de absorbancia de 0,265, únicamente se obtuvieron resultados positivos en dos de las plantas inoculadas con el lote 50:100, con unos valores de absorbancia promedio de 0,317 y 0,966, respectivamente (tasa de infección del 20 %). El resto de las plantas dieron resultados negativos para CGMMV, con un rango de absorbancia de entre 0,105 y 0,228 (absorbancia promedio: 0,134). En la segunda evaluación del bioensayo, realizada a 15 dpi, ninguna de las plantas inoculadas para los dos virus mostró síntomas. Los análisis de DAS-ELISA realizados en los pools de plantas mostraron resultados negativos para ambos virus, con valores promedio de lectura para SqMV de 0,134 para los pools de *N. benthamiana* (absorbancia umbral: 0,345), de 0,126 para los pools de plantas de pepino (absorbancia umbral: 0,3) y de 0,137 para los pools de plantas de melón (absorbancia umbral: 0,313). Los valores de absorbancia obtenidos para los pools del ensayo de CGMMV fueron de 0,160 para las plantas de *N. benthamiana* (absorbancia umbral: 0,396), de 0,183 para los pools de plantas de pepino (absorbancia umbral: 0,429) y de 0,215 para los pools de planta de melón (absorbancia umbral: 0,396).

II.3.4.2. Ensayo de germinación en lotes de semilla infectados con CGMMV

El protocolo oficial del ISTA 7-026 tiene establecido un bioensayo de germinación en caso de obtener un resultado positivo para SqMV con el DAS-ELISA. Por este motivo, se ejecutó un protocolo similar para la evaluación de semillas infectadas con CGMMV del lote obtenido en este trabajo. De las 90 semillas utilizadas, se obtuvo una tasa de germinación del 100 %, pero una plántula no prosperó, por lo que se evaluó un total de 89 plantas de pepino. La evaluación de las plantas se realizó cuando la mayoría se encontraba en un estadio de 3-4 hojas verdaderas, a un tiempo equivalente a 24 días post-germinación, estadio en el que los controles positivos inoculados mecánicamente presentaban los síntomas típicos de la enfermedad. La evaluación visual de las plantas germinadas resultó en que ninguna de ellas mostró síntomas atribuibles a la presencia de CGMMV. Siguiendo el protocolo establecido para SqMV, donde se establece que las plantas germinadas con ausencia de síntomas han de ser confirmadas como libres de virus analizándolas en grupos por DAS-ELISA, se realizó un primer análisis en grupos de 10 plantas. Con un valor de absorbancia umbral establecido para este ensayo de 0,269,

ninguno de los 9 grupos analizados resultó positivo, presentando un rango de absorbancias de entre 0,088 y 0,158 (promedio: 0,111). Así mismo, en caso de que, pese a que los lotes resultaron negativos, alguna planta estuviese infectada por CGMMV, se realizó un análisis de planta individual. Únicamente una planta resultó positiva por DAS-ELISA para CGMMV, con un valor de absorbancia de 0,563, lo que corresponde a una tasa de transmisión equivalente al 1,13 %. El resto de las plantas dieron resultado negativo para CGMMV, con un rango de absorbancias de entre 0,083-0,175 (absorbancia promedio: 0,122).

II.4. Discusión

El objetivo principal de este capítulo ha sido el desarrollo de protocolos de RT-qPCR basada en la tecnología TaqMan para la detección de tres virus de cucurbitáceas transmitidos por semilla, CGMMV, MNSV y SqMV, y su comparativa con la técnica de DAS-ELISA, el método certificado para su diagnóstico.

Disponer de material vegetal infectado únicamente por el virus objeto de estudio es esencial tanto para la puesta a punto y validación de una técnica de detección, como para la generación de controles positivos fiables en caso de tener que realizar un servicio diagnóstico. Para este trabajo era necesario disponer de lotes de semilla infectados con cada uno de los tres virus y, en el caso de CGMMV y SqMV, se consiguió. En el caso de MNSV, a pesar de que los alficoces presentaron infección sistémica con alto nivel de síntomas, las semillas obtenidas resultaron negativas para la presencia del virus, tanto por ELISA como por RT-qPCR /sonda. Aunque no hay muchos datos al respecto, parece ser que el desarrollo de la enfermedad causada por MNSV parece estar relacionado con las condiciones ambientales. En concreto, temperaturas bajas favorecen síntomas más agresivos, así como parecen disminuir el movimiento a larga distancia del virus, mientras que con temperaturas más altas (más de 25°C) ocurre lo contrario (Mallor Giménez, Álvarez Álvarez y Arteaga, 2003; Kido *et al.*, 2008; Wintermantel, 2017). En nuestro caso, el mantenimiento de las plantas en condiciones controladas pudo favorecer esa situación. Un alto nivel de síntomas y una restricción del movimiento del virus que pudiera dificultar su llegada hasta el tejido floral ha podido originar que no se haya detectado la presencia del virus en semilla. Aunque todo esto son especulaciones y sería necesaria más investigación al respecto.

Dada la finalidad diagnóstica de la RT-qPCR/sonda, es fundamental identificar regiones altamente conservadas en el genoma de los virus para así poder detectar el mayor número de aislados posibles. El set de iniciadores y sonda descritos para SqMV por Li y col. (2016) (Li, Berendsen y Ling, 2016) está diseñado en la región 3' UTR del ARN-2 del virus, una región conservada para los 9 genomas secuenciados para este virus. En su trabajo, además, estos investigadores comprobaron su eficacia y observaron que el set diseñado por ellos era capaz de detectar en semilla los tres genotipos descritos para SqMV, mientras que el ensayo descrito anteriormente (Ling *et al.*, 2011) solamente era capaz de detectar los genotipos 1 y 2, pero no al genotipo 3 (Li *et al.*, 2016), el cual ha sido descrito en España recientemente (Li *et al.*, 2015). Por esta razón elegimos éste para nuestro trabajo. Para CGMMV se decidió diseñar una nueva sonda (Hongyun *et al.*, 2008), diseñada en la región 3'UTR del virus y se eligió una zona altamente conservada en el gen que codifica la proteína de movimiento. En el caso de MNSV, es la primera vez que se describe un ensayo de RT-qPCR basado en la tecnología TaqMan. En este caso, sólo se encontraron dos regiones lo suficientemente conservadas para poder diseñar un ensayo de RT-qPCR/sonda, dada la alta heterogeneidad en las secuencias depositadas en la base de datos. Una primera tentativa con la región más conservada, coincidente con la porción final de las regiones que codifican la p89 y la región solapante con la p14/7A, no arrojó buenos resultados, pues mostró una eficiencia muy baja, inferior al 65 % (datos no mostrados), por lo que quedó descartada. La sonda elegida para este trabajo está completamente conservada en 19 de las 27 secuencias completas disponibles. En las 8 restantes, bien la introducción de degeneraciones en la sonda/iniciadores o bien la búsqueda de regiones alternativas, podría ser una buena estrategia a seguir.

Dos aspectos muy importantes en la puesta a punto de una técnica diagnóstica son la sensibilidad y la especificidad. Los datos de sensibilidad analítica para los tres virus ofrecieron resultados similares a otros ensayos de RT-qPCR/sonda realizados para otros virus, obteniéndose un límite de detección teórico inferior a 100 copias para CGMMV y SqMV, similar a lo observado para el ensayo ya existente de CGMMV (Hongyun *et al.*, 2008), *Maize chlorotic mosaic virus* (MCMV) (Zhang *et al.*, 2011), *Plum pox virus* (PPV) (Olmos *et al.*, 2005) y el ensayo para las cepas específicas de *Pepino mosaic virus* (PepMV) (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2009) y del orden de 10^2 copias para MNSV, similar a lo obtenido para *Citrus leaf blotch virus* (CLBV) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009) y con el set de

sonda e iniciadores del ensayo de amplio espectro para PepMV, diseñado por Ling y colaboradores (2007) (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2009).

La capacidad de la tecnología TaqMan de poder incorporar distintos fluoróforos a las sondas, junto con las máquinas de qPCR, que poseen hasta 6 canales de fluorescencia, permite diseñar ensayos multiplex en el que en un mismo tubo se pueden detectar hasta 5 dianas diferentes, lo que lleva a un abaratamiento de costes de esta técnica diagnóstica. Con este objetivo se realizó el ensayo de especificidad para los tres virus, donde no se observó reacción cruzada entre ellos, lo que indica que este ensayo se podría multiplexar. Como parte del ensayo multiplex, se podría incorporar, además de los tres virus, una cuarta diana con la que se incluiría un control de calidad para cada muestra, un aspecto fundamental en las técnicas de diagnóstico. En este contexto evaluamos al ARN ribosomal 18S como control endógeno de planta. Este gen ya ha sido utilizado tanto como control de calidad en extracción de ARN (Osman *et al.*, 2007; Li, Berendsen y Ling, 2016), como control endógeno en ensayos de cuantificación de título viral (Kokkinos y Clark, 2006; Liu *et al.*, 2013; Crespo *et al.*, 2018). Los altos valores de C_T obtenidos independientemente de la matriz, especie vegetal y estado del material (sano o infectado), lo convierten en un buen candidato para ser utilizado como control endógeno con fines diagnósticos. Como punto en contra, se observó cierta amplificación en el control sin muestra, pero esta siempre ocurrió a ciclos mayores de 30, independientemente del virus analizado. Esto puede deberse a una contaminación durante la preparación de las diluciones de la sonda/iniciadores o una contaminación en otros reactivos de la RT-qPCR, pues se trata de una secuencia altamente conservada en eucariotas. Dada la estabilidad observada en presencia de tejido vegetal (Tabla 2), se determinó establecer un umbral de detección y rechazar cualquier muestra con valores de C_T superiores a 30 para el control endógeno.

Aunque el objetivo de este trabajo es diagnóstico cualitativo (presencia/ausencia), la propiedad cuantitativa de la técnica evaluada permitió la evaluación de la eficiencia de los sets de iniciadores/sonda utilizados en este trabajo. En una situación ideal, en cada ciclo de PCR debería doblarse el número de moléculas de la diana evaluada, lo que equivaldría a una eficiencia del 100 %. El rango de eficiencia considerado como aceptable para un análisis por qPCR es entre el 90-110 % (Scott Adams, 2006). Las eficiencias observadas de los experimentos diseñados en este trabajo

para CGMMV y MNSV entraron dentro del rango tanto para transcritos como para material infectado, por lo que serían buenos candidatos para utilizarlos con fines cuantitativos (*i.e.* en escrutinio de variedades tolerantes/resistentes). Para el ensayo de SqMV, es la primera vez que se calcula su porcentaje de eficiencia y, pese a que éste mostró ser ligeramente inferior al rango de aceptación descrito, es el único ensayo descrito hasta ahora capaz de detectar los tres tipos existentes para este virus.

La concentración de virus en semilla suele ser inferior a la observada en otros tejidos vegetales (Ling, Wechter y Jordan, 2007; Zhang *et al.*, 2011). De hecho, en su trabajo, Ling y col. (2007) estimaron una concentración de PepMV en semilla del orden de 1.000 veces inferior a la observada en hoja y fruto (Ling, Wechter y Jordan, 2007). Nosotros pudimos corroborar este hecho ya que mientras que en la evaluación de diluciones seriadas de ARN total de semilla infectada pudimos detectar virus hasta una concentración de 10 pg/ μ l para CGMMV y de 1 pg/ μ l para SqMV, en un experimento similar realizado en hoja infectada, pudimos detectar ARN viral hasta en una concentración de 0,1 pg/ μ l para ambos virus. Este hecho apoya la necesidad de emplear técnicas más sensibles en los programas de certificación de semilla, pues lotes con un título viral bajo podrían pasar desapercibidos si la técnica de DAS-ELISA, que actualmente es el “gold standard” para el diagnóstico oficial en semilla, no es lo suficientemente sensible para detectarlo. En este contexto, la RT-qPCR parece el método más prometedor ya que, de las técnicas que se utilizan de rutina en un laboratorio, ésta es la más sensible. Comparado con la técnica de DAS-ELISA, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la RT-qPCR/sonda fue del orden de 1.000 veces más sensible para SqMV y hasta 10.000 más sensible para CGMMV, en la evaluación de un lote de semillas infectado con estos virus. Estos resultados concuerdan con otros obtenidos para virus de plantas en los que comparan ambas técnicas (Mumford *et al.*, 2000; Fabre *et al.*, 2003; Ratti *et al.*, 2004; Olmos *et al.*, 2005; Bertolini *et al.*, 2008; López-Fabuel *et al.*, 2013). El protocolo estándar del ISTA establece el análisis en lotes de 2.000 semillas, divididos en 20 submuestras de 100 (ISTA, 2017). Con los lotes de semilla infectados obtenidos en este trabajo, únicamente se pudo detectar por DAS-ELISA 1 semilla infectada en un lote de 100 sanas para ambos virus, que es el límite de sensibilidad establecido en el protocolo oficial, pero bastante inferior a lo descrito para estos virus, pues para CGMMV se ha llegado a detectar 1 semilla infectada

en 800 sanas (Kawai *et al.*, 1985) y para SqMV, se han obtenido límites de detección de 1 en 159 y 1 en 400 (Nolan, 1984; Franken, Maat y Kamminga, 1990). Con la RT-qPCR/sonda, sin embargo, se pudo detectar fácilmente hasta 1 semilla infectada en 1000 sanas. Este incremento en sensibilidad observado en el análisis de lotes no sólo podría abrir la posibilidad de reducir a dos submuestras el análisis de lotes de semilla (en vez de las 20 necesarias para el análisis por DAS-ELISA), reduciéndose así el coste de material y tiempo, sino que permitiría incrementar el tamaño de lotes a analizar.

Detectar un virus en semilla no implica necesariamente que éste sea viable para poder transmitirse a la siguiente generación. Tal es el caso de SqMV, el cual puede estar presente tanto en la cubierta como en el embrión, pero únicamente se transmite por semilla cuando se localiza en el embrión, por lo que una detección (DAS-ELISA o qPCR/sonda) positiva en semilla podría sobreestimar la tasa de transmisión (Lecoq y Desbiez, 2012). La técnica del bioensayo de germinación permite resolver este problema. Además, es la única técnica que permite estimar la tasa de transmisión en un lote de semillas infectado. Uno de los inconvenientes de los bioensayos es la duración del experimento, sobre todo en los bioensayos de inoculación de plantas indicadoras, como el uso de distintas especies del género *Nicotiana* (EPPO, 2013; ISTA, 2019), que necesitan al menos 1 mes desde que germinan hasta que pueden ser inoculadas. Otro de los inconvenientes es la infraestructura necesaria, ya que no siempre se dispone del espacio y las instalaciones necesarias para llevar a cabo este tipo de ensayos, especialmente si se pretende analizar un número de semillas suficientemente grande como para obtener certeza estadística de los resultados.

El efecto del tiempo de almacenaje de las semillas previo a la realización de un bioensayo es un factor determinante para la obtención de resultados positivos, ya que éste afecta a la viabilidad de los virus. Por ejemplo, en un estudio realizado sobre el efecto del almacenaje sobre la transmisibilidad de SqMV en distintos lotes semillas de melón Cantalupo, tras dos años de almacenaje, se observó una caída en la viabilidad del virus, llegando en algunos lotes al 0 % (Powell y Schlegel, 1970). Para CGMMV, el efecto del almacenamiento sobre la viabilidad del virus en semilla también ha sido estudiado, con una caída en la transmisibilidad en un lote de semillas de pepino, desde un 8 % hasta el 0,1 % tras 5 meses de almacenaje (revisado en Hollings y col. (1975) (Hollings, Komuro y Tochihara, 1975)). En este trabajo, los bioensayos se realizaron tras estar las semillas

almacenadas a 4°C durante un año y dos meses tras su recolecta, lo que podría explicar el resultado obtenido en los bioensayos, sobre todo en el bioensayo de transmisión, ya que son virus cuya transmisión mecánica ocurre con mucha facilidad.

En conclusión, las pruebas de RT-qPCR/sonda puestas a punto y evaluadas en este trabajo han demostrado su aptitud como técnicas de gran sensibilidad para la evaluación de lotes de semilla, por lo menos para CGMMV y SqMV. Aunque su capacidad para detectar una importante variedad de aislados ha sido estudiada *in silico*, sería conveniente evaluarlos experimentalmente. De probar la aptitud de la RT-qPCR/sonda para MNSV en semilla y ésta resultar, previsiblemente, igual de favorable que las otras dos, la implementación del uso de sondas tipo TaqMan en los programas de certificación de semilla merecería ser tenida en cuenta, bien como actualización del método existente (DAS-ELISA) o como método de análisis complementario.

II.5. Bibliografía

- Albrechtsen, S. E.** (2006) *Testing Methods for Seed-transmitted Viruses: Principles and protocols*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J.** (1990) «Basic local alignment search tool», *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp. 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., de Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. y Cambra, M.** (2008) «Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR», *European Journal of Plant Pathology*, 120(2), pp. 177-188. doi: 10.1007/s10658-007-9206-9.
- Bonants, P., Edema, M. y Robert, V.** (2013) «Q-bank, a database with information for identification of plant quarantine plant pest and diseases», *EPPO Bulletin*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 43(2), pp. 211-215. doi: 10.1111/epp.12030.
- Crespo, O., Janssen, D., Robles, C. y Ruiz, L.** (2018) «Resistance to Cucumber green mottle mosaic virus in *Cucumis sativus*», *Euphytica*, 214(11), p. 201. doi: 10.1007/s10681-018-2286-0.
- Díaz, J. A., Bernal, J. J., Moriones, E. y Aranda, M. A.** (2003) «Nucleotide sequence and infectious transcripts from a full-length cDNA clone of the carmovirus Melon necrotic spot virus», *Archives of Virology*, 148(3), pp. 599-607. doi: 10.1007/s00705-002-0927-y.
- EPPO** (2013) «PM 7/113 (1) Pepino mosaic virus», *EPPO Bulletin*, 43(1), pp. 94-104. doi: 10.1111/epp.12023.
- EPPO** (2015) «PM 7/125 (1) ELISA tests for viruses», *EPPO Bulletin*. John Wiley & Sons,

- Ltd (10.1111), 45(3), pp. 445-449. doi: 10.1111/epp.12259.
- Fabre, F., Kervarrec, C., Mieuzet, L., Riault, G., Vialatte, A. y Jacquot, E.** (2003) «Improvement of Barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR», *Journal of Virological Methods*, 110(1), pp. 51-60. doi: 10.1016/S0166-0934(03)00097-1.
- Franken, A. A. J. M., Maat, D. Z. y Kamminga, G. C.** (1990) «Detection of squash mosaic virus in seeds of melon (*Cucumis melo*) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)», *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 96(2), pp. 91-102. doi: 10.1007/BF02005133.
- Gutiérrez-Aguirre, I., Mehle, N., Delić, D., Gruden, K., Mumford, R. y Ravnkar, M.** (2009) «Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of Pepino mosaic virus», *Journal of Virological Methods*, 162(1-2), pp. 46-55. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.07.008.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. y Gelfand, D. H.** (1991) «Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), pp. 7276-7280. doi: 10.1073/pnas.88.16.7276.
- Hollings, M., Komuro, Y. y Tochiara, H.** (1975) «Cucumber green mottle mosaic virus», *CMI/AAB Descriptions of plant viruses*. Association of Applied Biologists, 154, pp. 1-4.
- Hongyun, C., Wenjun, Z., Qinsheng, G., Qing, C., Shiming, L. y Shuifang, Z.** (2008) «Real time TaqMan RT-PCR assay for the detection of Cucumber green mottle mosaic virus», *Journal of Virological Methods*, 149(2), pp. 326-329. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.02.006.
- ISTA** (2014) «Anexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods. 7-026: Detection of Squash Mosaic Virus, Cucumber Green Mottle Mosaic Virus and Melon Necrotic Spot Virus in cucurbits», en *International Rules for Seed Testing*. Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA), pp. 7-026-2 to 7-026-8.
- ISTA** (2017) «Chapter 7: Validated Seed Health Testing Methods. 7-026: Detection of Squash mosaic virus, Cucumber green mottle mosaic virus and Melon necrotic spot virus in cucurbit seed», en *International Rules for Seed Testing*. Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA), pp. 7-026-1 to 7-026-11.
- ISTA** (2019) «Chapter 7: Validated Seed Health Testing Methods. 7-028: Detection of infectious tobacco mosaic virus and tomato mosaic virus in *Solanum lycopersicum* (tomato) seed by the local lesion assay (indexing) on *Nicotiana tabacum* plants», en *International Rules for Seed Testing*, pp. 7-028-1 to 7-028-9.
- Kawai, A., Kimura, S., Nishio, T. y Nagao, N.** (1985) «Detection for cucumber green mottle mosaic virus in cucumber seeds using enzyme-linked immunosorbent

- assay», *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan.*, 21, pp. 47-53.
- Kido, K., Tanaka, C., Mochizuki, T., Kubota, K., Ohki, T., Ohnishi, J., Knight, L. M. y Tsuda, S.** (2008) «High Temperatures Activate Local Viral Multiplication and Cell-to-Cell Movement of Melon necrotic spot virus but Restrict Expression of Systemic Symptoms», *Phytopathology*, 98(2), pp. 181-186. doi: 10.1094/phyto-98-2-0181.
- Kokkinos, C. D. y Clark, C. A.** (2006) «Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of Sweetpotato Viruses», *Plant Disease*, 90(6), pp. 783-788. doi: 10.1094/PD-90-0783.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K.** (2016) «MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets», *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp. 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Lecoq, H. y Desbiez, C.** (2012) «Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region», en *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 67-126. doi: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00003-8.
- Li, R., Berendsen, S. y Ling, K.-S.** (2016) «A Duplex Real-Time RT-PCR System with an Internal Control Offers Sensitive and Reliable Broad-Spectrum Detection of Squash mosaic virus Variants», *Plant Disease*, 100(3), pp. 625-629. doi: 10.1094/PDIS-08-15-0944-RE.
- Li, R., Gao, S., Berendsen, S., Fei, Z. y Ling, K.-S.** (2015) «Complete Genome Sequence of a Novel Genotype of Squash Mosaic Virus Infecting Squash in Spain», *Genome Announcements*, 3(1), pp. e01583-14. doi: 10.1128/genomeA.01583-14.
- Ling, K.-S., Wechter, W. P. y Jordan, R.** (2007) «Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of Pepino mosaic virus», *Journal of Virological Methods*, 144(1-2), pp. 65-72. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.03.022.
- Ling, K.-S., Wechter, W. P., Walcott, R. R. y Keinath, A. P.** (2011) «Development of a Real-time RT-PCR Assay for Squash Mosaic Virus Useful for Broad Spectrum Detection of Various Serotypes and its Incorporation into a Multiplex Seed Health Assay», *Journal of Phytopathology*, 159(10), pp. 649-656. doi: 10.1111/j.1439-0434.2011.01814.x.
- Liu, W., Zhao, X., Zhang, P., Mar, T., Liu, Y., Zhang, Z., Han, C. y Wang, X.** (2013) «A one step real-time RT-PCR assay for the quantitation of Wheat yellow mosaic virus (WYMV)», *Virology Journal*, 10(1), p. 173. doi: 10.1186/1743-422X-10-173.
- López-Fabuel, I., Wetzels, T., Bertolini, E., Bassler, A., Vidal, E., Torres, L. B., Yuste, A. y Olmos, A.** (2013) «Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses», *Journal of Virological Methods*, 188(1-2), pp. 21-24. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.11.034.
- Lovisolo, O.** (1981) «Virus and Viroids Diseases of Cucurbits», *Acta Horticulturae*, 88, pp. 33-82. doi: 10.17660/ActaHortic.1981.88.3.
- Mallor Giménez, C., Álvarez Álvarez, J. M. y Arteaga, M. L.** (2003) «Inheritance of

- resistance to systemic symptom expression of Melon necrotic spot virus (MNSV) in *Cucumis melo* L. 'Doublon', *Euphytica*, 134(3), pp. 319-324. doi: 10.1023/B:EUPH.0000004969.95036.1d.
- Mumford, R. A., Walsh, K., Barker, I. y Boonham, N.** (2000) «Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus Using a Multiplex Real-Time Fluorescent Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay», *Phytopathology*, 90(5), pp. 448-453. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.5.448.
- Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J. y Barker, I.** (2006) «Advances in molecular phytodiagnosics – new solutions for old problems», *European Journal of Plant Pathology*, 116(1), pp. 1-19. doi: 10.1007/s10658-006-9037-0.
- Nolan, P. A.** (1984) «Squash Mosaic Virus Detection in Individual Seeds and Seed Lots of Cucurbits by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay», *Plant Disease*, 68(1), p. 971. doi: 10.1094/PD-68-971.
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M. y Cambra, M.** (2005) «Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids», *Journal of Virological Methods*, 128(1-2), pp. 151-155. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.05.011.
- Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D. y Rowhani, A.** (2007) «Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1-5 and 9», *Journal of Virological Methods*, 141(1), pp. 22-29. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.11.035.
- Pallas, V., Sanchez-Navarro, J., Varga, A., Aparicio, F. y James, D.** (2009) «Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-time Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of Plant Viruses», en *Article in Methods in Molecular Biology*, pp. 193-208. doi: 10.1007/978-1-59745-062-1_16.
- Parker, S. y Sanjeev, G.** (2017) «Seed Health Testing», en Keinath, A., Wintermantel, W., y Zitter, T. (eds.) *Compendium of cucurbit diseases and pests*. Second. St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press), pp. 10-11.
- Pfaffl, M. W.** (2001) «A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR», *Nucleic Acids Research*. Narnia, 29(9), pp. 45e - 45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Powell Jr., C. C. y Schlegel, D. E.** (1970) «Factors Influencing Seed Transmission of Squash Mosaic Virus in Cantaloupe», *Phytopathology*, 60(10), pp. 1466-1469.
- Ratti, C., Budge, G., Ward, L., Clover, G., Rubies-Autonell, C. y Henry, C.** (2004) «Detection and relative quantitation of Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and Polymyxa graminis in winter wheat using real-time PCR (TaqMan®)», *Journal of Virological Methods*, 122(1), pp. 95-103. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.08.013.
- Ruiz-Ruiz, S., Ambrós, S., Vives, M. del C., Navarro, L., Moreno, P. y Guerri, J.** (2009) «Detection and quantitation of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR», *Journal of Virological Methods*, 160(1-2), pp. 57-62. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.04.012.

- Scott Adams, P.** (2006) «Data analysis and reporting», en Tevfik Dorak, M. (ed.) *Real-Time PCR*. New York: Taylor & Francis, pp. 39-62.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J.** (1994) «CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice», *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 22(22), pp. 4673-4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
- Wintermantel, W. M.** (2017) «Diseases Caused by Viruses», en Keinath, A. P., Wintermantel, W. M., y Zitter, T. A. (eds.) *Compendium of cucurbit diseases and pests*. Second. St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press), pp. 108-155.
- Zhang, Y., Zhao, W., Li, M., Chen, H., Zhu, S. y Fan, Z.** (2011) «Real-time TaqMan RT-PCR for detection of maize chlorotic mottle virus in maize seeds», *Journal of Virological Methods*, 171(1), pp. 292-294. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.11.002.

Conclusiones generales

1. Tanto la técnica de HTS a partir de muestras enriquecidas en ADN circular como la técnica del clonaje y secuenciación tipo Sanger resultaron ser idóneas para la caracterización de TYLCV. Con la secuenciación masiva, además, se permitió descartar la presencia de otros geminivirus, así como de otros agentes subvirales de genoma de ADN circular que pudieran haber estado implicados en las epidemias observadas y que, de alguna manera, pudieran haber pasado desapercibidos a la técnica del clonaje. Por tanto, el empleo de ambas técnicas de manera complementaria parece ser el mejor procedimiento a seguir en una situación similar a la estudiada.

2. Las prospecciones realizadas en Murcia durante los años 2015 y 2016 mostraron la coexistencia de dos grupos de aislados de TYLCV-IL, uno emparentado filogenéticamente con aislados españoles antiguos (Grupo 1) y otro emparentado con aislados marroquíes recombinantes que parece haber emergido por un fenómeno de recombinación inversa (Grupo 2).

3. El clon pTYLCV-Mu15 sintetizado a partir de un aislado del Grupo 2 mostró ser infectivo. Aunque no fue capaz de reproducir la sintomatología agresiva observada en campo en plantas resistentes, en un ensayo de acumulación, en infección simple, se acumuló a niveles significativamente superiores que los otros dos clones utilizados, TYLCV-IL y TYLCV-IS76.

4. En los muestreos realizados en Almería en 2017 se identificaron dos tipos de aislados: unos emparentados con el Grupo 2 identificado en Murcia en los años 2015 y 2016 y otro grupo de aislados de tipo recombinante similares a TYLCV-IS76. En esta tesis se ha descrito su aparición por primera vez, tanto en España como fuera de Marruecos.

5. Con la aparición en España de aislados de TYLCV-IS76 cabe esperar, en el futuro, un eventual desplazamiento de los aislados TYLCV-IL residentes. Sin embargo, la situación podría ser más compleja, dada la presencia de los aislados del Grupo 2 y podría depender de la frecuencia en que ocurrieran infecciones mixtas (*i.e.* oportunidades de transmisión). La realización de muestreos en los próximos años será crucial para monitorizar esta posible nueva situación.

6. En esta tesis se describe por primera vez el diseño y la utilización de la tecnología RT-qPCR/ sonda TaqMan para la detección de MNSV en material vegetal infectado. Así mismo se diseñó un set de iniciadores y sonda para la detección de CGMMV. Ambos, junto con el set de iniciadores y sonda utilizado para la detección de SqMV, mostraron una gran sensibilidad analítica, tanto con RNA viral transcrito *in vitro*, como con extractos de hoja (para los tres virus) y de semilla (para CGMMV y SqMV) infectados.

7. Los análisis de RT-qPCR/ sonda TaqMan realizados para los tres virus mostraron una gran especificidad, no observándose reacción cruzada entre ellos, por lo que podrían utilizarse en análisis multiplex.

8. El análisis de sensibilidad comparada entre las técnicas de ELISA y RT-qPCR/ sonda para detectar SqMV y CGMMV en semillas, mostró que la RT-qPCR/ sonda fue unas 1.000 veces más sensible para SqMV y hasta 10.000 más sensible para CGMMV que la técnica de ELISA. Con respecto al análisis de lotes de semillas, la mayor sensibilidad mostrada por la tecnología RT-qPCR/ sonda TaqMan permitiría, además de la reducción del número de submuestras, el incremento del tamaño de los lotes a analizar, por lo que sería una buena opción para incorporar en programas oficiales de certificación.

9. Los análisis de los bioensayos mostraron que, pese a que se partía de lotes de semilla infectados, la viabilidad de los virus analizados resultó ser muy baja en el caso de CGMMV, y aparentemente nula en caso de SqMV.

Bibliografía

- Accotto, G. P., Bragaloni, M., Luison, D., Davino, S. y Davino, M.** (2003) «First report of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Italy», *Plant Pathology*, 52(6), pp. 799-799. doi: 10.1111/j.1365-3059.2003.00908.x.
- Acosta-Leal, R., Duffy, S., Xiong, Z., Hammond, R. W. y Elena, S. F.** (2011) «Advances in Plant Virus Evolution: Translating Evolutionary Insights into Better Disease Management», *Phytopathology*, 101(10), pp. 1136-1148. doi: 10.1094/PHYTO-01-11-0017.
- Adams, I. y Fox, A.** (2016) «Diagnosis of plant viruses using next-generation sequencing and metagenomic analysis», en *Current Research Topics in Plant Virology*. doi: 10.1007/978-3-319-32919-2_14.
- Adams, I. P., Fox, A., Boonham, N., Massart, S. y De Jonghe, K.** (2018) «The impact of high throughput sequencing on plant health diagnostics», *European Journal of Plant Pathology*, 152(4), pp. 909-919. doi: 10.1007/s10658-018-1570-0.
- Adams, M. J., Heinze, C., Jackson, A. O., Kreuze, J. F., MacFarlane, S. A. y Torrance, L.** (2012) «Family Virgaviridae», en King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., y Lefkowitz, E. J. (eds.) *Virus Taxonomy 9th Report, Proceedings of the International Comitee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press, pp. 1139-1162.
- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., et al.** (2016) «Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016)», *Archives of Virology*. Springer Vienna, 161(10), pp. 2921-2949. doi: 10.1007/s00705-016-2977-6.
- Agindotan, B. y Perry, K. L.** (2008) «Macroarray Detection of Eleven Potato-Infecting Viruses and Potato spindle tuber viroid», *Plant Disease*, 92(5), pp. 730-740. doi: 10.1094/PDIS-92-5-0730.
- Ainsworth, G. C.** (1935) «Mosaic Diseases of the Cucumber», *Annals of Applied Biology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 22(1), pp. 55-67. doi: 10.1111/j.1744-7348.1935.tb07708.x.
- Albrechtsen, S. E.** (2006) *Testing Methods for Seed-transmitted Viruses: Principles and protocols*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Alfaro-Fernández, A., Córdoba-Sellés, M. del C., Font, I. y Jordá-Gutiérrez, C.** (2013) *Virosis relevantes en el cultivo del tomate. Detección, diagnóstico y control*. 1.^a ed. Editado por C. Jordá-Gutiérrez. Valencia, España: Phytoma-España.
- Allarangay, M. D., Traoré, O., Traoré, E. V. S., Millogo, R. J. y Konaté, G.** (2006) «Evidence of non-transmission of Rice yellow mottle virus through seeds of wild host species», *Journal of Plant Pathology*, 88(3), pp. 309-315. doi: 10.4454/jpp.v88i3.877.
- Alonso-Prados, J. L., Fraile, A. y Garcia-Arenal, F.** (1997) «Impact of cucumber mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 infection on melon production in Central

- Spain», *Journal of Plant Pathology*. JSTOR, pp. 131-134.
- Alvarez, M.** (1978) «Transmission and Distribution of Squash Mosaic Virus in Seeds of Cantaloupe», *Phytopathology*, 68(3), p. 257. doi: 10.1094/Phyto-68-257.
- Amari, K., Gonzalez-Ibeas, D., Gómez, P., Sempere, R. N., Sanchez-Pina, M. A., Aranda, M. A., Diaz-Pendon, J. A., Navas-Castillo, J., et al.** (2008) «Tomato torrado virus is Transmitted by Bemisia tabaci and Infects Pepper and Eggplant in Addition to Tomato», *Plant Disease*. The American Phytopathological Society, 92(7), pp. 1139-1139. doi: 10.1094/PDIS-92-7-1139A.
- Antignus, Y. y Cohen, S.** (1994) «Complete nucleotide sequence of an infectious clone of a mild isolate of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)», *Phytopathology*, 84(7), pp. 707-712.
- Antignus, Y., Pearlsman, M., Ben-Yoseph, R. y Cohen, S.** (1990) «Occurrence of a variant of cucumber green mottle mosaic virus in ISRAEL», *Phytoparasitica*, 18(1), pp. 50-56. doi: 10.1007/BF02980826.
- Arguello-Astorga, G., Ascencio-Ibanez, J. T., Dallas, M. B., Orozco, B. M. y Hanley-Bowdoin, L.** (2007) «High-Frequency Reversion of Geminivirus Replication Protein Mutants during Infection», *Journal of Virology*, 81(20), pp. 11005-11015. doi: 10.1128/JVI.00925-07.
- Avgelis, A.** (1985) «Occurrence of Melon Necrotic Spot Virus in Crete (Greece)», *Journal of Phytopathology*, 114(4), pp. 365-372. doi: 10.1111/j.1439-0434.1985.tb00631.x.
- Avgelis, A. D. y Katis, N.** (1989) «Occurrence of squash mosaic virus in melons in Greece», *Plant Pathology*, 38, pp. 111-113. doi: 10.1111/j.1365-3059.1989.tb01436.x.
- Baizan-Edge, A., Cock, P., MacFarlane, S., McGavin, W., Torrance, L. y Jones, S.** (2019) «Kodoja: A workflow for virus detection in plants using k-mer analysis of RNA-sequencing data», *Journal of General Virology*, 100(3), pp. 533-542. doi: 10.1099/jgv.0.001210.
- Bang, B., Lee, J., Kim, S., Park, J., Nguyen, T. T. y Seo, Y.-S.** (2014) «A Rapid and Efficient Method for Construction of an Infectious Clone of Tomato yellow leaf curl virus», *The Plant Pathology Journal*, 30(3), pp. 310-315. doi: 10.5423/PPJ.NT.03.2014.0025.
- Barba, M., Czosnek, H. y Hadidi, A.** (2014) «Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology», *Viruses*, 6(1), pp. 106-136. doi: 10.3390/v6010106.
- Barbarossa, L., Loconsole, G. y Vovlas, C.** (2007) «Virus and virus-like diseases of citrus in Epirus», *Journal of Plant Pathology*. JSTOR, 89(2), pp. 273-276. doi: 10.4454/jpp.v89i2.754.
- Barboza, N., Blanco-Meneses, M., Hallwass, M., Moriones, E. y Inoue-Nagata, A. K.** (2014) «First Report of Tomato yellow leaf curl virus in Tomato in Costa Rica», *Plant Disease*. The American Phytopathological Society, 98(5), pp. 699-699. doi:

- 10.1094/PDIS-08-13-0881-PDN.
- Berdiales, B., Bernal, J. J., Sâez, E., Woudt, B., Beitia, F. y Rodríguez-Cerezo, E.** (1999) «Occurrence of cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) and beet pseudo-yellows virus in cucurbit crops in Spain and transmission of CYSDV by two biotypes of *Bemisia tabaci*», *European Journal of Plant Pathology*, 105(2), pp. 211-215. doi: 10.1023/A:1008713629768.
- Bernal-Vicente, A., Donaire, L., Torre, C., Gómez-Aix, C., Sánchez-Pina, M. A., Juárez, M., Hernando, Y. y Aranda, M. A.** (2018) «Small RNA-Seq to Characterize Viruses Responsible of Lettuce Big Vein Disease in Spain», *Frontiers in Microbiology*, 9(December), pp. 1-16. doi: 10.3389/fmicb.2018.03188.
- Blancard, D., Lecoq, H. y Pitrat, M.** (2000) *Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar, luchar*. Madrid, ES: Mundi-Prensa.
- Blua, M. J. y Perring, T. M.** (1989) «Effect of Zucchini Yellow Mosaic Virus on Development and Yield of Cantaloupe (*Cucumis melo*)», *Plant Disease*, 73(4), pp. 317-320.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J. y Mumford, R.** (2014) «Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing», *Virus Research*, 186, pp. 20-31. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.007.
- Boonham, N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N., Bennison, J. y Barker, I.** (2002) «The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan)», *Journal of Virological Methods*, 101(1-2), pp. 37-48. doi: 10.1016/S0166-0934(01)00418-9.
- Boonham, N., Tomlinson, J. y Mumford, R.** (2007) «Microarrays for Rapid Identification of Plant Viruses», *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), pp. 307-328. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094349.
- Botermans, M., Verhoeven, J. T. J., Jansen, C. C. C., Roenhorst, J. W., Stijger, C. C. M. M. y Pham, K. T. K.** (2009) «First Report of Tomato yellow leaf curl virus in Tomato in the Netherlands», *Plant Disease*. The American Phytopathological Society, 93(10), pp. 1073-1073. doi: 10.1094/PDIS-93-10-1073C.
- Boubourakas, I. N., Hatziloukas, E., Antignus, Y. y Katis, N. I.** (2004) «Etiology of Leaf Chlorosis and Deterioration of the Fruit Interior of Watermelon Plants», *Journal of Phytopathology*, 152(10), pp. 580-588. doi: 10.1111/j.1439-0434.2004.00900.x.
- Briddon, R. W., Akbar, F., Iqbal, Z., Amrao, L., Amin, I., Saeed, M. y Mansoor, S.** (2014) «Effects of genetic changes to the begomovirus/betasatellite complex causing cotton leaf curl disease in South Asia post-resistance breaking», *Virus Research*. Elsevier, 186, pp. 114-119. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.008.
- Briddon, R. W., Patil, B. L., Bagewadi, B., Nawaz-Ul-Rehman, M. S. y Fauquet, C. M.** (2010) «Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses», *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), p. 97. doi:

- 10.1186/1471-2148-10-97.
- Briddon, R. W., Pinner, M. S., Stanley, J. y Markham, P. G.** (1990) «Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity», *Virology*. Academic Press, 177(1), pp. 85-94. doi: 10.1016/0042-6822(90)90462-Z.
- Brown, J. K., Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Zerbini, F. M., Moriones, E. y Navas-Castillo, J.** (2012) «Family Geminiviridae», en King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., y Lefkowitz, E. J. (eds.) *Virus Taxonomy 9th Report, Proceedings of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press, pp. 351-373.
- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C. F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., et al.** (2015) «Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons», *Archives of Virology*, 160(6), pp. 1593-1619. doi: 10.1007/s00705-015-2398-y.
- Browning, I. A.** (2009) «Bioassay for Diagnosis of Plant Viruses», en Burns, R. (ed.) *Plant Pathology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 1-13. doi: 10.1007/978-1-59745-062-1_1.
- Van Brunschot, S. L., Persley, D. M., Geering, A. D. W., Campbell, P. R. y Thomas, J. E.** (2010) «Tomato yellow leaf curl virus in Australia: Distribution, detection and discovery of naturally occurring defective DNA molecules», *Australasian Plant Pathology*. Springer Netherlands, 39(5), pp. 412-423. doi: 10.1071/AP10083.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, M. J., Waterworth, L. y Zurcher, E. J.** (1996) *Plant viruses online: descriptions and lists from the VIDE database. Version: 20th August 1996*. University of Idaho.
- Butterbach, P., Verlaan, M. G., Dullemans, A., Lohuis, D., Visser, R. G. F., Bai, Y. y Kormelink, R.** (2014) «Tomato yellow leaf curl virus resistance by Ty-1 involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), pp. 12942-12947. doi: 10.1073/pnas.1400894111.
- Cambra, M., Pallas, V. y Bertolini, E.** (2016) «Diagnóstico y detección», en Ayllón, M. A., Cambra, M., Llave, C., y Moriones, E. (eds.) *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides*. 1.^a ed. Bubok Publishing S. L., pp. 93-132.
- Campbell, R. N., Sim, S. T. y Lecoq, H.** (1995) «Virus transmission by host-specific strains of *Olpidium bornovanus* and *Olpidium brassicae*», *European Journal of Plant Pathology*, 101(3), pp. 273-282. doi: 10.1007/BF01874783.
- Campbell, R., Wipf-Scheibel, C. y Lecoq, H.** (1996) «Vector-Assisted Seed Transmission of Melon Necrotic Spot Virus in Melon», *Phytopathology*, 86(12), pp. 1294-1298. doi: 10.1094/Phyto-86-1294.
- Celix, A.** (1996) «First Report of Cucumber Green Mottle Mosaic Tobamovirus Infecting Greenhouse-Grown Cucumber in Spain», *Plant Disease*, 80(11), p. 1303. doi: 10.1094/PD-80-1303C.
- Chakraborty, S., Vanitharani, R., Chattopadhyay, B. y Fauquet, C. M.** (2008)

- «Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India», *Journal of General Virology*, 89(3), pp. 818-828. doi: 10.1099/vir.0.82873-0.
- Chalupowicz, L., Dombrovsky, A., Gaba, V., Luria, N., Reuven, M., Beerman, A., Lachman, O., Dror, O., et al.** (2019) «Diagnosis of plant diseases using the Nanopore sequencing platform», *Plant Pathology*, 68(2), pp. 229-238. doi: 10.1111/ppa.12957.
- Chare, E. R. y Holmes, E. C.** (2004) «Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission», *Journal of General Virology*, 85(10), pp. 3149-3157. doi: 10.1099/vir.0.80134-0.
- Chinnaraja, C., Ramkisson, A., Rajendran, R., Tony, S. T., Ramsubhag, A. y Jayaraj, J.** (2016) «First Report of Zucchini yellow mosaic virus and Squash mosaic virus Infecting Cucurbits in Trinidad», *Plant Disease*, 100(4), p. 866. doi: 10.1094/PDIS-09-15-0988-PDN.
- Clark, M. F. y Adams, A. N.** (1977) «Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses», *Journal of general virology*. Microbiology Society, 34(3), pp. 475-483.
- Codoñer, F. M., Cuevas, J. M., Sánchez-Navarro, J. A., Pallás, V. y Elena, S. F.** (2005) «Molecular evolution of the plant virus family bromoviridae based on RNA3-encoded proteins», *Journal of Molecular Evolution*, 61(5), pp. 697-705. doi: 10.1007/s00239-005-0021-7.
- Cohen, S. y Antignus, Y.** (1994) «Tomato Yellow Leaf Curl Virus, a Whitefly-Borne Geminivirus of Tomatoes», en Springer, New York, NY, pp. 259-288. doi: 10.1007/978-1-4612-2590-4_10.
- Compton, J.** (1991) «Nucleic acid sequence-based amplification», *Nature*, pp. 91-92. doi: 10.1038/350091a0.
- Córdoba-Sellés, M. del C., García-Rández, A., Alfaro-Fernández, A. y Jordá-Gutiérrez, C.** (2007) «Seed Transmission of Pepino mosaic virus and Efficacy of Tomato Seed Disinfection Treatments», *Plant Disease*, 91(10), pp. 1250-1254. doi: 10.1094/PDIS-91-10-1250.
- Crespo, O., Janssen, D., García, C. y Ruiz, L.** (2017) «Biological and Molecular Diversity of Cucumber green mottle mosaic virus in Spain», *Plant Disease*, 101(6), pp. 977-984. doi: 10.1094/pdis-09-16-1220-re.
- Crespo, O., Janssen, D., Robles, C. y Ruiz, L.** (2018) «Resistance to Cucumber green mottle mosaic virus in *Cucumis sativus*», *Euphytica*, 214(11), p. 201. doi: 10.1007/s10681-018-2286-0.
- Cuadrado, I. M., Gomez, J. y Moreno, P.** (1993) «El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería . I . Importancia del MNSV como causa de la muerte súbita del melón», *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 19, pp. 93-106.
- Cuadrado, I. M., Gómez, J. y Moreno, P.** (1993) «El virus de las manchas necróticas del

- melón (MNSV) en Almería», *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 19, pp. 93-106.
- Czosnek, H. y Laterrot, H.** (1997) «A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses», *Archives of Virology*, 142(7), pp. 1391-1406. doi: 10.1007/s007050050168.
- Darzi, E., Smith, E., Shargil, D., Lachman, O., Ganot, L. y Dombrovsky, A.** (2018) «The honeybee *Apis mellifera* contributes to Cucumber green mottle mosaic virus spread via pollination», *Plant Pathology*, 67(1), pp. 244-251. doi: 10.1111/ppa.12702.
- Díaz-Pendón, J. A., Cañizares, M. C., Moriones, E., Bejarano, E. R., Czosnek, H. y Navas-Castillo, J.** (2010) «Tomato yellow leaf curl viruses: Ménage à trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector», *Molecular Plant Pathology*, 11(4), pp. 441-450. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00618.x.
- Díaz, J. A., Nieto, C., Moriones, E., Truniger, V. y Aranda, M. A.** (2004) «Molecular Characterization of a Melon necrotic spot virus Strain That Overcomes the Resistance in Melon and Nonhost Plants», *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(6), pp. 668-675. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.6.668.
- Dietzgen, R. G., Zeyong, X. y Teycheney, P.-Y.** (1994) «Digoxigeninl-Labeled cRNA Probes for the Detection of Two Potyviruses Infecting Peanut (*Arachis hypogaea*)», *Plant Disease*, 78(7), pp. 708-711.
- Dombrovsky, A. y Smith, E.** (2017) «Seed Transmission of Tobamoviruses: Aspects of Global Disease Distribution», en *Advances in Seed Biology*. InTechOpen, pp. 233-260. doi: 10.5772/intechopen.70244.
- Dombrovsky, A., Tran-Nguyen, L. T. T. y Jones, R. A. C.** (2017) «Cucumber green mottle mosaic virus : Rapidly Increasing Global Distribution, Etiology, Epidemiology, and Management», *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), pp. 231-256. doi: 10.1146/annurev-phyto-080516-035349.
- Domingo, E. y Holland, J. J.** (1994) «Mutation rates and rapid evolution of rna viruses», en Morse, S. S. (ed.) *The evolutionary biology of viruses*. New York: Raven press, pp. 161-184.
- Domingo, E. y Holland, J. J.** (1997) «RNA Virus Mutations AND Fitness for Survival», *Annual Review of Microbiology*, 51(1), pp. 151-178. doi: 10.1146/annurev.micro.51.1.151.
- Drake, J. W. y Holland, J. J.** (1999) «Mutation rates among RNA viruses», *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 96(24), pp. 13910-13913. doi: 10.1073/pnas.96.24.13910.
- Duffus, J. E.** (1965) «Beet pseudo-yellows virus, transmitted by the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*).», *Phytopathology*, 55(4), pp. 450-453.
- Duffus, J. E., Liu, H.-Y. y Wisler, G. C.** (1996) «Tomato infectious chlorosis virus - A new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*», *European Journal of Plant Pathology*, 102(3), pp. 219-226. doi: 10.1007/BF01877960.
- Duffy, S. y Holmes, E. C.** (2008) «Phylogenetic Evidence for Rapid Rates of Molecular

- Evolution in the Single-Stranded DNA Begomovirus Tomato Yellow Leaf Curl Virus», *Journal of Virology*, 82(2), pp. 957-965. doi: 10.1128/JVI.01929-07.
- Duffy, S. y Holmes, E. C.** (2009) «Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses», *Journal of General Virology*. Microbiology Society, 90(6), pp. 1539-1547. doi: 10.1099/vir.0.009266-0.
- Duffy, S., Shackelton, L. A. y Holmes, E. C.** (2008) «Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants», *Nature Reviews Genetics*, 9(4), pp. 267-276. doi: 10.1038/nrg2323.
- Eun, A. J.-C. y Wong, S.-M.** (2000) «Molecular Beacons: A New Approach to Plant Virus Detection», *Phytopathology*, 90(3), pp. 269-275. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.3.269.
- FAOSTAT** (2017) *Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT DATABASE. Rome, Italy*. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/> (Accedido: 13 de marzo de 2019).
- Faris-Mukhayyish, S. y Makkouk, K. M.** (1983) «Detection of Four Seed-borne Plant Viruses by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)», *Journal of Phytopathology*, 106(2), pp. 108-114. doi: 10.1111/j.1439-0434.1983.tb00033.x.
- Fernández-Cuartero, B., Burgyán, J., Aranda, M. A., Salánki, K., Moriones, E. y García-Arenal, F.** (1994) «Increase in the Relative Fitness of a Plant Virus RNA Associated with Its Recombinant Nature», *Virology*, 203(2), pp. 373-377. doi: 10.1006/viro.1994.1496.
- Flygare, S., Simmon, K., Miller, C., Qiao, Y., Kennedy, B., Di Sera, T., Graf, E. H., Tardif, K. D., et al.** (2016) «Taxonomer: an interactive metagenomics analysis portal for universal pathogen detection and host mRNA expression profiling», *Genome Biology*, 17(1), p. 111. doi: 10.1186/s13059-016-0969-1.
- Fontenele, R. S., Lamas, N. S., Lacorte, C., Lacerda, A. L. M., Varsani, A. y Ribeiro, S. G.** (2017) «A novel geminivirus identified in tomato and cleome plants sampled in Brazil», *Virus Research*, 240, pp. 175-179. doi: 10.1016/j.virusres.2017.08.007.
- Fortes, I., Sánchez-Campos, S., Fiallo-Olivé, E., Díaz-Pendón, J., Navas-Castillo, J. y Moriones, E.** (2016) «A Novel Strain of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus Has Spread to the Mediterranean Basin», *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 8(11), p. 307. doi: 10.3390/v8110307.
- Fox, A., Adams, I. A., Hany, U., Hodges, T., Forde, S. M. D., Jackson, L. E., Skelton, A. y Barton, V.** (2015) «The application of Next-Generation Sequencing for screening seeds for viruses and viroids», *Seed Science and Technology*, 43(3), pp. 531-535. doi: 10.15258/sst.2015.43.3.06.
- Fraile, A., Pagán, I., Anastasio, G., Sáez, E. y García-Arenal, F.** (2011) «Rapid genetic diversification and high fitness penalties associated with pathogenicity evolution in a plant virus», *Molecular Biology and Evolution*, 28(4), pp. 1425-1437. doi: 10.1093/molbev/msq327.

- Freitag, J. H.** (1941) «Insect transmission, host range and properties of squash-mosaic virus.», *Phytopathology*, 31, p. 8.
- Freitag, J. H.** (1956) «Beetle Transmission, Host Range, and Properties of Squash Mosaic Virus.», *Phytopathology*. Baltimore, Md., 46(2).
- Fukuta, S., Iida, T., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J., Kanbe, M. y Ishimoto, Y.** (2003) «Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP», *Archives of Virology*, 148(9), pp. 1713-1720. doi: 10.1007/s00705-003-0134-5.
- Galipienso, L., Carmen Vives, M., Navarro, L., Moreno, P. y Guerri, J.** (2004) «Detection of Citrus Leaf Blotch Virus Using Digoxigenin-Labeled cDNA Probes and RT-PCR», *European Journal of Plant Pathology*, 110(2), pp. 175-181. doi: 10.1023/B:EJPP.0000015354.91717.b8.
- Gallitelli, D.** (2000) «The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture», *Virus Research*, 71(1-2), pp. 9-21. doi: 10.1016/S0168-1702(00)00184-2.
- Gambino, G. y Gribaudo, I.** (2006) «Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control», *Phytopathology*, 96(11), pp. 1223-1229. doi: 10.1094/PHYTO-96-1223.
- García-Arenal, F. y Fraile, A.** (2008) «Questions and Concepts in Plant Virus Evolution: a Historical Perspective», en Roossinck, M. J. (ed.) *Plant Virus Evolution*. 1.^a ed. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, pp. 1-14.
- García-Arenal, F., Fraile, A. y Malpica, J. M.** (2002) «Variability and genetic structure of plant virus populations.», *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), pp. 157-186. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.157.
- García-Arenal, F., Fraile, A. y Malpica, J. M.** (2003) «Variation and evolution of plant virus populations», *International Microbiology*, 6(4), pp. 225-232. doi: 10.1007/s10123-003-0142-z.
- García-Arenal, F., Butt, T., Sanz, A. I., Harrison, B. D., Khalid, S., Zhou, X., Fraile, A. y Robinson, D. J.** (2015) «Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan», *Journal of General Virology*, 81(7), pp. 1839-1849. doi: 10.1099/0022-1317-81-7-1839.
- Genovés, A., Navarro, J. A. y Pallás, V.** (2006) «Functional analysis of the five melon necrotic spot virus genome-encoded proteins», *Journal of General Virology*, 87(8), pp. 2371-2380. doi: 10.1099/vir.0.81793-0.
- Gergerich, R. C. y Dolja, V. V.** (2006) «Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe.», *The Plant Health Instructor*, p. 24. doi: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01.
- Gergerich, R. C. y Scott, H. A.** (1996) «Comoviruses: Transmission, Epidemiology, and Control», en Harrison, B. D. y Murrant, A. F. (eds.) *The Plant Viruses*. TH. Boston, MA: Springer US, pp. 77-98. doi: 10.1007/978-1-4899-1772-0_4.
- Gil-Salas, F. M., Peters, J., Boonham, N., Cuadrado, I. M. y Janssen, D.** (2012) «Co-infection with Cucumber vein yellowing virus and Cucurbit yellow stunting

- disorder virus leading to synergism in cucumber», *Plant Pathology*, 61(3), pp. 468-478. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02545.x.
- Glick, E., Levy, Y. y Gafni, Y.** (2009) «The viral etiology of tomato leaf curl disease.», *Plant Protect. Sci.*, 45(3), p. 81–97. doi: 10.17221/26/2009-PPS.
- Goldbach, R. W. y Wellink, J.** (1996) «Comoviruses: Molecular Biology and Replication», en Harrison, B. D. y Murrant, A. F. (eds.) *The Plant Viruses*. Boston, MA: Springer US, pp. 35-76. doi: 10.1007/978-1-4899-1772-0_3.
- Gomez, P., Sempere, R. N., Elena, S. F. y Aranda, M. A.** (2009) «Mixed Infections of Pepino Mosaic Virus Strains Modulate the Evolutionary Dynamics of this Emergent Virus», *Journal of Virology*. American Society for Microbiology (ASM), 83(23), pp. 12378-12387. doi: 10.1128/JVI.01486-09.
- Gonzalez-Garza, R., Gumpf, D. J., Kishaba, A. N. y Bohn, G. W.** (1979) «Identification, Seed Transmission, and Host Range Pathogenicity of a California Isolate of Melon Necrotic Spot Virus», *Phytopathology*, 69(4), pp. 340-345.
- Gronenborn, B.** (2007) «The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Genome and Function of its Proteins», en Czosner, H. (ed.) *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for resistance*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 67-84. doi: 10.1007/978-1-4020-4769-5_5.
- Gu, Q.-S., Bao, W.-H., Tian, Y.-P., Prins, M., Yang, H.-X., Lu, J., Liu, L.-F. y Peng, B.** (2008) «Melon necrotic spot virus newly reported in China», *Plant Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 57(4), pp. 765-765. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01847.x.
- Gutiérrez-Aguirre, I., Rački, N., Dreo, T. y Ravnikar, M.** (2015) «Droplet Digital PCR for Absolute Quantification of Pathogens», en Lacomme, C. (ed.) *Plant Pathology: Techniques and protocols, Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press Inc., pp. 331-347. doi: 10.1007/978-1-4939-2620-6_24.
- Gutierrez, C.** (1999) «Geminivirus DNA replication», *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 56(3-4), pp. 313-329. doi: 10.1007/s000180050433.
- Hagen, C., Frizzi, A., Gabriels, S., Huang, M., Salati, R., Gabor, B. y Huang, S.** (2012) «Accurate and sensitive diagnosis of geminiviruses through enrichment, high-throughput sequencing and automated sequence identification», *Archives of Virology*, 157(5), pp. 907-915. doi: 10.1007/s00705-012-1253-7.
- Haible, D., Kober, S. y Jeske, H.** (2006) «Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses», *Journal of Virological Methods*, 135(1), pp. 9-16. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.01.017.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S. y Robertson, D.** (1999) «Geminiviruses: Models for Plant DNA Replication, Transcription, and Cell Cycle Regulation», *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(1), pp. 71-106. doi: 10.1080/07352689991309162.
- Hanssen, I. M. y Lapidot, M.** (2012) «Major Tomato Viruses in the Mediterranean Basin», en Loebenstein, G. y Nikolaos, K. (eds.) *Advances in Virus Research*.

- Elsevier, pp. 31-66. doi: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00002-6.
- Harrison, B. D.** (2002) «Virus variation in relation to resistance-breaking in plants», en *Euphytica*. doi: 10.1023/A:1015630516425.
- Hasiów-Jaroszewska, B., Fares, M. A. y Elena, S. F.** (2014) «Molecular evolution of viral multifunctional proteins: The case of potyvirus HC-Pro», *Journal of Molecular Evolution*, 78(1), pp. 75-86. doi: 10.1007/s00239-013-9601-0.
- Haudenschild, J. S. y Palukaitis, P.** (1998) «Diversity among isolates of squash mosaic virus.», *Journal of General Virology*, 79(10), pp. 2331-2341. doi: 10.1099/0022-1317-79-10-2331.
- Herranz, M. C., Sanchez-Navarro, J. A., Aparicio, F. y Pallás, V.** (2005) «Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'», *Journal of Virological Methods*. Elsevier, 124(1-2), pp. 49-55. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.11.003.
- Herrera-Vásquez, J. A.** (2009) *Tesis Doctoral. Epidemiología, caracterización molecular y desarrollo de métodos de diagnóstico del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) y de su hongo vector Olpidium bornovanus.*
- Herrera-Vásquez, J. A., Córdoba-Sellés, M. C., Cebrián, M. C., Alfaro-Fernández, A. y Jordá, C.** (2009) «Seed transmission of Melon necrotic spot virus and efficacy of seed-disinfection treatments», *Plant Pathology*, 58(3), pp. 436-442. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01985.x.
- Herrera-Vásquez, J. A., Córdoba-Sellés, M. C., Cebrián, M. C., Rosselló, J. A., Alfaro-Fernández, A. y Jordá, C.** (2010) «Genetic diversity of Melon necrotic spot virus and Olpidium isolates from different origins», *Plant Pathology*, 59(2), pp. 240-251. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02208.x.
- Hesketh, E. L., Saunders, K., Fisher, C., Potze, J., Stanley, J., Lomonossoff, G. P. y Ranson, N. A.** (2018) «The 3.3 Å structure of a plant geminivirus using cryo-EM», *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 9(1), p. 2369. doi: 10.1038/s41467-018-04793-6.
- Hillung, J., Cuevas, J. M. y Elena, S. F.** (2015) «Evaluating the within-host fitness effects of mutations fixed during virus adaptation to different ecotypes of a new host», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. The Royal Society, 370(1675), p. 20140292. doi: 10.1098/rstb.2014.0292.
- Ho, T. y Tzanetakis, I. E.** (2014) «Development of a virus detection and discovery pipeline using next generation sequencing», *Virology*. Academic Press, 471-473, pp. 54-60. doi: 10.1016/j.virol.2014.09.019.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. y Gelfand, D. H.** (1991) «Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), pp. 7276-7280. doi: 10.1073/pnas.88.16.7276.
- Hull, R.** (2014) *Plant Virology*. Fifth. Editado por C. Minihane y C. Mullane. ELSEVIER.
- Inoue-Nagata, A. K., Albuquerque, L. C., Rocha, W. B. y Nagata, T.** (2004) «A simple

- method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase», *Journal of Virological Methods*, 116(2), pp. 209-211. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.11.015.
- Ishibashi, K. y Ishikawa, M.** (2016) «Replication of Tobamovirus RNA», *Annual Review of Phytopathology*. Annual Reviews, 54(1), pp. 55-78. doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100217.
- Isogai, M., Yoshida, T., Shimura, T. y Yoshikawa, N.** (2015) «Pollen tubes introduce Raspberry bushy dwarf virus into embryo sacs during fertilization processes», *Virology*. Elsevier, 484, pp. 341-345. doi: 10.1016/j.virol.2015.06.028.
- ISTA** (2017) «Chapter 7: Validated Seed Health Testing Methods. 7-026: Detection of Squash mosaic virus, Cucumber green mottle mosaic virus and Melon necrotic spot virus in cucurbit seed», en *International Rules for Seed Testing*. Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA), pp. 7-026-1 to 7-026-11.
- ISTA** (2019) «Chapter 7: Validated Seed Health Testing Methods. 7-028: Detection of infectious tobacco mosaic virus and tomato mosaic virus in *Solanum lycopersicum* (tomato) seed by the local lesion assay (indexing) on *Nicotiana tabacum* plants», en *International Rules for Seed Testing*, pp. 7-028-1 to 7-028-9.
- Jacquemond, M.** (2012) «Cucumber Mosaic Virus», en *Advances in Virus Research*. 1.^a ed. Elsevier Inc., pp. 439-504. doi: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00013-0.
- James, D., Varga, A., Pallas, V. y Candresse, T.** (2006) «Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses», *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28(1), pp. 16-29. doi: 10.1080/07060660609507267.
- Jeske, H.** (2018) «Barcoding of Plant Viruses with Circular Single-Stranded DNA Based on Rolling Circle Amplification», *Viruses*, 10(9), p. 469. doi: 10.3390/v10090469.
- Jeske, H., Kober, S., Schäfer, B. y Strohmeier, S.** (2014) «Circomics of Cuban geminiviruses reveals the first alpha-satellite DNA in the Caribbean», *Virus Genes*. Springer US, 49(2), pp. 312-324. doi: 10.1007/s11262-014-1090-8.
- Ji, Y., Schuster, D. J. y Scott, J. W.** (2007) «Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato», *Molecular Breeding*, 20(3), pp. 271-284. doi: 10.1007/s11032-007-9089-7.
- Jin, J., Shen, J. G., Cai, W., Xie, G. H., Liao, F. R., Gao, F. L., Ma, J. F., Chen, X. H., et al.** (2017) «Narcissus yellow stripe virus and Narcissus mosaic virus detection in Narcissus via multiplex TaqMan-based reverse transcription-PCR assay», *Journal of Applied Microbiology*, 122(5), pp. 1299-1309. doi: 10.1111/jam.13422.
- Johansen, E., Edwards, M. C. y Hampton, R. O.** (1994) «Seed Transmission of Viruses: Current Perspectives», *Annual Review of Phytopathology*, 32(1), pp. 363-386. doi: 10.1146/annurev.py.32.090194.002051.
- Johne, R., Müller, H., Rector, A., van Ranst, M. y Stevens, H.** (2009) «Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase», *Trends in*

- Microbiology*, 17(5), pp. 205-211. doi: 10.1016/j.tim.2009.02.004.
- Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, T. M. y Miller, S. A.** (2014) *Compendium of tomato diseases and pests*. 2.^a ed. Editado por J. B. Jones, T. A. Zitter, T. M. Momol, y S. A. Miller. Minnessota, USA: The American Phytopathological Society.
- Jones, R. A. C.** (2001) «Developing integrated disease management strategies against non-persistently aphid-borne viruses: a model programme.», *Integrated Pest Management Reviews*, 6(1), pp. 15-46. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1020494604184>.
- Jordá, C., Alfaro, A., Aranda, A., Moriones, E. y Garcia-Arenal, F.** (1992) «Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes of eastern Spain», *Plant disease*, 76, pp. 363-366.
- Jordá, C., Font, I., Martínez, P., Juárez, M., Ortega, A. y Lacasa, A.** (2007) «Current Status and New Natural Hosts of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Spain», *Plant Disease*. The American Phytopathological Society, 85(4), pp. 445-445. doi: 10.1094/pdis.2001.85.4.445c.
- Juárez, M., Ortega, A. y Jorda-Gutierrez, C.** (1994) «Variabilidad del virus del cribado: un enemigo de las cucurbitáceas en expansión en España», *Horticultura*, 11, pp. 37-40.
- Juárez, M., Tovar, R., Fiallo-Olivé, E., Aranda, M. A., Gosálvez, B., Castillo, P., Moriones, E. y Navas-Castillo, J.** (2014) «First Detection of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Zucchini in Spain», *Plant Disease*, 98(6), pp. 857-857. doi: 10.1094/PDIS-10-13-1050-PDN.
- Kassem, M. A., Sempere, R. N., Juárez, M., Aranda, M. A. y Truniger, V.** (2007) «Cucurbit aphid-borne yellows virus Is Prevalent in Field-Grown Cucurbit Crops of Southeastern Spain», *Plant Disease*, 91(3), pp. 232-238. doi: 10.1094/PDIS-91-3-0232.
- Kendrick, J. B.** (1934) «Cucurbit mosaic transmitted by Muskmelon seed.», *Phytopathology*. [American Phytopathological Society], 24(7), pp. 820-823.
- Kil, E. J., Kim, S., Lee, Y. J., Byun, H. S., Park, J., Seo, H., Kim, C. S., Shim, J. K., et al.** (2016) «Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): A seed-transmissible geminivirus in tomatoes», *Scientific Reports*, 6(1), p. 19013. doi: 10.1038/srep19013.
- Kil, E. J., Park, J., Choi, E. Y., Byun, H. S., Lee, K. Y., An, C. G., Lee, J. H., Lee, G. S., et al.** (2018) «Seed transmission of Tomato yellow leaf curl virus in sweet pepper (*Capsicum annuum*)», *European Journal of Plant Pathology*, 150(3), pp. 759-764. doi: 10.1007/s10658-017-1304-8.
- Kil, E. J., Park, J., Choi, H. S., Kim, C. S. y Lee, S.** (2017) «Seed transmission of tomato yellow leaf curl virus in white soybean (*Glycine max*)», *Plant Pathology Journal*. The Korean Society of Plant Pathology, pp. 424-428. doi: 10.5423/PPJ.NT.02.2017.0043.
- Kim, S.-M., Lee, J.-M., Yim, K.-O., Oh, M.-H., Park, J.-W. y Kim, K.-H.** (2003) «Nucleotide

- sequences of two Korean isolates of Cucumber green mottle mosaic virus.», *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 16(3), pp. 407-412.
- Kim, S.-M., Nam, S.-H., Lee, J.-M., Yim, K.-O. y Kim, K.-H.** (2003) «Destruction of Cucumber green mottle mosaic virus by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR», *Molecules and Cells*, 16(3), pp. 338-342.
- Kishi, K.** (1966) «Necrotic spot of melon, a new virus disease», *Japanese Journal of Phytopathology*. The Phytopathological Society of Japan, 32(3), pp. 138-144.
- Knuhtsen, H. K. y Nelson, M. R.** (1968) «Identification of 2 serotypes in Squash mosaic virus strains», *Phytopathology*. AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121, 58(3), p. 345.
- de la Iglesia, F. y Elena, S. F.** (2007) «Fitness Declines in Tobacco Etch Virus upon Serial Bottleneck Transfers», *Journal of Virology*, 81(10), pp. 4941-4947. doi: 10.1128/JVI.02528-06.
- Lapidot, M., Friedmann, M., Pilowsky, M., Ben-Joseph, R. y Cohen, S.** (2001) «Effect of Host Plant Resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on Virus Acquisition and Transmission by Its Whitefly Vector», *Phytopathology*, 91(12), pp. 1209-1213. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.12.1209.
- Laver, T., Harrison, J., O'Neill, P. A., Moore, K., Farbos, A., Paszkiewicz, K. y Studholme, D. J.** (2015) «Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION», *Biomolecular Detection and Quantification*. Elsevier, 3, pp. 1-8. doi: 10.1016/j.bdq.2015.02.001.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O. y Herrbach, E.** (1992) «A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus», *Plant Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 41(6), pp. 749-761. doi: 10.1111/j.1365-3059.1992.tb02559.x.
- Lecoq, H. y Desbiez, C.** (2012) «Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region», en *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 67-126. doi: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00003-8.
- Lecoq, H. y Katis, N.** (2014) «Control of Cucurbit Viruses», en Loebenstein, G. y Nikolaos, K. (eds.) *Advances in Virus Research*. 1.^a ed. Oxford, UK: Elsevier Inc., pp. 255-296. doi: 10.1016/B978-0-12-801246-8.00005-6.
- Lecoq, H., Piquemal, J. P., Michel, M. J. y Blancard, D.** (1988) «Virus de la mosaïque de la courge: une nouvelle menace pour les cultures de melon en France», *PHM Revue Horticole*, 289, pp. 25-30.
- Lefevre, P., Martin, D. P., Harkins, G., Lemey, P., Gray, A. J. A., Meredith, S., Lakay, F., Monjane, A., et al.** (2010) «The Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from the Middle East to the World», *PLoS Pathogens*. Editado por C. Fauquet, 6(10), p. e1001164. doi: 10.1371/journal.ppat.1001164.
- Lefevre, P. y Moriones, E.** (2015) «Recombination as a motor of host switches and virus emergence: geminiviruses as case studies», *Current Opinion in Virology*, 10, pp. 14-19. doi: 10.1016/j.coviro.2014.12.005.

- Li, J.-X., Liu, S.-S. y Gu, Q.-S.** (2016) «Transmission Efficiency of Cucumber green mottle mosaic virus via Seeds, Soil, Pruning and Irrigation Water», *Journal of Phytopathology*, 164(5), pp. 300-309. doi: 10.1111/jph.12457.
- Li, R., Gao, S., Berendsen, S., Fei, Z. y Ling, K.-S.** (2015) «Complete Genome Sequence of a Novel Genotype of Squash Mosaic Virus Infecting Squash in Spain», *Genome Announcements*, 3(1), pp. e01583-14. doi: 10.1128/genomeA.01583-14.
- Ling, K.-S., Fei, Z., Kreuze, J., Gao, S., Li, R., Zheng, Y., Gutierrez, D., Fuentes, S., et al.** (2016) «VirusDetect: An automated pipeline for efficient virus discovery using deep sequencing of small RNAs», *Virology*. Elsevier, 500(October 2016), pp. 130-138. doi: 10.1016/j.virol.2016.10.017.
- Ling, K.-S., Li, R. y Zhang, W.** (2014) «First Report of Cucumber green mottle mosaic virus Infecting Greenhouse Cucumber in Canada», *Plant Disease*. The American Phytopathological Society, 98(5), pp. 701-701. doi: 10.1094/PDIS-09-13-0996-PDN.
- Ling, K.-S., Wechter, W. P. y Jordan, R.** (2007) «Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of Pepino mosaic virus», *Journal of Virological Methods*, 144(1-2), pp. 65-72. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.03.022.
- Liu, H. W., Luo, L. X., Li, J. Q., Liu, P. F., Chen, X. Y. y Hao, J. J.** (2014) «Pollen and seed transmission of Cucumber green mottle mosaic virus in cucumber», *Plant Pathology*, 63(1), pp. 72-77. doi: 10.1111/ppa.12065.
- Lockhart, B. E. L.** (1985) «Seed Transmission of Squash Mosaic Virus in *Chenopodium ssp.*», *Plant Disease*, 69(11), pp. 946-947.
- Loebenstein, G.** (2009) «Plant Virus Diseases: Economic Aspects», en Mahy, B. W. y Van Regenmortel, M. H. V. (eds.) *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. 1.^a ed. Oxford, UK: Elsevier, pp. 426-430.
- López-Fabuel, I., Wetzels, T., Bertolini, E., Bassler, A., Vidal, E., Torres, L. B., Yuste, A. y Olmos, A.** (2013) «Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses», *Journal of Virological Methods*, 188(1-2), pp. 21-24. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.11.034.
- López, M. M., Llop, P., Olmos, A., Marco-Noales, E., Cambra, M. y Bertolini, E.** (2009) «Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses?», *Current Issues in Molecular Biology*, 11, pp. 13-46.
- Lotos, L., Efthimiou, K., Maliogka, V. I. y Katis, N. I.** (2014) «Generic detection of polioviruses using an RT-PCR assay targeting the RdRp coding sequence», *Journal of Virological Methods*. Elsevier B.V., 198, pp. 1-11. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.12.007.
- Louro, D.** (1996) «First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Portugal», *Plant Disease*, 80, p. 1079. doi: 10.1094/PD-80-1079D.
- Luis-Arteaga, M., Alvarez, J. M., Alonso-Prados, J. L., Bernal, J. J., García-Arenal, F.,**

- Laviña, A., Batlle, A. y Moriones, E. (2007) «Occurrence, Distribution, and Relative Incidence of Mosaic Viruses Infecting Field-Grown Melon in Spain», *Plant Disease*, 82(9), pp. 979-982. doi: 10.1094/pdis.1998.82.9.979.
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., *et al.* (2017) «A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes», *PLOS ONE*. Editado por U. Melcher, 12(1), p. e0170429. doi: 10.1371/journal.pone.0170429.
- Mabvakure, B., Martin, D. P., Kraberger, S., Cloete, L., van Brunshot, S., Geering, A. D. W., Thomas, J. E., Bananej, K., *et al.* (2016) «Ongoing geographical spread of Tomato yellow leaf curl virus», *Virology*, 498, pp. 257-264. doi: 10.1016/j.virol.2016.08.033.
- Macdonald, B. A. (2004) «Population Genetics of Plant Pathogens», *The Plant Health Instructor*, 46, p. 235. doi: 10.1094/PHI-A-2004-0524-01.
- Maina, S., Edwards, O. R. y Jones, R. A. C. (2017) «Two Complete Genome Sequences of Squash mosaic virus from 20-Year-Old Cucurbit Leaf Samples from Australia», *Genome Announcements*, 5(32), pp. e00778-17. doi: 10.1128/genomea.00778-17.
- Malek, L., Sooknanan, R. y Compton, J. (1994) «Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA™)», en Isaac, P. G. (ed.) *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes. Methods in Molecular Biology™*. New Jersey: Humana Press, pp. 253-260. doi: 10.1385/0-89603-254-X:253.
- Malpica, J. M., Fraile, A., Moreno, I., Obies, C. I., Drake, J. W. y García-Arenal, F. (2003) «The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus», *Genetics*, 162(4), pp. 2505-15011.
- Mandal, S., Mandal, B. y Varma, A. (2008) «Properties , Diagnosis and Management of Cucumber green mottle mosaic virus», *Plant Viruses*, 3(2), pp. 25-35.
- Manso, M. de los A. y Gonzalez, G. (1990) «The squash mosaic virus in Cuba.», *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Protección de Plantas*, 13(1), pp. 7-23.
- Maree, H. J., Fox, A., Al Rwahnih, M., Boonham, N. y Candresse, T. (2018) «Application of HTS for Routine Plant Virus Diagnostics: State of the Art and Challenges», *Frontiers in Plant Science*, 9(August), pp. 1-4. doi: 10.3389/fpls.2018.01082.
- Martin, D. P., Biagini, P., Lefevre, P., Golden, M., Roumagnac, P. y Varsani, A. (2011) «Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses», *Viruses*, pp. 1699-1738. doi: 10.3390/v3091699.
- Martínez de Salinas, J., Fraile, A., Solís, I. y García-Arenal, F. (1987) «Characterization of Spanish isolate of Melon necrotic spot virus», en *Proceedings of the VII Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. Granada. Spain, p. 142.
- Más, P. y Pallás, V. (1995) «Non-isotopic tissue-printing hybridization: a new technique to study long-distance plant virus movement», *Journal of Virological Methods*, 52(3), pp. 317-326. doi: 10.1016/0166-0934(94)00167-F.
- Más, P., Sánchez-Navarro, J. A., Sánchez-Pina, M. A. y Pallás, V. (1993)

- «Chemiluminescent and colorigenic detection of cherry leaf roll virus with digoxigenin-labeled RNA probes», *Journal of Virological Methods*, 45(1), pp. 93-102. doi: 10.1016/0166-0934(93)90143-F.
- Maude, R. B.** (1996) *Seedborne diseases and their control: principles and practice*. Wallingford, UK: CAB international.
- Maule, A. y Wang, D.** (1996) «Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity», *Trends in Microbiology*, 4(4), pp. 153-158. doi: 10.1016/0966-842X(96)10016-0.
- Melgarejo, P., García-Jiménez, J., Jordá, M. C., López-González, M. M., Andrés, M. F. y Duran-Villa, N.** (2010) *Patógenos de plantas descritos en España*. 2º. Madrid, Spain: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Michelson, I., Zamir, D. y Czosnek, H.** (1994) «Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*», *Phytopathology*, 84(January 1994), pp. 928-933.
- Mink, G. I.** (1993) «Pollen and Seed-Transmitted Viruses and Viroids», *Annual Review of Phytopathology*, 31(1), pp. 375-402. doi: 10.1146/annurev.py.31.090193.002111.
- Minutillo, S. A., Mascia, T. y Gallitelli, D.** (2012) «A DNA probe mix for the multiplex detection of ten artichoke viruses», *European Journal of Plant Pathology*. Springer, 134(3), pp. 459-465. doi: 10.1007/s10658-012-0032-3.
- Miras, M., Sempere, R. N., Kraft, J. J., Miller, W. A., Aranda, M. A. y Truniger, V.** (2014) «Interfamilial recombination between viruses led to acquisition of a novel translation-enhancing RNA element that allows resistance breaking», *New Phytologist*, 202(1), pp. 233-246. doi: 10.1111/nph.12650.
- Monci, F., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. y Moriones, E.** (2002) «A Natural Recombinant between the Geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus Exhibits a Novel Pathogenic Phenotype and Is Becoming Prevalent in Spanish Populations», *Virology*, 303(2), pp. 317-326. doi: 10.1006/viro.2002.1633.
- Moriones, E. y Navas-Castillo, J.** (2000) «Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide», *Virus Research*, 71(1-2), pp. 123-134. doi: 10.1016/S0168-1702(00)00193-3.
- Morrison, R. H.** (1999) «Sampling in Seed Health Testing», *Phytopathology*, 89(11), pp. 1084-1087. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.11.1084.
- Mortimer-Jones, S. M., Jones, M. G. K., Jones, R. A. C., Thomson, G. y Dwyer, G. I.** (2009) «A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously», *Journal of Virological Methods*. Elsevier, 161(2), pp. 289-296. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.06.027.
- Moura, M. C. F., Holanda, I. S. A., Sales Júnior, R., Queiroz, A. P. O., Araújo, E. O. A., Oliveira, G. D. C., Nunes, G. H. S., Nagata, T., et al.** (2018) «First Report of Melon

- necrotic spot virus in Melon Plantations in Brazil», *Plant Disease*. *Plant Disease*, 102(5), pp. 1048-1048. doi: 10.1094/PDIS-09-17-1391-PDN.
- Moury, B. y Simon, V.** (2011) «dN/dS-Based Methods Detect Positive Selection Linked to Trade-Offs between Different Fitness Traits in the Coat Protein of Potato virus Y», *Molecular Biology and Evolution*, 28(9), pp. 2707-2717. doi: 10.1093/molbev/msr105.
- Muller, H. J.** (1964) «The relation of recombination to mutational advance», *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1(1), pp. 2-9. doi: 10.1016/0027-5107(64)90047-8.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H.** (1986) «Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction», *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, pp. 263-273. doi: 10.1101/SQB.1986.051.01.032.
- Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J. y Barker, I.** (2006) «Advances in molecular phytodiagnosics – new solutions for old problems», *European Journal of Plant Pathology*, 116(1), pp. 1-19. doi: 10.1007/s10658-006-9037-0.
- Nagy, P. D.** (2008) «Recombination in RNA plant Viruses», en Roossinck, M. J. (ed.) *Plant Virus Evolution*. 1.^a ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 133-156.
- Nagy, P. D. y Simon, A. E.** (1997) «New Insights into the Mechanisms of RNA Recombination», *Virology*, 235(1), pp. 1-9. doi: 10.1006/viro.1997.8681.
- Navas-Castillo, J., Sánchez-Campos, S., Díaz, J. A., Sáez-Alonso, E. y Moriones, E.** (1997) «First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Is in Spain: Coexistence of Two Different Geminiviruses in the Same Epidemic Outbreak», *Plant Disease*. The American Phytopathological Society, 81(12), pp. 1461-1461. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.12.1461B.
- Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M., Zamir, D. y Czosnek, H.** (1991) «Tomato yellow leaf curl virus: A whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component», *Virology*, 185(1), pp. 151-161. doi: 10.1016/0042-6822(91)90763-2.
- Nei, M. y Gojoborit, T.** (1986) «Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions.», *Molecular Biology and Evolution*, 3(5), pp. 418-426. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040410.
- Nelson, M. R. y Knuhtsen, H. K.** (1973) «Squash Mosaic Virus Variability: Review and Serological Comparisons of Six Biotypes», *Phytopathology*, 63(7), p. 920. doi: 10.1094/Phyto-63-920.
- Nikolaeva, O. V.** (2017) «Nucleic Acid Hybridization Methods in Diagnosis of Plant Viruses and Viroids», en Singh, R. P. y Singh, U. S. (eds.) *Molecular Methods in Plant Pathology*. CRC Press, pp. 133-144. doi: 10.1201/9780203746523-10.
- Nisbet, C., Monger, W. A., Ross, S., Holmes, R. F., Nova, Y., Thomson, C., Goodfellow, H. A., Lacomme, C., et al.** (2019) «Biological and molecular characterization of Potato yellow blotch virus, a new species of the genus Potyvirus», *Plant*

- Pathology*, 68(2), pp. 251-260. doi: 10.1111/ppa.12943.
- Noris, E. y Miozzi, L.** (2015) *Real-Time PCR Protocols for the Quantification of the Begomovirus Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus in Tomato Plants and in Its Insect Vector, Plant Virology Protocols*. Editado por G. D. Foster y S. C. Taylor. Totowa, NJ: Humana Press. doi: 10.1385/0896033856.
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. y Kanda, H.** (2015) «Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects», *Journal of Microbiology*, 53(1), pp. 1-5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9.
- Olmos, A., Bertolini, E. y Cambra, M.** (2002) «Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses», *Journal of Virological Methods*, 106(1), pp. 51-59. doi: 10.1016/S0166-0934(02)00132-5.
- Olmos, A., Bertolini, E. y Cambra, M.** (2007) «Isothermal amplification coupled with rapid flow-through hybridisation for sensitive diagnosis of Plum pox virus», *Journal of Virological Methods*, 139(1), pp. 111-115. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.09.012.
- Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M. T. y Terrada, E.** (1999) «New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube», *Nucleic Acids Research*, 27(6), pp. 1564-1565. doi: 10.1093/nar/27.6.1564.
- Olmos, A., Yuste, A. y Bertolini, E.** (2016) «Nuevas tecnologías en virología vegetal», en Ayllón, M. A., Cambra, M., Llave, C., y Moriones, E. (eds.) *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides*. 1.^a ed. Bubok Publishing S. L., pp. 415-438.
- Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D. y Rowhani, A.** (2007) «Real-time RT-PCR (TaqMan[®]) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1-5 and 9», *Journal of Virological Methods*, 141(1), pp. 22-29. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.11.035.
- Padidam, M., Sawyer, S. y Fauquet, C. M.** (1999) «Possible Emergence of New Geminiviruses by Frequent Recombination», *Virology*, 265(2), pp. 218-225. doi: 10.1006/viro.1999.0056.
- Pagán, I.** (2018) «The diversity, evolution and epidemiology of plant viruses: A phylogenetic view», *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V., 65, pp. 187-199. doi: 10.1016/j.meegid.2018.07.033.
- Pagán, I. y García-Arenal, F.** (2018) «Population Genomics of Plant Viruses», en Polz, M. F. y Om, P. R. (eds.) *Population Genomics: Microorganisms*. Springer International Publishing, pp. 233-265. doi: 10.1007/13836_2018_15.
- Pagan, I. y Holmes, E. C.** (2010) «Long-Term Evolution of the Luteoviridae: Time Scale and Mode of Virus Speciation», *Journal of Virology*, 84(12), pp. 6177-6187. doi: 10.1128/JVI.02160-09.
- Pallás, V., Más, P. y Sánchez-Navarro, J. A.** (1998) «Detection of Plant RNA Viruses by Nonisotopic Dot-Blot Hybridization», en Foster, G. D. y Taylor, S. C. (eds.) *Plant Virology Protocols. Methods in Molecular BiologyTM*. Totowa, NJ: Humana Press,

- pp. 461-468. doi: 10.1385/0-89603-385-6:461.
- Pallás, V., Sánchez-Navarro, J. A. y James, D.** (2018) «Recent Advances on the Multiplex Molecular Detection of Plant Viruses and Viroids», *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). doi: 10.3389/fmicb.2018.02087.
- Pappu, H. R., Jones, R. A. C. y Jain, R. K.** (2009) «Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead», *Virus Research*, 141(2), pp. 219-236. doi: 10.1016/j.virusres.2009.01.009.
- Paprotka, T., Boiteux, L. S., Fonseca, M. E. N., Resende, R. O., Jeske, H., Faria, J. C. y Ribeiro, S. G.** (2010) «Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank», *Virus Research*. Elsevier B.V., 149(2), pp. 224-233. doi: 10.1016/j.virusres.2010.02.003.
- Parker, S. y Sanjeev, G.** (2017) «Seed Health Testing», en Keinath, A., Wintermantel, W., y Zitter, T. (eds.) *Compendium of cucurbit diseases and pests*. Second. St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press), pp. 10-11.
- Parrella, G., Gognalons, P., Vovlas, C. y Marchoux, G.** (2003) «An update of the range of Tomato spotted wild virus», *Journal of Plant Pathology*, 85(4), pp. 227-264.
- Patil, B. L. y Fauquet, C. M.** (2009) «Cassava mosaic geminiviruses: Actual knowledge and perspectives», *Molecular Plant Pathology*, pp. 685-701. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00559.x.
- Peck, K. M. y Luring, A. S.** (2018) «Complexities of Viral Mutation Rates», *Journal of Virology*. Editado por C. S. Sullivan. American Society for Microbiology Journals, 92(14), pp. e01031-17. doi: 10.1128/jvi.01031-17.
- Peiró, A., Pallás, V. y Sánchez-Navarro, J. Á.** (2012) «Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe», *European Journal of Plant Pathology*, 132(4), pp. 469-475. doi: 10.1007/s10658-011-9893-0.
- Pereira-Carvalho, R., Díaz-Pendón, J., Fonseca, M., Boiteux, L., Fernández-Muñoz, R., Moriones, E. y Resende, R.** (2015) «Recessive Resistance Derived from Tomato cv. Tyking-Limits Drastically the Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus», *Viruses*, 7(5), pp. 2518-2533. doi: 10.3390/v7052518.
- Pérez de Castro, A., Díez, M. J. y Nuez, F.** (2005) «Evaluation of breeding tomato lines partially resistant to Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus derived from *Lycopersicon chilense*», *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27(2), pp. 268-275. doi: 10.1080/07060660509507224.
- Picó, B., Díez, M. J. y Nuez, F.** (1996) «Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus — a review», *Scientia Horticulturae*. ELSEVIER, 67(3-4), pp. 151-196. doi: 10.1016/S0304-4238(96)00945-4.
- Pirone, T. P. y Harris, K. F.** (2003) «Nonpersistent Transmission of Plant Viruses by Aphids», *Annual Review of Phytopathology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 15(1), pp. 55-73. doi:

- 10.1146/annurev.py.15.090177.000415.
- Pita, J. S. y Roossinck, M. J.** (2008) «Virus Populations, Mutation Rates and Frequencies», en Roossinck, M. J. (ed.) *Plant Virus Evolution*. 1.^a ed. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, pp. 109-122.
- Polischuk, V., Budzanivska, I., Shevchenko, T. y Oliynik, S.** (2007) «Evidence for plant viruses in the region of Argentina Islands, Antarctica», en *FEMS Microbiology Ecology*. Oxford University Press, pp. 409-417. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00242.x.
- Prabha, K., Baranwal, V. K. y Jain, R. K.** (2013) «Applications of Next Generation High Throughput Sequencing Technologies in Characterization, Discovery and Molecular Interaction of Plant Viruses», *Indian Journal of Virology*, 24(2), pp. 157-165. doi: 10.1007/s13337-013-0133-4.
- Pradhanang, P. M.** (2009) «TOMATO MOSAIC VIRUS: DOES IT TRANSMIT THROUGH TOMATO SEEDS?», *Acta Horticulturae*, 808(808), pp. 87-94. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.808.11.
- Quan, P.-L., Sauzade, M. y Brouzes, E.** (2018) «dPCR: A Technology Review», *Sensors*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 18(4), p. 1271. doi: 10.3390/s18041271.
- Rader, W. E., Fitzpatrick, H. F. y Hildebrand, E. M.** (1947) «A seed-borne virus of Muskmelon.», *Phytopathology*, 37(11), pp. 809-316.
- Radford, A. D., Chapman, D., Dixon, L., Chantrey, J., Darby, A. C. y Hall, N.** (2012) «Application of next-generation sequencing technologies in virology», *Journal of General Virology*, 93, pp. 1853-1868. doi: 10.1099/vir.0.043182-0.
- Raja, P., Sanville, B. C., Buchmann, R. C. y Bisaro, D. M.** (2008) «Viral Genome Methylation as an Epigenetic Defense against Geminiviruses», *Journal of Virology*, 82(18), pp. 8997-9007. doi: 10.1128/jvi.00719-08.
- Ramos, P. L.** (1996) «Detection of TYLCV in Cuba», *Plant Disease*, 80, p. 1208. doi: 10.1094/PD-80-1208C.
- Rico, P., Ivars, P., Elena, S. F. y Hernandez, C.** (2006) «Insights into the Selective Pressures Restricting Pelargonium Flower Break Virus Genome Variability: Evidence for Host Adaptation», *Journal of Virology*, 80(16), pp. 8124-8132. doi: 10.1128/jvi.00603-06.
- Riviere, C. J. y Rochon, D. M.** (1990) «Nucleotide sequence and genomic organization of melon necrotic spot virus», *Journal of General Virology*, 71(9), pp. 1887-1896. doi: 10.1099/0022-1317-71-9-1887.
- Robinson, R. W. y Decker-Walters, D. S.** (1997) *Cucurbits*. Oxford, UK; New York, NY: Cab International.
- Rocha, C. S., Castillo-Urquiza, G. P., Lima, A. T. M., Silva, F. N., Xavier, C. A. D., Hora-Junior, B. T., Beserra-Junior, J. E. A., Malta, A. W. O., et al.** (2013) «Brazilian Begomovirus Populations Are Highly Recombinant, Rapidly Evolving, and Segregated Based on Geographical Location», *Journal of Virology*, 87(10), pp.

- 5784-5799. doi: 10.1128/jvi.00155-13.
- Rodelo-Urrego, M., García-Arenal, F. y Pagán, I.** (2015) «The effect of ecosystem biodiversity on virus genetic diversity depends on virus species: A study of chiltepin-infecting begomoviruses in Mexico», *Virus Evolution*. Narnia, 1(1). doi: 10.1093/ve/vev004.
- Roenhorst, J. W., de Krom, C., Fox, A., Mehle, N., Ravnikar, M. y Werkman, A. W.** (2018) «Ensuring validation in diagnostic testing is fit for purpose: a view from the plant virology laboratory», *EPPO Bulletin*, 48(1), pp. 105-115. doi: 10.1111/epp.12445.
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J. y Gilbertson, R. L.** (2005) «Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses», *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), pp. 361-394. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939.
- Roossinck, M. J.** (1997) «Mechansims of plant virus evolution», *Annual Review of Phytopathology*, 35, pp. 191-209.
- Rubio, L., Guerri, J. y Moreno, P.** (2013) «Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family Closteroviridae», *Frontiers in Microbiology*, 4(JUN). doi: 10.3389/fmicb.2013.00151.
- Rubio, L., Janssen, D., Cuadrado, I. M., Moreno, P. y Guerri, J.** (2003) «Rapid detection of cucumber vein yellowing virus by tissue-print hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes», *Journal of Virological Methods*, 114(1), pp. 105-107. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.08.008.
- Ruiz, L., Crespo, O., Simon, A., Gomez, J. y Janssen, D.** (2016) «First Report of a Novel Melon necrotic spot virus Watermelon Strain in Spain», *Plant Disease*. Plant Disease, 100(5), p. 1031. doi: 10.1094/PDIS-11-15-1261-PDN.
- Ruiz, L., Janssen, D., Martin, G., Velasco, L., Segundo, E. y Cuadrado, I. M.** (2006) «Analysis of the temporal and spatial disease progress of Bemisia tabaci-transmitted Cucurbit yellow stunting disorder virus and Cucumber vein yellowing virus in cucumber», *Plant Pathology*, 55(2), pp. 264-275. doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01316.x.
- Ruiz, M. L., Simón, A., Velasco, L., García, M. C. y Janssen, D.** (2015) «First Report of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Tomato in Spain», *Plant Disease*. Plant Disease, 99(6), pp. 894-894. doi: 10.1094/PDIS-10-14-1072-PDN.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. y Erlich, H. A.** (1988) «Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase», *Science*, 239(4839), pp. 487-491. doi: 10.1126/science.2448875.
- Saldarelli, P.** (1996) «Digoxigenin-Labeled Riboprobes Applied to Phytosanitary Certification of Tomato in Italy», *Plant Disease*, 80(12), p. 1343. doi: 10.1094/PD-80-1343.
- Sanchez-Navarro, Aparicio, Rowhani y Pallás** (1998) «Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of prunus

- necrotic ringspot virus in herbaceous and Prunus hosts», *Plant Pathology*, 47(6), pp. 780-786. doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.00301.x.
- Sánchez-Navarro, J. A., Cañizares, M. C., Cano, E. A. y Pallás, V.** (1999) «Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization», *Journal of Virological Methods*, 82(2), pp. 167-175. doi: 10.1016/S0166-0934(99)00097-X.
- Sánchez-Navarro, J. A., Cooper, C. N. y Pallás, V.** (2018) «Polyvalent Detection of Members of the Genus Potyvirus by Molecular Hybridization Using a Genus-Probe», *Phytopathology*, 108(12), pp. 1522-1529. doi: 10.1094/PHYTO-04-18-0146-R.
- Sanfaçon, H., Iwanami, T., Karasev, A. V., van der Vlugt, R., Wellink, J., Wetzel, T. y Yoshikawa, N.** (2012) «Family Secoviridae», en King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., y Lefkowitz, E. J. (eds.) *Virus Taxonomy 9th Report, Proceedings of the International Comitee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press, pp. 881-899.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R.** (1977) «DNA sequencing with chain-terminating inhibitors», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, pp. 5463-5467.
- Sanjuán, R. y Domingo-Calap, P.** (2016) «Mechanisms of viral mutation», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), pp. 4433-4448. doi: 10.1007/s00018-016-2299-6.
- Saponari, M., Manjunath, K. y Yokomi, R. K.** (2008) «Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®)», *Journal of Virological Methods*, 147(1), pp. 43-53. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.07.026.
- Sastry, K. S.** (2013) *Seed-borne plant virus diseases, Seed-borne plant virus diseases*. India: Springer India. doi: 10.1007/978-81-322-0813-6.
- Saunders, K., Salim, N., Mali, V. R., Malathi, V. G., Briddon, R., Markham, P. G. y Stanley, J.** (2002) «Characterisation of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus and Indian Cassava Mosaic Virus: Evidence for Acquisition of a DNA B Component by a Monopartite Begomovirus», *Virology*, 293(1), pp. 63-74. doi: 10.1006/viro.2001.1251.
- Scholthof, K.-B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., et al.** (2011) «Top 10 plant viruses in molecular plant pathology», *Molecular Plant Pathology*, 12(9), pp. 938-954. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x.
- Seal, S. E., Van den Bosch, F. y Jeger, M. J.** (2006) «Factors Influencing Begomovirus Evolution and Their Increasing Global Significance: Implications for Sustainable Control», *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(1), pp. 23-46. doi: 10.1080/07352680500365257.
- Shim, C.-K., Lee, J.-H., Hong, S.-M., Han, K.-S. y Kim, H.-K.** (2006) «Construction of Antibodies for Detection and Diagnosis of Cucumber green mottle mosaic virus

- from Watermelon Plants», *The Plant Pathology Journal*, 22(1), pp. 21-27. doi: 10.5423/PPJ.2006.22.1.021.
- Silva, F. N., Lima, A. T., Rocha, C. S., Castillo-Urquiza, G. P., Alves-Júnior, M. y Zerbini, F. M.** (2014) «Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato rugose mosaic virus (ToRMV): Two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B», *Virology Journal*, 11(1), p. 66. doi: 10.1186/1743-422X-11-66.
- Simon-Loriere, E. y Holmes, E. C.** (2011) «Why do RNA viruses recombine?», *Nature reviews. Microbiology*. NIH Public Access, 9(8), pp. 617-26. doi: 10.1038/nrmicro2614.
- Spence, N. J., Basham, J., Mumford, R. A., Hayman, G., Edmondson, R. y Jones, D. R.** (2006) «Effect of Pepino mosaic virus on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK», *Plant Pathology*, 55(5), pp. 595-606. doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01406.x.
- Stenger, D. C., Revington, G. N., Stevenson, M. C. y Bisaro, D. M.** (1991) «Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(18), pp. 8029-8033. doi: 10.1073/pnas.88.18.8029.
- Svoboda, J. y Leisova-Svobodova, L.** (2011) «First Report of Squash Mosaic Virus in Ornamental Pumpkin in the Czech Republic», *Plant Disease*, 95(10), pp. 1321-1321. doi: 10.1094/pdis-05-11-0444.
- Tabein, S., Behjatnia, S. A. A., Laviano, L., Pecchioni, N., Accotto, G. P., Noris, E. y Miozzi, L.** (2017) «Pyramiding Ty - 1 / Ty - 3 and Ty - 2 in tomato hybrids dramatically inhibits symptom expression and accumulation of tomato yellow leaf curl disease inducing viruses», *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50(5-6), pp. 213-227. doi: 10.1080/03235408.2017.1287234.
- Tesoriero, L. A., Chambers, G., Srivastava, M., Smith, S., Conde, B. y Tran-Nguyen, L. T. T.** (2016) «First report of cucumber green mottle mosaic virus in Australia», *Australasian Plant Disease Notes*. Springer Netherlands, 11(1), pp. 1-3. doi: 10.1007/s13314-015-0186-x.
- Thelwell, N., Millington, A. S., Booth, J. y Brown, T.** (2000) «Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection», *Nucleic Acids Research*, 28(19), pp. 3752-3761. doi: 10.1093/nar/28.19.3752.
- Thomas, W.** (1973) «Seed-transmitted squash mosaic virus», *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16(4), pp. 561-567. doi: 10.1080/00288233.1973.10421105.
- Tian, T., Posis, K., Maroon-Lango, C. J., Mavrodieva, V., Haymes, S., Pitman, T. L. y Falk, B. W.** (2014) «First Report of Cucumber green mottle mosaic virus on Melon in the United States», *Plant Disease*, 98(8), pp. 1163-1163. doi: 10.1094/PDIS-02-14-0176-PDN.
- Tolin, S. A., Langham, M. A. C. y Gergerich, R. C. (eds.)** (2016) «CHAPTER 10: Beetle

- Transmission: A Unique Alliance of Virus, Vector, and Host», en *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society, pp. 131-146. doi: 10.1094/9780890545355.010.
- Tomassoli, L., Siddu, G., Carta, A., Lernia, G. di y Barba, M.** (1999) *Infezione da Melon necrotic spot virus su melone in Sardegna, Informatore Fitopatologico*. Edagricole.
- Tomlinson, J. A. y Thomas, B. J.** (1986) «Studies on melon necrotic spot virus disease of cucumber and on the control of the fungus vector (*Olpidium radicale*)», *Annals of Applied Biology*. Wiley Online Library, 108(1), pp. 71-80. doi: 10.1111/j.1744-7348.1986.tb01967.x.
- Torre, C., Donaire, L., Gómez-Aix, C., Juárez, M., Peterschmitt, M., Urbino, C., Hernando, Y., Agüero, J., et al.** (2018) «Characterization of Begomoviruses Sampled during Severe Epidemics in Tomato Cultivars Carrying the Ty-1 Gene», *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), p. 2614. doi: 10.3390/ijms19092614.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Oakeley, E. J., Veluthambi, K., Hohn, T. y Pooggin, M. M.** (2005) «Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes», *Journal of Virology*, 79(4), pp. 2517-2527. doi: 10.1128/jvi.79.4.2517-2527.2005.
- Ugaki, M., Tomiyama, M., Kakutani, T., Hidaka, S., Kiguchi, T., Nagata, R., Sato, T., Motoyoshi, F., et al.** (1991) «The complete nucleotide sequence of cucumber green mottle mosaic virus (SH strain) genomic RNA», *Journal of General Virology*. Microbiology Society, 72(7), pp. 1487-1495. doi: 10.1099/0022-1317-72-7-1487.
- Varga, A. y James, D.** (2006) «Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Plum pox virus», *Journal of Virological Methods*, 138(1-2), pp. 184-190. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.08.014.
- Varveri, C., Vassilakos, N. y Bem, F.** (2002) «Characterization and detection of Cucumber green mottle mosaic virus in Greece», *Phytoparasitica*. Springer Netherlands, 30(5), pp. 493-501. doi: 10.1007/BF02979754.
- Verbeek, M., Dullemans, A. M., van den Heuvel, J. F. J. M., Maris, P. C. y van der Vlugt, R. A. A.** (2007) «Identification and characterisation of tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato», *Archives of Virology*, 152(5), pp. 881-890. doi: 10.1007/s00705-006-0917-6.
- Verlaan, M. G., Hutton, S. F., Ibrahim, R. M., Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., Edwards, J. D. y Bai, Y.** (2013) «The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases», *PLoS Genetics*. Editado por J. M. McDowell, 9(3), p. e1003399. doi: 10.1371/journal.pgen.1003399.
- Vogelstein, B. y Kinzler, K. W.** (1999) «Digital PCR», *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 96(16), pp. 9236-9241. doi:

- 10.1073/pnas.96.16.9236.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. y Dunez, J.** (1992) «A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection», *Journal of Virological Methods*, 39(1-2), pp. 27-37. doi: 10.1016/0166-0934(92)90122-T.
- Wisler, G. C., Duffus, J. E., Liu, H.-Y. y Li, R. H.** (1998) «Ecology and Epidemiology of Whitefly-Transmitted Closteroviruses», *Plant Disease*, 82(3), pp. 270-280. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.3.270.
- Wittwer, C., Ririe, K. y Rasmussen, R.** (1998) «Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle PCR for Quantification», en Ferré, F. (ed.) *Gene Quantification. Advanced Biomedical Technologies*. Boston, MA: Birkhäuser Boston, pp. 129-144. doi: 10.1007/978-1-4612-4164-5_8.
- Wu, H. J., Qin, B.-X., Chen, H., Peng, B., Cai, J. y Gu, Q. S.** (2011) «The Rate of Seed Contamination and Transmission of Cucumber green mottle mosaic virus in Watermelon and Melon», *Scientia Agricultura Sinica*, 44(7), pp. 1527-1532.
- Wu, J. B., Dai, F. M. y Zhou, X. P.** (2006) «First Report of Tomato yellow leaf curl virus in China», *Plant Disease*. The American Phytopathological Society, 90(10), pp. 1359-1359. doi: 10.1094/PD-90-1359C.
- Wyant, P. S., Strohmeier, S., Schäfer, B., Krenz, B., Assunção, I. P., Lima, G. S. de A. y Jeske, H.** (2012) «Circular DNA genomics (circomics) exemplified for geminiviruses in bean crops and weeds of northeastern Brazil», *Virology*. Academic Press, 427(2), pp. 151-157. doi: 10.1016/j.virol.2012.02.007.
- Yadav, N. y Khurana, S. M. P.** (2016) «Plant Virus Detection and Diagnosis: Progress and Challenges», en *Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology*. New Delhi: Springer India, pp. 97-132. doi: 10.1007/978-81-322-2610-9_7.
- Yakoubi, S., Desbiez, C., Fakhfakh, H., Wipf-Scheibel, C., Marrakchi, M. y Lecoq, H.** (2008) «First report of Melon necrotic spot virus on melon in Tunisia», *Plant Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 57(2), pp. 386-386. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01719.x.
- Zambrano, K., Carballo, O., Geraud, F., Chirinos, D., Fernández, C. y Marys, E.** (2007) «First Report of Tomato yellow leaf curl virus in Venezuela», *Plant Disease*. The American Phytopathological Society, 91(6), pp. 768-768. doi: 10.1094/PDIS-91-6-0768A.
- Zamir, D., Ekstein-Michelson, I., Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Sarfatti, M., Eshed, Y., Harel, E., et al.** (1994) «Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1», *Theoretical and Applied Genetics*, 88(2), pp. 141-146. doi: 10.1007/BF00225889.
- Zhang, J., Dong, J., Xu, Y. y Wu, J.** (2012) «V2 protein encoded by Tomato yellow leaf curl China virus is an RNA silencing suppressor», *Virus Research*. Elsevier, 163(1), pp. 51-58. doi: 10.1016/j.virusres.2011.08.009.

- Zhang, W., Zhang, Z., Fan, G., Gao, Y., Wen, J., Bai, Y., Qiu, C., Zhang, S., et al.** (2017) «Development and application of a universal and simplified multiplex RT-PCR assay to detect five potato viruses», *Journal of General Plant Pathology*. Springer Japan, 83(1), pp. 33-45. doi: 10.1007/s10327-016-0688-1.
- Zhang, Y., Zhao, W., Li, M., Chen, H., Zhu, S. y Fan, Z.** (2011) «Real-time TaqMan RT-PCR for detection of maize chlorotic mottle virus in maize seeds», *Journal of Virological Methods*, 171(1), pp. 292-294. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.11.002.
- Zhao, X., Liu, X., Ge, B., Li, M. y Hong, B.** (2015) «A multiplex RT-PCR for simultaneous detection and identification of five viruses and two viroids infecting chrysanthemum», *Archives of Virology*, 160(5), pp. 1145-1152. doi: 10.1007/s00705-015-2360-z.
- Zheng, L., Rodoni, B. C., Gibbs, M. J. y Gibbs, A. J.** (2010) «A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses», *Plant Pathology*, 59(2), pp. 211-220. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x.
- Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim-Nape, G. W., Robinson, D. J. y Harrison, B. D.** (1997) «Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination.», *Journal of General Virology*, 78(8), pp. 2101-2111. doi: 10.1099/0022-1317-78-8-2101.
- Zhou, X., Robinson, D. J., Liu, Y. y Harrison, B. D.** (1998) «Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra.», *Journal of General Virology*, 79(4), pp. 915-923. doi: 10.1099/0022-1317-79-4-915.

Anexo

Publicaciones

Los resultados expuestos en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Torre, C., Donaire, L., Gómez-Aix, C., Juárez, M., Peterschmitt, M., Urbino, C., Hernando, Y., Agüero, J., y Aranda, M. A. (2018) «Characterization of Begomoviruses Sampled during Severe Epidemics in Tomato Cultivars Carrying the Ty-1 Gene», *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), p. 2614. doi: 10.3390/ijms19092614.

Torre, C., Agüero, J., y Aranda, M. A. (2019) «First Evidence of Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Israel IS76 Recombinant Isolates Associated with Severe Yellow leaf Curl Epidemics in Resistant Tomatoes in Spain», *Plant Disease*, p. PDIS-09-18-1619-PDN. doi: 10.1094/PDIS-09-18-1619-PDN.

