

## Avances en el estudio del “torrao” o cribado del tomate

A. ALFARO-FERNÁNDEZ, M. C. CÓRDOBA-SELLÉS, M. C. CEBRIÁN MICÓ, I. FONT, M. JUÁREZ, V. MEDINA, A. LACASA, J. A. SÁNCHEZ-NAVARRO, V. PALLÁS, C. JORDÁ GUTIÉRREZ

El “torrao” es una enfermedad presente en nuestro país desde 2001, que sigue presentándose en cada campaña de tomate con mayor o menor incidencia según el año. Las plantas afectadas muestran necrosis en la parte basal de los folíolos que puede evolucionar a cribado, manchas longitudinales en los peciolos y manchas necróticas en fruto, que terminan por rajarlo. El presente trabajo es la continuación del publicado en el número 32 de esta revista titulado “Necrosis del tomate: “torrao” o cribado” y surge de los resultados obtenidos tras la reciente publicación de la identificación y caracterización del nuevo virus “*Tomato torrado virus*” (ToTV) como agente implicado en la enfermedad conocida como “torrao”. En este estudio se seleccionaron 94 muestras procedentes de prospecciones realizadas en invernaderos de Murcia durante los años 2003 a 2006. La aplicación RT-PCR e hibridación molecular para la detección de ToTV ha permitido detectar la presencia de esta nueva virosis en 87 de las muestras analizadas. En 83 de ellas, se encontró la presencia conjunta de este nuevo virus con el *Pepino mosaic virus* (PepMV), mayoritariamente con el aislado tipo Chileno 2 (Accesión number: DQ00095). Se plantean nuevos estudios para determinar la implicación de ambos virus, ToTV y PepMV, en el desarrollo del síndrome conocido como “torrao” del tomate.

A. ALFARO-FERNÁNDEZ, M. C. CÓRDOBA-SELLÉS, M. C. CEBRIÁN MICÓ, I. FONT, C. JORDÁ GUTIÉRREZ. Instituto Agroforestal Mediterráneo- Virología Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022 Valencia. mjordaj@eaf.upv.es  
M. JUÁREZ. Universidad Miguel Hernández. Orihuela, Alicante.  
V. MEDINA. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Lleida.  
A. LACASA. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. La Alberca, Murcia.  
J. A. SÁNCHEZ-NAVARRO, V. PALLÁS. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universidad Politécnica de Valencia-CSIC.

**Palabras clave:** *Tomato torrado virus*, *Pepino mosaic virus*, diagnóstico, virosis, RT-PCR, hibridación molecular.

### INTRODUCCIÓN

El trabajo que se presenta a continuación recoge los avances en el estudio de la enfermedad conocida como “torrao” desde la publicación en el anterior número de esta revista del artículo titulado “Necrosis del tomate: “torrao” o cribado”, tras la reciente de identificación y caracterización del *Tomato torrado virus* (ToTV) como agente implicado en el síndrome (VERBEEK *et al.*, 2007).

El “torrao” o cribado del tomate es una enfermedad presente en España desde el año 2001, habiendo sido detectada por primera vez en invernaderos de Murcia, y cuya dispersión geográfica y agresividad se ha ido incrementando hasta la actualidad. El nombre de la enfermedad, “torrao”, hace referencia al aspecto quemado que adquieren las plantas afectadas. Al principio, las plantas muestran un amarilleo en la base de los folíolos que posteriormente se necrosa



Figura 1: Síntomas de “torrao” observados en plantas afectadas.  
 a. Amarilleo y necrosis en la zona basal de los foliolos, que posteriormente evoluciona a cribado.  
 b. Manchas internerviales de color negro que avanzan desde la base a la parte apical del foliolo.

(Figura 1a) y perfora, produciendo el típico “cribado” en los foliolos; en otros casos, los foliolos presentan unas manchas necróticas internerviales que van avanzando desde la base hacia el ápice del foliolo, sin que llegue a producirse dicho “cribado” (Figura 1b). En los tallos y peciolo aparecen manchas longitudinales que pueden ser de color pardo, endurecidas a modo de “costuras” (Figura 2a), o manchas más oscuras no endurecidas a modo de “chorreras” (Figura 2b). Los frutos de las plantas afectadas presentan costu-

ras marrones o negras que, al engordar el fruto, terminan por rajarlo (Figura 3).

En trabajos anteriores se ha constatado la amplia extensión de la enfermedad en las principales zonas productoras de tomate de nuestro país, habiéndose recogido y analizado un amplio número de muestras de diversas procedencias a lo largo de los seis años de historia de esta enfermedad (ALFARO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Asimismo, las diversas prospecciones realizadas han permitido determinar la naturaleza estacional de la



Figura 2: Síntomas de “torrao” observados en tallos de plantas afectadas.  
 a. Manchas longitudinales endurecidas a modo de “costuras”.  
 b. Manchas longitudinales no endurecidas a modo de “chorreras”.



Figura 3. Fruto de planta afectada por "torrao" presentando las costuras típicas, que al evolucionar terminan rajándolo.

enfermedad, presentándose ésta en primavera y otoño con mayor agresividad a mitad de primavera y otoño, aunque esto puede variar en función de la campaña (JORDÁ *et al.*, 2003). Los muestreos realizados han determinado la aparición del "torrao" en infecciones mixtas con otros virus que afectan habitualmente al cultivo del tomate, como el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), el *Potato virus Y* (PVY) y el *Tomato chlorosis virus* (ToCV), que producen una intensificación de los síntomas causados por dicha enfermedad (ALFARO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Hay que destacar, que difícilmente se encuentran plantas afectadas por "torrao" no infectadas con *Pepino mosaic virus* (PepMV), virosis presente en nuestro país desde 2000 y ampliamente extendida en España (JORDÁ *et al.*, 2001).

Los primeros estudios para la determinación del agente causal indicaron la posible implicación del *Ilarvirus Parietaria mottle virus* (PMoV) (ARAMBURU y ARIÑO, 2003), afirmación descartada no sólo por la diferencia sintomatológica que este virus produce en tomate, sino también por no detectarlo en ninguna de las muestras recogidas en los muestreos realizados durante las distintas prospecciones. Sólo se ha detectado la presencia de esta virosis asociada a necrosis en tomate en Vizcaya, Tarragona y Valencia, aunque como se ha indicado anteriormente

la sintomatología es claramente distinta (ALFARO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

La reciente publicación en esta revista de los estudios realizados por nuestro grupo hasta el verano de 2006, demostraron la asociación persistente del PepMV, concretamente del aislado tipo Ch2 (GenBank, accession number: DQ000985), en las muestras procedentes de campo con sintomatología típica de "torrao" recogidas a lo largo de los distintos años de estudio (ALFARO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Por otro lado, una comunicación oral presentada en el XV Tomato Working Group Meeting celebrado en Bari en Septiembre de 2005, apuntó la implicación como agente causal de esta enfermedad de un nuevo virus denominado "*Tomato torrado virus*" (ToTV). Este virus formado por partículas esféricas de 28 nm de diámetro, es una entidad cercana a los miembros de las familias Comoviridae y Sequiviridae (VERBEEK *et al.*, 2005). Recientemente, el mismo grupo de autores holandés ha publicado estudios en relación con la etiología de la enfermedad denominada "torrao". En primer lugar, el registro de la patente internacional (nº WO 2006085749), publicada el 17 de agosto de 2006, donde se recoge gran cantidad de información sobre la nueva entidad viral determinada como agente causal del "torrao", denominada por los autores como "*Tomato torrado virus*" (ToTV). En dicha información se detalla, entre otras cosas la secuencia nucleotídica de un aislado de ToTV, así como parejas de cebadores para la detección de la entidad viral en plantas infectadas (VAN DER HEUVEL *et al.*, 2006). Este mismo grupo, publica en enero de 2007, la identificación y caracterización del ToTV como un nuevo virus que afecta al tomate, encuadrado taxonómicamente por los autores como un virus del grupo picorna-like. Este virus debería constituir un nuevo género, debido a las notables diferencias existentes con virus pertenecientes a los géneros Sequiviridae, Sandwavirus y Cheravirus, a pesar de encontrarse cierta relación entre ellos en los análisis filogenéticos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (VERBEEK *et al.*, 2007).

Debido a la reciente identificación y caracterización del nuevo virus, el presente trabajo recoge los avances en el estudio de la implicación del ToTV en el síndrome del "torrao" en muestras recogidas de campo a lo largo de los diversos años de estudio, así como su relación con los estudios realizados anteriormente sobre el aislado tipo Chileno 2 de PepMV, publicados en el número 32 de esta revista.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestras seleccionadas

Como se indicó en el estudio previo, publicado recientemente, se han venido realizando muestreos en los invernaderos y campos afectados de las diferentes zonas productoras de tomate desde la aparición de la sintomatología asociada al "torrao", en el año 2001 (ALFARO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). A la vista de la identificación y caracterización de la nueva entidad viral ToTV, se procedió a la selección de muestras recogidas en los distintos muestreos, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo (U.P.V.) para la comprobación de la presencia de dicho virus. De todas las muestras recogidas en los distintos invernaderos de Murcia a lo largo de los años, se seleccionaron 94 muestras con síntomas típicos de "torrao": 4 muestras recogidas durante el año 2003, 1 muestra recogida en 2004, 24 muestras recogidas en 2005, 56 muestras recogidas en 2006 y 9 muestras recogidas en 2007.

### Análisis serológicos y moleculares previos

Las muestras seleccionadas para este estudio habían sido analizadas previamente a las distintas virosis que habitualmente afectan al tomate en nuestro país y, que en ocasiones, pueden producir síntomas de necrosis en esta especie.

Los análisis serológicos se realizaron por técnica DAS-ELISA utilizándose extractos de hojas y/o frutos de las plantas afectadas frente a los antisueros específicos para los virus: TSWV, *Tomato mosaic virus* (ToMV), PVY, *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (Loewe

Biochemica, Sauerlach, Germany) y PepMV (DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Braunschweig, Germany). Se siguieron los protocolos indicados por las propias casas comerciales, utilizando como testigo negativo tejido de tomate sano y como testigo positivo extractos foliares de plantas infectadas con los diferentes virus analizados.

Se procedió a la extracción del RNA total de cada una de las muestras mediante el kit de extracción RNA *wiz* (Ambion catalog. n° 9736) para poder aplicar las distintas técnicas que permiten la detección de distintas virosis. Para comprobar los resultados obtenidos por serología, las muestras se analizaron mediante RT-PCR con los cebadores específicos de PepMV (PAGÁN *et al.*, 2006). Para confirmar o descartar la presencia de los diferentes Crinivirus que afectan a tomate se analizaron las muestras mediante RT-PCR con los cebadores específicos de *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) (VAIRA *et al.*, 2002) y ToCV (LOURO *et al.*, 2000). La presencia de cualquier virosis del género Potexvirus se determinó mediante el análisis de las muestras por RT-PCR en dos pasos empleando cebadores degennerados para este género (MARTÍNEZ-CULEBRAS *et al.*, 2002). Todos los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TAE 1X y teñidos con bromuro de etidio. El tamaño del fragmento obtenido se estableció por comparación con un marcador de pesos moleculares conocidos GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Invitrogen Life Technologies. Barcelona, España). Algunas muestras se analizaron mediante hibridación molecular no radioactiva con digoxigenina con sonda específica de PMoV suministrada por el Dr. Pallás (GALIPIENSO *et al.*, 2005).

### Análisis moleculares realizados mediante nuevas técnicas de diagnóstico para PepMV y ToTV

#### Análisis realizados para la detección del PepMV

Como se indicó en la publicación anterior, los resultados obtenidos apuntaban la conti-

nua asociación del “torrao” con el PepMV. Este hecho unido a la sospecha de que las técnicas hasta el momento empleadas no eran capaces de detectar todos los aislados del PepMV en las muestras afectadas, llevaron al diseño de un nuevo método de detección que permitía la diferenciación de tres tipos de aislados de PepMV, que actualmente continúa en fase de publicación. Con este método, se analizaron las 94 muestras seleccionadas en este estudio para comprobar si eran positivas al PepMV, y en caso afirmativo determinar que tipo de aislado del virus estaba presente.

Análisis realizados para la detección del ToTV

De las 94 muestras seleccionadas en el presente trabajo, 68 se analizaron mediante RT-PCR con los cebadores específicos del RNA2 del ToTV (VAN DER HEUVEL *et al.*, 2006 y VERBEEK *et al.*, 2007) empleando el

enzima SuperScript Platinum Taq (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, Spain). Los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa, y comparados con un marcador de pesos moleculares conocidos como se indica anteriormente. Uno de los productos amplificados fue purificado empleando el kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y posteriormente secuenciado.

Para comprobar los resultados negativos obtenidos en la RT-PCR, así como para el análisis de nuevas muestras no testadas hasta el momento se empleó la técnica de hibridación molecular con una sonda de RNA específica del ToTV marcada con digoxigenina suministrada por el Dr. Sánchez-Navarro. La hibridación molecular mediante la técnica del dot-blot se realizó siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía (SÁNCHEZ-NAVARRO *et al.*, 1999).

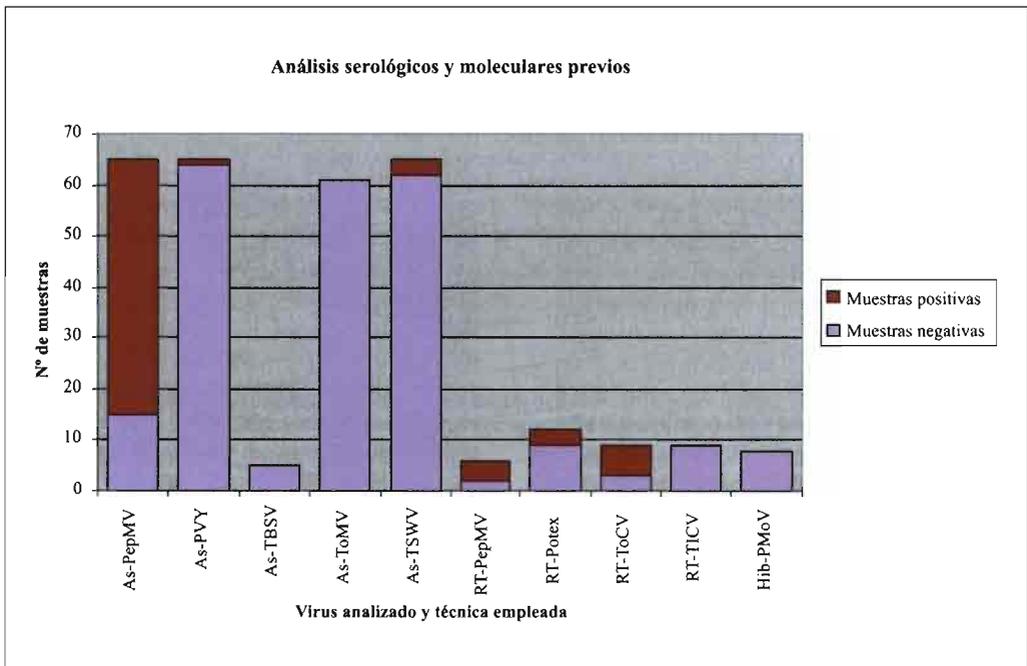


Figura 4: Número de positivos y negativos resultado de los análisis serológicos y moleculares previos de las muestras seleccionadas.

## RESULTADOS

### Resultados de los análisis serológicos y moleculares previos

Los resultados de los análisis serológicos y moleculares previos realizados a las 94 muestras seleccionadas para el estudio se detallan en la Figura 4. De todos los análisis serológicos realizados, el PepMV estaba presente en un 77% de las muestras analizadas. También se observa la presencia de otros virus en los invernaderos muestreados como es el caso del ToCV, el TSWV y en menor medida el PVY. De las muestras analizadas mediante RT-PCR con los cebadores degenerados del género Potexvirus, en 3 casos se amplificó una banda de tamaño

esperado 760 pb, que se purificó y se secuenció. La comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en el Gen Bank resultó en un 97-98% de homología con el aislado Ch2 de PepMV (Accession number: DQ000985).

### Análisis realizados mediante nuevas técnicas de diagnóstico

De las 94 muestras analizadas en el presente estudio, 83 muestras resultaron positivas a PepMV (lo que constituye el 88% de las muestras analizadas) al ser analizadas mediante la nueva técnica de diagnóstico. De estas muestras infectadas con PepMV, 50 presentaron infección con el aislado tipo Chileno 2 (53% de las muestras analizadas),

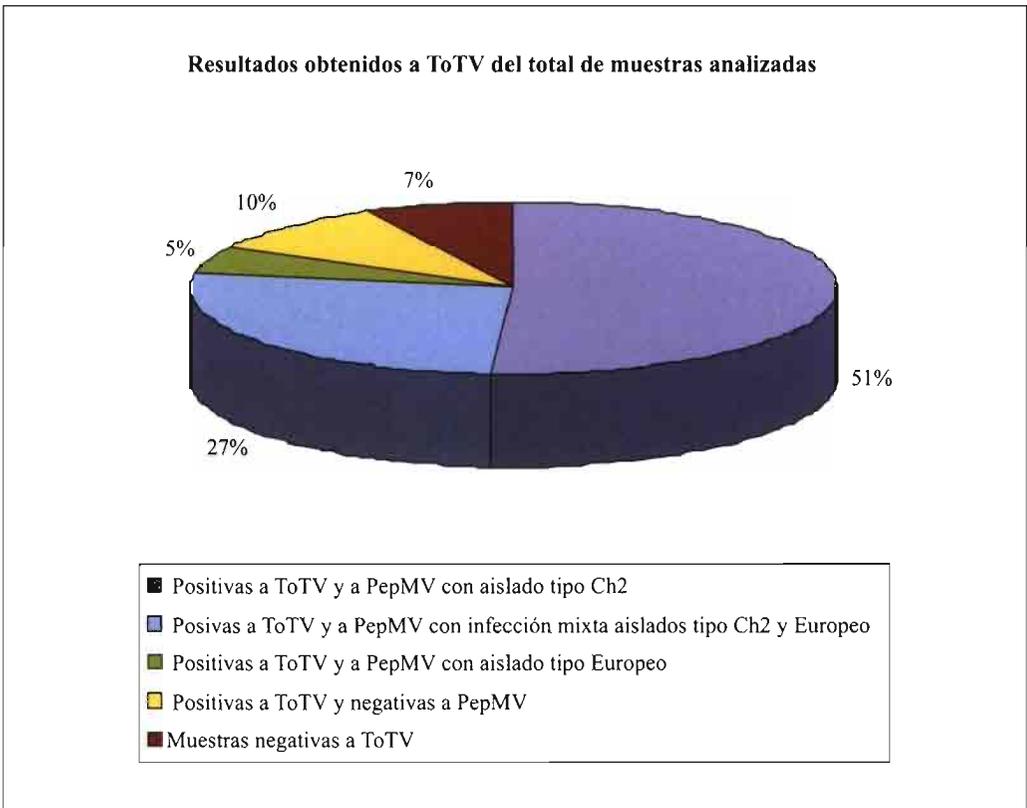


Figura 5: Representación gráfica de los resultados obtenidos en los análisis a ToTV de la totalidad de muestras analizadas (94 muestras).

Cuadro 1: Número de muestras positivas y negativas a los análisis a ToTV y a PepMV, distinguiendo en este último el tipo de aislado encontrado en las muestras afectadas.

	Muestras positivas a PepMV			Muestras negativas a PepMV	TOTAL
	Aislado tipo Ch2	Infección mixta aislados tipos Ch2 y Europeo	Aislado tipo Europeo		
Muestras positivas ToTV	48*	25	5	9	87
Muestras negativas a ToTV	2	2	1	2	7
Total Parcial	50	27	6	11	94
<b>TOTAL</b>		<b>83</b>			

\* Incluyendo las 3 muestras secuenciadas a partir de producto de PCR tras su análisis mediante RT-PCR con los cebadores generales de Potexvirus.

Cuadro 2: Número de muestras positivas y negativas analizadas mediante RT-PCR e hibridación molecular a ToTV.

	Nº muestras positivas	Nº muestras negativas	Nº Total de muestras analizadas
RT-PCR	47	21	68
Hibridación molecular	46	7	53

6 con el aislado tipo Europeo (6% de las muestras analizadas) y en 27 se había producido la infección mixta de ambos tipos de aislados (35 % de las muestras) (Cuadro 1), lo que implica que el 82% de las muestras presentaban infección con aislado tipo Chileno 2 de PepMV.

Los análisis realizados a ToTV por las dos técnicas moleculares empleadas, así como el número de positivos obtenido en cada caso se indican en el Cuadro 2. De las 68 muestras analizadas mediante RT-PCR, 47 resultaron positivas a ToTV. La secuencia obtenida, tras la purificación y secuenciación de una de ellas, se comparó con la secuencia publicada en el GenBank (Accesión number DQ 388880), presentando una homología del 100 %. Asimismo, 21 muestras de las 68 analizadas, resultaron negativas al análisis mediante RT-PCR. Estos negativos se comprobaron mediante hibridación molecular lo

que permitió la detección de nuevos positivos a ToTV. En resumen, tras todos los análisis realizados a este nuevo virus, únicamente en 7 muestras, de las 94 analizadas, no se detectó su presencia. El resto de muestras analizadas resultaron ser positivas (87 muestras de 94 analizadas), lo que constituye un 93% de las muestras (Cuadro 1).

Los resultados de los análisis realizados a ambos virus, ToTV y PepMV se detallan en el Cuadro 1. De todos los análisis realizados, únicamente 2 muestras resultaron negativas a ambos virus. En la Figura 5, se representa gráficamente los resultados obtenidos a ToTV de todas las muestras analizadas. Se puede observar la relación entre las muestras positivas a ToTV y los resultados de los análisis para la diferenciación de tipos de aislados de PepMV. Del gráfico se deduce una clara asociación entre la presencia de ToTV y PepMV en las plantas afectadas por el sín-

drome del “torrao”, ya que en 77 de las 94 muestras resultó positiva a ambas virosis (83% de las muestras). De éstas, se detecta la presencia del ToTV con el aislado tipo Chileno 2 de PepMV en un 78% de las muestras, encontrándose este tipo de aislado solo o en infección mixta con el tipo Europeo. Se han encontrado 9 muestras que, a pesar de ser positivas a ToTV, no se detecta la presencia de PepMV. Por el contrario, también se han detectado 6 muestras que presentando síntomas de “torrao”, no se ha identificado el ToTV aunque sí han sido positivas a PepMV. Es interesante indicar el caso de una muestra recogida en el año 2006, que presentaba diferencia de síntomas entre los dos brazos de la planta. Uno de los brazos mostraba el síntoma típico de mancha amarilla aislada, causado por una infección de PepMV (Figura 6a). En cambio, el otro brazo manifestaba, además de mancha aislada, necrosis en los folíolos que llegaban a cribar, costras en peciolo y frutos rajados (Figura 6b). Al analizar ambos brazos por separado, se observó que, así como el aislado tipo Chileno 2 de PepMV se encontraba presente en ambos brazos de la planta, el ToTV únicamente se detectaba en el brazo que mostraba síntomas de “torrao”. En cambio, en otro caso, una planta que no mostraba la sintomatología típica de “torrao” recogida de un invernadero

con una amplia distribución de la enfermedad, sí resultó positiva al ToTV. Los síntomas de dicha planta de tomate estaban asociados al PepMV, detectándose en ella además del ToTV el aislado tipo Ch2 de PepMV.

## DISCUSIÓN

La enfermedad conocida con el nombre de “torrao” lleva presente en nuestro país más de seis años (JORDÁ *et al.*, 2003), produciendo importantes pérdidas económicas en el cultivo del tomate. Han sido numerosos los intentos de determinar el agente causal de dicha enfermedad desde su primera aparición en Murcia en 2001. Debido a la gran proliferación de virosis que afectan a dicho cultivo y la gran variabilidad de síntomas que estos producen, llegado incluso a confundir o incrementar los síntomas típicos asociados a “torrao”, el diagnóstico de esta enfermedad es difícil. La reciente identificación y caracterización del nuevo virus ToTV ha dado un vuelco al estudio de la etiología de la citada enfermedad.

La aplicación de la RT-PCR con cebadores específicos de ToTV, recientemente publicados (VAN DER HEUVEL *et al.*, 2006; VERBEEK *et al.*, 2007) ha sido una herramienta eficaz, tanto para determinar la presencia de este nuevo virus en las muestras



Figura 6: Muestra recogida en 2006 en un invernadero de Murcia con diferencias sintomatológicas entre sus dos brazos. a. Brazo 1 de la planta donde se puede observar mancha amarilla aislada en los folíolos, síntoma asociado a infección por PepMV. b. Brazo 2 de la planta donde aparece necrosis en los folíolos con cribado y manchas longitudinales endurecidas en peciolo, síntomas típicos de “torrao”.

recogidas de campo, como para la síntesis de una sonda de RNA específica para el ToTV. Se ha demostrado en este trabajo la presencia de esta nueva entidad en 87 muestras de las 94 analizadas, lo que constituye aproximadamente el 93% de las muestras seleccionadas. Los problemas derivados de los análisis mediante RT-PCR fueron solventados con la obtención y aplicación de la hibridación molecular con sonda para detección de ToTV. Se debe recordar que las plantas afectadas con síntomas de "torrao" se encuentran muy necrosadas, por lo que el material extraído se encuentra muy oxidado lo que puede inhibir la reacción de RT-PCR. A esto se une, la extrema labilidad del RNA del ToTV, por lo que en estos momentos se está poniendo apunto un método de extracción para las muestras de "torrao" que permite la detección de virus que presentan problemas de rápida degradación. Los casos negativos del diagnóstico de ambos virus podrían ser debidos a esta causa.

Como se indicaba en el estudio anterior, el PepMV está presente en la mayoría de las muestras analizadas (ALFARO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). En la selección de muestras realizada en este estudio se confirma dicha apreciación, encontrándose la presencia de ToTV y PepMV en 77 de las muestras ensayadas. Esta asociación también la confirman otros autores (VERBEEK *et al.*, 2007), aunque también indican que la reproducción de los síntomas de "torrao" que ellos describen (necrosis en tomate, aunque no describen "cribado" ni rajado de frutos) la produce una purificación del ToTV, tras separarlo del PepMV en plantas hospedantes diferenciales. En este trabajo la asociación del PepMV y el "torrao" es claramente manifiesta, encontrándose además que el tipo de aislado mayoritario es el Chileno 2 de PepMV (constituyendo aproximadamente el 94% de las muestras positivas a dicho virus). Queda pendiente determinar la implicación clara de cada uno de los virus citados en dicho "síndrome", así como si la reiterada conjunción del tipo de aislado del PepMV es relevante o únicamente es fruto de una mayor distribu-

ción del nuevo aislado Chileno 2, en detrimento del habitualmente encontrado anteriormente, aislado tipo Europeo (PAGÁN *et al.*, 2006). Se plantea si la presencia del PepMV y el ToTV de forma conjunta puede producir un claro efecto sinérgico en la manifestación de la afección.

De los resultados obtenidos se deduce que puede existir una diferencia en la distribución de ambos virus en las plantas afectadas, ya que dos brazos de la misma planta afectada presentando síntomas diferenciales, también manifestaban diferencias en el diagnóstico de PepMV y ToTV. Mientras que el PepMV se encontraba presente en ambos brazos de la planta, el ToTV únicamente se detectaba en el brazo con síntomas típicos. Los análisis a otras plantas que no manifestaban síntomas típicos de "torrao", si resultaban positivos a ToTV. Se pone de manifiesto, por tanto la necesidad de un estudio exhaustivo de la distribución en plantas afectadas de ambas virosis presentes.

Como se apuntó en publicaciones anteriores, se observa en campo una clara relación entre la incidencia de la enfermedad y la presencia de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (ALFARO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). La transmisión por mosca blanca del ToTV ha sido indicada por otros autores (VERBEEK *et al.*, 2007). Se necesita un mayor estudio sobre la posible implicación de un insecto vector en la transmisión del virus. Asimismo, se ha indicado que la aparición, incidencia y agresividad de los síntomas de "torrao" se ven influenciadas por diversos factores como la variedad de tomate y las condiciones ambientales de humedad, temperatura e iluminación (ALFARO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Por tanto, queda pendiente la determinación de las condiciones concretas del desarrollo de la enfermedad y en que situación se producen las distintas manifestaciones asociadas al síndrome, comprobando el posible efecto sinérgico entre el ToTV y PepMV.

Reiteramos que este trabajo es una continuación del publicado en la revista Boletín Sanidad Vegetal Plagas nº 32 (4.1): 545-563

con el título “Necrosis del tomate: “torrao” o cribado”. Como se ha indicado al principio de este artículo, los datos publicados en el anterior trabajo, eran los estudios realizados hasta ese momento, estando en curso los resultados contenidos en este trabajo. Debemos incidir

en que el “torrao” es una enfermedad que sigue apareciendo en el cultivo del tomate en cada campaña produciendo importantes pérdidas, por lo que se sigue trabajando en el tema intentando aportar nuevos datos de epidemiología de dicha enfermedad.

#### ABSTRACT

ALFARO-FERNÁNDEZ A., M. C. CÓRDOBA-SELLÉS, M. C. CEBRIÁN MICÓ, I. FONT, M. JUÁREZ, V. MEDINA, A. LACASA, J. A. SÁNCHEZ-NAVARRO, V. PALLÁS, C. JORDÁ GUTIÉRREZ. 2007. Advances in the study of Tomato “Torrao” or “Cribado” syndrome. *Bol. San. Veg. Plagas*, **33**: 99-109.

Since 2001, “torrao disease” has occurred affecting tomato crops in Spain along each growing season with more or less incidence depending on the year. Affected plants show severe necrosis symptoms in the base of the leaflet that could fall down producing little holes on it. The stems show longitudinal stains and the fruits present necrotic lines that later made them crack. This study is the following part of the study published in nº 32 of this journal entitled: “Necrosis del tomate: “torrao” o cribado”. The study arises from the new results obtained afterwards the recent publication of the identification and characterization of the new virus “*Tomato torrado virus*” (ToTV), as an implicated agent in the syndrome known as “torrao”. Ninety-four samples were selected from different surveys carried out in Murcia greenhouses from 2003 to 2006. RT-PCR and molecular hybridation were performed and 87 of the tested samples resulted positive to ToTV. In 83 of the samples, ToTV was detected associated to the presence of *Pepino mosaic virus* (PepMV), isolate type Chilean 2 in majority. New studies are raised to set the implication of both viruses, ToTV and PepMV, in the development of the syndrome named “torrao” in tomato crops.

**Key words:** *Tomato torrado virus*, *Pepino mosaic virus*, diagnosis, virus, RT-PCR, molecular hybridation.

#### REFERENCIAS

- ALFARO-FERNÁNDEZ, A., CÓRDOBA-SELLÉS, M. C., CEBRIÁN-MICÓ, M. C., FONT, I., JUÁREZ, M., MEDINA, V., LACASA, A., SÁNCHEZ-NAVARRO, J. A., PALLÁS, V., JORDÁ-GUTIÉRREZ, C. 2006. Necrosis del tomate: “torrao” o cribado. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 545-562.
- ARAMBURU, J. y ARIÑO, J. 2003. La “necrosis apical del tomate”. Una nueva virosis causada por una raza del virus del moteado de la parietaria (PMoV). *Phytoma España*, **151**: 32-38.
- GALAPIENSO, L., HERRANZ, M. C., PALLAS, V. y ARAMBURU, J. 2005. Detection of a tomato strain of *Parietaria mottle virus* (PMoV-T) by molecular hybridization and RT-PCR in field samples from north-eastern Spain. *Plant Pathology*, **54**: 29-35.
- JORDÁ, C., LÁZARO-PÉREZ, A., MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. y ABAD, P. 2001. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato in Spain. *Plant Disease*, **85**: 1292.
- JORDÁ, C., MARTÍNEZ, M. C., CÓRDOBA, M. C., MARTÍNEZ, O., JUÁREZ, M. y FONT, I. 2003. El “cribado” o “torrao”, ¿una nueva enfermedad del cultivo del tomate? *Phytoma. España*, **152**: 130-136.
- LOURO, D., ACCOTTO, G. P. y VAIRA, A. M. 2000. Occurrence and diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 589-592.
- MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V., LÁZARO, A., ABAD-CAMPOS, P. y JORDÁ, C. 2002. A RT-PCR assay combined with RFLP analysis for detection and differentiation of isolates of *Pepino mosaic virus* (PepMV) from tomato. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 887-892.
- PAGÁN, I., CÓRDOBA-SELLÉS, M. C., MARTÍNEZ-PRIEGO, LL, FRAILE, A., MALPICA, J. M. JORDÁ, C. y GARCÍA-ARENAL, F. 2006. Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology*, **96**: 274-279.
- SÁNCHEZ-NAVARRO, J. A., CAÑIZARES, M. C., CANO, E. A. y PALLÁS, V. 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridation. *Journal of Virological Methods*, **82**: 167-175.
- VAIRA, A. M., ACCOTTO, G. P., VECCHIATI, M. y BRAGALONI, M. 2002. *Tomato infectious chlorosis virus*

- causes leaf yellowing and reddening of tomato in Italy. *Phytoparasitica*, **30** (3): 290-294.
- VAN DER HEUVEL, J. F., MARIS, P. C., VERBEEK, M., DULLEMANS, A. M., y VAN DER VLUGT, R. A. 2006. Plant virus designated *Tomato torrado virus*. N° Patente WO2006085749.
- VERBEEK, M., DULLEMANS, A. M. y VAN DER VLUGT, R. A. A. 2005. *Tomato torrado virus*, a new virus infecting tomato. XV Tomato working group meeting. Bari, Italia. Comunicación oral.
- VERBEEK, M., DULLEMANS, A. M., VAN DER HEUVEL, J. F. J. M., MARIS, P. C. Y VAN DER VLUGT, R. A. A. 2007. Identification and characterization of *Tomato torrado virus* a new plant picorna-like virus from tomato. *Archives of Virology*, **152**: 881-990.

(Recepción: 16 febrero 2007)

(Aceptación: 9 marzo 2007)