

## INDICE.

Temario.	Página.
I.INTRODUCCIÓN.	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA.	3
2.1 El Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	3
2.1.1 Generalidades del cultivo.	3
2.1.2 Botánica de la planta.	3
2.1.3 Enfermedades y plagas que afectan al tomate.	5
2.2 Virus fitopatógenos.	5
a. Características del PepMV.	6
b. Propiedades biológicas del virus.	7
c. Estructura y organización del genoma.	7
d. Variabilidad molecular o Diversidad genética de las poblaciones de PepMV.	8
e. Estabilidad del virus.	10
f. Distribución del virus PepMV en la planta.	11
g. Sintomatología del virus.	12
h. Rango de hospederos.	16
i. Formas de transmisión del virus.	19
-Transmisión Mecánica.	19
-Transmisión por insectos vectores.	19
-Transmisión por semilla.	20

-Propagación vegetativa.	21
-Transmisión por hongos vectores y soluciones nutritivas.	22
j. Diagnóstico de PepMV.	22
-Técnicas clásicas.	22
-Técnicas serológicas.	22
-Técnicas moleculares.	23
1. RT-PCR.	24
2. RT-PCR y análisis por RFLPs.	24
3. Real time- RT-PCR.	24
K. Medidas de control del PepMV.	24
K.1. Medidas Preventivas.	25
K.2. Control de la diseminación del virus.	26
K.3. Control biológico de la enfermedad	28
<i>K.3.1. Trichoderma spp. y Bacillus spp. como inductores</i>	
de resistencia.	29
III. MATERIALES Y METODOS.	31
3.1. Ubicación de los ensayos.	31
3.2. Material Vegetal de los ensayos.	31
3.3. Obtención e Identificación del material de inoculación del virus.	
<i>Pepino Mosaic Virus-PepMV.</i>	32

<b>3.4. Propagación del virus PepMV.</b>	<b>33</b>
<b>3.5. Aplicación de biocontroladores.</b>	<b>33</b>
<b>3.6. Evaluaciones de Incidencia y severidad.</b>	<b>34</b>
a) Incidencia.	34
b) Medición de severidad.	35
c) Medición de altura, peso fresco y seco en el ensayo.	35
<b>3.7. Determinación de la presencia de PepMV por unidad experimental.</b>	<b>36</b>
a) DAS-ELISA.	36
b) Extracción de ARN totales y obtención de cADN.	36
c) PCR.	36
<b>3.8. Diseño Experimental y tratamientos.</b>	<b>37</b>
<b>3.9. Análisis de resultados.</b>	<b>37</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION.</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Análisis de prospección viral de PepMV.</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Multiplicación a partir de muestras de campo.</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Presencia del virus del mosaico del pepino PepMV en los tratamientos.</b>	<b>41</b>
<b>4.4 Evaluación de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> sp. en el control preventivo del virus del mosaico del pepino, PepMV.</b>	<b>42</b>
4.4.1 Severidad de la enfermedad.	42
4.4.2 Incidencia de la enfermedad.	44
<b>4.5. Efectos del <i>Virus del mosaico del pepino</i> (PepMV) sobre el crecimiento</b>	

<b>vegetativo en las plantas de tomate variedad María Italia.</b>	<b>47</b>
<b>4.5.1. Altura de plantas.</b>	<b>47</b>
<b>4.5.2. Peso fresco, seco y porcentaje de materia seca de las plantas.</b>	<b>51</b>
<b>4.5.3. Número de hojas por planta.</b>	<b>58</b>
<b>4.6. Determinación de la presencia del virus PepMV en los tratamientos a través de la técnica DAS-ELISA.</b>	<b>60</b>
<b>4.6.1 Resultado de los análisis DAS-ELISA (Double antibody sándwich- Enzyme Linked Inmunosorbent Assay) para detección de PepMV.</b>	<b>60</b>
<b>4.7 Determinación de la presencia del virus PepMV en los tratamientos a través del análisis RT-PCR.</b>	<b>63</b>
<b>V. CONCLUSIÓN.</b>	<b>69</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>71</b>
<b>VII. ANEXOS.</b>	<b>83</b>

## INDICE DE CUADROS.

	<b>Páginas</b>
<b>Cuadro 2.1.</b> Clasificación taxonómica del tomate.	<b>3</b>
<b>Cuadro 3.1:</b> Definiciones de escalas de severidad.	<b>35</b>
<b>Cuadro 3.2:</b> Tratamientos evaluados en el ensayo de determinación del efecto de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp. como inductores de resistencia a <i>Pepino mosaic virus</i> , PepMV, en plantas de tomate a virus.	<b>37</b>
<b>Cuadro 4.1:</b> Resultados DAS ELISA realizados a plantas de tomate inoculadas con aislados de <i>Pepino mosaic virus</i> , PepMV obtenidos en el campo.	<b>40</b>
<b>Cuadro 4.2:</b> Efecto del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) sobre peso fresco, seco y porcentaje de materia seca en tomate. Plantas inoculadas con el virus, con aplicación pre-inoculación de <i>Trichoderma</i> spp., y <i>Bacillus</i> spp.	<b>54</b>
<b>Cuadro 4.3:</b> Resultado prueba RT-PCR para muestras de tomate inoculadas con PepMV, tratadas previamente con biocontroladores.	<b>63</b>

## INDICE DE FIGURAS.

	Páginas
<b>Figura 2.1:</b> Fotografía de una flor de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).	4
<b>Figura 2.2:</b> Partículas flexuosas de PepMV observadas al microscopio electrónico.	7
<b>Figura 2.3:</b> Representación esquemática de la organización del genoma del PepMV.	7
<b>Figura 2.4:</b> Fotografías de secciones ultrafinas del mesófilo, obtenidas al ME de inclusiones en resina Spurr de hojas de tomate infectadas con PepMV.	11
<b>Figura 2.5:</b> Diferentes mosaicos en hojas causados por PepMV: a) fuerte mosaico verde disperso en el foliolo, b) clorosis intervenal leve, c) distintos grados de mosaico amarillo, d) aparición del mosaico amarillo en bandas en las hojas, e) clorosis irregular en el foliolo.	13
<b>Figura 2.6:</b> Sintomatología necrótica característica causada por el virus PepMV en tomate, la llamada necrosis café se caracteriza por a) una extensa necrosis en las hojas avanzando desde el borde al peciolo de la hoja que se va quemando, dando como resultando una hoja seca por completo; b) manchas necróticas de color marrón en los frutos verdes; c) aparición de rayas o estrías necróticas en el raquis de las hojas, d) en los sépalos de la fruta; e) marchitez y necrosis desde el ápice de la hoja; f) hojas cloróticas con necrosis intervenal.	14
<b>Figura 2.7:</b> a) mosaico dorado brillante en hojas, b) estrías longitudinales de color amarillo en tallo, y c) estrías longitudinales de color amarillo en sépalos y pedúnculos de los frutos.	14
<b>Figura 2.8:</b> Deformaciones en hojas causadas por PepMV: a) grandes ampollas en el limbo foliar; b) ampollas en la superficie del limbo foliar de color verde oscuro en hojas con fuerte clorosis intervenal; c) dispersión de grandes ampollas en el limbo foliar; d) hojas filiformes provocadas por PepMV. e) ligero acusamiento del ápice del foliolo; f) alargamiento y estrechamiento muy fuerte de los foliolos de las hojas de la zona apical conocido como “nettle-like head”.	15
<b>Figura 2.9:</b> Síntomas que se presentan en frutos de tomate relacionados con la infección por PepMV. a) Los frutos a veces muestran decoloración con patrones de mosaicos de color amarillo- rojo, denominado “marbling” más severo, y b) en menor grado, c) “marbling”; d) Manchado de fruto maduro; e) maduración irregular; f) frutos de una misma planta infectada con PepMV que presentan distintos síntomas: marbling, maduración irregular y manchado necrótico.	16
<b>Figura 2.10:</b> Síntomas ocasionados por PepMV en malezas. a) Mosaico amarillo, amarillez en venas y deformación de hojas de <i>Rumex sp.</i> ; b) Infección asintomática en <i>Sonchus oleraceae</i> .	18
<b>Figura 3.1:</b> Infraestructura de cubierta del ensayo. a) Invernadero de ensayos de la estación experimental “Panguilemo”; b) Invernadero de estructura metálica cubierta con polietileno de tres temporadas, con ventilación y sistema de calefacción automáticos; c) Estructura interna de madera cubierta con malla antiáfidos en donde se mantuvieron aisladas las plantas inoculadas con PepMV.	31
<b>Figura 3.2:</b> Plantas con 4 hojas verdaderas adquiridas en la empresa <i>Serviplant</i> Ltda.	32
<b>Figura 3.3:</b> Materiales utilizados en el ensayo. a) Preparación de sustrato con aplicación de urea y superfosfato triple como fertilización base; b) bolsas de polietileno con mezcla de tierra de hoja, perlita y turba, utilizados como sustrato de plantas de tomate; c) trasplante de plantas de tomate al estado de 4 hojas verdaderas.	32
<b>Figura 3.4:</b> Disposición espacial de plantas por cada tratamiento, a) malla antiáfido protectora; b) plantas distanciadas a 1 m. de longitud entre una y otra.	33
<b>Figura 3.5:</b> Aplicaciones de biocontroladores, a) aplicación al sustrato de una suspensión de	

biocontroladores; b) aplicación foliar de biocontroladores.	34
<b>Figura 3.6:</b> Niveles de severidad de PepMV en tomate, a) Nivel 0: sin síntoma; b) Nivel 1: clorosis intervenal y moteado leve; c) Nivel 2: clorosis intervenal y moteado severo; d) Nivel 3: clorosis intervenal severa con moteado y mosaico severo acompañado de necrosis.	35
<b>Figura 4.1:</b> Área de muestreo de invernaderos con el cultivo de tomate en la localidad de Colín y Numpay, de la ciudad de Talca.	38
<b>Figura 4.2:</b> Sintomatología viral de clorosis intervenal y moteado en hojas recolectadas en campo, a) Encarrujamiento y clorosis intervenal; b) Encarrujamiento y abullonamiento; c) Clorosis y moteado; d) moteado de foliolos.	39
<b>Figura 4.3:</b> Síntomas observados en plantas de tomate dispuestas en cámara de crecimiento e inoculadas con aislados de <i>Pepino mosaic virus</i> , PepMV obtenidos en el campo, a) clorosis intervenal; b) moteado clorótico; c) ampollamiento, d) ampollamiento y moteado clorótico; e) y f) acusamiento foliar; g) acusamiento y filimorfismo; h) e i) necrosis de hojas que termina en defoliación de la planta.	40
<b>Figura 4.4:</b> Inoculación viral a los tratamientos, a) pesaje de hojas; b) maceración de hojas con tampón en el mortero; c) extracto utilizado para la infección y d) infección mecánica en tratamientos.	41
<b>Figura 4.5:</b> Niveles de severidad de mosaico del pepino dulce observados en plantas de tomate inoculadas con PepMV bajo diferentes tratamientos de biocontroladores, a) Grado 0 de severidad; b) grado 1 de severidad; c) grado 2 de severidad y d) grado 3 de severidad.	42
<b>Figura N° 4.6:</b> Efectividad de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> sobre la severidad del virus PepMV en tratamientos con aplicación de biocontroladores ( <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp.) y virus PepMV a los 30 días post segunda inoculación viral.	43
<b>Figura N° 4.7:</b> Efectividad de <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> sobre la severidad del virus PepMV en tratamientos con aplicación de biocontroladores ( <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp.) y virus PepMV a los 45 días post segunda inoculación viral.	44
<b>Figura 4.8:</b> Evolución de la incidencia del virus del mosaico del pepino, PepMV, en tres fechas de evaluación de plantas de tomate tratadas con <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> .	45
<b>Figura 4.9:</b> Mediciones de altura de plantas, a) Forma de evaluación realizada en la primera y segunda medición de altura; b) forma de evaluación en la tercera medición de altura.	48
<b>Figura 4.10:</b> Diferencias en alturas entre los tratamientos evaluados y testigo absoluto.	49
<b>Figura 4.11:</b> Evolución de la altura de plantas de tomate inoculadas con <i>Pepino mosaic virus</i> , PepMV y tratadas con dos biocontroladores en preinoculación.	49
<b>Figura 4.12:</b> Medición de peso fresco y seco en los diferentes tratamientos, a) trozado de plantas; b) separación de la planta por órganos; c) pesaje diferenciado por órganos (hojas, tallo y raíz); d) secado en estufa para posteriormente medir peso seco.	51
<b>Figura 4.13:</b> Efecto del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) sobre el Porcentaje de materia seca (%) en tomate. Plantas inoculadas con el virus, con aplicación pre-inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. ó <i>Bacillus</i> spp.	54
<b>Figura 4.14:</b> Efecto del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) en el contenido y distribución de materia seca por órganos en tomate.	56
<b>Figura 4.15:</b> Efecto del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) sobre el número de hojas promedio en tomate durante tres fechas de evaluación. Plantas inoculadas con el virus, con	

tratamiento pre-inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. ó <i>Bacillus</i> spp.	59
<b>Figura 4.16:</b> Toma de muestras para la prueba de diagnóstico DAS-ELISA.	60
<b>Figura 4.17:</b> Valores de absorbancia para la prueba DAS ELISA a los 15, 30 y 45 días post segunda inoculación viral. Análisis de hojas de plantas inoculadas con PepMV, tratadas previamente con <i>Trichoderma</i> spp. ó <i>Bacillus</i> spp.	62
<b>Figura 4.18:</b> Gel de agarosa teñido con rojo cresol en el que se observan los fragmentos de unos 375 pb obtenidos por PCR.	65
<b>Figura 4.19:</b> Porcentaje de muestras positivas del análisis RT-PCR a plantas de tomate de la última evaluación DAS-ELISA. Análisis de hojas de plantas inoculadas con PepMV, tratadas previamente con <i>Trichoderma</i> spp. ó <i>Bacillus</i> spp.	66
<b>Figura 4.20:</b> Análisis de regresión lineal donde se enfrentan el análisis RT.PCR, absorbancia dada por el análisis DAS- ELISA y la Severidad	67

## INDICE DE ANEXOS.

	<b>Página.</b>
<b>ANEXO 1:</b> Cronograma de actividades ensayos PepMV en tomates María Italia.	<b>84</b>
<b>ANEXO 2:</b> Protocolo de Extracción de RNA Totales.	<b>85</b>