

Utilisation et adaptation du système sPAGE pour la détection des viroïdes en Corse.

Marie-Line CARUANA, M. NICOLI et C. CHABRIER*

UTILIZATION AND ADAPTATION OF THE sPAGE TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF CITRUS VIROIDE IN CORSICA.

Marie Line CARUANA, M. NICOLI and C. CHABRIER.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 174-180.

ABSTRACT - Thus far, the indexation of viroids was performed through bioassays on indicator plants, the procedure requiring one or two years.

The technique of successive electrophoresis on 5% polyacrylamide gel (sPAGE (DURAN VILA *et al.*, 1988) is a new reliable and sensitive tool for the detection of viroids in suspected citrus plants, 6 months after they have been inoculated on Etrog 861-S1 citron cultivated in a warm greenhouse (30°C). Citron is known to be very sensitive to viroids.

The technique is being applied routinely on the accessions of the SRA Station. Various experiments are still in progress however for an optimal use of the technique under the conditions of Corsica. The objective is to determine the best season for the graft inoculation on Citron and the time lag requested for unambiguous viroid detection. Our first results indicate that the indexation of viroids can be carried out on a minimum duration of three months. This new technique is far more expedient than the previous one based on bioassays.

INTRODUCTION

Les viroïdes sont les plus petits agents pathogènes connus des plantes. Ce sont des molécules d'ARN monocaténaire de faible masse moléculaire, non encapsidées, circulaires et linéaires ayant *in vivo* une forte structure secondaire. Leur taille varie de 246 à 371 nucléotides. Leur lieu de multiplication est le noyau cellulaire. Ils sont transmissibles mécaniquement et par greffage.

Au sein des agrumes, les viroïdes apparaissent toujours sous forme de complexe de viroïdes. Douze viroïdes distincts ont cependant pu être isolés. Ils ont été classés en

UTILISATION ET ADAPTATION DU SYSTEME sPAGE POUR LA DETECTION DES VIROIDES EN CORSE.

Marie Line CARUANA, M. NICOLI et C. CHABRIER.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 174-180.

RESUME - Le programme de sélection de variétés d'agrumes indemnes de maladies de dégénérescence connues (virus, viroïdes, mycoplasmes, bactéries endogènes) de la Station INRA/IRFA de San Giuliano (Corse) comporte un volet «Indexation Viroïdes» basé jusqu'à présent sur l'indexation biologique (1 à 2 ans).

La méthode des électrophorèses successives en gel de polyacrylamide 5 p. 100 (sPAGE) (DURAN VILA *et al.*, 1988) permet de façon fiable et sensible de mettre en évidence la présence de viroïdes dans les plants d'agrumes suspectés, 6 mois après leur inoculation en serre chaude (30°C) au cédratier Etrog 861-S1 (plante très sensible à ce pathogène).

La maîtrise de cette méthode et son utilisation en routinier sont déjà efficaces. Toutefois, différents essais ont été entrepris dans le but de définir les meilleures conditions d'indexation en Corse : période favorable d'inoculation des cédratiers et temps de latence nécessaire pour une indexation certaine en sPAGE.

Les résultats obtenus devraient permettre une indexation viroïdes rapide (\leq à 3 mois) et par là même une meilleure rentabilité de la serre.

5 groupes selon des critères biophysiques et biologiques (figure 1) (DURAN VILA *et al.*, 1988). La pathogénicité n'a été établie que pour trois d'entre eux le CEV (Citrus Exocortis Viroid), le CV IIb et CV IIc. Le CEV est l'agent responsable de l'exocortis (BROADBENT et GARNSEY, 1987 ; SCHLEMMER *et al.*, 1985 ; SEMANCIK, 1980 ; VISVADER et SYMONS, 1983) et les CV IIb et IIc de la cachexie-xyloporose (ROISTACHER, 1983 ; SEMANCIK *et al.*, 1988). Le rôle et la nature de la présence des autres viroïdes est en cours d'étude.

Le programme de sélection de variétés d'agrumes indemnes de maladies de dégénérescence connues (virus, viroïdes, mycoplasmes, bactéries endogènes) de la station INRA/IRFA de San Giuliano (Corse) comporte un volet «Indexation viroïdes» basé jusqu'à présent sur l'indexation biologique. Elle faisait appel au cédratier Etrog 861-S1 et au mandarinier Parson spécial, greffés tous deux sur C.

* - CARUANA - CIRAD-IRFA - Laboratoire LPRC - B.P. 5035 34032 MONTPELLIER CEDEX 01
NICOLI et CHABRIER - Station de Recherches Agronomiques San Giuliano - 20230 SAN NICOLAO (Haute Corse).

FIGURE 1 - Groupes de spécificité des viroïdes des agrumes.**Groupe CEV : Agent responsable de l'Exocortis****GROUPE I :**CV Ia
CV Ib**GROUPE II :**CV IIa
CV IIb } Agents responsables de la Cachexie-Xyloporose
CV IIc } C Ca V**GROUPE III :**CV IIIa
CV IIIb
CV IIIc
CV IIId**GROUPE IV :**CV IVa
CV IVb

CEV : Citrus Exocortis Viroïd

CV : Citrus Viroïd

C Ca V : Citrus Cachexia Viroïd.

volkameriana, comme plantes indicatrices respectives de l'exocortis (et des viroïdes en général) et de la cachexie-xyloporose. Outre la longueur des délais d'indexation, 1 à 2 ans minimum, certains viroïdes (groupe II, III) ne présentaient pas ou peu de symptômes sur cédratier (figure 2).

Le risque de propager des agents pouvant être infectieux et les délais d'indexation ont orienté la station de San Giuliano à utiliser une méthode de détection plus performante.

La méthode, développée par DURAN-VILA *et al.*, 1988, constituée d'une extraction d'acides nucléiques et d'électrophorèses successives en gel de polyacrylamide 5 p. 100 (sPAGE), permet d'identifier la présence ou l'absence de viroïdes, quels qu'ils soient, dans les plants d'agrumes analysés, **6 mois** après leur inoculation en serre chaude (30°C) au cédratier Etrog 861-S1.

Dans le but de maîtriser cette méthode, et d'en définir les meilleures conditions d'utilisation en Corse, favorisant son emploi routinier comme méthode d'indexation des viroïdes, plusieurs expériences ont été envisagées. Les premiers résultats sont présentés ci-dessous.

MATERIELS ET METHODES**Origine du matériel végétal.**

- Cédratiers.

Les cédratiers sélectionnés sont les cédratiers Etrog 861-S1, greffés sur *Citrus volkameriana* comme porte-greffe. Ce matériel est cultivé sous serre chaude 32°C.

- Collection des viroïdes.

Les cédratiers, constituant cette collection, multiplient de façon unique les onze viroïdes disponibles. Ils ont été infectés par greffage d'écusson, à partir de rameaux issus de la collection de viroïdes du Dr DURAN-VILA (IVIA, Espagne).

Inoculations des viroïdes.

L'inoculum est constitué d'écussons d'écorce, deux types d'inoculation sont pratiqués :

- Inoculation différée (ID) = le cédratier est greffé en premier sur le porte-greffe, l'inoculum est greffé sur le cédratier après un temps nécessaire au développement de ce dernier ;

- Inoculation simultanée (IS) = le cédratier et l'inoculum sont greffés en même temps sur le porte-greffe. L'oeil de cédratier est placé entre deux écussons d'inoculum.

Extraction d'acides nucléiques enrichis en viroïdes.

Les jeunes pousses (feuilles et tiges) issues de cédratiers inoculés d'au moins 6 mois sont broyées dans un tampon d'extraction contenant 0,4 M Tris - HCl pH 8,9, 1 p. 100 SDS, 5mM EDTA pH 7,0, 4 p. 100 2-mercaptoéthanol en présence de phénol saturée en eau (SEMANCIK *et al.*, 1975). Les acides nucléiques totaux obtenus sont alors fractionnés dans du chlorure de Lithium 2M. La fraction soluble, enrichie en viroïdes, est concentrée par précipitation à l'éthanol.

Détection des viroïdes.

Les fractions enrichies en viroïdes sont analysées après électrophorèses successives en gel de polyacrylamide 5 p. 100 (sPAGE 5 p. 100). Après une première électrophorèse (PAGE) en condition standard, une bande du gel, délimitée par la migration de deux colorants (le xylène cyanol et le bleu de bromophénol), est découpée et placée en haut d'un deuxième gel dénaturant dPAGE (pH 6,5, contenant de l'urée 8M). Cette deuxième électrophorèse en conditions dénaturantes (dPAGE, tampon d'électrophorèse pH 8,3) permet une séparation significative des molécules ARN viroïdes circulaires des autres molécules d'ARN de petite taille (ARN linéaires viroïdes, ribosomiques, etc.) (FLORES *et al.*, 1985 ; RIVERA-BUSTAMANTE *et al.*, 1986).

Après coloration au nitrate d'argent des acides nucléiques (SCHUMACHER *et al.*, 1986), la détection des viroïdes est réalisée par observation de la présence ou de l'absence de ces bandes circulaires d'ARN dans la première moitié supérieure du gel (DURAN-VILA *et al.*, 1988).



FIGURE 2 - Symptômes caractéristiques de la multiplication des viroïdes dans le cédratier Etrog 861-S1.

A : CV IIb, sans symptôme, 8 mois après inoculation.

B : CV Ia, épinastie prononcée, 3 mois après inoculation.

C : CEV, 2 mois après inoculation.

D : CV IV, brunissement de la nervure principale, 4 mois après inoculation.

RESULTATS

Identification des viroïdes de la collection viroïdes Corse.

Les expériences sont réalisées à partir d'échantillons extraits de la collection de cédratiers sains et de la collection viroïdes de Corse.

Les résultats sont présentés sur la figure 3.

Des bandes nettes et uniques sont présentes dans la zone de migration des ARNs viroïdes forme circulaire pour tous les extraits issus de la collection viroïdes. L'échantillon CV Ia (piste 3) présente toutefois, deux bandes nettes ; la bande supérieure ayant une migration similaire à celle du CEV. L'observation des symptômes développés en serre et l'apparition de cette bande surnuméraire confirme la contamination du plant par l'exocortis. Aucune bande n'apparaît dans cette même zone pour les extraits sains. Les profils électrophorétiques, correspon-

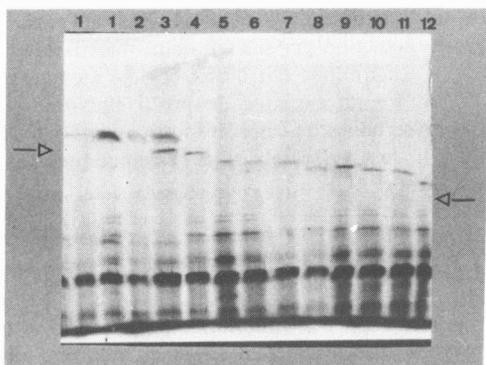


FIGURE 3 - Profil électrophorétique sPAGE des acides nucléiques extraits à partir de la collection «Viroïdes» Corse.

- | | | |
|-------------|-------------|--------------|
| 1 : CEV 117 | 5 : CV IIa | 9 : CV IIIb |
| 2 : CEV 129 | 6 : CV IIb | 10 : CV IIIc |
| 3 : CV Ia | 7 : CV IIc | 11 : CV IIId |
| 4 : CV Ib | 8 : CV IIIa | 12 : CV IV |

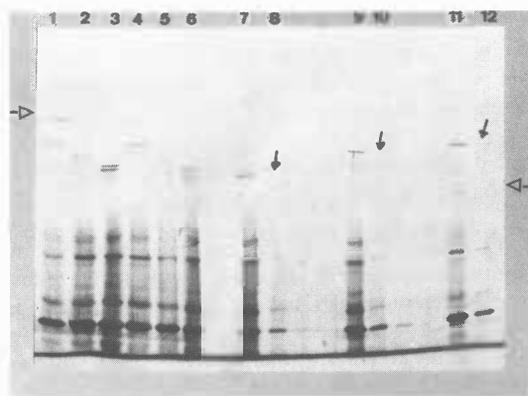


FIGURE 4 - Profil électrophorétique sPAGE d'échantillons contenant des viroïdes en mélange.

- | | | |
|---------------------------------|-------------------|----------------|
| 1 : CV Ia + Ib | 4 : CV Ib + IIa | 7, 8 : CV IV |
| 2 : CV IIa + IIb + IIc | 5 : CV IIc + IIIa | 9, 10 : CV IIa |
| 3 : CV IIIa + IIIb + IIc + IIId | 6 : CV IIId + IV | 11, 12 : CV Ib |

→ ← : zone de migration des ARN circulaires viroïdes
 → : ARN circulaire viroïdes.

dant en fait à des extraits enrichis et non purifiés en viroïdes, comportent de nombreuses bandes contaminantes d'origine végétale, dans la partie inférieure du gel.

Identification des viroïdes en mélange.

Des électrophorèses sont réalisées à partir d'échantillons constitués d'un mélange de viroïdes, au stade final de l'extraction.

Les profils électrophorétiques représentés (figure 4) sont obtenus à partir d'échantillons correspondant à des

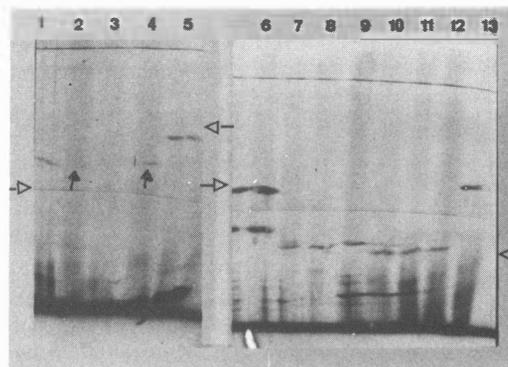


FIGURE 5 - Profil électrophorétique en sPAGE d'échantillons lyophilisés.

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| 1 : CV IIb f | 7 : CV IIa f |
| 2 : CV IIb I TE = 5 ml | 8 : CV IIa I TE = 5 ml |
| 3 : CV IIb I TE = 10 ml | 9 : CV IIa I TE = 10 ml |
| 4 : CV IIb I TE = 15 ml | 10 : CV IIc f |
| 5, 13 : CEV f | 11 : CV IIc I TE = 5 ml |
| 6 : CV Ia f | 12 : CV IIc I TE = 10 ml |

f : échantillon frais
 I : échantillon lyophilisé
 TE : tampon d'extraction

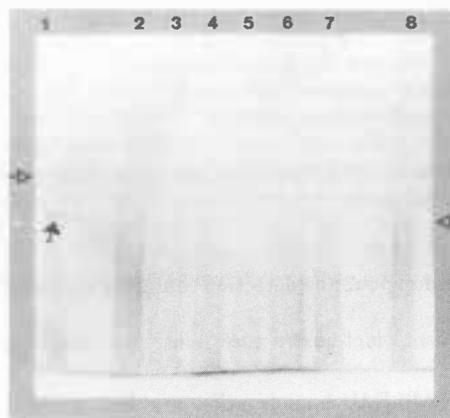


FIGURE 6 - Indexation routinière sPAGE effectuée en Corse.

- 1 : CV IIb témoin
 2 > 8 : accessions SRA en indexation.

mélanges de 5 µl d'extraits enrichis en viroïdes. Un nombre de bandes distinctes correspondant au nombre de viroïdes en mélange est obtenu pour les échantillons 2, 4, 5 et 6. Les échantillons 7-8, 9-10 et 11-12 représentent des témoins de migration d'un seul viroïde, respectivement CV IV, CI IIa et CV Ib.

L'échantillon 1, mélange de 2 viroïdes, présente 3 bandes. Ceci s'explique par le fait de l'utilisation du CV Ia qui apparaît au cours de nos expériences sous forme de deux bandes.

L'échantillon 3, mélange de 4 viroïdes distincts (figure

3), a un profil électrophorétique contenant seulement 2 bandes. Ces bandes sont intenses et les viroïdes du groupe III ayant une taille similaire, correspondent à une mobilité électrophorétique très proche.

Identification des viroïdes à partir d'échantillon lyophilisé.

Une grande quantité de matériel végétal est en attente d'«indexation viroïde» sous forme lyophilisée. La méthode d'extraction étant décrite pour du matériel frais, quelques modifications sont envisagées pour le matériel lyophilisé. L'extraction à partir d'1 g d'échantillon et 15 ml de phénol est réalisée pour 3 volumes de tampon d'extraction différents : 5 ml, 10 ml et 15 ml. Le culot final est remis en suspension dans 150 μ l de tampon TKM.

Les viroïdes du groupe II, les plus délicats à extraire et à mettre en évidence par sPAGE, sont lyophilisés (l) et utilisés pour cette étude. Les résultats sont illustrés sur la figure 5.

Des bandes nettes apparaissent pour le CV IIa (piste 8,9) et le CV IIc (piste, 11, 12). Quel que soit le volume de tampon d'extraction employé. Elles sont de plus comparables à celles obtenues à partir de matériel frais (f) (CV IIa, piste 7 ; CV IIc, piste 10).

Le CV IIb, ne présente de bandes que pour les volumes de 5 et 15 ml de tampon d'extraction (piste 2, 4) avec une bande nette, répétitive et comparable au matériel frais (piste 1) pour le volume de 15 ml.

Ce volume est retenu pour les extractions d'échantillons lyophilisés.

Utilisation pour une détection routinière en Corse.

Cinq cent vingt-quatre accessions, sous forme de maté-

riel frais ou lyophilisé, doivent être traitées au plus vite. La méthode de détection par sPAGE étant maîtrisée, une cinquantaine d'échantillons ont d'ores et déjà été indexés. La figure 6 montre un exemple de profil électrophorétique obtenu pour certaines de ces accessions, apparues indemnes de viroïdes ; le CV IIb est utilisé systématiquement comme contrôle du sPAGE.

Adaptation aux conditions de la Corse.

La connaissance des conditions d'indexation en Corse pour une année doit permettre d'évaluer, selon les périodes d'inoculation et le mode d'inoculation, le temps de latence nécessaire à la multiplication du viroïde dans le cédratier, permettant une indexation certaine en sPAGE \leq à 6 mois. Ceci dans le but d'une meilleure rentabilité de la serre chaude.

Le protocole d'étude suivant a été mis en place. Tous les viroïdes de la collection sont utilisés comme source d'inoculum ; deux modes d'inoculation sont pratiqués : l'inoculation simultanée (IS) et l'inoculation différée (ID) (cf Matériel et méthodes) ; les trois périodes d'inoculation choisies sont mars, juin et septembre correspondant au printemps, à l'été et à l'automne ; l'essai de détection viroïde par sPAGE débute un mois après l'inoculation et est renouvelé tous les mois jusqu'à 6 mois.

Les premiers résultats obtenus pour l'inoculation printemps sont notés dans le tableau 1.

• La majorité des viroïdes, inoculés selon le mode ID, sont détectés dès le 2e mois. Seuls les viroïdes du groupe II présentent des bandes fines de faible intensité. La présence de ces bandes est confirmée le mois d'après, pour le CV IIa et CV IIb (bandes nettes), le CV IIc apparaissant toujours plus faiblement.

L'inoculation selon le mode IS, permet la détection de tous les viroïdes, à l'exception du CV IIIId, 3 mois après

TABLEAU 1 - Indexation en sPAGE des viroïdes de la collection inoculés au printemps, mode ID et IS.

	CEV 117	CEV 129	CV Ia	CV Ib	CV IIa	CV IIb	CV IIc	CV IIIa	CV IIIb	CV IIIc	CV IIIId	CV IV
ID												
1er mois	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
2e mois	-	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+
3e mois	-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
4e mois	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5e mois	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6e mois												
IS												
1er mois	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2e mois	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3e mois	nd	nd	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	-	+
4e mois	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5e mois	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6e mois												

nd : non déterminé

+ : présence de bandes viroïdes

+/- : bandes viroïdes fines, de faible intensité

- : absence de bandes viroïdes

TABEAU 2 - Temps nécessaire à l'indexation en sPAGE et observation visuelle des symptômes, des viroïdes de la collection inoculés au printemps, mode ID et IS.

	CEV	CV Ia	CV Ib	CV IIa	CV IIb	CV IIc	CV IIIa	CV IIIb	CV IIIc	CV IIId	CV IV
ID											
sPAGE	2 *	2	1	2/3	2/3	3/4	1	1	1	2	2
Obs. visuelle	1 *	4	6	>6	>6	>6	>6	6	6	6	6
IS											
sPAGE	nd	3	3	3/4	3/4	3/4	3	3	3	nd	3
Obs. visuelle	3	2	2	>6	>6	>6	>6	4	6	6	4

* : en mois après inoculation.

inoculation. Comme pour le mode ID, les viroïdes du groupe II apparaissent tout d'abord faiblement.

- Une indexation par observation visuelle des symptômes est réalisée, parallèlement à la détection par sPAGE. Un plant est considéré comme positif dès qu'il présente des symptômes nets et caractéristiques (épinastie, nanisme, brunissement des nervures ou du pétiole, courbure du pétiole, ...) même sur une seule feuille, contrairement à une indexation visuelle classique.

Le tableau 2 rapproche les résultats obtenus, de ces deux types d'indexation. A l'évidence la détection par sPAGE est plus rapide, sensible et homogène au sein des viroïdes que l'observation visuelle.

Les viroïdes du groupe II ne présentent toujours pas de symptômes après 6 mois alors que leur détection par sPAGE, témoin de leur multiplication, est réalisé au 3^e mois après inoculation mode ID et 4^e mois mode IS.

Quel que soit le mode d'inoculation le CV IIIa développe une très légère épinastie et un brunissement de nervure seulement au bout de 6 mois alors que sa détection par sPAGE est établie dès le 1^{er} mois après inoculation mode ID et le 3^e mois mode IS.

CONCLUSIONS - DISCUSSIONS

La technique de détection des viroïdes dans les agrumes, développée par le Dr N. DURAN-VILA *et al.*, 1988, est maintenant maîtrisée en Corse. Cette méthode permet par la mise en évidence de la présence de leur ARN circulaire, une indexation rapide et sensible de ces pathogènes. Elle est, de plus, relativement résolutive et permet de les distinguer seuls ou en mélange. Toutefois l'identification ciblée d'un type de viroïde nécessite une analyse plus approfondie soit par l'emploi de sondes spécifiques, soit au travers de viroïdes identifiés, utilisés comme marqueurs.

Les adaptations envisagées de cette méthode aux besoins de la station de Corse vont permettre, d'une part l'indexation des accessions lyophilisées en attente, d'autre part, une rentabilité raisonnée de la serre chaude. En effet, bien que les résultats énoncés ne soient que préliminaires, une réduction de deux mois du temps d'indexation semble tout à fait compatible avec une indexation sûre et sensible pour des inoculations de printemps, en favorisant l'inoculation selon le mode ID.

La suite de ces expérimentations est en cours d'étude.

BIBLIOGRAPHIE

BROADBENT (P.) and GARNSEY (S.M.). 1987. «Citrus Exocortis». In *the viroids*, p. 235-245. Ed. T.O. Diener Plenum Press New York.

DURAN-VILA (N.), ROISTACHER (C.N.), RIVERA-BUSTAMANTE (R.) and SEMANCIK (J.S.). 1988. A definition of citrus viroid groups and their relationship to the Exocortis disease. *J. gen. Virol.*, 69, 3069-3080.

FLORES (R.), DURAN-VILA (N.), PALLAS (V.), SEMANCIK (J.S.). 1985. Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevine. *J. gen. Virol.*, 66, 2095-2102.

RIVERA-BUSTAMANTE (R.F.), GIN (R.) and SEMANCIK (J.S.). 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Analytical Biochemistry*, 156, 91-95.

ROISTACHER (C.N.). 1983. Cachexia disease : virus or viroid ?. *Citrograph*, 68, 111-113.

SCHLEMMER (A.), ROISTACHER (C.N.) and SEMANCIK (J.S.). 1985. A unique infection RNA associated with citron, showing symptoms typical of citrus exocortis disease. *Phytopathology*, 75, 946-949.

SCHUMACHER (J.), MEYER (N.), RIESNER (D.) and WEIDEMANN (H.L.). 1986. Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by «Return» - Gel electrophoresis. *J. Phytopathology*, 115, 332-343.

SEMANCIK (J.S.). 1980. Citrus exocortis viroid. *CMIIAAB description of plant viruses*, 226, 4.

SEMANCIK (J.S.), ROISTACHER (C.N.), RIVERA-BUSTAMANTE (R.) and DURAN-VILA (N.). 1988. Citrus cachexia viroid : a new viroid of citrus. Relationships to viroids of the exocortis disease group. *J. gen. Virol.*, 69, 3059-3068.

SEMANCIK (J.S.), MORRIS (T.J.), WEATHERS (L.G.), RORDORF (G.F.) and KEARNS (D.R.). 1975. Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology*, 63, 160-167.

VISVADER (J.E.) and SYMONS (R.H.). 1983. Comparative sequence and structure of different isolates of citrus exocortis viroid. *Virology*, 232-237.

UTILIZACION Y ADAPTACION DEL SISTEMA sPAGE PARA LA DETECCION DE LOS VIROIDES DE LOS CITRICOS EN CORCEGA.

Marie-Line CARUANA, N. NICOLI y C. CHABRIER.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 174-180.

RESUMEN - El programa de selección de las variedades de cítricos indemnes de enfermedades de degeneraciones conocidas (virus, viroides, micoplasmas, bacterias endógenas) de la Estación INRA/IRFA de San Giuliano (Córcega) incluye una parte «Ajustamiento Viroides basada hasta la presente sobre el ajustamiento biológico (1 a 2 años).

El método de las electrofóresis sucesivas en gel de poliacrilamida 5% (sPAGE) (DURAN VILA *et al.*, 1988) permite de manera fiable y sensible poner en evidencia la presencia de viroides en las plantas de cítricos sospechadas. 6 meses después de su inoculación en invernadero caliente (30°C) al cidro Etrog 861-S1 (planta muy sensible a este patógeno).

El dominio de este método y su utilización en rutinario son ya eficientes. Sin embargo, diferentes pruebas han sido emprendidas con vistas de determinar las mejores condiciones de ajustamiento en Córcega : período favorable de inoculación de los cidros y tiempo de estado latente necesario para un ajustamiento seguro en sPAGE.

Los resultados obtenidos deberían permitir un ajustamiento viroides rápido (\leq 3 meses) y así mismo una mejor rentabilidad del invernadero.