

CAPITULO VI

LOCALIZACIÓN DE *Beet pseudo-yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus* Y *Lettuce infectious yellows virus* EN SUS INSECTOS VECTORES*

* Este trabajo forma parte de la publicación 'Subcellular localization of *Cucurbit yellow stunting disorder crinivirus* (CYSDV) in plant and its vector *Bemisia tabaci*' Rodrigo, G., Livieratos, I., Coutts, R., Medina, V. (en fase de redacción)

1. INTRODUCCIÓN

El elevado grado de especificidad que muestran algunos virus por sus vectores, junto con las diferencias que se observan en los lugares de retención y acumulación viral implican la existencia de una asociación muy estrecha en algunos casos (van del Heuvel *et al.*, 1999). En general, la transmisión de modo semipersistente de virus se asocia con una relación temporal entre el virus y el vector, en la que el primero permanece en los primeros tramos del canal alimentario del vector y es transmitido mediante el proceso de regurgitación que tiene lugar durante la alimentación (López-Moyá y López-Abella, 1996).

Ammar (1991) sugiere que en el modo de transmisión semipersistente las partículas virales no pasan de forma pasiva a través del canal alimentario, sino que existen puntos de retención específicos. Este autor recopila distintos estudios realizados en pulgones y cicadélidos, en los que se muestra una asociación de las partículas virales con la capa de cutícula que recubre la faringe y con la que recubre el intestino anterior, como ocurre en el caso del virus del enanismo clorótico del maíz (*Maize chlorotic dwarf virus*) (Gén. *Wiakavirus*) transmitido por el cicadélido *Graminella nigrifons* (Forbes), en el que además, las partículas virales también se localizan en el canal alimentario de la maxila. Pero, no todos los virus transmitidos de modo semipersistente se asocian con el inicio del canal alimentario, ya que las partículas virales del virus esférico del tungro del arroz (*Rice tungro spherical virus*) (Gén. *Waikavirus*) se han localizado en las glándulas salivares de su vector *Nephotettix virescens* (Distant) (Medina *et al.*, 1994).

Tanto *T. vaporariorum* como *B. tabaci* transmiten de modo semipersistente distintos *Crinivirus* pero, además, esta última especie también transmite de modo persistente virus circulativos pertenecientes al género *Begomovirus*. Los estudios realizados por Hunter *et al.* (1998) y Medina *et al.* (2001) muestran la presencia de algunos virus de este género en la cámara filtrante, intestino medio y glándulas salivares, existiendo un recorrido por el cuerpo del vector semejante al descrito para algunos virus persistentes en pulgones; por lo que parece probable pensar, que para que la transmisión de

Crinivirus sea semipersistente algún factor, viral o propio de *B. tabaci*, esté limitando o impidiendo la entrada de estos virus en el interior del cuerpo del insecto.

Para acabar de definir las relaciones que establecen los virus inductores del amarilleo de las cucurbitáceas con sus vectores, se plantea la localización de BPYV y CYSDV, así como la de LIYV, en sus respectivos vectores, y de este modo seleccionar y ajustar un modelo para la transmisión semipersistente por moscas blancas de entre los propuestos en vectores homópteros.

2. OBJETIVOS

- Comparar dos procesos de inclusión de insectos utilizados en inmunolocalización de proteínas
- Reconocer los lugares de transporte y/o circulación de *Crinivirus* en sus insectos vectores mediante detección directa de BPYV, CYSDV y LIYV
- Ajustar un modelo de transmisión de *Crinivirus* por moscas blancas

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Insectos

Se dispuso de ejemplares de *T. vaporariorum* y de *B. tabaci* alimentados durante 24 h sobre plantas infectadas con BPYV, LIYV y CYSDV, y también con moscas alimentadas durante los mismos períodos sobre plantas sanas. Los insectos con LIYV, por las razones comentadas en otros capítulos, ya estaban de origen en fijador o incluidas en resina.

3.2. Técnicas microscópicas

Todos los ejemplares de moscas blancas, tanto virulíferos como no virulíferos se incluyeron en resina para su examen al MET, del mismo modo que el material vegetal

(ver capítulo V, apartado 3.2.), eliminando alas y patas para conseguir una mejor penetración de fijador y resina, y en parafina para realizar ISH, tal y como describen Jackson (1992). Para la realización de estas experiencias y para comparar con el proceso de inclusión en frío tradicional, se dispuso, además, de ejemplares *B. tabaci* con LIYV ya procesados en resina de acuerdo con un protocolo de inclusión rápido descrito por Gilberson *et al.* (1997). En esta metodología para acortar la duración del proceso, la inclusión se realiza en un microondas modificando las condiciones de tiempo y temperatura. Las muestras se someten a una fijación sencilla con 2,5% GA en 100 mM tampón fosfato sódico de Sörensen durante 2,5 min a 37°C, y a continuación se deshidratan durante 15 min a 45°C. La infiltración se realiza durante 15 min a 50°C y la polimerización se completa en 15 min a 95°C en resina LR White de grado medio con lo que el tiempo de inclusión dura menos de 1 h, a diferencia del proceso explicado en el capítulo IV que puede llegar a durar hasta 4 días.

Los bloques se seleccionaron y orientaron, y en las secciones, independientemente de su finalidad, se realizaron observaciones preliminares al MO y al MET. El estudio se llevó a cabo con cinco bloques de inclusión para cada especie de mosca blanca y virus, observándose de 8-10 especímenes en cada estudio.

Los procesos de inmunomarcaje en las secciones ultrafinas se llevaron a cabo como describe VandenBosch (1992) y con antisueros purificados contra la CP de CYSDV y de LIYV previamente ensayados en el tejido vegetal (ver capítulo IV, apartado 3.2.5). Estos antisueros, previamente cruzados con material vegetal sano, se cruzaron de nuevo con extracto deshidratado y desecado de insectos no virulíferos, concretamente del cicadélido *Cicadulina mbila* (Naude) (proporcionado por Marion S. Pinner¹²) para eliminar en lo posible reacciones inespecíficas con el tejido del insecto.

Las pruebas de ISH, se realizaron como describen Morel y Cavalier (2000) y Rodríguez-Cerezo *et al.* (1999) (capítulo IV, apartados 3.2.5 y 6). Para estas pruebas se emplearon las sondas de ARN marcadas con DIG e hidrolizadas de BPYV y de CYSDV (ver capítulo I, apartado 3.2.2.2.1.1) ensayadas previamente en tejido vegetal.

¹² Dept of Virus Research (actual Dept. of Disease and Stress) John Innes Center, U.K

4. RESULTADOS

4.1. Observaciones preliminares

Al MET, en el caso de los insectos procesados de forma rápida, la preservación del tejido y el contraste de las membranas era relativamente mejor que en el caso de los insectos procesados a baja temperatura. En estos ejemplares incluidos de forma rápida, se detectó la presencia de un número elevado de organismos semejantes a bacterias de pequeño tamaño (0,5-1 μ).

En la observación previa de secciones ultrafinas de insectos virulíferos, para la realización posterior de pruebas de inmunomarcaje o de ISH, no se observaron partículas semejantes a virus en ninguno de los tramos del canal alimentario de estas moscas blancas.

Los bloques de parafina presentaron repetidos problemas de inclusión, que en la mayoría de los casos dificultaron la obtención de secciones semifinas por la retracción de la muestra en el interior del bloque.

4.2. Localización de *Beet pseudo-yellows virus* en *Trialeurodes vaporariorum*

Las ISH realizadas con la sonda de ARN de polaridad negativa mostraron la presencia de oro coloidal en todo el cuerpo del insecto que no permitieron diferenciar las posibles señales de hibridación específica (no mostrado). La modificación de las condiciones durante la hibridación, así como la incubación con ARNasa para eliminar los restos de sonda no hibridada y el aumento del agente de bloqueo durante la inmunodetección, tampoco permitieron localizar señales de hibridación específica.

4.3. Localización de *Cucurbit yellow stunting disorder virus* en *Bemisia tabaci*

CYSDV únicamente se localizó mediante inmunomarcaje en los insectos que se habían alimentado sobre plantas infectadas con este virus. Este marcate se localizó en los tramos iniciales del canal alimentario, en la luz del intestino anterior (Fig. 41 B), y en

algunos casos se observó estrechamente asociada a unas estructuras membranosas (Fig. 42). Estas estructuras, definidas por algunos autores como cristalinas, también se han observado en la luz intestinal del intestino medio ascendente de algunos insectos no virulíferos (Fig. 40). En el resto de tramos del aparato digestivo, cámara filtrante, intestino medio ascendente y descendente, íleon e intestino posterior, y en el sistema salivar, glándulas salivares primarias y accesorias y respectivos conductos salivares, no se observó marcaje, así como en el caso de los insectos no virulíferos.

En las experiencias de ISH con la sonda de polaridad negativa se observó marcaje inespecífico en todo el cuerpo del insecto, lo que no permitió localizar las posibles señales de hibridación específica. Estos resultados se observaron de nuevo después de modificar las condiciones de hibridación.

4.4. Localización de *Lettuce infectious yellows virus* en *Bemisia tabaci*

En las pruebas realizadas en las moscas blancas virulíferas, procesadas a baja temperatura, el inmunomarcaje se localizó en el interior de la bomba cibarial y, en la mayoría de los casos, asociado a material amorfo electrodenso que no estaba en contacto directo con las paredes de esta bomba (Fig. 43). Si bien, en ocasiones este material electrodenso no presentaba inmunomarcaje. En el resto de órganos y estructuras de la cabeza y del tórax se observó marcaje inespecífico en algunas áreas del tejido muscular del tórax (no mostrado). En las glándulas salivares primarias o accesorias no se observó inmunomarcaje.

En el abdomen, el inmunomarcaje se localizó en las células columnares de algunos tramos del intestino medio (Fig. 44 B-C). El oro coloidal apareció, generalmente, asociado al citoplasma y al extremo apical celular, siendo menos frecuente en la luz intestinal. Salvo en el tejido muscular, en el resto del aparato digestivo, intestino anterior, cámara filtrante e intestino posterior, y en los otros órganos y estructuras del abdomen no se observó marcaje. En los insectos no virulíferos también se observó marcaje en la musculatura.

En los insectos sometidos al proceso de inclusión rápido, tanto virulíferos como no virulíferos no se observó inmunomarcaje.

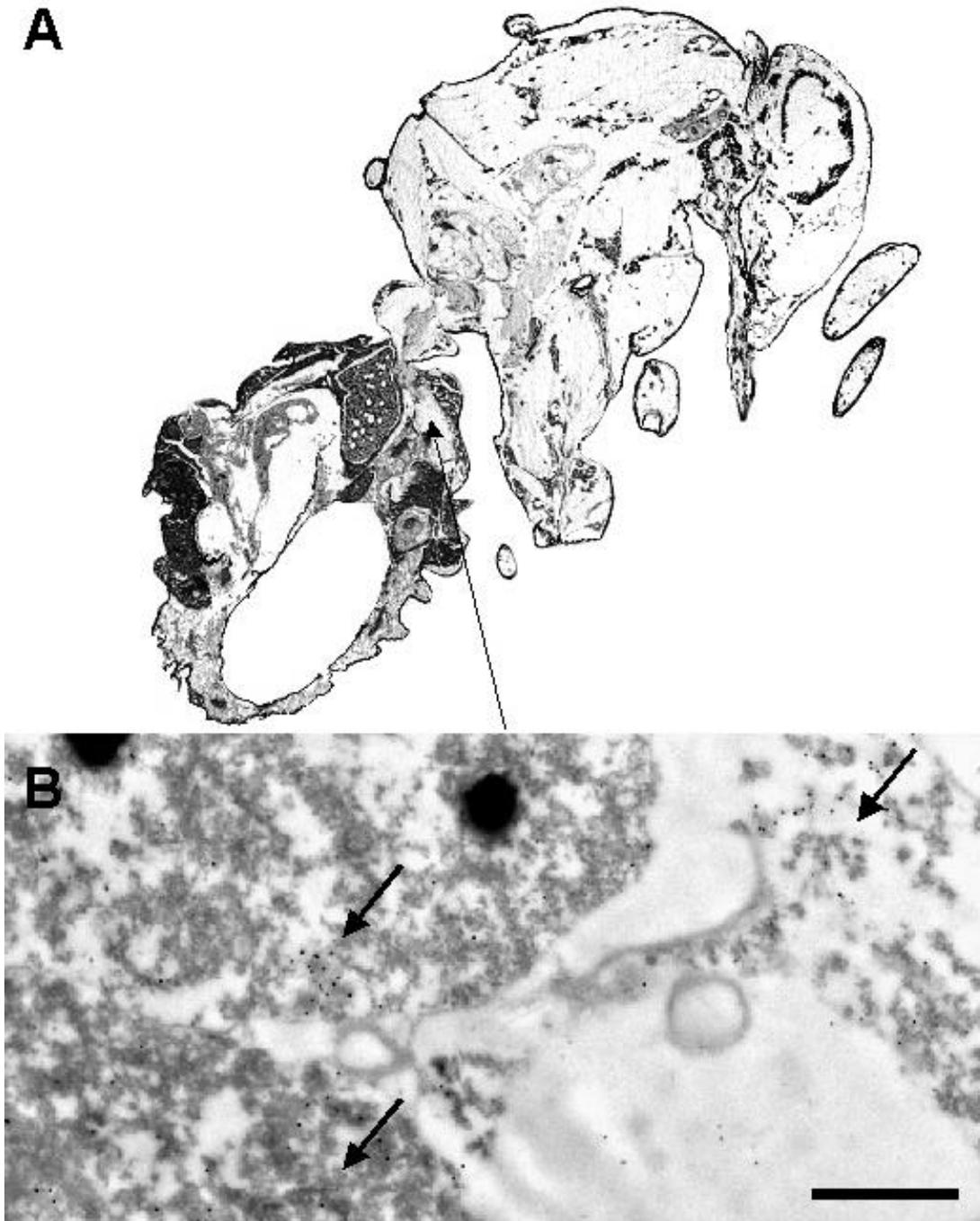


Figura 41. Inmunolocalización de *Cucurbit yellow stunting disorder virus* en el aparato digestivo de *Bemisia tabaci*. A: sección parasagital de *B. tabaci* observada al microscopio óptico. B: detalle subcelular de A, el marcaje (flechas) se localiza en las células del intestino anterior (Barras A: 50 μ ; B: 2 μ . Tamaño de las partículas de oro coloidal 10 nm) .

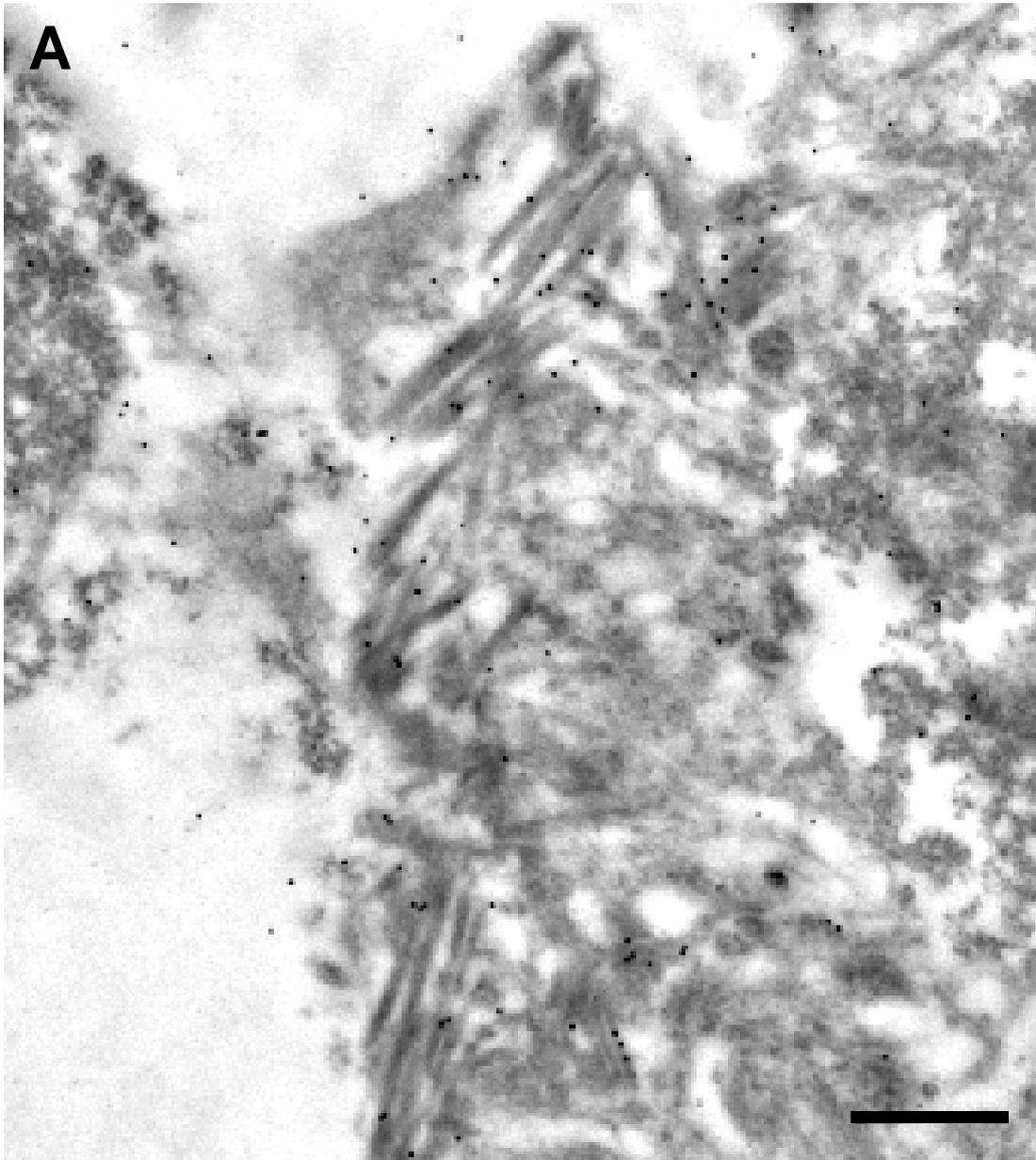


Figura 42. Inmunolocalización de *Cucurbit yellow stunting disorder virus* en el aparato digestivo de *Bemisia tabaci*. El marcaje se localiza en unas estructuras laminares de la luz del intestino anterior (Barra 980 nm; Tamaño de las partículas de oro coloidal 10 nm) .

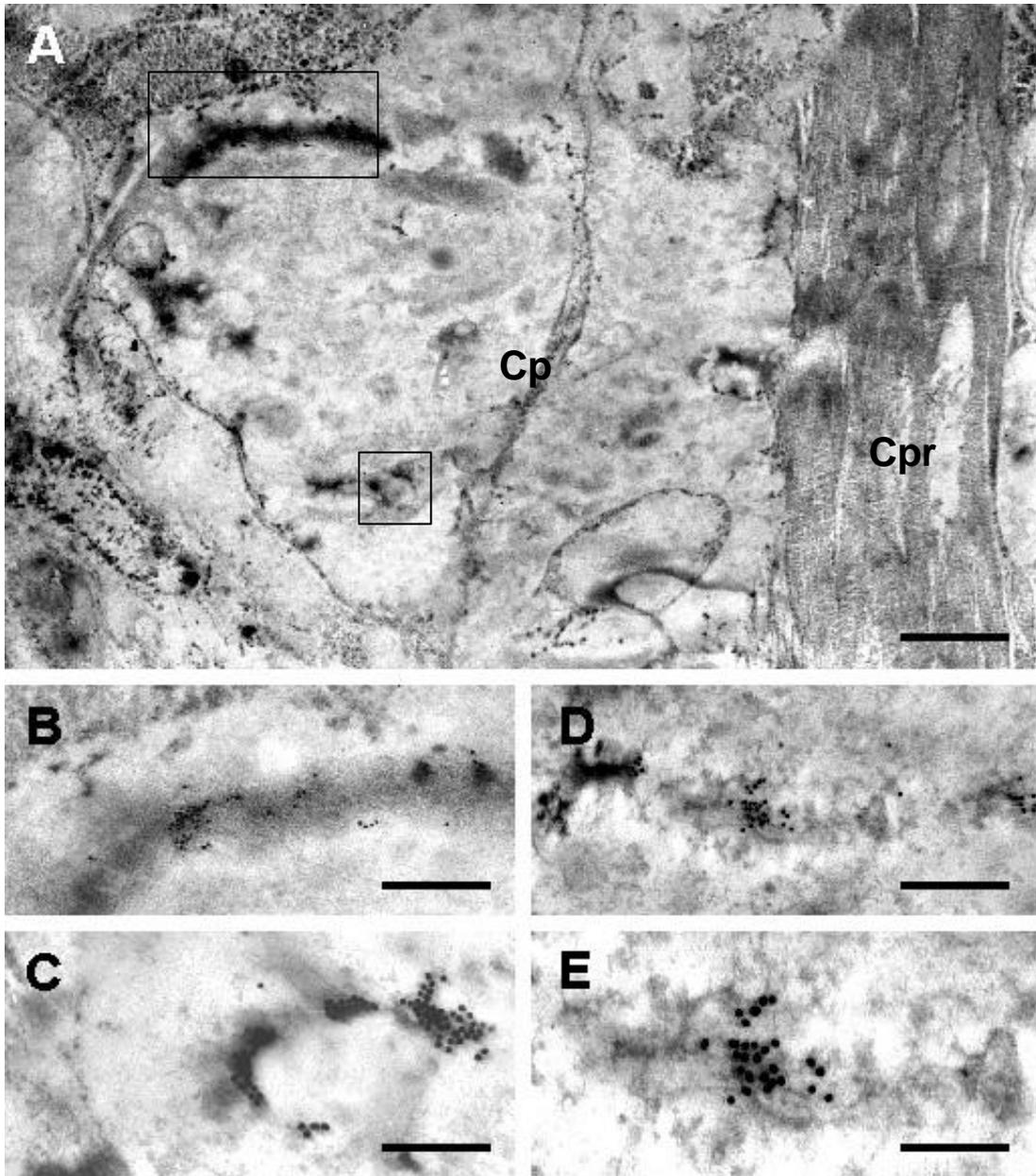


Figura 43. Inmunolocalización de *Lettuce infectious yellows virus* en el inicio del canal alimentario de *Bemisia tabaci*. A: sección de la bomba cibarial. B: detalle de A, marcaje cercano a la cúpula de la bomba. C: detalle de A, marcaje asociado a un material electrodenso D: inmunomarcaje la pared de la bomba. E: detalle de D (Cp: Bomba cibarial; Cpr: músculos retractores de la bomba cibarial. Barras A: 4 μ ; B: 1 μ ; C: 400 nm; D: 600 nm; E: 250 nm.) .

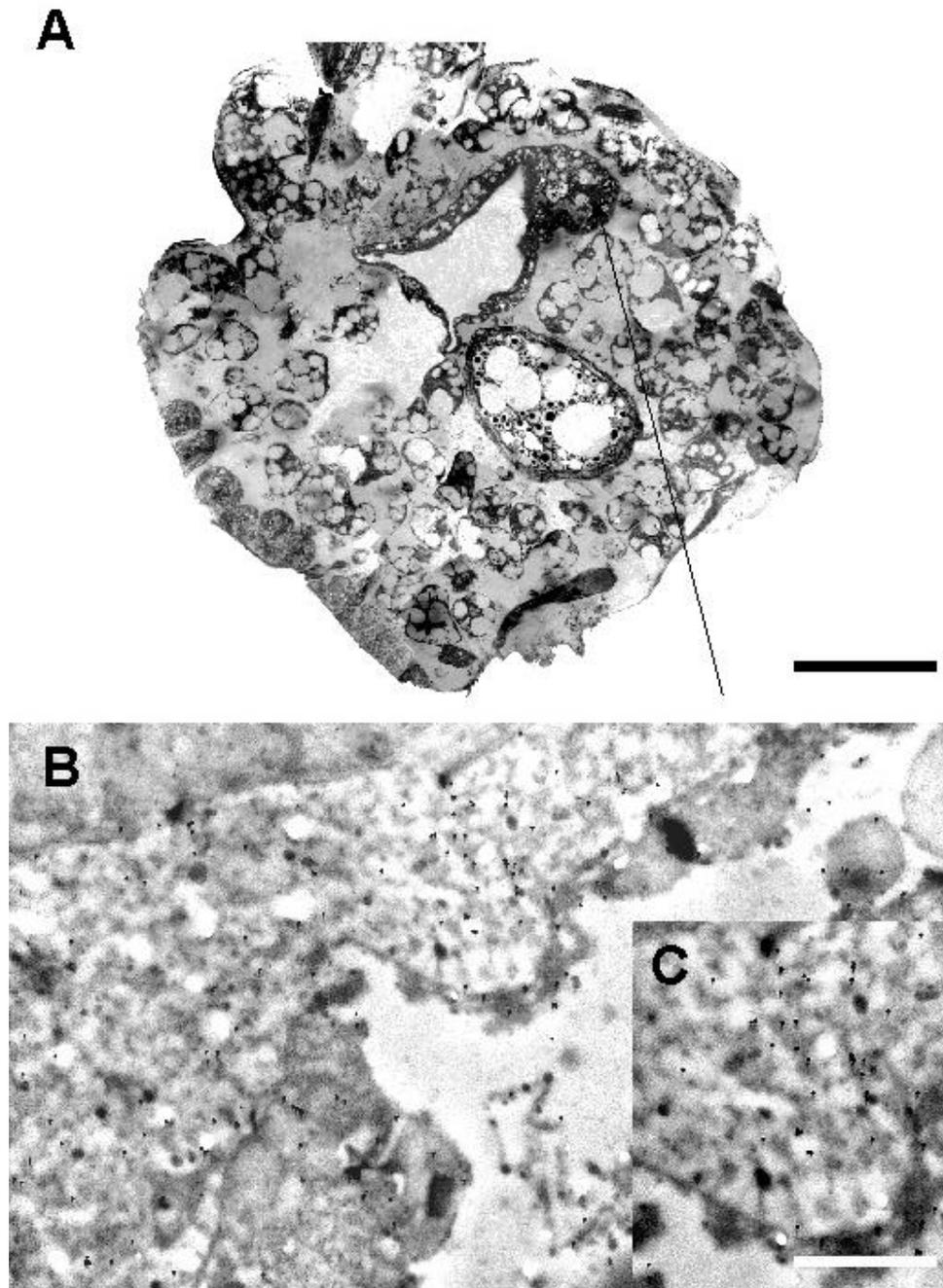


Figura 44. Inmunolocalización de *Lettuce infectious yellows virus* en el aparato digestivo de *Bemisia tabaci*. A: sección parasagital del abdomen observada al microscopio óptico. B: detalle subcelular de A, el marcaje se localiza en las células del intestino medio. C detalle de B, marcaje en el citoplasma celular (Barras A: 60 μ ; B: 1,9 μ ; C: 1,2 μ . Tamaño de las partículas de oro coloidal 25 nm) .

5. DISCUSIÓN

Tanto la CP de LIYV como de CYSDV se han localizado, mediante inmunomarcaje, en los tramos iniciales del canal alimentario de sus insectos vectores coincidiendo con los resultados y descripciones que se han realizado para otros virus transmitidos por homópteros de forma semipersistente (Ammar, 1991; López-Moyá y López-Abella, 1996). No se ha observado la presencia de inmunomarcaje en otros órganos y estructuras de *B. tabaci* descritas en relación con la transmisión de virus circulativos. Tampoco se observa inmunomarcaje en el hemocele del insecto, por lo que no parece probable que estos virus salgan del aparato digestivo.

El inmunomarcaje de la CP de LIYV se ha localizado en la bomba cibarial y aparece en ocasiones asociado a un material amorfo y electrodenso, que también ha sido descrito por Ammar *et al.* (1994) y Murant *et al.* (1976) en virus transmitidos por pulgones, no persistentes y semipersistentes. No se ha observado el material no denso a los electrones que, en el último caso Murant *et al.* (1976) observan, también, de forma más externa y que, según estos autores, podría proceder de las plantas infectadas con el virus. La interpretación de estos autores es que el material electrodenso actuaría protegiendo a las partículas virales a lo largo del canal alimentario y el no denso tendría una función de unión específica a algunos tramos del mismo.

Murant *et al.* (1976) aunque no descartan la existencia de una asociación específica entre el virus y el vector, también describen la asociación de las partículas virales con áreas del canal alimentario que presentan protuberancias. Por lo que el virus quedaría retenido en estas zonas para ser liberadas progresivamente mediante el proceso de ingestión-regurgitación.

La localización de LIYV-CP en el citoplasma y en el extremo apical de las células del intestino medio podría indicar algún proceso de absorción, tal y como describen Smith (1968) y Martoja y Ballan-Dufrançais (1982), aunque, también podría ser atribuible a alguna reacción inespecífica del antisuero con algún producto de la digestión de origen vegetal. Esta posibilidad se descarta, pues en los insectos no virulíferos no se observa.

La CP de CYSDV únicamente se ha localizado en el intestino anterior, por lo que podría interpretarse que las partículas se dirigen hacia tramos relativamente más internos del canal alimentario dónde son retenidas, ya que Célix *et al.* (1996) y Wisler *et al.* (1998) describen que su período de retención es el más largo de entre los *Crinivirus*, no obstante el relativamente escaso número de hallazgos no permite tal aseveración. Cabría pensar que el inmunomarcaje, asociado a las estructuras membranosas presentes en la luz del intestino anterior, pudiera corresponderse con partículas semejantes a virus, posiblemente asociadas al alimento, que hubiesen sido parcialmente degradadas en parte durante procesos previos a la digestión (Ballan-Dufrançais, 1982), sin observarse un lugar claro de acumulación, pero es muy difícil inferir esta interpretación sin datos adicionales. Otra posibilidad, es que la presencia de la CP en la luz intestinal se deba a un proceso de absorción/retención por las células epiteliales o bien que las partículas virales permanecen y se acumulan en el intestino y son transmitidas durante el proceso de regurgitación que se produce durante la alimentación (Harris *et al.*, 1996), hecho también difícil de probar con los estudios realizados.

Las señales de hibridación observadas tanto en *T. vaporariorum* como *B. tabaci* se podrían atribuir a un cambio en la reacción del tejido como consecuencia del proceso de fijación y no a una reacción inespecífica, como también se ha descrito en tejido vegetal (Aranda *et al.*, 1996; Más *et al.*, 2000). Ya que al realizar tratamientos con ARNasa no se observaron estas señales.

La ausencia de inmunomarcaje en los insectos incluidos mediante el método de inclusión rápido en microondas podría atribuirse a la pérdida de la capacidad antigénica de las muestras, como consecuencia de las altas temperaturas a las que son sometidas durante el proceso de inclusión (45, 50 y 95°C) (del Brío y Riera, 1994). Este hecho impidió establecer algún tipo de asociación viral con los endosimbiontes que presentaban en su interior.

Los inmunomarcajes observados podrían indicar que en el interior del cuerpo de *B. tabaci* se produce una cierta circulación de estos virus en su canal alimentario, aunque ésta no alcanza la descrita para virus persistentes.

3. DISCUSIÓN GENERAL

Discusión

Los resultados obtenidos en las prospecciones dirigidas a plantas con síntomas de amarilleo en el sudeste español han asociado esta sintomatología con los dos *Closteroviridae* estudiados (el virus del falso amarilleo de la remolacha, BPYV, y el virus del amarilleo enanizante de las cucurbitáceas, CYSDV), que previamente ya habían sido detectados y asociados con el amarilleo de las cucurbitáceas por Berdiales *et al.* (1999) y Rubio *et al.* (1999). Al igual que estos dos autores, se ha observado la predominancia de CYSDV sobre BPYV, atribuible a la mayor abundancia de *Bemisia tabaci* sobre *Trialeurodes vaporariorum*, cuyas poblaciones además de haberse reducido notablemente en los últimos años (Célix *et al.*, 1996; Lacasa *et al.*, 1998) únicamente se localizan, según Livieratos *et al.* (1999) en áreas apartadas de la principal zona de producción de Almería.

El relativo elevado número de muestras, tanto del sudeste español como de la zona de Lleida, en los que no se detectó ninguno de estos *Closteroviridae* ni ninguno de los otros virus ensayados, apoyan que la manifestación de estos síntomas puede estar ocasionada por otros agentes bióticos y/o abióticos (Wisler *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos confirman lo ya indicado por estos últimos autores junto con Coffin y Coutts (1996) y Berdiales *et al.* (1999), que los síntomas de amarilleo en las hojas adultas son bastante inespecíficos como consecuencia de su estado fisiológico o de la presencia de otros agentes fitopatógenos.

En la provincia de Lleida, el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus del mosaico de la sandía cepa 2 (WMV-2) y el virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) son los virus más abundantes, coincidiendo con el resto de áreas de producción nacionales (Luis-Arteaga *et al.*, 1998). Su presencia se ha detectado tanto en infecciones simples como en distintas infecciones múltiples, hecho este último frecuente en estos virus transmitidos por pulgones (Ullman *et al.*, 1991; Grafton-Cardwell *et al.*, 1996; Luis-Arteaga *et al.*, 1998; Yuki *et al.*, 2000). Esta adquisición y transmisión conjunta de virus ha sido descrita en los *Potyvirus* WMV-2, PRSV-W y ZYMV (Lecoq *et al.*, 1985; Yuki *et al.*, 2000) y parece probable se esté produciendo con los dos *Potyvirus* detectados en este estudio, WMV-2 y ZYMV. La predominancia observada de CMV coincide con la determinada en otras áreas de cultivo de melón al

aire libre y se asocia con su amplio rango de hospedantes y por ser transmitido por más de 86 especies de pulgones (Luis-Arteaga, 1994).

Los resultados de los estudios citopatológicos y de localización, mediante inmunomarcaje e hibridación *in situ*, con BPYV y CYSDV muestran que estos dos *Closteroviridae* se distribuyen y acumulan específicamente en las células del floema. Del mismo modo, la infección por el virus del amarilleo infeccioso de lechuga (LIYV) también se localiza en este tejido coincidiendo con Hoefert *et al.* (1988), ya que aunque se observaron vesículas membranosas citoplasmáticas en algunas células del protoxilema, el virus no se detectó mediante inmunomarcaje en estas células.

Esta limitación al tejido del floema de los *Closteroviridae*, con excepción del virus del amarilleo de la remolacha (BYV) y el virus del moteado necrótico del clavel (*Carnation necrotic fleck virus*) (Esau y Hoefert, 1971; Medina *et al.*, 1998), es objeto un área de continuo estudio. Las infecciones mixtas con virus sistémicos y algunos virus restringidos al floema parecen indicar que, estos últimos, pueden invadir otros tejidos gracias a las modificaciones inducidas en los plasmodesmos por factores proteícos probablemente codificados por el genoma del virus sistémico (Nelson y Van Bel, 1998). Pero, aunque por el momento los estudios realizados por Karyeija *et al.* (2000) con *Crinivirus* (virus del enanismo clorótico de la batata, SPCSV) y *Potyvirus* (virus del jaspeado de la batata, SPFMV) continúan mostrando la limitación y acumulación de SPCSV a este tejido, no se puede descartar la existencia de posibles mecanismos de regulación que actúen impidiendo la difusión de los *Crinivirus* fuera del floema. Esta acumulación en el tejido vascular también podría atribuirse a las diferencias morfológicas y funcionales de los plasmodesmos de las células de la vaina del haz del floema y del mesófilo, y que limitan la difusión de otros virus (Thompson y García-Arenal, 1998). Este papel funcional de los plasmodesmos, derivado tanto de su número como de su morfología, también se vería apoyado por la acumulación de BPYV en las células acompañantes en especies con pocos plasmodesmos (lechuga) frente a su acumulación en las células de la vaina del haz del floema de las especies con un elevado número de ellos (cucurbitáceas).

En las infecciones producidas por BPYV y CYSDV, y por el virus de la clorosis infecciosa del tomate (TICV) y de la clorosis del tomate (ToCV), no se ha observado la

presencia de los depósitos cónicos de material electrodensos característicos de la infección de su miembro tipo, LIYV. Un rasgo común de todas estas infecciones ha sido la presencia de grandes masas de partículas virales y la proliferación de vesículas tipo BYV. Dada la similitud que presentan las partículas virales de los *Crinivirus* estudiados con la proteína P su identificación en ocasiones se ha visto dificultada en ausencia de inmunomarcaje. Si bien, la presencia de una membrana limitando las inclusiones en banda de CYSDV ha permitido su identificación sin necesidad de realizar las pruebas comentadas. La existencia de una membrana limitando estas inclusiones no se ha descrito para ningún otro virus perteneciente a la familia *Closteroviridae*, desconociéndose tanto su origen como su función en el proceso de infección.

De forma cuantitativa, las infecciones producidas por BPYV y CYSDV han inducido una proliferación de vesículas tipo BYV mayor que las otras infecciones estudiadas pero, este hecho no se puede emplear como criterio para definir la actividad, el progreso o severidad de la infección al no haber partido de material vegetal en condiciones comparables. En algunos *Closteroviridae* se ha confirmado que estas vesículas participan en la síntesis del ARN viral (Medina *et al.*, 1998; Erokhina *et al.*, 2001) aunque su origen todavía se desconoce. En base a la clasificación de Lesemann (1991) las vesículas tipo BYV serían evaginaciones del citoplasma que se sintetizan *de novo* a partir del retículo endoplasmático, de un modo similar a las vesículas producidas por virus del mosaico de la judía de vara (Carette *et al.*, 2000). Mediante IGL e ISH no se ha observado ninguna relación directa entre estas vesículas y el ARN viral o la CP de los virus estudiados aunque, CYSDV mediante ISH se ha observado asociado a las membranas del retículo endoplasmático, por lo que se podría especular sobre su posible participación en la proliferación de las mismas, como ocurre en otros virus fitopatógenos (Buck, 1998).

Otras características comunes a todas estas infecciones han sido la alteración de las mitocondrias y un gran deterioro de los cloroplastos. Estos dos efectos ultraestructurales son muy frecuentes en las infecciones por virus fitopatógenos de ARNmc (+) y son un indicativo del daño producido al sistema metabólico celular (Lesemann, 1988). En lo referente a las mitocondrias, la alteración más frecuente ha sido la hipertrofia, similar a la producida por *Potyvirus*, ya que a pesar del aumento de

volumen, tanto las crestas como la matriz permanecían normales (Lesemann, 1988). En las mitocondrias no se ha observado la presencia de vesículas como las descritas por Kim *et al.* (1989) en infecciones producidas por otros *Closteroviridae*. Los cloroplastos, en la mayoría de los casos, presentaban las membranas y lamelas desorganizadas, así como depósitos de almidón, cuerpos osmiófilos, y vesiculación en el caso de ToCV, que son también frecuentes en numerosas infecciones por virus fitopatógenos (Lesemann, 1989).

Por otro lado, la casi totalidad de alteraciones comentadas y para todos los virus estudiados se observan en hojas jóvenes asintomáticas, contrariamente a lo que ocurre en la gran mayoría de alteraciones producidas por otros virus fitopatógenos (Lesemann, 1989), mientras que en los tejidos sintomáticos la observación ha sido difícil o casi imposible debido a los procesos de avanzados de necrosis. Por lo que podría especularse que la alteración de este tejido vascular provoca la alteración del sistema de transporte de la planta, bloqueando la traslocación y provocando la aparición de amarillos internerviales.

En el estudio comparativo de la anatomía interna de *T. vaporariorum* con respecto a la de *B. tabaci*, la única diferencia encontrada en los canales alimentarios ha sido la presencia de organismos semejantes a bacterias con distinta morfología pero, que sin embargo se muestra insuficiente para poder establecer una relación directa con su distinta eficiencia como vectores. La distinta capacidad de los pulgones como vectores se ha atribuido a diferencias en su comportamiento y a la preferencia por otras especies vegetales en su alimentación, hecho que no parece aplicable a estos aleuródidos (Ruiz *et al.*, 1999).

En *Crinivirus*, los trabajos desarrollados por el equipo del Dr. Bryce W. Falk indican que la CPd está relacionada con el proceso de transmisión por moscas blancas (Tian *et al.*, 1999), pudiendo las diferencias encontradas a nivel de secuencia y tamaño en esta proteína estar relacionadas con la especificidad de estos virus por la especie de mosca blanca (Livieratos *et al.*, 2001).

En las observaciones realizadas en los insectos virulíferos no se ha observado la presencia de partículas semejantes a virus, que como apuntan Ammar *et al.* (1994)

podrían atribuirse al proceso de inclusión en resina que ocasiona el lavado de los virus no persistentes y semipersistente alojados en los primeros tramos del canal alimentario y que además de dificultar las observaciones también limita los posibles resultados de los inmunomarcajes. Estos mismos autores también observan el inmunomarcaje de virus transmitidos por pulgones de modo no persistente en el canal alimentario de la maxila, mientras que los virus transmitidos de modo semipersistente por pulgones y cicadélidos se localizan en el intestino anterior (Murant *et al.*, 1976). El inmunomarcaje de CYSDV se ha localizado en la luz intestinal de los primeros tramos del aparato digestivo de *B. tabaci*, mientras que el de LIYV aparece en el tramo inicial del canal alimentario asociado a un material electrodensito y en el intestino medio. Ninguno de estos virus se ha observado en otras estructuras de *B. tabaci* involucradas en la transmisión de virus circulativos como la cámara filtrante, las glándulas salivares (Hunter *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 2000) o los endosimbiontes (Morin *et al.*, 1999) ni se han observado vesículas en las membranas y láminas basales de estos órganos como los descritos en la transmisión persistente por pulgones (Gildow y Gray, 1993). Por lo que, al no localizar estos *Crinivirus* en otros órganos y estructuras, parece probable que estos permanezcan en el canal alimentario de las moscas blancas para ser transmitidos mediante un proceso de regurgitación del alimento.

En base a los resultados obtenidos en este estudio y por comparación con los modelos de transmisión de virus por homópteros descritos en los últimos años y recopilados por Hull (2002), la transmisión semipersistente de *Crinivirus* por moscas blancas se ajusta al modelo de ingestión-regurgitación propuesto por Harris (1977). Este modelo se recoge en la figura 45 y se describe a continuación.

Las moscas blancas se alimentan preferentemente de las venas menores de las plantas, existiendo una relación entre el número de venas y la capacidad de estos insectos para alcanzarlas (Cohen *et al.* 1996; 1998). Las cucurbitáceas, debido al elevado número de venas que presentan por unidad de superficie, son uno de los hospedantes preferentes de estos insectos (Cohen *et al.*, 1996). Los *Crinivirus* presentes en las venas menores del floema serían adquiridos, con el concurso de la CPd (Tian *et al.*, 1999), durante la alimentación y entrarían en el cuerpo de la mosca blanca a través del canal alimentario de la maxila.

Como consecuencia de los procesos de ingestión-regurgitación que realizan las moscas blancas (Harris, 1996), el virus, con la participación o no de algún factor viral o del propio vector, debe unirse a alguna estructura del canal alimentario previa a la cámara filtrante, dónde permanezca retenido por períodos de tiempo variables dependiendo del virus y del vector. Además, con esta retención en los tramos iniciales del canal alimentario también se estaría evitando la degradación de la partícula viral por el proceso de digestión.

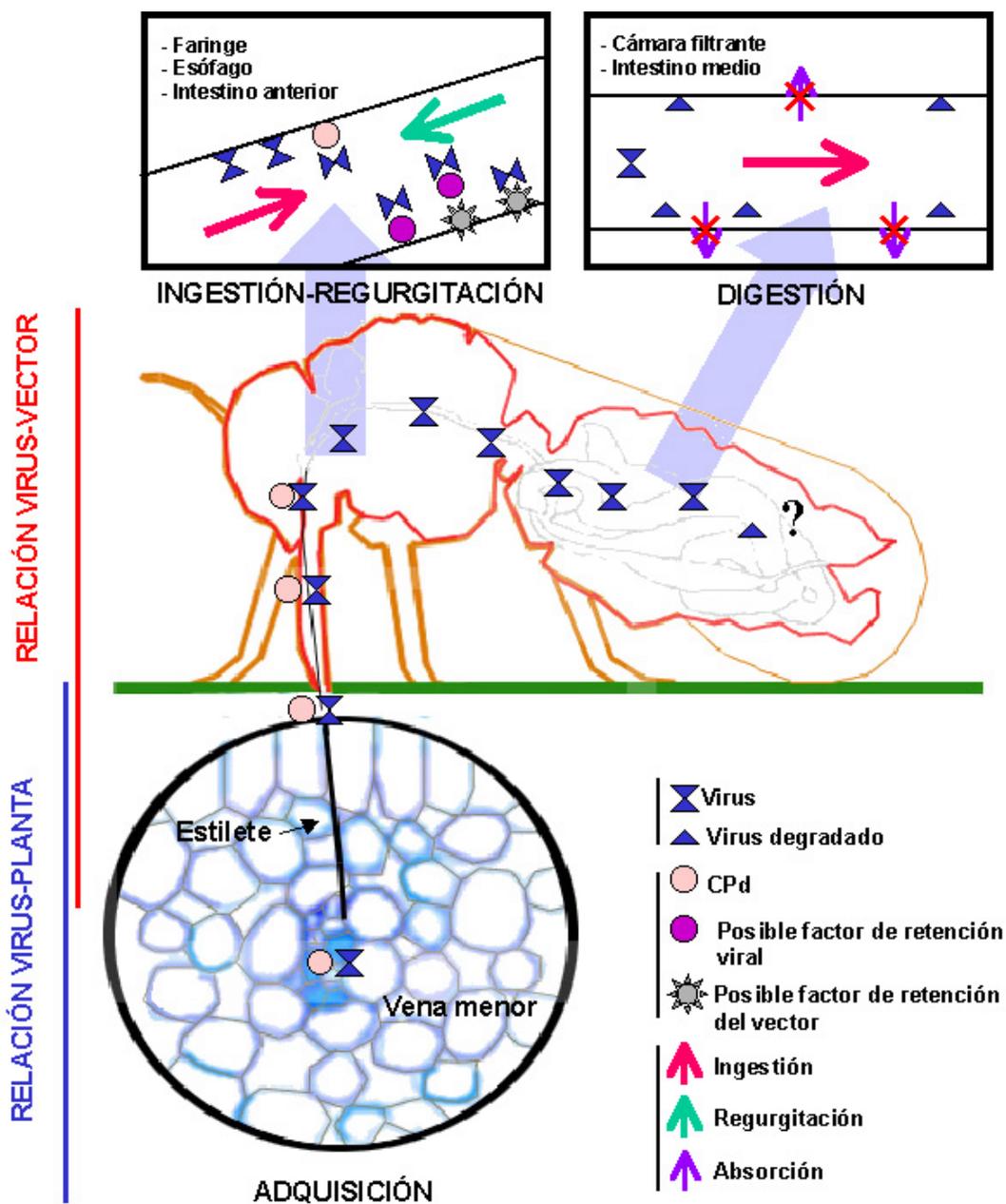


Figura 45. Modelo de transmisión de *Crinivirus* de forma semipersistente por *Bemisia tabaci*.

El final de tal asociación implicaría la vuelta del virus al canal alimentario de la mosca blanca para ser transmitido mediante el proceso comentado. Por otro lado, aunque estos virus pueden ser retenidos hasta seis u ocho días por su vector, la eficiencia de la transmisión es considerablemente inferior frente a la que muestran tras dos días de adquisición (Wisler *et al.*, 1998).

Así pues, BPYV y CYSDV presentes en las venas menores de las cucurbitáceas serían adquiridos específicamente por sus insectos vectores, pasarían al interior del cuerpo del insecto y se retendrían en los tramos iniciales del canal alimentario, llegando hasta el intestino anterior, para ser transmitidas progresivamente mediante la ingestión-regurgitación que realizan estos aleuródidos.

4. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La RT-PCR es, de las técnicas ensayadas para la detección del virus del falso amarilleo de la remolacha (BPYV) y el virus del amarilleo enanizante de las cucurbitáceas (CYSYDV), la que ofrece mayor fiabilidad, permitiendo además discriminar entre ambos.
2. Los análisis mediante RT-PCR en las muestras de melón y pepino con amarilleo de los cultivos protegidos del sudeste español, corroboran la predominancia de CYSYDV sobre BPYV.
3. El amarilleo observado en los cultivos de melón de la zona de Lleida no está asociado a virus pertenecientes a la familia *Closteroviridae* transmitidos por moscas blancas.
4. El virus del mosaico del pepino (CMV), el virus del mosaico de la sandía-2 (WMV-2) y el virus del mosaico del calabacín (ZYMV), transmitidos por pulgones, son los únicos virus detectados en los cultivos al aire libre de la comarca de El Segrià (Lleida).
5. CMV se confirma como el virus más con mayor presencia en los cultivos de melón al aire libre.
6. Los principales cambios citopatológicos inducidos por BPYV, CYSYDV, el virus de la clorosis infecciosa del tomate (TICV) y el virus de la clorosis del tomate (ToCV) son la alteración de las membranas de los cloroplastos, y la proliferación de vesículas membranosas citoplasmáticas que forman las inclusiones características de la familia *Closteroviridae*.
7. Las alteraciones citopatológicas producidas por los *Crinivirus* estudiados se observan con más facilidad en las hojas jóvenes asintomáticas que en las hojas adultas con síntomas.

8. Los *Crinivirus* estudiados no inducen la formación de los típicos depósitos cónicos electrodensos que aparecen en la cara interna del plasmalema de las células acompañantes del floema infectadas por el miembro tipo del género, el virus del amarilleo infeccioso de la lechuga (LIYV), sin embargo producen otros de morfología diversa y localizados siempre en su cara externa.
9. Las inclusiones en banda producidas por CYSDV difieren de las del resto de *Crinivirus* estudiados en la presencia de membranas rodeándolas.
10. Los *Crinivirus* estudiados presentan tropismo celular ya que se localizan únicamente en las células del floema.
11. Tanto las pruebas de inmunolocalización de CYSDV y LIYV y como las de hibridación *in situ* de BPYV y CSYDV confirman su limitación y acumulación en el floema.
12. La técnica de inclusión rápida en microondas para microscopía electrónica de transmisión es una alternativa válida para los estudios de anatomía de insectos a escala celular.
13. *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) no presentan diferencias anatómicas ni morfológicas aparentes en su canal alimentario que permitan explicar su desigual capacidad como vectores de virus semipersistentes.
14. El modelo de ingestión-regurgitación propuesto por Harris (1977) para virus asociados a los tramos iniciales del canal alimentario de sus vectores, es el que más se ajusta a los resultados de localización obtenidos con CYSDV y LIYV en *B. tabaci*.

5. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Achón, M.A. 1993. El virus del mosaico enanizante del maíz (MDMV) en Cataluña. Tesis Doctoral. E.T.S.E.A.-UdL. 150 pp.

Agranovsky, A.A. 1996. Principles of molecular organization, expresion, and evolution of closteroviruses: over the barriers. *Advances in Virus Research*, 47:119-158.

Agranovsky, A.A., Koonin, E.V., Boyko, V.P., Maiss, E., Frotschl, R., Lunina, N.A., Atabekov, J.G. 1994. *Beet yellows closterovirus*: complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease. *Virology* 198:311-324.

Agranovsky, A.A., Leseman, D.E., Maiss E., Hull, R., Atabekov, J.G. 1995. "Rattlesnake"structure of a filamentous plant RNA virus built of two capsid proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:2470-2473.

Agrios, G.N. 1997. *Plant Pathology*. Academic Press. 4ª Edición. 635 pp.

Álvarez, J.M. 1997. Tendencias en la mejora genética del melón. En: "Melones. Compendios de Horticultura 10". pp: 25-34. Ed. Namesny, A. Ediciones de Horticultura, S.L.

Alzhanova, D.V., Hagiwara, Y., Peremyslov, V.V., Dolja, V.V. 2000. Genetic analysis of the cell-to-cell movement of *Beet yellows closterovirus*. *Virology* 268: 192-200.

Ammar, E.D. 1991. Mechanisms of plant virus transmission by homopteran insects. En: "Electron microscopy of plant pathogens". pp: 133-146. Eds. Mendgen K., Lesemann D.E. Springer-Verlag.

Antignus, Y., Wang, Y., Pearlsman, M., Lachman, O., Lavi, N., Gal-On, A. 2001. Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting *Tobamovirus*. *Phytopathology* 91:565-571.

APSNet. 1999. Url: <http://APSnet.org./emerging.html>.

Aranda, M.A., Escaler, M., Wang, M., Maule, A.J. 1996. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:15289-15293.

Aranzana, M.J. 1997. El amarilleo del melón: descripción del síndrome y prospección en Lleida de los virus que los causan. Proyecto Final de Carrera. E.T.S.E.A.-UdL. 89 pp.

Avila, F.J., Bruton, B.D., Fletcher, J., Sherwood, J.L., Pair, S.D., Melcher, U. 1998. Polymerase chain reaction and phylogenetic characterization of an agent associated with *Yellow vine disease* in cucurbits. *Phytopathology* 88:428-436.

Bar-Joseph, M., Yang, G., Gafny, R., Mawassi, M. 1997. Subgenomic RNAs: the possible building blocks for modular recombinations of *Closteroviridae* genomes. *Seminars in Virology* 8:113-119.

Beitia, F. 1998. Aleyrodidae. En: "Entomología Agroforestal". pp: 499-518. Ed. de Liñan, C. Ediciones Agrotécnica S.L.

Bellows, J.R., Perring, T.M., Gill, R.J., Headrick, D.H. 1994. Description of a species of *Bemisia* (*Homoptera:Aleyrodidae*). *Annals of Entomological Society of America* 87:195-206.

Berdiales, B., Bernal, J.J., Sáez, E., Woudt, B., Beitia, F., 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):211-215.

Bergmann, W. 1992. Nutritional disorders of plants. Developmental, visual and diagnosis. Gustav Fischer. 310 pp.

Bernal, J.J., Jiménez, I., Moreno, M., Hord, M., Rivera, C., Koenig, R., Rodríguez-Cerezo, E. 2000. *Chayote mosaic virus*, a new *Tymovirus* infecting *Cucurbitaceae*. *Phytopathology* 90:1098-1104.

Binder, M., Roth, J., Gehring, W.J. 1986. *In situ* hybridization at the electron microscope level: localization of transcripts on ultrathin sections of Lowicryl K4M-embedded tissue using biotinylated probes and protein A-Gold complexes. *Journal of Cell Biology* 102:1646-1653.

Blancard, D., Lecoq, H., Pitrat, M. 1991. Enfermedades de las cucurbitáceas. Observar, identificar, luchar. Mundi Prensa. 301 pp.

Blanco, M.A. 1996. Micosis vasculares. En: "Patología Vegetal". pp: 913-937. Vol. II. Eds. Llácer, G., López, M^aM., Trapero, A., Bello, A. Sociedad Española de Fitopatología.

Bos, L., Dorst, H.J.M.-V., Huttinga, H., Maat, D.Z. 1984. Further characterization of *Melon necrotic spot virus* causing severe disease in glasshouse cucumbers in the Netherlands and its control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 90:55-69.

Bosco, D., Demichelis, S., Simon, B., Rapisanda, C., Moriones, E., Cenis, J.L. 2001. Presence and distribution of *Bemisia tabaci* (*Homoptera:Aleyrodidae*) biotypes in Italy. *European Whitefly Symposium, Ragusa (Italia)*.

Boyko, V.P., Karasev, A.V., Agranovsky, A.A., Koonin, E.V., Dolja, V.V. 1992. Capsid protein gene duplication in a filamentous virus of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:9156-9160.

Brown, J.K., Idris, A.M., Olsen, M.W., Miller, M.E., Isakeit, T. Anciso, J. 2000. *Cucurbit leaf curl virus*, a new whitefly transmitted geminivirus in Arizona, Texas and Mexico. *Plant Disease* 86 (7): 809

Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. 1996. *Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database.* CAB International. pp: 1484.

Buck, K.W. 1998. Comparison of the replication of positives-stranded RNA viruses of plants and animals. *Advances in Virus Research* 47:159-251.

Campbell, R.N., Smith, S.T., Lecoq, H. 1995. Virus transmission by host-specific strains of *Olpidium bornovanus* and *Olpidium brassicae*. *European Journal of Plant Pathology* 101:273-282.

Candresse, T., Namba, S., Martelli, G.P. 1994. a). Genus *Closterovirus*. En: "Classification and nomenclature of viruses". pp: 461-464. 6th Report of the ICTV. Eds. Fauquet, C.M., Murphy, F., Bishop, D.H.L., Summers, M.D., Martelli, G.P., Ghabria, I. M.A., Jarvis, A.W.. *Archives of Virology, Supplementum* 10.

Candresse, T., Namba, S., Martelli, G.P. 1994. b). Genus *Trichovirus*. En: "Classification and nomenclature of viruses". pp: 468-470. 6th Report of the ICTV. Eds. Fauquet, C.M., Murphy, F., Bishop, D.H.L., Summers, M.D., Martelli, G.P., Ghabria, I. M.A., Jarvis, A.W.. *Archives of Virology, Supplementum* 10.

Carette, J.E., Stuiver, M., Van Lent, J., Wellink, K., Van Kammen, A. 2000. *Cowpea mosaic virus* infection induces a massive proliferation of endoplasmic reticulum but not Golgi membranes and is dependent on *de novo* membrane synthesis. *Journal of Virology* 74:6556-6563.

Célix, A., López-Sese, A., Almazara, N., Gomez-Guillamón, M.L., Rodríguez-Cerezo, E. 1996. Characterization of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, a *Bemisia tabaci*-transmitted closterovirus. *Phytopathology*, 86:1370-1376.

Cicero, J.M., Hiebert, E., Webb, S.E. 1995. The alimentary canal of *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes abutilonea* (Homoptera, Sternorrhynchi): histology, ultrastructure and correlations function. *Zoomorphology* 115:31-39.

Ciuffo, M., Roggero, P., Masenga, V. 1999. Natural infection of muskmelon by *Eggplant mottled dwarf rhabdovirus* in Italy. *Plant Disease* 83:78

Clark, M.F., Bar-Joseph, M. 1984. Enzyme immunoabsorbent assay in Plant Virology. *Methods in Virology*, 7:51-85.

Coffin, R.S., Coutts, R.H.A. 1995. Relationships among *Trialeurodes vaporariorum*-transmitted yellowing viruses from Europe and North America. *Journal of Phytopathology* 143:375-380.

Cohen A.C., Chu C.C., Henneberry T.J. 1998. Feeding biology of the silverleaf whitefly (Homoptera:Aleyrodidae). *Chinese Journal of Entomology* 18:65-82.

Cohen, A.C., Henneberry T.J., Chu, C.C. 1996. Geometric relationships between whitefly feeding behaviour and vascular bundle arrangements. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 78:135-142.

Cohen S. 1990. Epidemiology of whitefly-transmitted viruses. En: "Whiteflies: their bionomics, pest status and management". pp: 211-225. Ed. Gerling, D. Intercept Ltd.

Cohen, S., Duffus, J.E., Liu, H.Y. 1992. A new *Bemisia tabaci* biotype in the southwestern United States and its role in silverleaf of squash and transmission of *Lettuce infectious yellows virus*. *Phytopathology* 82:86-90.

Conti, M.A. 1994. Whiteflies other than *Bemisia tabaci* as vectors of plant viruses. *Arabian Journal of Plant Protection* 12:126-121.

Converse, R.H., Martin, R.R. 1990. ELISA methods for plant viruses. En: "Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens". pp: 179-196. Eds. Hampton, R., Ball, E., De Boer, S. APS Press.

Costa, A.S. 1969. Whiteflies as virus vectors. En: "Viruses, vectors and vegetation". pp 95-117. Ed. Maramorosh, M.. Interscience, New York.

Costa, H.S., Westcot, D.M., Ullman, D.E., Johnson, M.W. 1993. Ultrastructure of the endosymbionts of the whitefly, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Protoplasma* 176:106-115.

Coutts, R.H.A., Coffin, R.S. 1996. *Beet pseudo-yellows virus* is an authentic closterovirus. *Virus Genes* 13:179-181.

Christie, R.G., Edwarson, J.R. 1986. Light microscopic techniques for detection of plant virus inclusions. *Plant Disease* 70:279-279.

Cronshaw J., Esau K. 1968 a). P protien in the phloem of Cucurbita. I The development of P-protein bodies. *The Journal of Cell Biology* 38:25-39.

Cronshaw J., Esau K. 1968 b). P protien in the phloem of Cucurbita. II The P-protein of mature sieve elements. *The Journal of Cell Biology* 38:25-39.

Cronshaw J., Gilder J., Stone D. 1973. Fine structural studies of P-protein in Cucurbita, Cucumis and Nicotiana. *Journal of Ultrastructure Research* 45, 192-205.

Cuadrado, I.M., Jansen, D., Velasco, L., Ruíz, L., Segundo, E. 2001. First report of *Cucumber vein yellowing virus* in Spain. *Plant Disease* 85 (3): 336.

Cuartero, J., Esteva, J., Nuez, F. 1985. Sintomatología y desarrollo del amarilleamiento del melón en cultivo bajo invernadero. IV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología. Pamplona (España).

Czosnek, H., Laterrot, H. 1997. A worldwide survey of *Tomato yellow leaf curl viruses*. *Archives of Virology*, 142:1391-1406.

DARP 1999. Estadística i conjuntura agrària. N° 146-147. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca. Generalitat de Catalunya.

Das, P., Hari, V. 1992. Intracellular distribution of the 126K/183K and capsid proteins in cells infected by some tobamovirus. *Journal of General Virology*, 73:11.

Deulofeu, C. 1997. Situación y perspectivas del melón en el mundo. En: *Melones*. pp: 21-24. Ed. Namesny, A. Colección Compendios de Horticultura 10. Ediciones de Horticultura SL.

Díaz-Ruíz, J.R., García-Jiménez, J. 1994. Enfermedades de la cucurbitáceas en España. Eds. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología nº1. Agropubli SL. 115 pp.

Ding, X.S., Carter, S.A., Deom, C.M., Nelson, R.S. 1998. *Tobamovirus* and *Potyvirus* accumulation in minor veins of inoculated leaves from representatives of the *Solanaceae* and *Fabaceae*. *Plant Physiology* 116:125-136.

Dolja, V.V., Karasev, A.V., Koonin, E.V. 1994. Molecular biology and evolution of closteroviruses: sophisticated build-up of large genomes. *Annual Review of Phytopathology*, 32:261-285.

Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V.M., Pichersky, E. 1996. Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* 8, 1137-1144.

Duffus, J. E. 1977. Aphids, viruses, and the yellow plague. En: "Aphids as virus vectors". pp: 361-383. Eds. Harris, K.F., Maramorosch, K. Academic Press.

Duffus J. E. 1987. Whitefly transmission of plant viruses. En: "Current topics in vector research". pp: 73-91. Ed. Harris, K.F. Springer-Verlag, New York.

Duffus J.E. 1965. *Beet pseudo - yellows virus*, transmitted by the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). *Phytopathology*, 55:450-453.

Duffus, J.E. 1994. Whitefly transmitted yellowing viruses of the *Cucubitaceae*. *Cucurbitaceae* 94: Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germoplasm. South Padre Island. pp: 24.

Duffus J.E., 1996. Whitefly-borne viruses. En: "Bemisia 1995: taxonomy, biology, damage, control and management". pp: 255-263. Ed. Gerling D., Mayer R.T.. Intercept Ltd, U.K.

Duffus, J.E., Larsen, R.C., Liu, H.Y. 1986. *Lettuce infectious yellows virus*- a new type of whitefly-transmitted viruses. *Phytopathology*, 76:97-101.

de Barro, P.J. 2001. Whitefly biology-some insights and comparisons. European Whitefly Symposium, Ragusa (Italia). pp: 33.

del Brío, Mº.A., Riera, P. 1994. Manual de bases teórico-prácticas de inmunocitoquímica. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo. 134 pp.

EPPO 2001. EPPO Alert List, [http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert list.html](http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert%20list.html)

Erokhina, T.N., Vitushkina, M.V., Zinovkin, R.A., Lesemann, D.-E., Jelkmann, W., Koonin, E.V., Agranovsky A.A. 2001. Ultrastructure localization and epitope mapping of the methyltransferase-like and helicase-like proteins of *Beet yellows virus*. *Journal of General Virology* 82:1983-1994.

Esau, K., Hoefert, L. L. 1971. Cytology of *Beet yellows virus* infection in Tetragonia I. Parenchyma cells in infected leaves. *Protoplasma* 72:255:273.

Esau K., Hoefert L. L. 1981. *Beet yellows stunt virus* in the phloem of *Sonchus oleraceus* L. *Journal of Ultrastructure Research* 75:326-332.

Esteva, J., Nuez, F. 1991. Enfermedades causadas por virus en el cultivo del melón. *ITEA* 87: 111-125.

Falk, B.W., Klaassen, V. 1996. *Lettuce infectious yellows virus*: a bipartite closterovirus transmitted by *Bemisia*, and representative of a new genus of plant viruses. En: "*Bemisia* 1995: taxonomy, biology, damage, control and management". pp: 265-275. Eds. Gerling, D., Mayer, R.T.. Intercept Ltd.

FAOSTAT. 2001. FAO Statistical Database. <http://www.faostat.org.html>.

Febres, V.J., Ashouin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Niblett, C.L. 1996. The p27 protein is present at one end of the *Citrus tristeza virus* particles. *Phytopathology* 86:1331-1335.

Fereres, A. 1991. Insectos vectores de virus en cultivos hortícolas. *Phytoma* 30:82-87.

Francki, R.I.B., Milne, R.G., Hatta, T. 1985. Atlas of Plant Viruses. Vol. II. CRC Press. 284 pp.

García-Jiménez, J. 1997. Enfermedades del melón causadas por hongos y nemátodos. En: "Melones. Compendios de Horticultura 10". pp: 131-139. Ed. Namesny, A. Ediciones de Horticultura SL.

García-Jiménez, J., Armengol, J., Martínez-Ferrer, G. 1994. Acremoniosis (*Acremonium* sp.). Enfermedades producidas por hongos. En: "Enfermedades de las cucurbitáceas en España". pp: 32-38. Eds. Díaz-Ruíz, J.R., García-Jiménez, J. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología nº1. Agropubli SL.

García-Jiménez, J., Rodríguez, R. 1994. Condiciones climáticas adversas. En: "Enfermedades de las cucurbitáceas en España". pp: 122-126. Eds. Díaz-Ruíz, J.R., García-Jiménez, J. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología nº1. Agropubli SL.

García-Valero J. 1991. Tipos de resinas y su interacción con el material biológico. En: "Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica". pp: 169-187. Eds. Durfort, M., Vilaró, S., Renau, J., Serratos, J. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Barcelona.

- Gil, F. 1995.** Elementos de fisiología vegetal. Mundi-Prensa. 1147 pp.
- Gildow, F.E., Gray, S. M. 1993.** The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of *Barley yellow dwarf luteovirus*. *Phytopathology* 83(12):1293-1302.
- Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M., Czosnek, H. 1998.** Evidence for transovarial transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology*, 240:295-303.
- Ghanim, M., Rosell, R.C., Campbell, L.R., Czosnek, H., Brown, J.K., Ullman, D.E. 2001.** Digestive, salivary and reproductive organs of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera:Aleyrodidae) B type. *Zomophorology* 140:256-263.
- Gilberson, R.T., Demaree, R.S., Nordhansen, R.W.Jr. 1997.** Four-hour processing of clinical diagnostic specimens for EM using microwave technique. *Journal of Veterinary Investigation* 9:61-67.
- González-Torres, R., Melero, J.M^a, Gómez-Vázquez, J., Jiménez-Díaz, R.M. 1994.** Fusariosis vasculares del melón y de la sandía (*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* y *F. oxysporum* f.sp. *niveum*). Enfermedades producidas por hongos. En: "Enfermedades de las cucurbitáceas en España". pp: 47-50. Eds. Díaz-Ruíz, J.R., García-Jiménez, J. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología nº1. Agropubli SL.
- Grafton-Cardwell, E.E., Perring, T.M., Smith, R.F., Valencia, J., Farrar, C.A. 1996.** Occurrence of mosaic viruses in melons in the Central Valley of California. *Plant Disease* 80:1092-1097.
- Gray, S.M. 1996.** Plant virus proteins involved in natural vector transmission. *Trends in Microbiology* 4:259-264.
- Guerra-Sánchez, J.M., Cuadrado, I.M^a. 1996.** Double-stranded RNA as a test for infectivity of "yellowing" syndrome in cucurbits in Almeria, Spain. En: "Cucurbits towards 2000". pp:302-305. Ed. Gómez-Guillamón, M^aL. Estación Experimental La Mayora CSIC, Málaga.
- Guzman, P., Sudarshana, M.R., Seo, Y.-S., Rojas, M.R. 2000.** A new bipartite geminivirus (*Begomovirus*) causing leaf curl and crumpling in cucurbits in the Imperial Valley of California. *Plant Disease* 84: 488.
- Harris, K.F., Bath, J.E. 1973.** Regurgitation by *Myzus persicae* during membrane feeding: its likely function and transmission of nonpersistent plant viruses. *Annals of the Entomological Society of America* 66:793-796.
- Harris, K.F. 1977.** An ingestion-egestion hypothesis of noncirculative virus transmission. En: "Aphids as virus vectors". pp: 165-220. Eds. Harris, K.F., Maramorosch K. Academic Press.

Harris, K.F., Treur, B., Tsai, J., Toler, R. 1981. Observations on leafhopper ingestion-egestion behavior: its likely role in the transmission of noncirculative viruses and other plant pathogens. *Journal of Economic Entomology* 74:446-453.

Harris, K.F., Pesic-van Esbroek, Z., Duffus, J.E. 1996. Anatomy of a virus vector. En: "Bemisia 1995: taxonomy, biology, damage, control and management". pp: 289-317. Ed. Gerling, D., Mayer, R.T.. Intercept Ltd, U.K.

Hernández-Suárez, E., Aguiar, A., Martin, J.H., Carnero, A. 2001. Current studies on the whitefly fauna (Hemiptera:Aleyrodidae) of the Macaronesian Islands. European Whitefly Symposium, Ragusa (Italia). pp: 27.

Hewitt, E.J. 1983. The effects of mineral deficiencies and excesses on growth and composition. En:"Diagnosis of mineral disorders in plants". pp: 54-110. Vol. I Principles. Ed. Robinson, J.B.D. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Agricultural Research Council. HMSO

Hiebert, E., Abouzid, A.M., Polston, J.E. 1996. Whitefly-transmitted Geminiviruses. En: "Bemisia 1995: taxonomy, biology, damage, control and management". pp: 277-288. Eds. Gerling, D., Mayer, R.T.. Intercept Ltd, U.K.

Hoefert, L.L., Pinto, R.L., Fail, G.L. 1988. Ultrastructural effects of *Lettuce infectious yellows* virus in *Lactuca sativa* L. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* 98:243-253.

Höfer, P., Bedford, I.D., Markham, P.G., Jeske, H., Frischmuth, T. 1997. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, 236:288-295.

Hristova, D.P., Natskova, V.T. 1986. Interrelation between *Trialeurodes vaporariorum* (West.) and the virus causing infectious chlorosis in cucumbers. *Comptes Rendus de L'Académie Bulgare de Sciences* 39:105-118.

Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology. Academic Press. 1001 pp.

Hunter, W.B., Hiebert, E., Webb, S.E., Tsai, J.H., Polston, J.E. 1998. Location of Geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). *Plant disease* 82(10):1147-1151.

Jackson, D. 1992. *In situ* hybridization in plants. En: "Molecular Plant Pathology: A Practical Approach" pp: 163-174. Vol. I. Eds Gurr M.J., McPherson, M.J., Bowles, D.J. Oxford University Press.

Jain, R.K., Pappu, H.R., Pappu, S.S., Krishna Reddy M., Vani, A. 1998. *Watermelon bud necrosis tospovirus* is a distinct virus species belonging to serogroup IV. *Archives of Virology* 143:1637-1644.

Janssen, D., Ruiz, L., Velasco, L., Segundo, E., Cuadrado, I.M. 2001. New insights into the evolution of *Bemisia tabaci* and CYSDV in protected cucumber crops: keys to rationalized sustainable hosticulture in the Mediterranean Area. *European*

Whitefly Symposium, Ragusa (Italia). pp: 79.

Jones, D.R. Sansford, C., Morris, J. 2001. Viruses transmitted by whiteflies threaten tomato and cucumber crops within the European Union. European Whitefly Symposium, Ragusa (Italia). pp: 51.

Jordá, C. 1997. Bacterias, fitoplasmas y viroides. En: "Melones. Compendios de Horticultura 10". pp: 153-158. Ed. Namesny A. Ediciones de Horticultura SL.

Jorda, C. 1991. Virosis de las plantas hortícolas. Phytoma España, 30:16-22.

Jordá-Gutiérrez, C., Gómez-Guillamón, M.L., Juárez, M., Alfaro-García, A. 1993. Clostero-like particles associated with a yellows disease of melons in South-eastern Spain. Plant Pathology, 42:722-727.

Karasev A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. Annual Review of Phytopathology 38:293-324.

Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., Dawson, W.O. 1995. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. Virology 208:511-522.

Karasev, A.V., Kashina, A.S., Gelfand, V.I., Dolja, V.V. 1992. HSP70-related 65 kDa protein of *Beet yellows closterovirus* is a microtubule-binding protein. FEBS Letters 304:1-24.

Karyeija, R.F., Kreuze, J.F., Gibson, R.W., Valkonen, J.P.T. 2000. Synergistic interactions of a Potyvirus and a phloem-limited *Crinivirus* in sweet potato plants. Virology 269:26-36.

Katis, N.I., Livieratos, I., Winter, S., Boubourakas, I., Tsitsipis, J.A. 2001. Epidemics of *Beet pseudo-yellows virus* in glasshouse melon and cucumber crops in Greece. European Whitefly Symposium, Ragusa (Italia). pp: 50.

Kato, K., Hanada, K., Kameya-Iwaki, M. 2000. *Melon yellow spot virus*: A distinct species of the genus *Tospovirus* isolated from melon. Phytopathology 90:422-426.

Klaassen, V.A., Boeshore, M., Dolja, V.V., Falk, B.W. 1994. Partial characterization of the *Lettuce infectious yellows virus* genomic RNAs, identification of the coat protein gene and comparison of its amino acid sequence with those of other filamentous RNA plant viruses. Journal of General Virology 75: 1525:1533.

Klaassen, V.A., Boeshore, M., Koonin, E.V., Tian, T., Falk, B.W. 1995. Genome structure and phylogenetic analysis of *Lettuce infectious yellows virus*, a whitefly-transmitted, bipartite closterovirus. Virology, 208:99-110.

Klaassen, V.A., Mayhew, D., Fisher, D., Falk, B.W. 1996. *In vitro* transcripts from cloned cDNAs of the LIYV closterovirus bipartite genomic RNAs are competent for replication in *Nicotiana benthamiana* protoplasts. Virology 222:169-175.

Kennedy, J.S., Day, M.F., Eastop, V.F. 1962. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Institute of Entomology.

Kim, K.S., Gonsalves, D., Teliz, D., Lee, K.W. 1989. Ultrastructure and mitochondrial vesiculation associated with closteroviruslike particles in leafroll-diseased grapevines. *Phytopathology* 79:357-360.

Koonin, E.V., Dolja, V. V. 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews of Biochemical and Molecular Biology* 28:375-430.

Lacasa, A., Bielza, P., Guerrero, M.M. 1998. Evolución de las plagas de los cultivos hortícolas en el último decenio. *Phytoma* 100:129-137.

Larsen, R.C., Kim, K.S., Scott, H.A. 1991. Properties and cytopathology of *Diodia vein chlorosis virus*-a new whitefly-transmitted virus. *Phytopathology* 81:227-232.

Lecoq, H., Desbiez, C., Delécolle, B., Cohen, S., Mansour, A. 2000. Cytological and molecular evidence that the whitefly-transmitted *Cucumber vein yellowing virus* is a tentative member of the family *Potyviridae*. *Journal of General Virology* 81:2289-2293.

Lesemann, D.E. 1988. Cytopathology. En: "The plant viruses. The filamentous plant viruses". Vol. 4, pp:179-235. Ed. Milne, R. G. Plenum Press, NY.

Lesemann, D.E. 1991. Specific cytopathological alterations in virus-infected plant cells. En: "Electron microscopy of plant pathogens". pp: 147-159. Eds. Mendegen, K., Lesemann, D.E. Springer-Verlag.

Lister, R.M., Bar-Joseph, M. 1981. Closterovirus. En: "Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis". pp: 809-844. Ed. Kurstak, E. Elsevier, Holland.

Liu, H.-Y., Wisler, C.G., Duffus, J.E. 2000. Particle lengths of whitefly-transmitted criniviruses. *Plant Disease*, 84:803-805.

Liu H.Y., Duffus J.E. 1990. *Beet pseudo-yellows virus*: purification and serology. *Phytopathology*, 80:866-869.

Liu, S., Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G. 1997. Efficient whitefly transmission of *African cassava mosaic geminivirus* requires sequences from both genomic components. *Journal of General Virology*, 78:1791-1794.

Livieratos, I.C., Avgelis, A.D., Coutts, R.H.A. 1999. Molecular characterization of the *Cucurbit yellow stunting disorder virus* coat protein gene. *Phytopathology* 89:1050-1055.

Livieratos, I.C., Katis, N., Coutts, R.H.A. 1998. Differentiation between *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Beet pseudo-yellows virus* by reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Plant Pathology*, 47:362-369.

Livieratos, I.C., Muller, G., Salazar, L.F., Coutts R.H.A. 2001. Similarity and divergence among whitefly-transmitted closteroviruses. European Whitefly Symposium, Ragusa (Italia). pp: 48.

Locascio, S.L. 1996. Cucurbits: cucumber, muskmelon and watermelon. En: "Nutrient deficiencies and toxicities in crop plants". pp: 123-130. Ed. Bennett, W.F. APS Press.

López-Moyá, J.J., López-Abella, D. 1996. Transmisión de virus de plantas por insectos vectores. En: "Patología Vegetal". pp: 275-300. Vol. I. Eds. Llácer, G., López, M^aM., Trapero, A., Bello, A. Sociedad Española de Fitopatología.

Lot, H., Delecalle, B., Lecoq, H. 1982. A whitefly-transmitted virus causing muskmelon yellows in France. Acta Horticulturae, 127:175-182.

Luis-Arteaga, M., Alvarez, J.M., Alonso-Prados, J.L., Bernal, J.J., García-Arenal, F., Laviña, A., Batlle, A., Moriones, E. 1998. Occurrence, distribution, and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grow melon in Spain. Plant Disease, 82:979-982.

Luis-Arteaga, M. 1994. Enfermedades producidas por virus. En: "Enfermedades de las cucurbitáceas". pp: 73-91. Eds. Díaz-Ruiz, J.R., García-Jiménez, J. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología nº1. Phytoma España.

Mahgoub, H.A., Wipf-Scheibel, C., Delecalle, B., Pitrat, M., Dafalla, G., Lecoq, H. 1997. *Melon rugose mosaic virus*: characterization of an isolate from Sudan and seed transmission in melon. Plant Disease 81:656-660.

MAPA 1999. Anuario de Estadística Agroalimentaria. Secretaría General Técnica, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. 695 pp.

Markham, P.G., Bedford, I.D., Liu, S., Frolich, D.F., Rosell, R., Brown, J.K. 1996. The transmission of geminiviruses by biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius). En: "Bemisia 1995: taxonomy, biology, damage, control and management". pp: 69-75. Eds. Gerling D., Mayer R.T.. Intercept Ltd, U.K.

Martelli, G.P. 1991. Cytochemistry of virus-infected plant cells. En: "Electron microscopy of plant pathogens". pp: 103-117. Eds. Mendegen, K., Lesemann, D.E. Springer-Verlag.

Martelli, G.P. 1993. The New Clasification of Plant Viruses. Virology 3:131-140.

Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Duffus, J.E., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Murrant, A.F., Namba, S., Niblett, C.L., Vetten, H.J., Yoshikawa, N. 2000. Family *Closteroviridae*. En: "Virus Taxonomy". Eds. van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L. San Diego, CA Academic Press.

Martoja, R., Ballan-Dufrçais, C. 1982. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. En: "Insect Ultrastructure". pp: 199-264. Eds. King, R.C., Akai, H. Plenum Press.

Más, P., Sánchez-Pina, A., Balsalobre, J., Pallás, V. 2000. Subcellular localisation of cherry leaf roll virus coat protein and genomic RNAs in tobacco leaves. *Plant Science* 153:113-124.

Matthews, R.E.F. 1991. *Plant Virology*. 3ª De. Academic Press. 835 pp.

Medina, V., Bedford, I., Marta, F., Pinner, M.S., Markham, P.G. 2000. *Bemisia tabaci* (Genn.): Anatomía interna y relación con el virus del rizado amarillo del tomate. X Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Valencia (España). pp: 36.

Medina, V., Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y., Dolja, V.V. 1999. Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by *Beet yellows closterovirus*. *Virology* 260:173-181.

Medina, V., Tian, T., Yeh, H., Livieratos, I.C., Falk, B.W. 2001. The *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) P26 gene product is localized at the plasmalemma deposits within LIYV-infected cells. European Whitefly Symposium, Ragusa (Italia). pp: 54.

Medina, V., Tian, T., Wierzchos, J., Falk, B.W. 1998. Specific inclusion bodies are associated with replication of *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) RNAs in *Nicotiana benthamiana* protoplasts. *Journal of General Virology* 78:2325-2329.

Medina, V., Venkitesh, R., Markham, P.G. 1994. Immunoelectronmicroscopy of viral complex causing rice tungro disease (RTD). *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales, Fuera de Serie* n°2:343-354.

Morel, G., Cavalier, A. 2001. *in situ* hybridization in light microscopy. *Methods in visualization Series*. Ed. Morel, G. CRC Press. 327 pp.

Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F.J.M. 1999. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology*, 256:75-84.

Murant, A.F., Roberts, J.M., Elnagar, S. 1976. Association of virus-like particles with the foregut of the aphid *Cavariella aegopodii* transmitting the semi-persistent viruses Anthriscus yellows and Parsnip yellow fleck. *Journal of General Virology* 31:47-57.

Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M., Moriones, E. 2000. Severe yellowing in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease* 84:835-837.

Nameth, S.T., Dodds, J.A., Paulus, A.O., Laemmien, F.F. 1986. Cucurbits viruses of California an ever-changing problem. *Plant Disease* 70:8-12.

Nayar, N.M., More, T.A. 1998. Cucurbits. Science Publishers. 340 pp.

Nayar, N.M., Singh, R. 1998. Taxonomy, distribution and ethnobotanical uses. En: "Cucurbits". pp: 1-18. Eds. Nayar, N.M., More, T.A. Science Publishers.

Nelson, R.S., van Bel, A.J.E. 1998. The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. *Progress in Botany* 59:476-533.

Nuez, F., Pico, B., Iglesias, A., Esteva, J., Juarez, M. 1999. Genetics of Melon yellows resistance derived from *Cucumis melo* ssp. *agrestis*. *European Journal of Plant Pathology* 105:453-464.

Oparka, K.J., Santa Cruz, S. 2000. The great scape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:323-347.

Pallás, V., Más, P., Sánchez-Navarro, A. 1998. Detection of plant RNA viruses by non-isotopic Dot-Blot hybridization. En: "Plant Virology Protocols: From virus isolation to transgenic resistance". pp: 461-496. *Methods in molecular biology* Vol. 81. Eds. Foster, G.D., Taylor, S.C. Humana Press. Totowa, NJ.

Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y., Dolja, V.V. 1998. HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:14771-14776.

Perring, T.M. 1996. Biological differences of two species of *Bemisia* that contribute to adaptive advantage. En: "Bemisia 1995: taxonomy, biology, damage, control and management". pp: 3-16. Eds. Gerling, D., Mayer, R.T.. Intercept Ltd, U.K.

Pinto, R.L., Hoefert, L.L., Fail, G.L. 1988. Plasmalema deposits in tissues infected with *Lettuce infectious yellows virus*. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* 100:245-254.

Polston, J.E. 2001. Whitefly-geminivirus interactions: a new world perspective. *Resúmenes del European Whitefly Symposium, Ragusa (Italia)*. pp: 43.

Ponsen, M.B. 1977. Alimentary tract. En: "Aphids as virus vectors". pp: 79-97. Eds. Harris, K.F., Maramorosch K. Academic Press

Purcifful, D.E., Hiebert, E., Petersen M.A., Simone G.W., Kucharek, T.A., Gooch, M.D., Crawford, W.E., Beckham, K.A., De Sa, P.B. 1998. Partial characterization of a distinct potyvirus isolated from watermelon in Florida. *Plant Disease* 82:1386-1390.

Richards, O.W., Davies, R.G. 1983. Tratado de entomología Imms. Estructura, fisiología y desarrollo 10ª Ed. Ediciones Omega. pp: 183.

Richardson, K.C., Jarett, L., Finke, E.H. 1960. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology* 35:313-323.

Rincón, L. 1997. Fertilización del melón en riego por goteo. En: "Melones. Compendios de Horticultura 10". pp: 85-93. Ed. Namesny, A. Ediciones de Horticultura SL.

Robinson, R.W., Decker-Walters, D.S. 1997. Cucurbits. *Crop Production Science in Horticulture series 6*. Series Editor Atherton, J., Rees, A. CAB International. 226 pp.

Rodrigo, G., Wierzchos, J., Tian, T., Falk, B.W., Medina, V. 2000. *In situ* localization of *Lettuce infectious yellows* and *Maize stripe viruses* by immunogold labeling and laser scanning confocal microscopy in reflected signal detection mode. *Acta Microscopica* 8:24-32.

Rodríguez, R., García-Jiménez, J. 1994. Condiciones edáficas adversas. En: "Enfermedades de las cucurbitáceas en España". pp: 120-122. Eds. Díaz-Ruíz, J.R., García-Jiménez, J. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología nº1. Agropubli SL.

Rodríguez-Cerezo, E., Célix, A. 1996. Closterovirus transmitidos por mosca blanca. En: "El Virus del rizado amarillo (hoja en cuchara) del tomate (TYLCV) y su vector *Bemisia tabaci*". pp: 61-66. Región de Murcia. Servicio de Publicaciones de la Consejería de Medio Ambiente Agricultura y Agua. Serie: Jornadas, 8.

Rodríguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J.G., Lomonosof, G.P., Qiu S.G., Linstead, P., Shanks, M., Risco, C. 1997. The coat and cylindrical inclusion proteins of a Potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* 236:296-306.

Rodríguez-Rodríguez, M^aD., Téllez, M^aM., Rodríguez-Rodríguez, M^aP. 1997. Plagas del melón. En: Melones. pp: 113-130. Ed. Namesny, A. Colección Compendios de Horticultura 10. Ediciones de Horticultura SL.

Roggero, P., Milne, R.G., Masenga, V., Ogliara, P. 1995. First reports of *Eggplant mottled dwarf rhabdovirus* in cucumber and pepper. *Plant Disease* 79:321.

Roland, J.C., Vian, B. 1991. General preparation and staining of thin sections. En: "Electron microscopy of plant cells" pp: 1-66. Eds. Hall, J.L., Hawes, C. Academic Press.

Rosell, R.C., Lichty, J.E., Brown, J.K. 1995. Ultrastructure of the mouthparts of adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera:Aleyrodidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 24:297-306.

Rubinstein, G., Czosnek, H. 1997. Long-term association of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) with its whitefly vector *Bemisia tabaci*, effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology*, 78:2683-2689.

Rubio, L., Soong, J., Kao, J., Falk, B.W. 1999. Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne Closteroviruses of cucurbits: *Lettuce infectious yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Beet pseudo-yellows virus*. *Phytopathology* 89:707-711.

Ruiz, L., Janssen, D., Cuadrado, I.M. 1999. Moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) sobre cultivos protegidos de cucurbitáceas en Almería: Dinámica de las poblaciones de *Trialeurodes vaporariorum* (West.) y *Bemisia tabaci* (Genn.) y caracterización del biotipo de *B. tabaci*. *Agrícola Vergel* 44:660-666.

Samretwanich, K., Chiemsoombat, P., Kittipakorn, K., Ikegami, M. 2000. Yellow leaf disease of cantaloupe and wax gourd from Thailand caused by *Tomato leaf curl virus*. *Plant Disease* 84:200.

Sánchez-Monge, E. 1990. Diccionario de Plantas Agrícolas. Servicio de Publicaciones Agrarias. Ministerio de Agricultura Pesa y Alimentación. pp: 467.

Satyanarayana, T., Gowda, S., Boyko, V.P., Albiach-Marti, M.R., Mawassi, M., Navas-Castillo, J., Karasev, A.V., Dolja, V., Hilf, M.E., Lewandowski, D.J., Moreno, P., Bar-Joseph, M. 1999. An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:7433-7438.

Scopsi, L. 1989. Silver-enhanced colloidal gold method. En: "Colloidal gold. Principles, methods and applications". pp: 251-296. Ed. Hayat, M.A. Academic Press INC.

Simón, B., Hernández, E., Carnero, A., Beitia, F., Aguiar, A., Benazoum, A., Cenis, J.L. 2001. Biotypes of *Bemisia tabaci* in the western mediterranean basin and atlantic Islands. *European Whitefly Symposium, Ragusa (Italia)*.

Smith, D.S. 1968. *Insect Cells. Their structure and function.* Oliver and Boyd. pp: 325.

Snodgrass, R.E. 1993. *Principles of insect morphology.* Cornell University Press. pp: 667.

Sohi, H.S., Sharma, S.R. 1998. Fungal diseases and their management. En: "Cucurbits". pp: 211-224. Eds. Nayar, N.M., More, T.A. Science Publishers.

Soria, C., Gomez-Guillamón, M.L., Duffus, J.E. 1991. Transmission of the agent causing a melon yellowing disease by the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* in southeast Spain. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97:289-296.

Sûtíc, D.D., Ford, R.E., Tôsic, M.T. 1999. *Handbook of plant virus diseases.* CRC Press. pp: 553.

Thompson, J.R., García-Arenal, F. 1998. The bundle sheath-phloem interface of *Cucumis sativus* is a boundary to systemic infection by *Tomato aspermy virus*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11:109-114.

Tian, T., Klaassen, V.A., Soong, J., Wisler, G., Duffus, J.E., Falk, B.W. 1996. Generation of cDNAs specific to *Lettuce infectious yellows virus* and other whitefly-transmitted viruses by RT-PCR and degenerate oligonucleotide primers corresponding to the closterovirus gene encoding the heat shock protein 70 homolog. *Phytopathology* 86:1167-1173.

Tian, T., Rubio, L., Yeh, H. -H., Crawford, B., and Falk, B. W. 1999. *Lettuce infectious yellows virus*: in vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology* 80:1111-1117.

Torés, J.A., Álvarez, J. M^a. 1994. Oidio (*Sphaerotheca fuliginea*, *Erysiphe cichoracearum*, *Leveillula taurica*). Enfermedades producidas por hongos. En: "Enfermedades de las cucurbitáceas en España". pp: 13-20. Eds. Díaz-Ruíz, J.R., García-Jiménez, J. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología nº1. Agropubli SL.

Torres, J.M. 1997. Los tipos de melón comerciales. En: "Melones. Compendios de Horticultura 10". pp: 13-20. Ed. Namesny, A. Ediciones de Horticultura SL.

Tsai, J.H., Perrier, J.L. 1996. Morphology of the digestive and reproductive systems of *Dalbulus maidis* and *Graminella nigrifons* (Homoptera:Cicadellidae). *Florida Entomologist* 79:563-578.

Turgeon, R., Webb, J.A., Evert, R.F. 1975. Ultrastructure of minor veins in *Cucurbita pepo* leaves. *Protoplasma* 83:217-232.

Ullman, D.E., Cho, J.J., German, T.L. 1991. Occurrence and distribution of cucurbit viruses in the Hawaiian Islands. *Plant Disease* 75:367-370.

Valverde, R.A., Nameth, S.T., Jordan, R.L. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Phytopathology* 75:255-258.

VandenBosch, K. A. 1992. Localization of proteins and carbohydrates using immunogold labelling in light and electron microscopy. En: "Molecular Plant Pathology: A Practical Approach" pp: 31-44. Vol. II. Eds. Gurr, M.J., McPherson, M.J., Bowles, D.J. Oxford University Press.

Vilaró S. 1991. Fijación química en inmunocitoquímica: métodos y fundamentos. En: "Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica". pp: 65-80. Eds. Durfort, M., Vilaró, S., Renau, J., Serratos, J. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Barcelona.

Visa, N. 1991. Inmunocitoquímica e hibridación *in situ* en microscopía óptica y electrónica. En: "Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica". pp: 295-321. Eds. Durfort, M., Vilaró, S., Renau, J., Serratos, J. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Barcelona.

van del Heuvel, F.J.M., Hogenhout, S.A., van der Wilk, F. 1999. Recognition and receptors in virus transmission by arthropods. *Trends in Microbiology* 7:71-76.

van Lenteren, J.C. 1992. *Bemisia tabaci*: a threat for Europe. Newsletter on Biological Control in Greenhouses 12:10 -11.

Wells, B. 1985. Low temperature box and tissue handling device for embedding biological tissue for immunostaining in electron microscopy. *Micron and Microscopica Acta* 16:49-53.

Wisler G.C., Duffus J.E., Liu H.-Y., Li R.H. 1998. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted Closteroviruses. *Plant Disease* 82:270-280.

Woudt, L.P., deRover, A.P., deHaan, P.T., vanGrinsven, M.Q.J.M. 1993. Sequence analysis of the RNA genome of *Cucumber chlorotic spot virus* (CCSV), a whitefly-transmitted closterovirus. IX International Congress of Virology, Glasgow (Reino Unido). pp: 326.

Yamashita, S., Doi, Y., Yora, K., Yoshino, M. 1979. *Cucumber yellows virus*: Its transmission by the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), and the yellowing disease of cucumber and muskmelon caused by the virus. *Annuary of the Phytopathological Society of Japan* 45:484-496.

Yilmaz, M.A., Oazaslan, M., Oazaslan, D. 1989. *Cucumber vein yellowing virus* in *Cucurbitaceae* in Turkey. *Plant Disease* 73:610.

Yuki, V.A., Rezende, J.A.M., Kitajima, E.W., Barroso, P.A.V., Kuniyuki, H., Groppo, G.A., Pavan, M.A. 2000. Occurrence, distribution and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 84:516-520.

Zitter, T.A., Hopkins, D.L., Thomas, C.E. 1996. *Compendium of Cucurbit Diseases*. APS Press. 87 pp.

Zouba, A.A., Lopez, M.V., Anger, H. 1998. *Squash yellow leaf curl virus*: A new whitefly-transmitted poty-like virus. *Plant Disease* 82:475-478.

Fe de erratas

Página 31 a 51, encabezamiento del Capítulo I, donde pone Capítulo I. Diagnóstico y propagación de BPYV y CYSDV debe poner Capítulo I. Diagnóstico y propagación de BPYV y CYSDV.

Página 78, donde pone en presencia de escamas de KOH debe poner en presencia de escamas de NaOH

Página 115, donde pone anatomía intrerna debe poner anatomía interna.

Página 123, pie de la figura 35 donde pone Barra 65 μ debe poner Barra 45 μ .

Página 124, pie de la Figura 36 donde pone A: localización de algunos órganos y estructuras del canal alimentario, glándulas salivares (azul) y distintos tramos del aparato digestivo (rojo) debe poner localización de algunos órganos y estructuras, cerebro (azul), glándulas salivares (violeta), tramos del aparato digestivo (rojo), huevo (amarillo), ovarios y ovariolos (verde), espermateca (morado)

Página 157, conclusión 1, donde pone el virus del amarilleo enanizante de las cucurbitáceas (CSYDV) debe poner el virus del amarilleo enanizante de las cucurbitáceas (CYSDV)

Página 157, conclusión 5, donde pone como el virus con más mayor presencia, debe poner el virus con mayor presencia.

Página 158, conclusión 11, donde pone BPYV y CSYDV debe poner BPYV y CYSDV.