

**UNIVERSITAT DE LLEIDA**

**EL AMARILLO DE LAS CUCURBITÁCEAS: DIAGNÓSTICO  
Y MICROSCOPIA DE LAS RELACIONES VIRUS-PLANTA  
Y VIRUS-VECTOR**

Gema Rodrigo Villar  
Tesis Doctoral



**UNIVERSITAT DE LLEIDA**

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària  
Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal

**EL AMARILLO DE LAS CUCURBITÁCEAS: DIAGNÓSTICO Y  
MICROSCOPIA DE LAS RELACIONES VIRUS-PLANTA  
Y VIRUS-VECTOR**

**TESIS DOCTORAL**

**Gema Rodrigo Villar**

**Lleida, Marzo 2002**



Memoria presentada por Gema Rodrigo Villar para optar al grado de Doctor  
Ingeniero Agrónomo por la Universitat de Lleida

Doctoranda

Gema Rodrigo Villar

Dirección de tesis

Dr. Vicente Medina Piles

Dra. M<sup>a</sup> Angeles Achón Samá

Lleida, marzo de 2002

**A mis padres**

La vida hierve a nuestro alrededor  
solo que no la vemos

Paramecios, átomos y otras cosas pequeñas. Rosa Montero

## AGRADECIMIENTOS

A los Drs. Vicente Medina y M<sup>a</sup> Angeles Achón, directores de esta Tesis, por su gran ayuda, consejos y dedicación en todo momento.

Al Dr. Bryce W. Falk y al Dr. Tongyan Tian, profesores e investigadores del Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de California en Davis (UCDavis), EE.UU., por todo el material e información que me han proporcionado para el estudio de BPYV, LIYV y TICV.

Al Dr. Valerian Dolja, investigador y profesor del Departamento de Botánica y Patología Vegetal de la Universidad Estatal de Oregon, EE.UU. por el material para el diagnóstico de BYV.

Al Dr. Emilio Rodríguez-Cerezo, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Madrid, por el material relacionado con CYSDV.

Al Dr. Enrique Moriones, Estación Experimental La Mayora, CSIC Málaga, y al Dr. Aurelio Carnero, Instituto Canario de investigaciones Agrarias, La Laguna, Tenerife, por el material para el estudio de ToCV.

Al Dr. Miguel Juárez, Departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández en Orihuela, Alicante, por su ayuda en las prospecciones en el Sudeste Español.

A la Dra. Asumpció Batlle, Departament de Patologia Vegetal del IRTA de Cabrils, por facilitarme material vegetal infectado con CMV, WMV-2 y ZYMV.

Al Dr. Jacek Wierzchos, Director Técnico del Servei de Microscopia Electrónica de la Universitat de Lleida (SUIC-ME de la UdL), y a Xavier Calomarde, técnico del mismo servicio, por toda la ayuda y colaboración que me han prestado.

Al Dr. Jaume Lloveras, Director del Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal de la UdL, por facilitarme el acceso y uso de la infraestructura del departamento que dirige, y en su nombre, a todos los miembros de dicho departamento.

A Pilar Henández, Unitat d'Entomologia Aplicada del IRTA de Cabrils por la poblaciones de *Trialeurodes vaporariorum*

A Antonio Monturiol y a todos los técnicos de las Cooperativas y Asociaciones de Defensa Vegetal de la comarca de El Segrià, por su ayuda en las prospecciones realizadas en esta zona.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la concesión de una beca de FPI para el desarrollo este trabajo.

A las bibliotecarias de la Escola Técnica Superior d'Enginyeria Agrària (ETSEA) de la UdL, por facilitarme el trabajo de búsqueda y recopilación bibliográfica.



A los miembros del Servei de Reproducció d'imatge de la Universitat de Lleida (SUIC-RI de la UdL) por su ayuda con la impresión de las imágenes

Con estas líneas también quisiera agradecer la ayuda que durante estos últimos años he recibido de numerosas personas, especialmente

A Marta Sobrepere por su ayuda en el laboratorio y por el trabajo bien hecho.

A Federico Marta (en fin pilarín) por su ayuda con las fotografías de campo.

A August, Carla, Carmen, Francesc, José Antonio, Laura, Luis y Mikel por compartir experiencias de becarios en crisis.

A Montse por su amistad, ayuda y colaboración más allá de la biblioteca

A Joana y Xavi por méritos propios, ya que durante estos años continuamente he puesto a prueba su amistad y siempre han conseguido salir airosos.

A Jasone, Mónica, Carles y Roc por ser unos compañeros, y sin embargo amigos, que han aguantado de casi todo y no han cambiado la cerradura.

A los miembros de la A.S. Resacas por celebrar todas las vísperas y fiestas de guardar, y por continuar preguntándome angustiados como me va y sí trabajaré en lo mío.

A toda la familia Lotina-García porque hace más de 12 años que me acogen en su casa.

A toda mi familia por animarme durante estos años. A mis padres, que siempre han respetado mis decisiones, a Fátima que siempre plantea la mejor alternativa y a mi abuela que se preocupa.

---

**INDICE GENERAL**

	Página
INDICE	I
RELACIÓN DE FIGURAS	VII
RELACIÓN DE CUADROS	X
RELACIÓN DE ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Introducción	3
1.1. Los cultivos de cucurbitáceas en España	4
1.1.1. El amarilleo de las cucurbitáceas	7
1.1.2. Etiología del amarilleo en cucurbitáceas	9
1.1.2.1. Agentes abióticos	9
1.1.2.2. Agentes bióticos	10
1.1.2.2.1. Fitopatógenos de naturaleza no vírica	10
1.1.2.2.2. Virus: virus causantes del 'amarilleo de las cucurbitáceas'	12
1.2. Los closterovirus: familia <i>Closteroviridae</i>	14
1.2.1. Género <i>Closterovirus</i>	16
1.2.2. Género <i>Crinivirus</i>	17
1.3. Las moscas blancas, vectores de virus causantes del amarilleo de las cucurbitáceas	18
1.3.1. Distribución geográfica	19
1.3.2. Importancia como plagas en hortalizas	19
1.3.3. Importancia como vectores	20
1.3.4. Modos de transmisión de virus por moscas blancas	22
1.3.5. Modelos establecidos	23
1.3.5.1. Mecanismo asociado al estilete	23
1.3.5.2. Ingestión-Regurgitación	23
1.3.5.3. Ingestión-Salivación	24
2. OBJETIVOS	25
CAPITULO I. Diagnóstico y propagación de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	29
1. INTRODUCCIÓN	31
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL Y MÉTODOS	32
3.1. Prospecciones	32

	Página
3.2. Diagnóstico de <i>Beet pseudo-yellow virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	33
3.2.1. Métodos serológicos	33
3.2.1.1. Antisueños	33
3.2.1.2. Purificación de inmunoglobulinas	33
3.2.1.3. Prueba ELISA	33
3.2.2. Métodos moleculares	34
3.2.2.1. Extracción de ácidos nucleicos	34
3.2.2.1.1. Extracción de ARNs totales de plantas	34
3.2.2.1.2. Extracción de ARN bicatenario	36
3.2.2.2. Hibridaciones moleculares	37
3.2.2.2.1. Obtención y marcaje no isotópico de sondas	37
3.2.2.2.1.1. Obtención de sondas de ARN	38
3.2.2.2.1.2. Obtención de sondas de ADN	40
3.2.2.2.2. Dot-Blot	41
3.2.2.3. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa	42
3.3. Propagación de <i>Beet pseudo-yellow virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	44
3.3.1. Poblaciones de moscas blancas y material vegetal infectado	44
3.3.2. Transmisiones mediante vector	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Síntomas observados	45
4.2. Detección de <i>Beet pseudo-yellow virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	47
4.2.1. Mediante serología	47
4.2.2. Extracción y análisis del ARN bicatenario	47
4.2.3. Hibridación	48
4.2.4. Amplificación del ARN viral	49
4.3. Aislamiento de <i>Beet pseudo-yellow virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	50
5. DISCUSIÓN	51
CAPITULO II. Prospección de virus asociados a amarilleo en melón en la provincia de Lleida	55
1. INTRODUCCIÓN	57
2. OBJETIVOS	58
3. MATERIAL Y MÉTODOS	58
3.1. Prospecciones	58
3.2. Métodos serológicos	59
3.2.1. Antisueños, purificación de inmunoglobulinas y prueba ELISA	59
3.3. Reacciones de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de <i>Beet pseudo-yellow virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	59

	Página
4. RESULTADOS	62
4.1. Síntomas observados	62
4.2. Presencia de <i>Beet yellows virus</i> , <i>Beet western yellows virus</i> , <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> , <i>Cucumber mosaic virus</i> , <i>Papaya ring-spot virus watermelon strain</i> , <i>Squash mosaic virus</i> , <i>Watermelon mosaic virus-2</i> y <i>Zucchini yellows mosaic virus</i>	64
4.3. Presencia de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	65
5. DISCUSIÓN	65
CAPITULO III. Citopatología de las infecciones producidas por los virus causantes del amarilleo de las cucurbitáceas: comparación con la de otros <i>Crinivirus</i>	69
1. INTRODUCCIÓN	71
2. OBJETIVOS	73
3. MATERIAL Y MÉTODOS	73
3.1. Material vegetal	73
3.2. Microscopía electrónica de transmisión: proceso convencional	73
3.3. Ultramicrotomía	75
3.4. Observación preliminar de las muestras	77
3.4.1. Tinción de secciones semifinas para microscopía óptica	77
3.4.2. Contraste de secciones para microscopía electrónica de transmisión	77
4. RESULTADOS	78
4.1. Cambios ultraestructurales producidos por <i>Beet pseudo-yellows virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	79
4.2. Citopatología comparativa de <i>Lettuce infectious yellows virus</i> , <i>Tomato infectious chlorosis virus</i> y <i>Tomato chlorosis virus</i>	83
5. DISCUSIÓN	88
CAPITULO IV. Localización de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> , <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> y <i>Lettuce infectious yellows virus</i> en tejido vegetal	91
1. INTRODUCCIÓN	93
2. OBJETIVOS	94
3. MATERIAL Y MÉTODOS	94
3.1. Material vegetal	94
3.2. Técnicas microscópicas	94

	Página
3.2.1. Proceso de inclusión en resina para inmunomarcaje e hibridación <i>in situ</i>	95
3.2.2. Proceso de inclusión en parafina para hibridación <i>in situ</i>	95
3.2.3. Microtomía	97
3.2.4. Observación preliminar de las muestras	98
3.2.5. Inmunomarcaje con oro coloidal	98
3.2.5.1. Absorción cruzada de antisueros	98
3.2.5.2. Inmunolectromicroscopía	99
3.2.6. Hibridación <i>in situ</i>	99
4. RESULTADOS	102
4.1. Localización de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> en el tejido vegetal	102
4.2. Localización de <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> en el tejido vegetal	104
4.3. Localización de <i>Lettuce infectious yellows virus</i> en el tejido vegetal	110
5. DISCUSIÓN	112
CAPITULO V. Aspectos de la anatomía interna de las moscas blancas relacionados con la transmisión <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood) <i>versus Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	115
1. INTRODUCCIÓN	117
2. OBJETIVOS	119
3. MATERIAL Y MÉTODOS	119
3.1. Insectos	119
3.2. Procesos de inclusión y microscopía	119
4. RESULTADOS	120
5. DISCUSIÓN	128
CAPITULO VI. Localización de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> , <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> y <i>Lettuce infectious yellows virus</i> en sus insectos vectores	131
1. INTRODUCCIÓN	133
2. OBJETIVOS	134
3. MATERIAL Y MÉTODOS	134
3.1. Insectos	134
3.2. Técnicas microscópicas	134

---

	Página
4. RESULTADOS	135
4.1. Observaciones preliminares	135
4.2. Localización de <i>Beet pseudo-yellow virus</i> en <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	136
4.3. Localización de <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> en <i>Bemisia tabaci</i>	136
4.4. Localización de <i>Lettuce infectious yellows virus</i> en <i>Bemisia tabaci</i>	137
5. DISCUSIÓN	142
3. DICUSIÓN GENERAL	145
4. CONCLUSIONES	155
5. BIBLIOGRAFÍA	159
ANEJO I. Relación de especies virales que infectan a cucurbitáceas	179
ANEJO II. Características de alguno miembros de la familia <i>Closteroviridae</i>	183
ANEJO III. Especies de moscas blancas presentes actualmente en España	189
ANEJO IV. Modelos de transmisión de virus por vectores homópteros	193
ANEJO V. Relación de los cultivos protegidos de melón y pepino visitados en el sudeste español en la prospección de <i>Closterovirus</i> transmitidos por moscas blancas	197
ANEJO VI. Relación de las parcelas de melón al aire libre de la comarca de El Segrià, provincia de Lleida, para la prospección de virus inductores de amarilleo	201
ANEJO VII. Esquema del aparato digestivo y la cámara filtrante de distintos insectos homópteros.	205



## RELACIÓN DE FIGURAS

	Página	
Figura 1	Principales áreas y modos de producción de melón en España	6
Figura 2	Evolución de la superficie, producción y rendimiento del cultivo del melón en España desde 1985-1997	7
Figura 3	Síntomas producidos por la enfermedad del amarilleo de las cucurbitáceas	8
Figura 4	Cambios ultraestructurales producidos por BYV en <i>Tetragonia expansa</i> (Murr.)	15
Figura 5	Organización de los genomas de los miembros tipo de los géneros <i>Closterovirus</i> y <i>Crinivirus</i>	17
Figura 6	Partículas virales de <i>Lettuce infectious yellows virus</i>	18
Figura 7	Ejemplares de <i>Bemisia tabaci</i> y <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	21
Figura 8	Imágenes de los ensayos de transmisión con moscas blancas para la propagación de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	45
Figura 9	Síntomas observados en las muestras de melón y pepino procedentes del Sudeste Español	46
Figura 10	Análisis de la extracción del ARN bicatenario	47
Figura 11	Hibridación con sondas de ARN de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> en ARNs totales de plantas sanas e infectadas con BPYV y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	48
Figura 12	Gel de agarosa de los productos de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa obtenidos a partir de ARNs totales y empleando las parejas de oligonucleótidos específicas de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	49
Figura 13	Síntomas observados en las muestras de melón y pepino expuestas al inóculo y al vector <i>Bemisia tabaci</i>	51
Figura 14	Localización de la zona de muestreo en la provincia de Lleida	60
Figura 15	Localización de la zona de muestreo en la provincia de Lleida	61
Figura 16	Síntomas observados en las muestras de melón procedentes de la comarca de El Segrià	63



	Página	
Figura 17	Secciones semifinas de resina para microscopía óptica	78
Figura 18	Secciones ultrafinas de hojas de melón y lechuga infectadas por <i>Beet pseudo-yellows virus</i>	81
Figura 19	Secciones ultrafinas de hojas de pepino y melón infectadas por <i>Cucurbit yellow stunting disorder</i>	82
Figura 20	Secciones ultrafinas de hojas de tabaco y lechuga infectadas por <i>Lettuce infectious yellows virus</i>	84
Figura 21	Secciones ultrafinas de hojas de lechuga infectadas por <i>Tomato infectiuos chlorosis virus</i>	85
Figura 22	Secciones ultrafinas de tomate infectadas por <i>Tomato chlorosis virus</i>	86
Figura 23	Hibridación <i>in situ</i> del gen homólogo de las proteínas de choque térmico de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> en tejido vegeta observada al microscopio óptico	103
Figura 24	Hibridación <i>in situ</i> del gen homólogo de las proteínas de choque térmico de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> en tejido vegetal observada al microscopio electrónico de transmisión	104
Figura 25	Inmunolocalización de la proteína de cubierta de <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> en tejido vegetal	106
Figura 26	Inmunolocalización de la proteína de cubierta de <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> en tejido vegetal	107
Figura 27	Inmunolocalización de la proteína de cubierta de <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> en tejido vegetal	108
Figura 28	Hibridación <i>in situ</i> del homólogo de las proteínas de choque térmico de <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> en tejido vegetal observada al microscopio óptico	109
Figura 29	Hibridación <i>in situ</i> del homólogo de las proteínas de choque térmico de <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> en tejido vegetal observada al microscopio electrónico de transmisión	110
Figura 30	Inmunolocalización de la proteína de cubierta de <i>Lettuce infectious yellows virus</i> en tejido vegetal	111
Figura 31	Diagrama del proceso de obtención de secciones de <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	120

---

	Página
Figura 32 Sección de la cabeza y protórax de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> observada al microscopio óptico	121
Figura 33 Sección dorsoventral de la cabeza y el tórax de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> observada al microscopio óptico	122
Figura 34 Secciones dorsoventrales seriadas del protórax y mesotórax de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> observadas al microscopio óptico	123
Figura 35 Sección dorsoventral del abdomen de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> observada al microscopio óptico	123
Figura 36 Secciones parasagitales de <i>Bemisia tabaci</i> observadas al microscopio óptico	124
Figura 37 Glándulas salivares primarias de <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	125
Figura 38 Ultraestructura del intestino medio de <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	126
Figura 39 Cámara filtrante de <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	127
Figura 40 Detalles de los endosimbiontes y del intestino medio ascendente	128
Figura 41 Inmunolocalización de <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> en el aparato digestivo de <i>Bemisia tabaci</i>	138
Figura 42 Inmunolocalización de <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> en el aparato digestivo de <i>Bemisia tabaci</i>	139
Figura 43 Inmunolocalización de <i>Lettuce infectious yellows virus</i> en el inicio del canal alimentario de <i>Bemisia tabaci</i>	140
Figura 44 Inmunolocalización de <i>Lettuce infectious yellows virus</i> en el aparato digestivo de <i>Bemisia tabaci</i>	141
Figura 45 Modelo propuesto para la transmisión de <i>Crinivirus</i> de forma semipersistente por <i>Bemisia tabaci</i>	152
Figura 46 Relaciones filogenéticas de los <i>Closteroviridae</i> basadas en el gen que codifica para el homólogo de las proteínas de choque térmico	188
Figura 47 Esquema del aparato digestivo y la cámara filtrante de distintos insectos homópteros.	207

## RELACIÓN DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Agentes fitopatógenos diferentes a virus que producen amarilleamiento cucurbitáceas	11
Cuadro 2 Características de los plásmidos recombinantes empleados para la obtención de sondas	37
Cuadro 3 Resumen de los procesos de digestión y marcaje realizados para la obtención de sondas	39
Cuadro 4 Descripción de las reacciones de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa realizadas con las parejas de oligonucleótidos específicas de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> .	43
Cuadro 5 Resultados de los análisis de <i>Beet pseudo-yellows virus</i> y <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> , mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa, en las muestras recogidas durante los dos años de estudio	50
Cuadro 6 Concentración de uso de las inmunoglobulinas de cada antisuero y de las conjugadas con fosfatasa alcalina	62
Cuadro 7 Resultados de los análisis serológicos mediante ELISA-ACP durante los dos años de estudio	64
Cuadro 8 Tipos de infecciones detectados durante los dos años de estudio	65
Cuadro 9 Origen del material vegetal infectado empleado en el estudio citopatológico y tipo de resina utilizada en su inclusión	74
Cuadro 10 Procesos de inclusión en resina para observación convencional	76
Cuadro 11 Principales alteraciones observadas en las infecciones producidas por <i>Beet pseudo-yellows virus</i> , <i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> , <i>Lettuce infectious yellows virus</i> , <i>Tomato infectious chlorosis virus</i> y <i>Tomato chlorosis virus</i>	87
Cuadro 12 Procesos de inclusión en resina a baja temperatura para inmunomarcaje e hibridación <i>in situ</i>	96
Cuadro 13 Proceso de inclusión parafina para hibridación <i>in situ</i>	97

## RELACIÓN DE ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico  
 ARN: ácido ribonucleico  
 ARNmc (+): ácido ribonucleico monocatenario de sentido positivo  
 ARNbc: ácido ribonucleico bicatenario  
 ARNt: ácido ribonucleico de transferencia  
 BCIP: fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl  
 BSA: albúmina de suero bovino  
 BME: peróxido de benzoína  
 BPYV: *Beet pseudo-yellows virus*, virus del falso amarilleamiento de la remolacha (Fam. *Closteroviridae*)  
 BYV: *Beet yellows virus*, virus del amarilleo de la remolacha (Gén. *Closterovirus*)  
 BWYV: *Beet western yellows virus*, virus del amarilleo de la remolacha del oeste (Gén. *Polerovirus*)  
 cADN: ácido desoxirribonucleico complementario  
 CMV: *Cucumber mosaic virus*, virus del mosaico del pepino (Gén. *Cucumovirus*)  
 CP: proteína de cubierta viral  
 CPd: duplicado de la proteína de cubierta viral  
 CSPD: -(4-metoxiespiro {1.2-dioxetan-3,2'-(5'cloro) triciclo [3.3.1.13.7] decan}-4 il) fenil fosfato disódico.  
 CVYV: *Cucumber vein yellowing virus*, virus del amarilleamiento de las nerviaduras del pepino (Gén. *Ipomovirus*)  
 CYSVD: *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, virus del amarilleo enanizante de las cucurbitáceas (Gén. *Crinivirus*)  
 DEPC: dietil pirocarbonato  
 DPVCF: Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal  
 DIG: digoxigenina  
 DMFO: dimetil formamida  
 EDTA: ácido etilendiaminotetracético  
 ELISA: “Enzyme linked immunoabsorbent assay”  
 EPPO: “European and Mediterranean Plant Protection Organization” Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas  
 FAO: “Food and Agriculture Organization” Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación  
 GA: glutaraldehído  
 LIYV: *Lettuce infectious yellows virus*, virus del amarilleo infeccioso de la lechuga (Gén. *Crinivirus*)  
 HSP: “Heat shock proteins”, proteínas de choque térmico  
 ICTV: “International Comitee of Taxonomy of viruses” Comité Internacional de Taxonomía de Virus  
 IgG: inmunoglobulinas  
 IGL: “immunogold labelling” inmunomarcaje con oro coloidal  
 ISH: “*In situ* hibridization”, hibridación *in situ*  
 IRTA: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries  
 ITPG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido  
 Kb: kilobase  
 LB: “Luria-Broth”  
 MET: microscopio electrónico de transmisión  
 MNSV: *Melon necrotic spot virus*, virus de las manchas necróticas o del cribado del melón (Gén. *Carmovirus*)

MO: microscopio óptico  
MOPS: ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico  
MRDV: *Maize rough dwarf virus*, virus del enanismo rugoso del maíz (Gén. *Fijivirus*)  
NBT: tetrazolio nitroazul  
ORF: “open reading frames” secuencia con fase de lectura abierta  
pb: pares de bases  
PBS: tampón fosfato salino  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PFA: paraformaldehído  
PRSV-W: *Papaya ring-spot virus watermelon strain*, virus de las manchas anulares de la papaya cepa sandía (Gén. *Potyvirus*)  
rpm: revoluciones por minuto  
RT: transcripción reversa  
SDS: dodecilsulfato sódico  
SqMV: *Squash mosaic virus*, virus del mosaico de la calabaza (Gén. *Comovirus*)  
SSC: tampón citrato sódico salino  
STE: tampón tris-EDTA sódico  
TAE ó TEAc: tampón tris-acetato-EDTA  
TB: “Terrific-Broth”  
TBE: tampón tris-bórico-EDTA  
TE: tampón tris-EDTA  
TF: tampón fosfato sódico de Sørensen  
TICV: *Tomato infectious chlorosis virus*, virus de la clorosis infecciosa del tomate (Gén. *Crinivirus*)  
ToCV: *Tomato chlorosis virus*, virus de la clorosis del tomate (Gén. *Crinivirus*)  
Tris: trihidroximetilaminoetano  
X-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido  
WMV-2: *Watermelon mosaic virus-2*, virus del mosaico de la sandía cepa 2 (Gén. *Potyvirus*)  
ZYMV: *Zucchini yellow mosaic virus*, virus del mosaico amarillo del calabacín (Gén. *Potyvirus*)

## **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1. Introducción

Desde la pasada década, y debido a la explosión demográfica de las poblaciones de moscas blancas del género *Bemisia* (Homoptera:Aleyrodidae) (Cohen, 1990), las epidemias de virus transmitidos por estos insectos han aumentado, y se suceden en las áreas de producción hortícola de todo el mundo (Duffus, 1996). Dentro de estas epidemias, las producidas por virus del género *Crinivirus* (Fam. *Closteroviridae*), transmitidos todos ellos por moscas blancas, han adquirido una gran importancia, tanto en número como en incidencia, siendo las cucurbitáceas uno de los cultivos más afectados (Wisler *et al.*, 1998; Karasev, 2000).

En los cultivos de cucurbitáceas españoles, y en relación directa con las plagas de moscas blancas, ya se han determinado dos de los virus causantes de la enfermedad, de etiología viral reconocida, denominada genéricamente ‘amarilleo de las cucurbitáceas’: el virus llamado del falso amarilleo de la remolacha (*Beet pseudo-yellows virus*, BPYV<sup>1</sup>) (Liu y Duffus, 1990; Soria *et al.*, 1991; Jordá-Gutiérrez *et al.*, 1993) y el virus del amarilleo enanizante o del enanismo amarillo de las cucurbitáceas (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*, CYSDV) (Gén. *Crinivirus*) (Célix *et al.*, 1996), transmitidos de forma semipersistente, respectiva y específicamente, por las moscas blancas *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Soria *et al.*, 1991; Jordá-Gutiérrez *et al.*, 1993) y *Bemisa tabaci* (Gennadius) (Célix *et al.*, 1996).

La incidencia del ‘amarilleo de las cucurbitáceas’ está aumentando en los cultivos protegidos del sudeste español, probablemente por los problemas de control que presentan las poblaciones de sus vectores (Ruiz *et al.*, 1999), convirtiéndose en una enfermedad que se extiende por la cuenca mediterránea (Janssen *et al.*, 2001).

En los cultivos de melón al aire libre de la provincia de Lleida se han venido observando, desde 1996, amarilleos asociados a poblaciones de moscas blancas, especulándose, tras unos resultados preliminares, que también podrían estar relacionados con un agente viral semejante a BPYV (Aranzana, 1997). Este dato, junto con el interés creciente por las enfermedades producidas por *Crinivirus*,

---

<sup>1</sup> Virus perteneciente a la familia *Closteroviridae* no asignado todavía a ningún género (The Taxonomy of Plant Viruses-2000, [www.scri.sari.ac.uk/Vir/ICTV/ictvhome.htm](http://www.scri.sari.ac.uk/Vir/ICTV/ictvhome.htm)) y propuesto por Karasev 2000) para el género *Crinivirus*.



catalogadas de emergentes en todo el mundo y de gran repercusión en los países mediterráneos, las características distintivas de los virus de la familia *Closteroviridae*, únicas dentro de los virus fitopatógenos, y la relativa escasez de datos sobre aspectos de la relación virus-planta y virus-vector en moscas blancas, ha hecho que se abordara durante los últimos cuatro años un proyecto de investigación, por parte del grupo de Virología Vegetal del Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal de la Universidad de Lleida (UdL), titulado: “Los virus patógenos de hortícolas transmitidos por moscas blancas en España: microscopía de la relación virus-vector y citopatología” (CICYT, AGF97-0815), proyecto que engloba a esta Tesis Doctoral.

La colaboración continuada que mantiene el grupo de Virología Vegetal de la UdL con diferentes laboratorios, tanto españoles como extranjeros, especializados en el estudio de virus de la familia *Closteroviridae*, ha permitido concretar el objeto de esta Tesis Doctoral en el estudio de las relaciones que BPYV y CYSDV establecen con sus plantas hospedantes y sus insectos vectores y, al mismo tiempo, un estudio comparativo con el virus del amarilleo infeccioso de la lechuga (*Lettuce infectious yellows virus*, LIYV), miembro tipo del género *Crinivirus*, y con otros virus de la familia.

A lo largo de los siguientes apartados se describirá la situación actual de estos cultivos en España, la enfermedad del amarilleo de las cucurbitáceas, y se comentarán los agentes abióticos y bióticos que pueden producir una sintomatología similar haciendo especial mención a otros virus. Se describirán las características que definen a la familia *Closteroviridae* y sus géneros, y se expondrán, brevemente, los aspectos de las moscas blancas relacionados con su importancia como plagas y como vectores de virus, haciendo especial referencia a los modos de transmisión de virus que se han descrito para homópteros.

### **1.1. Los cultivos de cucurbitáceas en España**

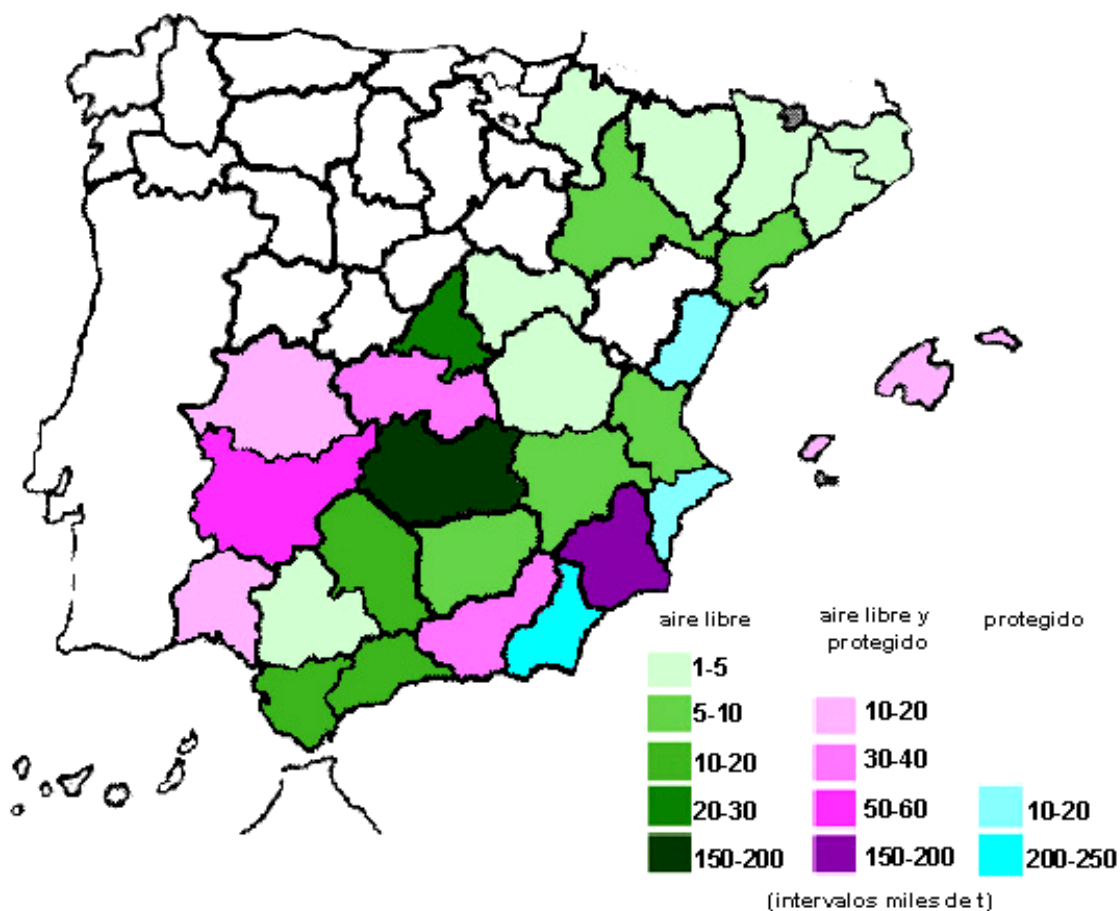
La familia *Cucurbitaceae* comprende un gran número de especies cultivadas desde la antigüedad, principalmente, por su interés alimentario, medicinal, ornamental y por otras propuestas minoritarias que incluyen aplicaciones industriales, artesanales, asociadas al folklore y a prácticas ancestrales (Robinson y Decker-Walters, 1997; Nayar y Singh, 1998).

Esta familia incluye, aproximadamente, 825 especies clasificadas en dos subfamilias, *Zanonioideae* y *Cucurbitioideae*, y 118 géneros (Nayar y Singh, 1998). Dentro de la subfamilia *Cucurbitioideae* se encuentran las especies cultivadas más importantes: sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.), pepino (*Cucumis sativus* L.), melón (*C. melo* L.) calabaza (*Cucurbita maxima* L.) y calabacín (*C. pepo* L.), y otros cultivos que aunque son calificados de menores tienen gran importancia en muchos países de Sudamérica, Asia y África, como la esponja vegetal (*Luffa cylindrica* L.) y la calabaza de San Roque o calabaza de los peregrinos (*Lagenaria siceraria* Molina) (Sánchez-Monge, 1990; Robinson y Decker-Walters, 1997).

Inicialmente, las cucurbitáceas se localizaban en las áreas tropicales y subtropicales del planeta pero, después de la Segunda Guerra Mundial, ya se cultivan de forma intensiva y protegida en numerosas zonas de Europa y Norte América (Robinson y Decker-Walters, 1997). Esta amplitud de dispersión es consecuencia de su gran variabilidad genética, permitiendo su adaptación a distintas condiciones agronómicas, la resistencia a plagas y enfermedades, así como la mejora de su calidad organoléptica y conservación en postcosecha (Álvarez, 1997). Actualmente, estas hortalizas se comercializan en mercados dónde no eran tradicionales, popularizando su consumo y dando lugar a un aumento de las superficies cultivadas para satisfacer la creciente demanda (Deulofeu, 1997; Nayar y More, 1998).

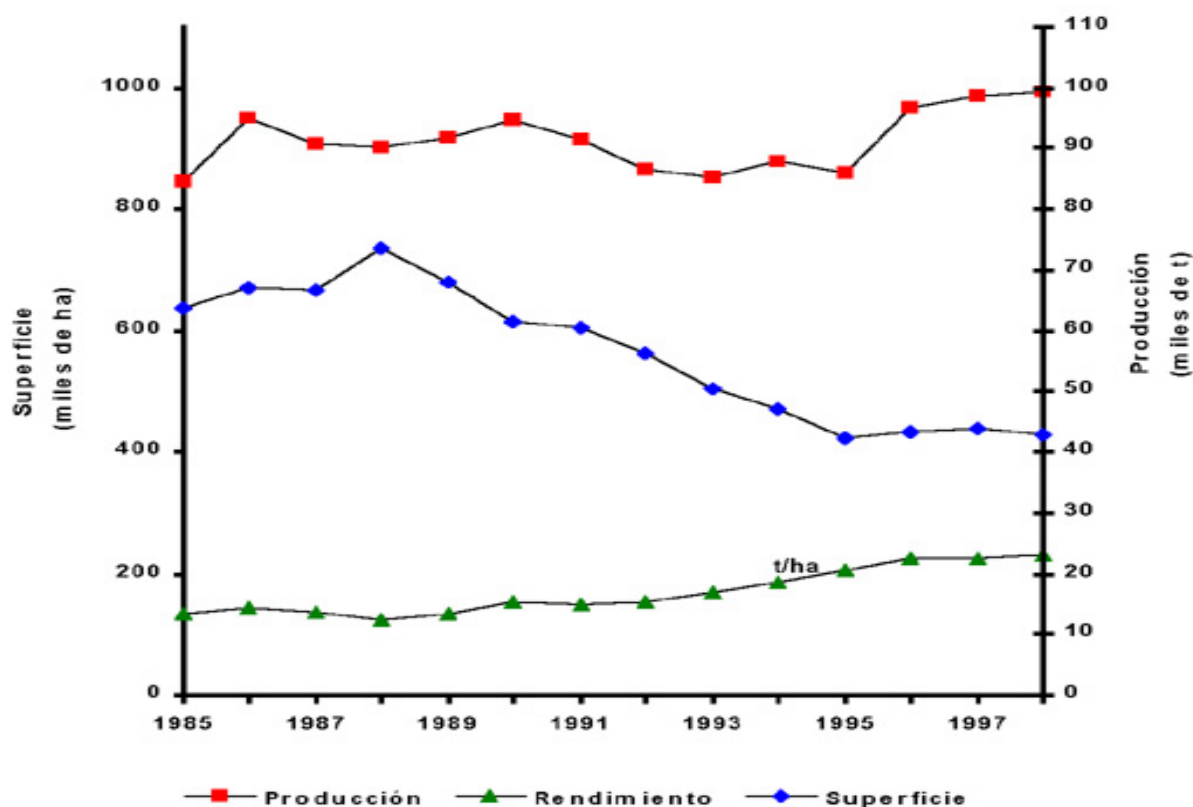
De los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) se concluye que la superficie mundial dedicada a los cultivos de cucurbitáceas en el año 2000 fue, aproximadamente, de 7.065.721 ha con una producción de 128.033.460 t. En la última década, esta superficie ha experimentado un aumento próximo a los dos millones de hectáreas y se han producido 34 millones de toneladas más que en 1990. Durante este período, la especie más cultivada fue la sandía, con una superficie y producción medias equivalentes al 43% y 47% (FAOSTAT, 2001). En Europa, se localiza el 11% de la superficie mundial dedicada al cultivo de cucurbitáceas, siendo también la sandía la especie más cultivada, y España, Italia y Ucrania los principales países productores (FAOSTAT, 2001).

En España, en el año 2000, se cultivaron 76.000 ha de cucurbitáceas, el 57% se destinaron a cultivos de melón, con una producción de 1.100.000 t (FAOSTAT, 2001). Aproximadamente, el 75% de esta superficie está ocupada por cultivos al aire libre distribuidos a lo largo de toda la Península Ibérica, siendo la provincia de Ciudad Real la principal zona de producción. El 25% de la superficie restante la ocupan cultivos protegidos localizados en la zona sudeste de la cuenca mediterránea, entre los que destaca la provincia de Almería (Fig. 1) (MAPA, 1999).



**Figura 1.** Principales áreas y sistemas de producción de melón en España (MAPA, 1999).

En España en los últimos años, se ha observado una disminución de la superficie de los cultivos de melón y un aumento en su producción (Fig. 2) (MAPA, 1999). Este incremento se atribuye, tanto al aumento de la superficie dedicada a los cultivos protegidos como al empleo de cultivares mejorados genéticamente (Torres, 1997). Actualmente, el melón es el segundo cultivo hortícola en cuanto a superficie dedicada y valor económico, y el tercero en producción (MAPA, 1999).



**Figura 2.** Evolución de la superficie, producción y rendimiento del cultivo del melón en España desde 1985-1997 (MAPA, 1999)

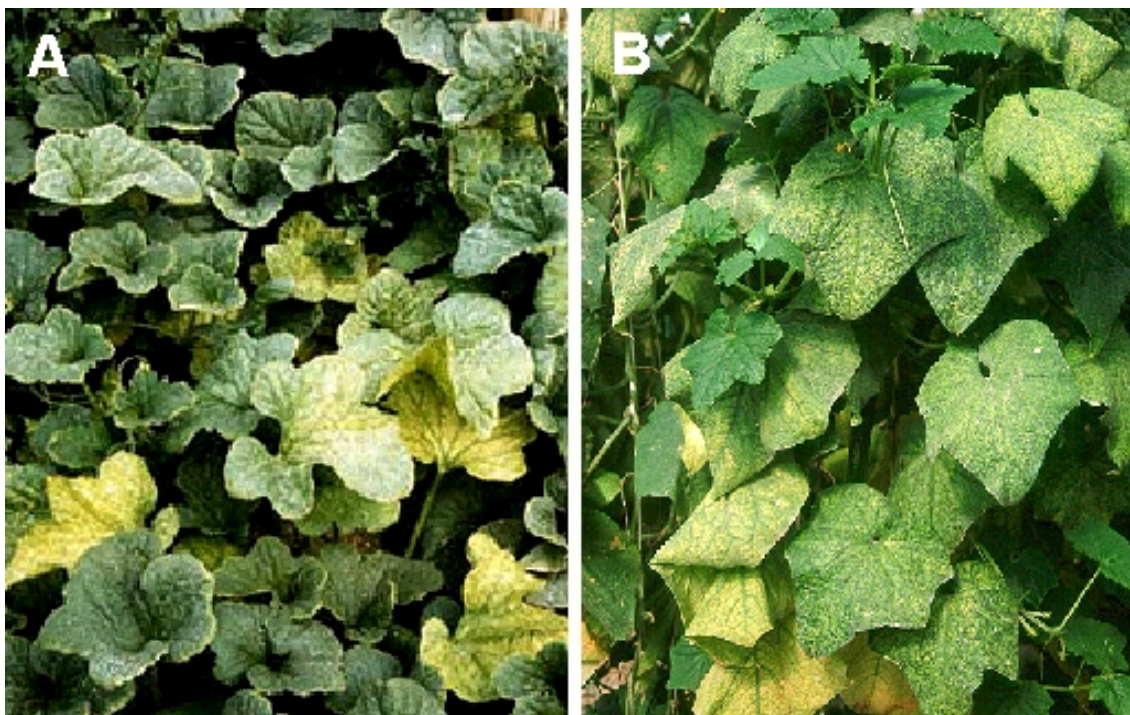
El cultivo intensivo en invernadero ha generado problemas en el control de las plagas (Janssen *et al.*, 2001), y como consecuencia la aparición o intensificación de algunas enfermedades transmitidas o asociadas a ellos (Jorda, 1991). En esta dinámica se circunscribe del llamado ‘amarilleo de las cucurbitáceas’, problema de importancia creciente en los cultivos protegidos del sudeste español.

### 1.1.1. El amarilleo de las cucurbitáceas

El amarilleo, entendido como una placionecrosis que conlleva la pérdida generalizada del color verde de las hojas por destrucción de la clorofila, es un síntoma frecuente en los cultivos de cucurbitáceas, que se presenta bajo diferentes aspectos: limitado a una

pequeña superficie en forma de mancha, afectando a un único lado de la hoja (unilateral) o desarrollado desde las nerviaduras o entre ellas (internervial) (Blancard *et al.*, 1991).

La enfermedad llamada del ‘amarilleo’ en melón y pepino, se caracteriza principalmente por la aparición de puntos cloróticos en las zonas internerviales de las hojas más viejas, que van creciendo hasta que todo el limbo se vuelve amarillo, excepto las nerviaduras que permanecen de color verde (Liu y Duffus, 1991; Célix *et al.*, 1996). A medida que progresa la infección, las hojas más viejas se quiebran y engrosan y en ocasiones adquieren un tacto aceitoso. Posteriormente, los síntomas se van extendiendo a las hojas más jóvenes, dando lugar a plantas con un amarilleo generalizado (Brunt *et al.*, 1996; Rodríguez-Cerezo y Célix, 1996) (Fig. 3).



**Figura 3.** Síntomas producidos por la enfermedad del amarilleo de las cucurbitáceas en cultivos de melón (A) y pepino (B).

Esta sintomatología se referencia en la década de los años 80 en los cultivos de cucurbitáceas del sudeste español (Cuartero *et al.*, 1985), coincidiendo con una serie de detecciones consecutivas de la misma en diversos países (Yamashita *et al.*, 1979; Lot *et al.*, 1982; Hristova y Natskova 1986). Al inicio de la década de los 90, se determinó su asociación con un virus, posible miembro de la familia *Closteroviridae*

(Liu y Duffus, 1990; Soria *et al.*, 1991; Jordá-Gutiérrez *et al.*, 1993), y en 1995, Coffin y Coutts confirmaron que los distintos aislados de los virus detectados se correspondían con BPYV. Durante los últimos años, en la misma zona de producción y asociado a la misma sintomatología, se ha identificado CYSDV con una elevada y creciente incidencia (Célix *et al.*, 1996).

### **1.1.2. Etiología del amarilleo en cucurbitáceas**

Pese a la asociación establecida del amarilleo de las cucurbitáceas con virus, el amarilleo, entendido como la pérdida del color verde de las plantas, engloba una serie de manifestaciones que, presentando características similares a las descritas anteriormente, pueden haberse originado como consecuencia de la acción y/o interacción directa o indirecta de otros agentes causales, tanto abióticos como bióticos, que se describen a continuación.

#### **1.1.2.1. Agentes abióticos**

De entre los distintos factores que pueden producir amarilleamiento en las cucurbitáceas destacan los problemas fisiológicos derivados de deficiencias nutricionales y toxicidades que interfieren y enmascaran las infecciones causadas por muchos agentes bióticos. Las carencias de macro y micronutrientes, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, nitrógeno, potasio y zinc, provocan generalmente decoloraciones y amarillos internerviales en las hojas de los cultivos de melón y pepino (Bergmann, 1992; Locascio, 1996; Rincón, 1997). Estos síntomas también se observan como consecuencia de toxicidad por boro (Hewitt, 1983; Bergmann, 1992; Locascio, 1996) y en ocasiones por toxicidad a productos fitosanitarios como herbicidas con inhibidores fotosintéticos de tipo amina (Zitter *et al.*, 1996).

En relación indirecta con las carencias nutricionales, están los procesos de senescencia del tejido vegetal, que provocan amarilleo en las hojas como consecuencia del cese en el transporte de nutrientes y la existencia de reacciones de oxidación e hidrólisis (Gil, 1995; Agrios, 1997).

Otros factores abióticos que pueden producir amarilleamientos son las condiciones edáficas adversas, suelos encharcados y excesivamente salinos (Rodríguez y García-Jiménez, 1994); y las condiciones ambientales no adecuadas, como la falta de luz, derivada del empleo de marcos de plantación estrechos, la polución y contaminantes del aire, en especial ozono (O<sub>3</sub>) y los dióxidos de azufre (SO<sub>2</sub>) y de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) (García-Jiménez y Rodríguez, 1994; Zitter *et al.*, 1996).

#### **1.1.2.2. Agentes bióticos**

Los agentes fitopatógenos que se describen a continuación, divididos en dos grupos haciendo referencia a su naturaleza viral o no, pueden producir, en mayor o menor medida, coloraciones amarillas en las hojas de cucurbitáceas, especialmente en melón. Además de estos agentes, también se ha descrito que los ataques de las arañas rojas *Tetranychus urticae* (Koch) y *T. turkestanus* (Ugarov y Nikolski) (Arachnida:Tetranychidae) pueden producir en las hojas decoloraciones o punteaduras amarillas como consecuencia de su alimentación (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 1997; Zitter *et al.*, 1996).

##### **1.1.2.2.1. Fitopatógenos de naturaleza no vírica**

En el cuadro 1 se recogen los organismos semejantes a bacterias (“Bacterium like-organisms”, BLOs) y fitoplasmas que pueden producir amarilleo en las hojas. Se incluyen otros agentes patógenos, especialmente hongos, de gran importancia e incidencia en cucurbitáceas que, aunque no producen “amarilleo”, pueden provocar estados similares de alteración al final del ciclo de las enfermedades que inducen. A continuación se describe brevemente la importancia relativa de cada una de estas enfermedades.

En España, actualmente, la incidencia de las alternariosis, la podredumbre negra de las raíces, el decaimiento de ramas y la muerte por *Rhizoctonia* es muy baja (García-Jiménez, 1997). En cambio, la acremoniosis, que produce el colapso o muerte súbita del melón, es la enfermedad más extendida e importante de estos cultivos, limitando la producción en numerosas áreas localizadas en la cuenca mediterránea (García-Jiménez *et al.*, 1994; García-Jiménez, 1997). El oídio es una de las enfermedades

más importantes a escala mundial, especialmente en cultivos de cucurbitáceas en invernadero (Robinson y Decker-Walters, 1997). Entre las especies que inducen la enfermedad destacan *Erysiphe cichoracearum* y *Sphaerotheca fuliginea* (Zitter *et al.*, 1996; Agrios, 1997), siendo esta última la causante del oídio de las cucurbitáceas en España (Torés y Álvarez, 1994). En lo referente a las fusariosis vasculares, de las cuatro especies de *Fusarium* que afectan a distintas cucurbitáceas Robinson y Decker-Walters (1997), las formas especiales de *F. oxysporum*, f.sp. *melonis* y f.sp. *niveum* producen, respectivamente, las fusariosis vasculares del melón y de la sandía en España (González-Torres *et al.*, 1994; Blanco, 1996). Los amarilleamientos que pueden provocar estos microorganismos, si se producen, están asociados a marchitamientos.

**Cuadro 1. Agentes fitopatógenos diferentes a virus que producen amarilleamiento en cucurbitáceas <sup>1</sup>**

Agente causal	Enfermedad
BLOs	"Yellow vine disease" <sup>a</sup>
<i>Aster yellow phytoplasma</i>	"Aster yellows" <sup>b</sup>
<i>Acremonium cucurbitacearum</i> (Alfaro <i>et al.</i> )	Acremoniosis
<i>Alternaria alternata</i> (Fries) von Keissler f. sp. <i>cucurbitae</i> Vakalounakis o <i>A. tenuis</i> (Nees)	Alternariosis <sup>b</sup>
<i>A. cucumerina</i> (Ellis y Everth.) Elliot <i>A. pluriseptata</i> (Karts. y Han.)	El tizón de las hojas La mancha seca de las hojas del pepino
<i>Erysiphe cichoracearum</i> (DC.) <i>Sphaerotheca fuliginea</i> (Schlechtend.:Fr.) Pollaci	Oídio
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheld. <i>F. moniliforme</i> var. <i>Subglutinans</i> Wollenweb y Reinking <i>F. oxysporum</i> Schlechtend: f. sp. <i>melonis</i> (Leach y Currence) Snyder y Hansen f. sp. <i>cucumerinum</i> Oven f. sp. <i>niveum</i> (E. F. Smith) Snyder y Hansen <i>F. solani</i> (Martins) Saccardo	Fusariosis <sup>c</sup>
<i>Phomopsis sclerotioides</i> van Kesteren	Podredumbre negra de las raíces
<i>Rhizoctonia bataticola</i> (Taubenhaus) Briton-Jones o <i>Tiarospora phaseolina</i> (Tassi) van der Aa	Decaimiento de ramas
<i>Rhizoctonia solani</i> (Kühn) o	Muerte por <i>Rhizoctonia</i>



---

<sup>1</sup> Modificado de Díaz-Ruiz y García-Jiménez (1994); <sup>a</sup> Avila *et al.* (1998); <sup>b</sup> Zitter *et al.*, (1996);  
<sup>c</sup> Robinson y Decker-Walters (1997).

#### **1.1.2.2.2. Virus: virus causantes del ‘amarilleo de las cucurbitáceas’**

Hasta el momento, se han descrito 54 especies virales que producen enfermedades en los cultivos de cucurbitáceas (estas especies se recogen en el Anejo I).

A escala mundial, los virus con mayor distribución e incidencia en cucurbitáceas son: el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Gén. *Cucumovirus*) transmitido de forma no persistente por pulgones; el virus del mosaico de la calabaza (*Squash mosaic virus*, SqMV) (Gén. *Comovirus*) transmitido por coleópteros, por semilla y de forma mecánica; el virus de las manchas anulares de la papaya cepa sandía (*Papaya ring spot virus watermelon strain*, PRSV-W), el virus del mosaico de la sandía-2 (*Watermelon mosaic virus-2*, WMV-2) y el virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellows mosaic virus*, ZYMV) todos ellos pertenecientes al género *Potyvirus* y transmitidos mecánicamente y de modo no persistente por pulgones (Agrios, 1996; Zitter *et al.*, 1996; Sûtic *et al.*, 1999). Estos cinco virus afectan principalmente a los cultivos al aire libre, provocando una sintomatología variada, tal como mosaicos en las hojas, deformaciones en el borde y en el limbo de las mismas (Luis-Arteaga, 1994; Sûtic *et al.*, 1999).

En España, además, se ha determinado la presencia del virus de las manchas necróticas o del cribado del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) (Gén. *Carmovirus*) (Luis-Arteaga, 1994), transmitido por el hongo del suelo *Olpidium bornovanus* (Sahtiyanci) Karling y algunas cepas por semilla (Campbell *et al.*, 1995). Este virus, distribuido mundialmente en cultivos protegidos de melón, induce un reticulado clorótico en las hojas, que evolucionan a necróticas, pudiendo determinar la muerte del tejido (Bos *et al.*, 1984).

Por el momento, afectando a los cultivos de cucurbitáceas en España, solo se ha determinado la presencia de tres virus transmitidos por moscas blancas, dos

miembros de la familia *Closteroviridae*, objeto de estudio de este trabajo, BPYV y CYSDV (Soria *et al.*, 1991; Jordá-Gutiérrez *et al.*, 1993; Célix *et al.*, 1996); y, recientemente, un *Ipomovirus* (Fam. *Potyviridae*), el virus del amarilleamiento de las nervaduras del pepino (*Cucumber vein yellowing virus*, CVYV) (Cuadrado *et al.*, 2001). Este último, a diferencia de los anteriores, induce un punteado clorótico o necrótico conducente a un severo amarilleo de las nervaduras de las hojas, que permite distinguir su sintomatología fácilmente (Yilmaz *et al.*, 1989; Lecoq *et al.*, 2000).

Las infecciones producidas por los virus transmitidos por moscas blancas, BPYV, CYSDV y LIYV, y por pulgones, virus del amarilleo de la remolacha (*Beet yellows virus*, BYV) (Gén. *Closterovirus*), virus del amarilleo de la remolacha del oeste (*Beet western yellows virus*, BWYV) (Fam. *Luteoviridae*, Gén. *Polerovirus*) y el virus del amarilleo de las cucurbitáceas asociado a pulgones (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CaBYV) (Fam. *Luteoviridae*), provocan amarilleo internervial, enrojecimiento y bronceado, enrollamiento y fragilidad en las hojas (Duffus, 1977; Duffus *et al.*, 1986). A causa de la dificultad para diferenciar las infecciones producidas por cada uno, se denominan genéricamente virus inductores de amarilleo (Duffus, 1996; Wisler *et al.*, 1998).

Actualmente, los principales virus inductores de amarilleo en cucurbitáceas a escala mundial son BPYV, CYSDV y LIYV (Duffus, 1994). Desde los años 80, BPYV ha producido pérdidas económicas elevadas en cultivos protegidos de países de la cuenca mediterránea (Duffus, 1994; Katis *et al.*, 2001). En los cultivos españoles, la incidencia de BPYV llegó a amenazar la comercialización del producto (Liu y Duffus, 1990; Jordá, 1997), si bien en los últimos años su incidencia parece haber remitido (Berdiales *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 1999).

CYSDV forma parte de la lista de alerta de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas ("European and Mediterranean Plant Protection Organization", EPPO) (EPPO Alert List, 2001) y en la actualidad se ha determinado en EE.UU., diversos países Europeos, incluido España, y Oriente Medio (Rubio *et al.*, 1999). En España, las infecciones producidas por CYSDV han provocado ya pérdidas próximas al 30-40% en cultivos de melón y pepino (Rodríguez-Cerezo y Célix, 1996).

La presencia de LIYV solo se ha determinado en el continente americano, EE.UU. y Méjico, y su incidencia ha decrecido notablemente en los últimos años (Rubio *et al.* 1999), posiblemente, debido al desplazamiento de las poblaciones de *B. tabaci* por poblaciones del biotipo B de *B. tabaci* o *B. argentifolii* (Bellows *et al.*, 1994) que es un vector menos eficiente de este virus (Cohen *et al.*, 1992; Perring, 1996).

Estos tres *Closteroviridae* transmitidos por moscas blancas e inductores de amarilleo se han convertido en uno de los conjuntos de patógenos emergentes más importantes de las zonas hortícolas de clima templado (APSN<sub>et</sub>, 1999).

## **1.2. Los closterovirus: familia *Closteroviridae***

Los *Closteroviridae* forman un grupo heterogéneo de virus fitopatógenos con grandes genomas de ARN de cadena sencilla y sentido positivo (ARN<sub>mc</sub> (+)) y largas partículas filamentosas y flexuosas. Estos virus están restringidos al tejido vascular del floema en el que inducen vesículas membranosas citoplasmáticas. Su rango de hospedantes es amplio, afectando a cultivos herbáceos y leñosos, y son transmitidos de forma semipersistente por insectos pertenecientes a tres familias de homópteros, Aleyrodidae (moscas blancas), Aphididae (pulgones) y Coccidae (cochinillas) (Martelli *et al.*, 2000).

Estos virus han presentado problemas de clasificación, fundamentalmente por la aplicación de un criterio basado en caracteres morfológicos que era inadecuado para definirlos (Karasev, 2000). Inicialmente, este grupo incluía una colección heterogénea de virus agrupados en dos categorías, los denominados closterovirus típicos, con partículas virales de 1000-2000nm de longitud, inductores de vesículas membranosas citoplasmáticas, y transmitidos por homópteros; y los closterovirus atípicos, con partículas cortas de 750nm, no inductores de vesículas y con vector desconocido (Lister y Bar-Joseph, 1981; Francki *et al.*, 1985).

Desde 1994 , el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (“International Comitee of Taxonomy of Viruses”, ICTV) establece la familia *Closteroviridae*, y algunas de las especies antes clasificadas como closterovirus pasan a pertenecer a los géneros *Capillovirus*, *Trichovirus* y *Vitivirus* (Martelli, 1993; Candresse *et al.*, 1994 a y b; Dolja