

et al., 1994). Actualmente, la familia *Closteroviridae* comprende dos géneros, *Closterovirus* y *Crinivirus* diferenciados por poseer genomas mono y bipartidos, respectivamente, siendo la transmisión una característica a nivel de género (Martelli *et al.*, 2000) pero, como postulan Karasev (2000) y Hull (2002), su transmisión por diferentes grupos de homópteros puede ser una característica, diferenciadora de género, de mayor rango, lo que puede obligar a una reclasificación.

Las características que determinan la inclusión de un virus en esta familia son: tamaño de la partícula viral (12 x 800-1200 nm), genomas mono o bipartidos de ARNmc (+) (15,5-19,3 kb) que codifican para una proteína homóloga de las proteínas de choque térmico (HSP70) y para un duplicado de la proteína de cubierta (CPd). La presencia en los viriones de dos proteínas estructurales, la proteína de cubierta (CP), cuyas subunidades se disponen formando una estructura helicoidal regular, y la CPd (Boyko *et al.*, 1992; Agranovsky, 1996) dispuesta en un solo extremo de la partícula, conforman una estructura que recuerda a una serpiente de cascabel (“rattlesnake structure”) (Febres *et al.*, 1996). Otras características son la formación de vesículas membranosas citoplasmáticas aisladas o agrupadas con masas de viriones en las células del floema (Fig. 4), y transmisión de modo semipersistente por insectos vectores homópteros, siendo la transmisión mecánica muy difícil o imposible.

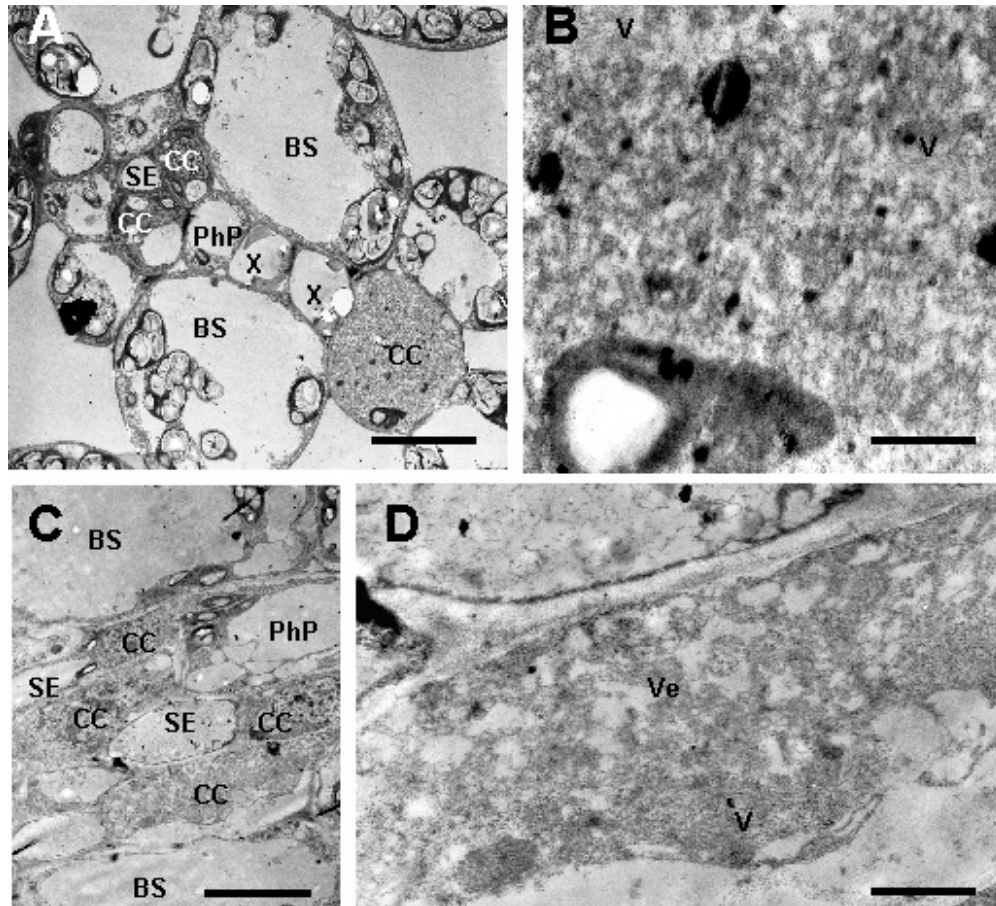


Figura 4. Cambios ultraestructurales producidos por *Beet yellows virus* (BYV) en *Tetragonia expansa* (Murr.). A, vena menor. B, detalle de A: partículas virales y vesículas. C, vena menor. D, detalle de C: agregados de vesículas en el citoplasma de una célula acompañante. (BS: célula de la vaina del haz, CC: célula acompañante, PhP: célula del parénquima del floema, SE: célula cribosa, V: partículas virales, Ve: vesículas, X: xilema. Barras: A: 7,3 μ ; B: 910 nm; C: 5,8 μ ; D: 1,44 μ .) (extraído de Medina *et al.*, 1999).

Pero la aplicación de esta clasificación presenta limitaciones por la presencia de especies que poseen características comunes a los dos géneros, como por ejemplo BPYV o el virus de la cereza pequeña (*Little cherry virus*). Para paliar estas deficiencias, Karasev (2000) propone la creación de tres géneros diferenciados por la familia de vector que realiza la transmisión. Esta propuesta se basa en las relaciones filogenéticas determinadas a partir de tres genes altamente conservados (HSP70 y las posibles replicasa y helicasa virales), mostrando la existencia de tres linajes separados, uno para cada familia de homópteros (ver Anejo II).

1.2.1. Género *Closterovirus*

En este género se incluyen especies virales con un tamaño de partícula que oscila

entre 1200-2000 nm (Matthews, 1991), con genomas monopartidos de 15.5-19.3 kb, en los que se distinguen dos grupos o bloques de genes altamente conservados, con diferentes estrategias de expresión (Martelli *et al.*, 2000).

El primer bloque incluye los genes implicados en la replicación que codifican para la replicasa viral (RdRp) y las posibles helicasa (HEL) y metiltransferasa (MT) y para una o dos proteasas similares a la papaína (P) (Agranovsky *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1994) (Fig. 5). Este bloque de genes presenta dos estrategias de expresión, poliproteína (ORF 1a) y cambio en la pauta +1 de lectura traduccional (ORF 1b). El procesamiento proteolítico, catalizado por las proteasas virales, genera las posibles HEL y MT, mientras que la RdRp es generada mediante el cambio en la lectura traduccional (Peremyslov *et al.*, 1998; Satyanarayana *et al.*, 1999).

La expresión del segundo bloque de genes, localizado en el extremo 3' del ARN genómico, se realiza en forma de subgenómicos, y codifica para los genes exclusivos de esta familia HSP70, CPd y CP y para las proteínas p64, p6 (Boyko *et al.*, 1992; Dolja *et al.*, 1994; Agranovsky *et al.*, 1995) (Fig. 5), que probablemente están implicadas en el movimiento célula a célula (Alzhanova *et al.*, 2000; Hull, 2002).

Los miembros de este género están distribuidos mundialmente y su rango de hospedantes es amplio, afectando a especies cultivadas tanto herbáceas como leñosas de interés agrícola y ornamental (Brunt *et al.*, 1996). Los síntomas que producen en los cultivos herbáceos son amarilleamiento, necrosis nervial y enrollamiento de hojas (Matthews, 1991), y en leñosos amarilleo en brotes, incompatibilidad patrón variedad, bronceado, hendidura del tallo, decaimiento y disminución de la calidad de la fruta en postcosecha (Martelli *et al.*, 2000). Son transmitidos en la naturaleza por pulgones, moscas blancas y cochinillas de forma semipersistente. Los períodos de adquisición y transmisión son variables, dependiendo de la combinación virus-vector (Duffus, 1996) y de su especificidad (Karasev, 2000).

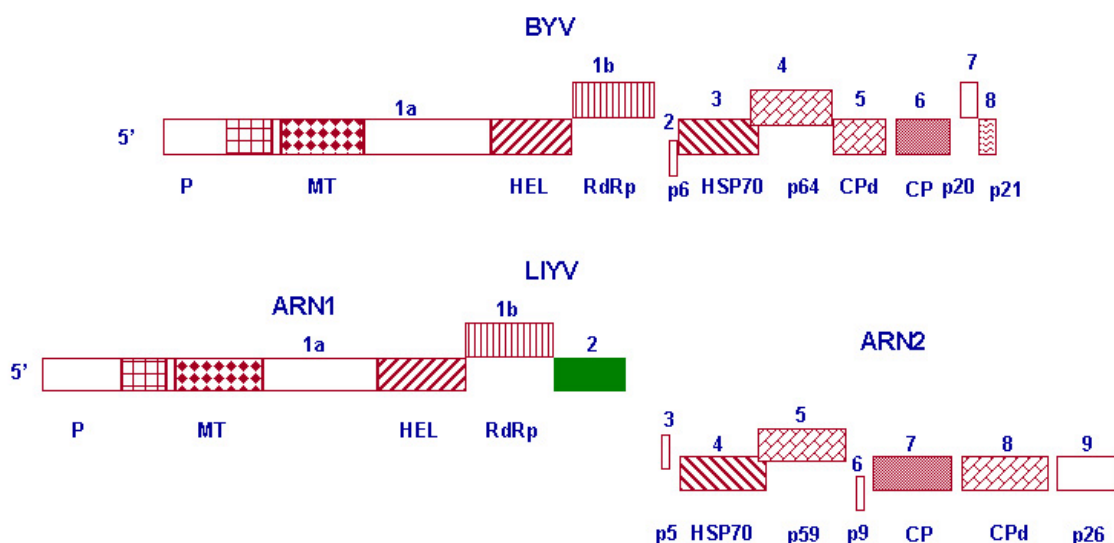


Figura 5. Organización de los genomas de los miembros tipo de los géneros *Closterovirus* (*Beet yellows virus*) y *Crinivirus* (*Lettuce infectious yellows virus*). (Extraído de Karasev, 2000. CP: proteína de cubierta; CPd: duplicado de la proteína de cubierta; HEL: helicasa; HSP70: proteínas de choque térmico; MET: metiltransferasa; P: papaina; RdRp: replicasa viral).

1.2.2. Género *Crinivirus*

Las especies de este género poseen tamaños de partícula inferiores a las del género antes descrito oscilando entre 650-900 nm (Fig. 6), presentan genomas bipartidos (7-8 + 7,5-9 kb) y son transmitidas por moscas blancas (Martelli *et al.*, 2000).

En el ARN1 y el ARN2 se localizan, respectivamente, el primer y segundo bloque de genes descritos para *Closterovirus*, que emplean estrategias idénticas de expresión (Klaassen *et al.*, 1996) (Fig. 5), pero a diferencia de *Closterovirus* la CP y CPd han invertido su posición en el genoma (Klaassen *et al.*, 1995).

El genoma de CYSDV, constituido por dos ARNmc (+) de 8+9 kb (Célix *et al.*, 1996), parece presentar unas características semejantes a las de LIYV (Livieratos *et al.*, 2001), conociéndose la secuencia de sus HSP70 (Célix *et al.*, 1996) p59, p9, CP (Livieratos *et al.*, 1999) y CPd (Livieratos *et al.*, 2001). En cambio, de BPYV se desconoce si es mono o bipartito. Hasta el momento, y a pesar de que Woudt *et al.* (1993) secuenciaron uno de los aislados de BPYV (*Cucumber yellows virus*), la única información disponible es la secuencia de sus HSP70 (Coutts y Coffin, 1996; Tian *et*

al., 1996), la presencia de una ORF adicional entre el gen que codifica para las proteínas anteriores y el que lo hace para p59, y la existencia de variaciones en el tamaño y secuencia de su CPd frente a la de LIYV y CYSDV (Livieratos *et al.*, 2001).

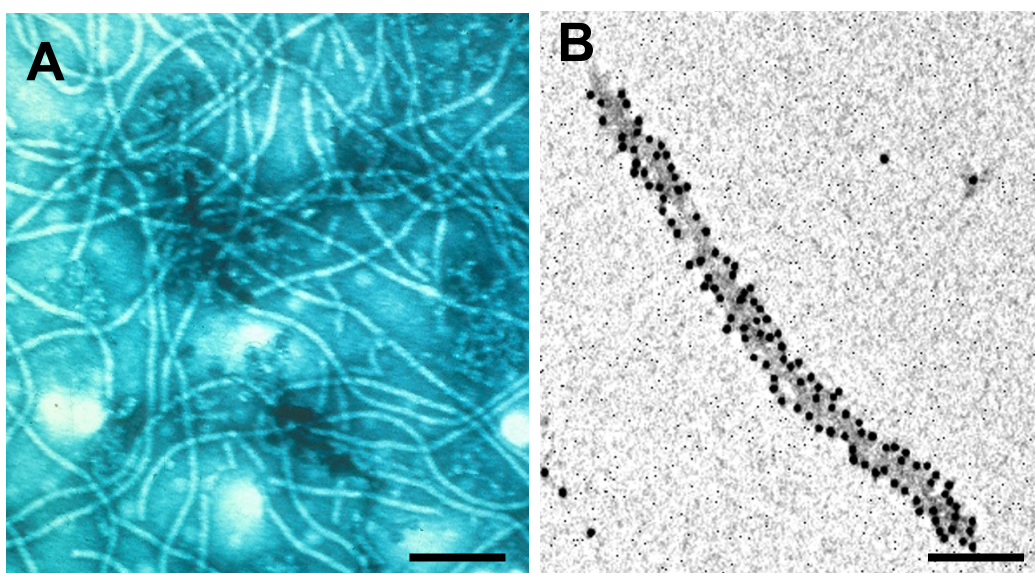


Figura 6. Partículas virales de *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV). Purificado (A) e inmunomarcaje de una partícula con oro coloidal mediante el antisuero contra la proteína de cubierta (B) (Barras, A: 240 nm; B: 45 nm) (fotos cedidas por Dr. Bryce W. Falk).

1.3. Las moscas blancas, vectores de virus causantes del amarilleo de las cucurbitáceas

Las moscas blancas son uno de los grupos de insectos productores de plagas que más repercusión ha tenido en todos los sectores de la horticultura mundial. Su acción alimentaria ocasiona daños directos en las plantas al succionar su savia, produciendo debilitamiento, defoliación y disminución del rendimiento. Indirectamente, la excreción de melaza sobre hojas y frutos favorece el crecimiento de hongos formadores de negrilla que disminuyen la calidad del producto final (Lacasa *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 1999). Los daños producidos por ellas ocasionan grandes pérdidas económicas, llegando en algunas zonas a provocar situaciones críticas (Duffus, 1996; Lacasa *et al.*, 1998; Polston, 2001).

El aumento en el número de especies presentes en cada país, y en la densidad de poblaciones de moscas blancas, observado en los últimos años, se ha atribuido a factores como el transporte de material vegetal infestado con estos insectos, el

cambio en las condiciones climáticas, la intensificación de las prácticas agrícolas, el uso indiscriminado de insecticidas y el desarrollo de resistencias a éstos (Cohen, 1990; Célix *et al.*, 1996; Lacasa *et al.*, 1998). Así, por ejemplo, en Australia, desde 1996 hasta el año 2001, el número de nuevas especies de moscas blancas ha aumentado en más de 101 (de Barro, 2001). O, en España, en las Islas Canarias, en las que en los últimos años se ha determinado la introducción de dos especies de moscas blancas de origen neotropical, *Aleurodicus dispersus* (Russell) y la mosca algodonosa de las ornamentales *Lecanoideus floccissimus* (Martin) que están produciendo elevadas pérdidas económicas (Torres *et al.*, 2000; Hernández-Suárez *et al.*, 2001).

Hasta el momento, se han determinado unas 1200 especies de moscas blancas, distribuidas en 140 géneros, que afectan en distinta medida tanto a plantas cultivadas leñosas o herbáceas de interés alimenticio, agrícola u ornamental, como a malas hierbas (Perring, 1996). Las especies de moscas blancas presentes actualmente en España se recogen en el Anejo III.

1.3.1. Distribución geográfica de las moscas blancas

Las moscas blancas se localizaban generalmente en las zonas tropicales y subtropicales del planeta, en la banda que se extiende desde el Ecuador hacia el norte y el sur 30°, y normalmente sólo en áreas locales y aisladas (Costa 1969). Pero, desde la década pasada su presencia y distribución ha aumentado y en la actualidad ocupan áreas en las que se supera esta barrera de temperatura, citándose en la mayoría de las zonas de producción hortícola del mundo (Markham *et al.*, 1996; de Barro, 2001).

1.3.2. Importancia como plagas en hortícolas

Del total de especies descritas, únicamente 40 especies producen daños agrícolas, de las que las más reconocidas como plagas de hortícolas son *B. tabaci* y *T. vaporariorum*. De éstas, el complejo de biotipos de *B. tabaci* constituye el conjunto de moscas blancas más importante, ya sea como plaga o vector (Markham *et al.*, 1996),

pues afectan a unas 500 especies y están ocasionando problemas de mayor gravedad que los causados por *T. vaporariorum* (van Lenteren 1992).

En España, en los invernaderos dedicados al cultivo de hortalizas de la zona sudeste las poblaciones de *T. vaporariorum* han sido desplazadas progresivamente por las de *B. tabaci* (Célix *et al.*, 1996; Lacasa *et al.*, 1998). Estos autores atribuyen esta situación a la llegada de poblaciones de *B. tabaci* más agresivas y con mayor capacidad reproductiva que, junto con la falta de efectividad de los métodos de control empleados, han propiciado desequilibrios y la consecuente explosión demográfica del biotipo autóctono de *B. tabaci*, el biotipo Q. Por ello, actualmente en España y en Italia, el biotipo Q de *B. tabaci* es el más extendido (Bosco *et al.*, 2001; Simón *et al.*, 2001).

1.3.3. Importancia como vectores

Uno de los efectos más importantes derivado de la alimentación de las moscas blancas es la transmisión de virus (Ferreeres, 1991; Duffus, 1996; Markam *et al.*, 1996; Perring, 1996). La introducción y asentamiento de poblaciones de moscas blancas, ha llevado consigo la aparición y/o intensificación de epidemias de virus transmitidos por ellas (Czosnek y Laterrot 1997; Wisler *et al.*, 1998).

Además de *B. tabaci* y *T. vaporariorum* (Fig. 7), las especies de moscas blancas *Aleurotrachelus socialis* (Bondar), *Aleurothrixus floccus* (Mask), *B. manihotis* (Frappa), *B. tuberculata* (Bondar), *B. voyssieri* (Frappa), *T. abutilonea* (Haldeman) y *T. natalensis* (Corbett) también son vectores de virus (Costa, 1969; Conti, 1994).

Las moscas blancas, y posiblemente a causa de *B. tabaci*, han estado asociadas a la transmisión de virus pertenecientes al género *Begomovirus* pero también transmiten virus pertenecientes a los géneros, *Crinivirus*, *Carlavirus*, *Ipomovirus*, *Luteovirus* y *Nepovirus* (Duffus *et al.*, 1986; Matthews, 1991). En total, transmiten más de 70 virosis que afectan a plantas cultivadas y malas hierbas (Duffus, 1996).



Figura 7. *Bemisia tabaci* (inferior izquierda) y *Trialeurodes vaporariorum* (superior y derecha). (imagen cedida por el Dr. Peter Markham).

El cambio en las poblaciones de moscas blancas, así como la introducción y asentamiento de nuevos biotipos en la mayoría de las zonas de cultivo mundiales, hace a estos insectos responsables del aumento de las epidemias virales en áreas de agricultura intensiva alejadas de los trópicos, como países de la cuenca mediterránea, España, Grecia, Italia, Israel y Jordania; y el sudeste de los EE.UU. (Hiebert *et al.*, 1996; Wisler *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2001). Una de las epidemias más extendidas, junto con las producidas por *Crinivirus* (Wisler *et al.*, 1998), es la del virus del rizado amarillo o de la hoja en cuchara del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (Gén. *Begomovirus*), transmitido por el biotipo de B de *B. tabaci*, factor limitante de la producción de tomates en muchas áreas (Hiebert *et al.*, 1996).

Los factores que intervienen y permiten a las moscas blancas, o a otro insecto, transmitir un virus son complejos, e involucran numerosas interacciones entre el virus, el hospedante y el vector potencial (Matthews, 1991; Markham *et al.*, 1996). Actualmente se conocen muchos de los factores que participan en el proceso, pero todavía se desconocen algunos aspectos anatómicos de las moscas blancas relacionados con la transmisión.

1.3.4. Modos de transmisión de virus por moscas blancas

Los aleuródidos actúan como vectores de distintos géneros de virus con distintos modos de transmisión (Duffus, 1996). Los virus pertenecientes a los géneros, *Carlavirus*, *Nepovirus* y algunos *Ipomovirus* son transmitidos por las moscas blancas de un modo no persistente (Ammar, 1991), lo que implica una asociación virus-vector escasa con periodos de adquisición y retención cortos, y no llegan a circular por el vector (no circulativos), mientras que *Crinivirus* y otros *Ipomovirus* lo son de modo semipersistente (Falk y Klaassen, 1996; Zouba *et al.*, 1998), con una asociación virus-vector algo mayor. Los pertenecientes al género *Begomovirus*, todos ellos transmitidos por *B. tabaci*, son transmitidos de modo persistente circulativo no propagativo.

De forma general, como también se ha descrito en pulgones, la transmisión no persistente se relaciona con virus que también presentan transmisión mecánica, aunque, sin embargo, CVYV transmitido de modo semipersistente también presenta transmisión mecánica experimental (Lecoq *et al.*, 2000).

La transmisión semipersistente implica una asociación temporal y relativamente específica entre el virus y el vector (Matthews, 1991; López-Moyá y López-Abella, 1996. Así, por ejemplo, BPYV, CYSDV, el virus de la clorosis de la lechuga (*Lettuce chlorosis virus*, LCV), LIYV, el virus de la mancha clorótica del boniato (*Sweet potato chlorotic spot virus*, SPCSV) y el virus de la clorosis infecciosa del tomate (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV) pueden ser adquiridos en un período de diez minutos (Duffus, 1996). Los virus son retenidos en las moscas blancas por períodos máximos de tres días para LIYV (Duffus, 1996), seis días para BPYV (Soria *et al.*, 1991) y ocho días para CYSDV (Célix *et al.*, 1996), existiendo una correlación entre el período de adquisición, el de inoculación y la posibilidad de transmisión (Duffus, 1996). Hasta el momento, y con el fin de conocer los distintos factores relacionados con este tipo de transmisión, se ha comprobado que uno de los factores que participa en el proceso de adquisición, así como en la especificidad del virus por la especie de mosca blanca es la CPd (Tian *et al.*, 1999; Livieratos *et al.*, 2001).

La transmisión persistente es, a diferencia de las anteriores, más específica y está definida por la necesidad de períodos de adquisición elevados (Duffus, 1996). Además, parece probable que los endosimbiontes primarios que presenta *B. tabaci* participen en la persistencia del virus en su interior, como se ha comprobado con algunos *Luteovirus*, *Polerovirus* y *Enamovirus* transmitidos por pulgones (Morin *et al.*, 1999). Estos endosimbiontes también podrían estar implicados en la transmisión transovarial de la cepa israelí de TYLCV (TYLCV-Is) (Ghanim *et al.*, 1998), convirtiendo a los moscas blancas en reservorios virales. Por otro lado, también se ha observado que la acción de TYLCV en *B. tabaci* no es pasiva, ya que la presencia del ADN viral disminuye la eficiencia de la transmisión, la longevidad y la fecundidad del vector (Duffus, 1996; Rubinstein y Czosnek, 1997).

1.3.5. Modelos establecidos de transmisión de virus

Se han establecido tres modelos para explicar el proceso de transmisión (Harris *et al.*, 1996; Hull, 2002), atendiendo a la duración de la relación entre cada virus y su vector homóptero, generalmente pulgones, y los aspectos anatómicos involucrados en la transmisión. Estos modelos se recogen en el Anejo IV.

1.3.5.1. Modelo asociado al estilete

Este modelo está descrito para la transmisión de tipo no persistente de virus no circulativos que se asocian a los estiletos de los homópteros (“styletborne viruses”) (Agrios, 1996; Hull, 2002) tanto de forma específica (Ammar, 1991, López-Moya y López-Abella, 1996) o como consecuencia de una contaminación de estos estiletos durante el proceso de probatura (Kennedy *et al.*, 1962; Hull, 2002).

En este modo de transmisión, se han propuesto a su vez tres teorías para explicar la inoculación del virus, el virus sería inoculado con los estiletos mediante una transmisión mecánica; la inoculación se realizaría mediante procesos de regurgitación y salivación; el virus sería inoculado con la saliva ya que en el extremo del estilete maxilar se unen el canal alimentario y el salivar (Hull, 2002).

1.3.5.2. Modelo Ingestión-Regurgitación

Los homópteros, y más concretamente pulgones y cicadélidos, realizan fases de ingestión y de regurgitación durante su alimentación, de forma constante y por períodos de tiempo de varios minutos (Harris y Bath, 1973). Este proceso está asociado con el comportamiento funcional de limpieza de los canales de alimentación atascados y, generalmente, se acompaña de la expulsión de los tapones de saliva que cierran dichos pasajes (Harris *et al.*, 1981; Harris *et al.*, 1996). De esta forma, los homópteros transmitirían virus no circulativos, de tipo no persistente o semipersistente, que se asocian a distintos tramos iniciales del canal alimentario, el canal alimentario de la maxila, faringe, esófago e intestino anterior (Ferreeres, 1991; Harris, 1997).

1.3.5.3. Modelo Ingestión-Salivación

Este modelo incluye un comportamiento funcional relacionado con el descrito en el apartado anterior, si bien en este caso los virus serán transmitidos directamente con la secreción de saliva empleada para limpiar los canales atascados durante el proceso de regurgitación (Harris *et al.*, 1996; Harris, 1997). Los virus así transmitidos, son virus circulativos, propagativos o no, que tras un período de latencia variable y después de recorrer el cuerpo del insecto llegan hasta las glándulas salivares (Harris, 1997).

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS DE LA TESIS

En su planteamiento general, y expuesta la situación actual de los virus que afectan a los cultivos de cucurbitáceas españoles, con la realización de la presente Tesis Doctoral se pretende alcanzar los siguientes objetivos:

I.- Verificar la etiología del amarilleo presente en los cultivos de melón y otras cucurbitáceas en la zona de Lleida y sudeste español, concretamente su asociación con BPYV y CYSDV.

II.- Establecer los rasgos característicos de la infección de los *Crinivirus* a escala celular mediante descripción y comparación de la citopatología producida por algunos miembros del género.

III.- Ajustar a un modelo de interacción virus-planta-vector las relaciones que mantienen los *Crinivirus*, con las cucurbitáceas y las moscas blancas, basándose en su localización *in situ*.

Estos objetivos se concretan en objetivos y propuestas parciales que se exponen en cada uno de los capítulos siguientes.

