

CAPITULO I

DIAGNÓSTICO Y PROPAGACIÓN DE *Beet pseudo-yellows virus* Y *Cucurbit yellow stunting disorder virus**

* Este trabajo ha sido parcialmente presentado como comunicación oral en el IV Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas (Cáceres, 2001) y forma parte de la publicación: Virus asociados al amarilleo del melón. Rodrigo, G., Achón, M. A., Juárez, M., Medina, V. 2002. Actas de Horticultura (aceptado)

1. INTRODUCCIÓN

Hasta hace unos años, el diagnóstico de BPYV se realizaba mediante ensayos biológicos (transmisión con distintas especies de moscas blancas, rango de hospedantes, etc.), pruebas bioquímicas y microscopía electrónica de transmisión (Soria *et al.*, 1991; Jordá-Gutiérrez *et al.*, 1993).

El diagnóstico serológico de los virus de la familia *Closteroviridae* ha presentado limitaciones, que han relegado su uso rutinario, ya sea por la dificultad de obtener antisueros específicos o por la escasa fiabilidad (reacciones cruzadas, reacciones no específicas, etc) de algunos de los antisueros ya disponibles (Karasev, 2000). Pese a ello, ya existen antisueros específicos de BYV, CTV y LIYV, obtenidos en diferentes laboratorios, disponibles o no comercialmente, que se usan para diagnóstico. Para BPYV y CYSDV no existen antisueros comerciales y los disponibles son aun objeto de estudio como los que se presentan en esta Tesis Doctoral.

Actualmente, la detección tanto de BPYV como de CYSDV se lleva a cabo principalmente mediante técnicas moleculares. Para el diagnóstico de BPYV y CYSDV se están empleando hibridaciones Dot-Blot con sondas de ARN no isotópicas (Tian *et al.*, 1996; Rubio *et al.*, 1999) y reacciones de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con parejas de oligonucleótidos específicas para cada uno de ellos (Célix *et al.*, 1996; Livieratos *et al.*, 1998; Berdiales *et al.*, 1999).

La aplicación de estas técnicas ha permitido comprobar que el amarilleo asociado a moscas blancas en los cultivos de cucurbitáceas del sudeste español está actualmente producido por CYSDV principalmente, mientras que BPYV únicamente se localiza en algunas áreas aisladas y que en ocasiones estos virus se pueden detectar conjuntamente (Berdiales *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 1999). Estas técnicas han supuesto un gran avance en el diagnóstico de BPYV o CYSDV pero, no ha eliminado la utilización de algunos de los métodos de diagnóstico utilizados anteriormente, como los ensayos biológicos de transmisión con vectores, dada la transmisión específica de BPYV por *T. vaporariorum* que permite confirmar el diagnóstico (Soria *et al.*, 1991; Célix *et al.*, 1996) y aislarlo de posibles infecciones múltiples. Estos ensayos son, además, útiles y necesarios para su propagación (Nuez *et al.*, 1999).

La consecución de los objetivos propuestos en la Tesis Doctoral ha requerido material vegetal sano e infectado con aislados españoles de los virus objeto de estudio, e insectos vectores virulíferos y no virulíferos. Para ello, se ha procedido a la realización de prospecciones dirigidas a cucurbitáceas con síntomas de amarilleo, al aislamiento y propagación de los virus a estudiar y al ensayo de diferentes técnicas de diagnóstico. A continuación se describen estos procedimientos y los resultados.

2. OBJETIVOS

- Establecer la técnica de diagnóstico de BPYV y CYSDV más idónea.
- Propagar BPYV y CYSDV mediante transmisión con sus insectos vectores.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Prospecciones

Durante los años 1998 y 1999, en el sudeste español, se realizaron prospecciones dirigidas a plantas de melón y/o pepino con síntomas de amarilleo en parcelas comerciales en las que se había observado, en años anteriores, la presencia de moscas blancas. El primer año se visitaron dos parcelas bajo malla y siete invernaderos comerciales de melón y pepino de las provincias de Almería, Granada y Murcia. El segundo año, el muestreo se realizó en invernaderos de las provincias de Almería y Granada (ver referencias en el Anejo V).

Cada año de estudio se recogieron muestras correspondientes a hojas jóvenes de plantas que presentaban síntomas de amarilleo. Las muestras consistieron en hojas, que después de su descripción, se liofilizaron y preservaron a -20°C en presencia de CaCl_2 hasta el momento de ser analizadas

3.2. Diagnóstico de *Beet pseudo-yellows virus* y *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

3.2.1. Métodos serológicos

3.2.1.1. Antisueros

Para realizar estos análisis se dispuso de tres antisueros policlonales contra BPYV (proporcionados por el Dr. Miguel Juárez²) y para CYSDV se empleó un antisuero contra LIYV (proporcionado por el Dr. Bryce W. Falk³), de supuesta reacción cruzada con CYSDV (Bryce Falk, c. personal), de los que, previo a su utilización, se purificaron las inmunoglobulinas (IgG) con el método especificado a continuación.

3.2.1.2. Purificación de inmunoglobulinas

Las IgG se purificaron siguiendo el procedimiento de Clark y Bar-Joseph (1984). Para ello, cada antisuero se diluyó en H₂O estéril en la proporción 1:10 (v/v) y a continuación se añadió un volumen igual de una solución saturada de NH₃SO₄. Las IgG se precipitaron mediante centrifugación a 6.000 rpm (JA-20) durante 5 min, previa incubación a temperatura ambiente durante 30 min. El precipitado fue resuspendido en 2 ml de ½X PBS (PBS: 13,6 mM NaCl, 0,14 mM KH₂PO₄, 0,8 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 0,26 mM NaN₃ pH 7,4). El NH₃SO₄ se eliminó mediante diálisis en ½X PBS durante tres períodos de 8 h cada uno. La separación de las IgG de otros componentes del suero se llevó a cabo en columnas de celulosa (Celulosa DE52, Sigma). La concentración de las fracciones se determinó mediante espectrometría (A₂₈₀).

La concentración óptima de estas IgG así como la de las IgG anticonejo conjugadas con fosfatasa alcalina (Sigma) se determinó de forma experimental mediante ELISA, como se describe a continuación.

3.2.1.3. Prueba ELISA

La modalidad de ELISA utilizada fue "Antigen Coated Plate" (ACP) como describen Converse y Martin (1991) con algunas modificaciones. El material vegetal se

² Depto. Producción Vegetal y Microbiología. EPSO, Universidad Miguel Hernández, Orihuela

homogeneizó, con mano y mortero en tampón carbonato (15 mM Na₂HCO₃, 35 mM NaHCO₃, 0,02% NaN₃ pH 9,6) en las proporciones 1:1000, 1:500; 1:200 y 1:100 (p/v). Para eliminar los restos de tejido, el homogeneizado se centrifugó a 14.000 rpm 1 min en microcentrífuga. Los pocillos se tapizaron con 100 µl del extracto vegetal obtenido y se incubaron durante 16 h a 4°C. Posteriormente, se procedió al lavado de la placa por inundación con PBS-T (PBS, 0,05% Tween-20) durante 3 min. El lavado se repitió cuatro veces, y los pocillos se incubaron con 200 µl de tampón de bloqueo (1% BSA en PBS-T) durante 1h a 37°C. Pasado este tiempo, las placas se lavaron del modo comentado tres veces, y los pocillos se volvieron a incubar, durante 2,5 h a 37°C, con 100 µl de las IgG específicas de cada virus diluidas en PBS-T, a las concentraciones, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml. Seguidamente, los pocillos se lavaron tres veces e incubaron durante 2 h a 37°C con 100 µl de las IgG conjugadas con fosfatasa alcalina en PBS-T, a las concentraciones 1:7500 y 1:15000. Finalmente, se lavaron tres veces y se añadió 1mg/ml fosfato de p-nitrofenol (Sigma Aldrich Química, S.A.) en tampón de detección (9,7% Dietanolamina, 0,9 mM MgCl₂.6H₂O, 0,02% NaN₃ pH 9,8). Después de la incubación a distintos intervalos de tiempo y a temperatura ambiente, la densidad óptica de las reacciones se midió con un lector automático (Titertek Multiskan[®] PLUS MKII) a 450 nm.

Como testigos positivos se emplearon extractos del material vegetal infectado con cada virus, que en el caso de BPYV se obtuvieron a partir de muestras de lechuga y para CYSDV de muestras de pepino. Los testigos negativos consistieron en extractos vegetales de las respectivas plantas sanas. Se consideraron positivas las muestras que superaron en al menos tres veces los valores de absorbancia del testigo sano.

3.2.2. Métodos moleculares

3.2.2.1. Extracción de ácidos nucleicos

3.2.2.1.1. Extracción de ARNs totales

Previamente a la extracción sistemática de ARNs totales, se ensayaron los métodos descritos en la bibliografía por Achón (1993), Célix *et al.* (1996) y Pallás *et al.* (1998), y el kit de extracción comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, S.A.).

³ Plant Pathology Dept. of University of California in Davis (UCDavis)

Los ensayos se realizaron con 0,02 g de tejido vegetal que se homogeneizaron manualmente, con mano y mortero, y empleando N₂ líquido. Tras la homogeneización se añadió el tampón de extracción en la proporción 1:25 (p/v).

En el caso del proceso descrito por Achón (1993) el tampón empleado fue 2% SDS, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA. A continuación los extractos se sometieron a un choque térmico durante 2 min a 57°C y a una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para separar y eliminar restos proteicos. Los ARNs se precipitaron mediante centrifugación a 14.000 rpm por 15 min en una microcentrífuga, previa adición de 2,5 volúmenes de etanol 95% y 3 M acetato sódico pH 5,5 en la proporción 1:10 (v/v) e incubación a -20°C durante al menos 1 h, se lavó con etanol 95% y centrifugó de nuevo durante 10 min. El precipitado se secó al vacío, se resuspendió en H₂O-DEPC y conservó a -20°C hasta su empleo.

El proceso descrito por Célix *et al.* (1996) difiere del anterior en la ausencia de NaCl en el tampón de extracción y en la incorporación de una precipitación selectiva con LiCl para favorecer la separación del ARN. Por lo que, después de la extracción con fenol:cloroformo, las fases acuosas se ajustaron hasta una concentración final 2 M LiCl e incubaron a 4°C al menos 6 h. Los ARNs totales se precipitaron mediante centrifugación a 14.000 rpm por 20 min y se resuspendieron en H₂O-DEPC. Este proceso se realizó dos veces.

La metodología descrita por Pallás *et al.* (1998) se diferencia de las anteriores en que no realiza desproteinización ni precipitación de ácidos nucleicos con etanol. En este caso la extracción se llevó a cabo con una solución 50 mM de citrato sódico y los extractos se clarificaron mediante centrifugación a 14.000 rpm por 15 min .

En el caso del kit de extracción comercial, basado en la utilización de columnas de sílice, se siguieron las recomendaciones de la casa comercial para finalmente eluir el ARN en H₂O-DEPC y conservarlo a -20°C.

3.2.2.1.2. Extracción de ARN bicatenario

Para la extracción y posterior comprobación de la naturaleza del tipo de ácido nucleico extraído, se siguieron, respectivamente, la metodología descrita por Valverde *et al.* (1990) con algunas modificaciones y por Klaassen *et al.* (1994).

Esta técnica se ensayó con muestras de melón sanas e infectadas con BPYV. Como control de la extracción se emplearon muestras de maíz sanas e infectadas con el virus del enanismo rugoso del maíz (*Maize rough dwarf virus*, MRDV) (Gén. *Fijivirus*) cuyo genoma está constituido por 10 fragmentos de ARN bicatenario (ARNbc) que actuaron así, al mismo tiempo, de marcadores de peso molecular de la doble cadena.

El material vegetal se homogeneizó del modo comentado en el apartado anterior. En el caso de las muestras de melón, el homogeneizado se incubó en agitación a 4°C durante 30 min con el tampón de extracción STE (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl,

1 mM EDTA pH 6,8) en la proporción 1:15 (p/v), 0,8% SDS y 0,08% bentonita (concentración final) y fenol saturado en STE (1:17 p/v). En el caso de las muestras de maíz, para favorecer la descapsidación de MRDV y antes de la adición del fenol, el homogeneizado se incubó a 57°C durante 30 min. La separación de los ácidos nucleicos del resto de componentes se realizó mediante centrifugación a 8.250 rpm (JA-20) por 30 min y posterior ajuste hasta una concentración final de etanol 16%. El ARNbc se separó del resto de ácidos nucleicos mediante columnas de celulosa CF-11 (Sigma Aldrich Química, S.A.) en STE-etanol 16%. Después de añadir la muestra, las columnas se lavaron con STE-etanol 16% y con STE. El ARNbc se eluyó con STE, precipitó con etanol y resuspendió en H₂O.

Los productos de la extracción se analizaron en geles de agarosa al 0,7% en TBE

(143 mM Tris pH 8,8, 44 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA). La verificación del ARNbc se realizó mediante tratamientos con 100 µg/ml ARNasa I (Sigma Aldrich Química, S.A.) en 300 mM NaCl y en 0,3 mM NaCl.

3.2.2.2. Hibridaciones moleculares

3.2.2.2.1. Obtención y marcaje no isotópico de sondas

Se utilizaron tanto sondas de ARN como de ADN correspondientes al segmento del genoma que codifica para el homólogo de las HSP70 de BPYV y de CYSDV (propocionadas, respectivamente, por los Drs. Bryce W. Falk y Emilio Rodríguez-Cerezo⁴). En el cuadro 2 se detallan algunas de las características de los clones empleados para la obtención de estas sondas.

Cuadro 2. Características de los plásmidos recombinantes empleados para la obtención de sondas

VIRUS	VECTOR	INSERTO		
		Correspondiente al genoma viral	Tamaño (pb)	Número de acceso a la base de datos NCBI
BPYV	pGEM-T	HSP70	677	U67447
CYSDV	Pbluescript	HSP70	557	U67170

BPYV: *Beet pseudo-yellows virus*; CYSDV: *Cucubit yellow stunting disorder virus*; HSP70: homólogo de las proteínas de choque térmico.

Con el fin de disponer de suficiente cADN, para los procesos que se realizarían posteriormente, se procedió a la multiplicación y posterior purificación de los plásmidos que contenían los insertos deseados. La multiplicación se realizó transformando células competentes de *E. coli* DH5 α (Life Technologies, S.A.), atendiendo a las recomendaciones de la casa comercial, y ensayando varias concentraciones de los plásmidos recombinantes diluídos en tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) que se mezclaron con 100 μ l de células competentes e incubaron sucesivamente durante 30 min a 4°C, 45 seg a 42°C y 2 min a 4°C.

⁴ CNB-CSIC, Cantoblanco, Madrid

Seguidamente se añadieron 900 μ l de medio SOC (2% triptona, 0,55% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glucosa) y se incubaron durante 1 h a 37°C (agitación continua 225 rpm). Las mezclas de transformación (200-400 μ l) se vertieron en placas de LB-Agar (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 170 mM NaCl pH 7, 1,5% agar) que además contenían 100 μ g/ml ampicilina, 50 μ g/ml X-Gal y 20 μ g/ml IPTG, y se incubaron 16 h a 37°C.

La multiplicación de los clones se realizó mediante inoculación de una colonia aislada en medio LB o en medio TB (0,12% triptona, 0,24% levadura, 0,04% glicerol, 1,7 mM KH_2PO_4 , 7,17 mM K_2HPO_4) que contenían 100 μ g/ml de ampicilina, y posterior incubación en agitación continua (220 rpm) durante 12-16 h a 37°C.

La purificación se llevó a cabo con el kit de purificación comercial Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, S.A.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La presencia de ADN plasmídico se verificó analizando los purificados (1-5 μ l) en geles de agarosa al 1% en TBE. Posteriormente, mediante digestión con los enzimas de restricción indicados en el cuadro 3, se comprobó el tamaño del inserto de cada uno de los clones. Estas digestiones se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y consistieron en incubaciones durante 2 h a 37°C con 0,25-0,5 U/ μ l de enzima. Finalmente, la concentración del ADN plasmídico se estimó por espectrometría (A_{260}).

3.2.2.2.1.1. Obtención de sondas de ARN

Las sondas de ARN se obtuvieron siguiendo el proceso descrito por Tian *et al.* (1996) con el kit de marcaje de ARN *in vitro* DIG RNA Labelling Kit SP6/T7 (Roche Diagnostics, S.L.), y la enzima T3 ARN polimerasa correspondiente a uno de los promotores del vector en el que se insertó el de cADN de CYSDV. Este kit incorpora un nucleótido (UTP) marcado con digoxigenina (DIG-UTP).

Para obtener controles negativos se sintetizaron sondas con las dos polaridades, por lo que la misma cantidad de cada plásmido se linearizó con cada una de las enzimas de restricción entre las que se insertó el cADN (Cuadro 3). La linearización del vector se verificó mediante análisis en geles de agarosa al 1% en TBE. La síntesis de las

sondas se realizó en base al protocolo suministrado por la casa comercial. Una vez finalizado este proceso, para eliminar el cADN, las sondas se incubaron 15 min a 37°C con 0,6 U/μl ADNasa I libre de ARNasa. A continuación, la reacción se paró con la adición de 200 mM EDTA pH 8 y los transcritos marcados con DIG se precipitaron por centrifugación, se lavaron con etanol 95% y resuspendieron en H₂O-DEPC. Las sondas se preservaron a -20°C hasta su utilización.

La efectividad de la transcripción se verificó en geles desnaturalizantes de agarosa al 1% en 20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico, 1 mM EDTA, 7,5% formaldehído. Antes de ser sometidos al desarrollo electroforético, los ARNs se mezclaron, 1:3 (v/v), con el tampón de carga (67% formamida, 13% formaldehído, 25 mM MOPS, 6,5 mM acetato sódico, 1,3 mM EDTA, 0,1 mg/ml bromuro de etidio) e incubaron durante 5 min a 60°C.

La comprobación del marcaje, así como su concentración óptima de uso, se estimó con el kit de detección inmunofluorescente DIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics, S.L.) atendiendo a las recomendaciones del fabricante. Se realizaron diluciones de concentración decreciente de las sondas en tampón de ARN para hibridación (H₂O-DEPC:20XSSC:Formaldehído, 5:3:2) (20XSSC: 3 M NaCl, 300 mM citrato sódico pH 7) y se aplicaron 5 μl de cada una en una membrana de Nylon cargada positivamente (Roche Diagnostics, S.L.). Los ARNs se fijaron a la membrana por exposición a luz ultravioleta en una cámara de luz ultravioleta. Las características del proceso de detección se describen en el apartado 3.2.2.2.2..

Cuadro 3. Resumen de los procesos de digestión y marcaje realizados para la obtención de sondas

VIRUS	Sondas ARN		Sondas ADN	
	Linearización Plásmidos	Transcripción y marcaje	Dobles Digestiones	Amplificación y marcaje
	Enzimas	ARN Polimerasas	Enzimas	ADN Polimerasa
BPYV	<i>NdeI</i>	T7	<i>NdeI</i> + <i>NcoI</i> <i>NdeI</i> + <i>SstII</i>	Frgamento Klenow
	<i>NcoI</i> <i>SstII</i>	SP6		
CYSDV	<i>EcoRI</i>	T7	<i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	Fragmento

BPYV: *Beet pseudo-yellows virus*; CYSDV: *Cucubit yellow stunting disorder virus*.

Dado que las sondas presentaban un tamaño superior al considerado en la literatura como óptimo se procedió al fraccionamiento de las mismas mediante hidrólisis alcalina con la fórmula siguiente y según describe Jackson (1992).

$$t = (L_o - L_f) / (K \cdot L_o \cdot L_f)$$

L_o = longitud inicial de la sonda de ARN (kb), L_f = longitud final de la sonda de ARN (kb), K = constante ($K = 0,11$ kb/minuto), t = tiempo de hidrólisis en minutos (siendo la temperatura de hidrólisis 60°C)

Tanto en el caso de las sondas de BPYV como en el de las CYSDV se estimó un tamaño final de 0,15 kb.

Así pues, a las sondas sintetizadas se les añadió Na_2CO_3 y NaHCO_3 hasta una concentración final 60 mM y 40 mM, respectivamente, y se incubaron a 60°C . Para las sondas de BPYV el proceso tuvo una duración de 47 min y para las de CYSDV fue de 37 min. Posteriormente, el ARN se precipitó con etanol del modo descrito y para favorecer esta precipitación se añadió una solución que contenía una concentración final 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ARNt, 0,5% ácido acético, 12 mM MgCl_2 . La comprobación del marcaje de las sondas así como su concentración óptima de uso, se realizó del modo descrito.

3.2.2.2.1.2. Obtención de sondas de ADN

Los insertos se liberaron de sus vectores respectivos mediante dobles digestiones con las endonucleasas de restricción que se indican en el cuadro 3. Los productos de estas digestiones se separaron en geles de agarosa al 1% en TEAc o TAE (40 mM Tris-acetato, 20 mM acetato sódico, 2 mM EDTA pH 8). Las bandas correspondientes a los cADNs del tamaño deseado se cortaron y purificaron con el kit de purificación de ADN Gene Clean Kit (BIO 101, Quantum Biotechnologies, S.A.) como describe el fabricante. La concentración de estos cADNs se estimó mediante espectrometría.

Las sondas de ADN, también marcadas con DIG, se obtuvieron con el kit de marcaje ADN DIG-High Prime (Roche Diagnostics, S.L.). Tanto la comprobación del marcaje

de las sondas así como el establecimiento de la concentración óptima de uso, se realizó con el sistema inmunofluorescente comentado. Si bien, los ADNs antes de ser aplicados a la membrana se diluyeron en tampón de dilución de ADN para hibridación (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8, 50 µg/ml ADN de esperma de salmón).

3.2.2.2.2. Dot-Blot

Estas hibridaciones se realizaron de acuerdo con las recomendaciones suministradas por la casa comercial del kit de detección inmunofluorescente (CSPD) (Roche Diagnostics, S.L.).

Previo a la aplicación a la membrana, los ARNs totales se desnaturalizaron durante 10 min a 60°C en presencia del tampón de dilución de ARN para hibridación (apartado 3.2.2.2.1.1.) en la proporción 1:1 (v/v). Se aplicó un volumen de 2-5 µl y se fijaron a las membranas de Nylon mediante exposición a luz ultravioleta.

Para la prehibridación se empleó la solución para sondas de ARN, 5XSSC, 50% formamida, 0,02% SDS, 0,1% N-laurylsarcosina, 2% reactivo bloqueo (p/v), descrita en manual y la solución comercial DIG Easy Hyb Granules (Roche Diagnostics, S.L.). Las membranas se prehibridaron durante 2 h en un horno de hibridación, a 55°C en el caso de las sondas de ARN, y a 60°C en el de las sondas de ADN.

Pasado este tiempo se añadió la sonda, previamente desnaturalizada a 100°C durante 10 min, y se hibridó durante 16 h a las temperaturas comentadas. Las sondas de ARN y ADN se emplearon a las concentraciones determinadas en los ensayos descritos (ver apartados 3.2.2.2.1.1 y 2), 1:200 y 1:135, respectivamente.

Terminada la hibridación se procedió a sucesivos lavados astringentes, dos veces con una solución que contenía 2XSSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente, durante 10 min cada vez, y dos veces con 0,1X SSC, 0,1% SDS a 68°C, durante 15 min cada vez. La inmunodetección de las hibridaciones se realizó con el kit DIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics, S.L.). En primer lugar, la membrana se lavó con tampón de lavado (100 mM ácido maleico, 15 mM NaCl pH 7,2, 0,3% Tween-20) durante 5 min y después se incubó 30 min en tampón de bloqueo (2% reactivo de bloqueo, 100 mM ácido maleico, 15 mM NaCl pH 7,2). El antisuero, anti-DIG

conjugado con AP, se diluyó 1:10.000 en tampón de bloqueo y se incubó en esta solución durante 30 min. Pasado este tiempo, se lavó por dos veces con el tampón de lavado durante 15 min cada vez. Finalmente, se equilibró con el tampón de detección (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 9,5) durante 3 min y se incubó durante 5 min en CSPD a la dilución 1:100 en tampón de detección. El exceso de líquido se eliminó con papel de filtro y la membrana se incubó durante 15 min a 37°C para aumentar la reacción luminiscente.

Finalmente, las membranas se expusieron a películas radiográficas (Film Kodak X-Omat, Sigma Aldrich Química, S.L.) durante distintos intervalos de tiempo. Las películas se revelaron con un revelador radiográfico (G150, Agfa, S.L.) a la dilución 1:4, se lavaron con agua, se fijaron con fijador fotográfico (Superfix, Tetenal, S.A.) a la dilución 1:10, se lavaron y se dejaron secar a temperatura ambiente.

3.2.2.3. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

Para determinar la presencia de BPYV y de CYSDV en las muestras, se utilizó la técnica de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), tal y como describen Berdiales *et al.* (1999) y Célix *et al.* (1996) respectivamente. Las parejas de oligonucleótidos empleadas para cada virus, su concentración de uso y las condiciones de la RT-PCR se detallan en el cuadro 4.

Estas reacciones se llevaron a cabo con el kit GeneAmp® ThermoStable *rTth* Reverse Transcriptase RNA PCR kit (Perkin Elmer, Applied Biosystems S.A.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En cada una de estas reacciones se emplearon 5 µl de ARNs totales extraídos a partir de 0,02 g de tejido liofilizado con el kit comercial.

Como control, en cada uno de los análisis se incorporaron reacciones con ARNs totales de plantas sanas e infectadas con BPYV y con CYSDV. Los productos de las reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1,2% en TBE. Se consideraron infectadas con BPYV, las muestras que presentaban productos de amplificación de 780 pb, y en el caso de CYSDV de 480 pb.

3.3. Propagación de *Beet pseudo-yellows virus* y *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

El aislamiento y la propagación de los virus se llevó a cabo como indican Nuez *et al.* (1999), mientras que para la obtención de ejemplares virulíferos de *T. vaporariorum* y *B. tabaci* se siguió, respectivamente, la metodología descrita por Soria *et al.* (1991) y Célix *et al.* (1996).

3.3.1. Poblaciones de moscas blancas y material vegetal infectado

Para la propagación de BPYV y de CYSDV se dispuso, respectivamente, de poblaciones no virulíferas de *T. vaporariorum* mantenidas sobre plantas de acelga (*Beta vulgaris* L.) (proporcionadas por Pilar Hernández⁵) y de *B. tabaci* mantenidas sobre plantas de melón (cv: Piel de Sapo) (proporcionadas por el Dr. Miguel Juárez). Estas poblaciones se mantuvieron, por separado, en jaulas aisladas (0,5X0,5X0,5m). Como fuente de inóculo se emplearon plantas de melón y pepino con síntomas de amarilleo (proporcionadas por el Dr. Miguel Juárez) susceptibles de estar infectadas con alguno de estos virus o con ambos (Fig. 8).

3.3.2. Transmisiones mediante vector

Las transmisiones se realizaron de forma masiva en jaulas aisladas (1X0,5X0,5m) donde se introdujeron plantas sanas de melón (cv. Piel de Sapo) y pepino (cv. Marketmore), en estado de dos hojas completamente desarrolladas, cinco plantas con síntomas de amarilleo y cada una de las poblaciones del vector por separado (Fig. 8). En ambos casos, y una vez transcurrido el período de tiempo establecido, 3-4 semanas para *B. tabaci* y 5-6 semanas para *T. vaporariorum*, las plantas más viejas se sustituían por plantas sanas. Como control, se realizaron ensayos de características similares en los que no se introducía el inóculo y, además, se cultivaron plantas de melón y pepino aisladas de las poblaciones de vectores. Para disponer de insectos virulíferos, una vez transcurridas 48 h de exposición al inóculo, se recogieron 25-30 ejemplares de cada especie de mosca blanca empleada en los ensayos.

⁵ Unitat d'Entomologia Aplicada, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) de Cabrils



Figura 8. Jaulas utilizadas en los ensayos de transmisión con moscas blancas (A) (imagen cedida por el Dr. Miguel Juárez) y en la propagación de *Beet pseudo-yellows virus* y *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (B).

4. RESULTADOS

4.1. Síntomas observados

La mayoría de las plantas de los cultivos protegidos de melón y pepino visitados en el bienio 1998-99 presentaban amarillos generalizados (Fig. 9). Las hojas más viejas de estas plantas, independientemente de la especie, presentaban amarillos internerviales, y en ocasiones estaban quebradizas y también mostraban engrosamiento en las nerviaduras y en el peciolo. En las hojas jóvenes, en algunos

casos, se observaron puntos cloróticos próximos a la zona internervial (Fig. 9). En algunas plantas también se observó enanismo.

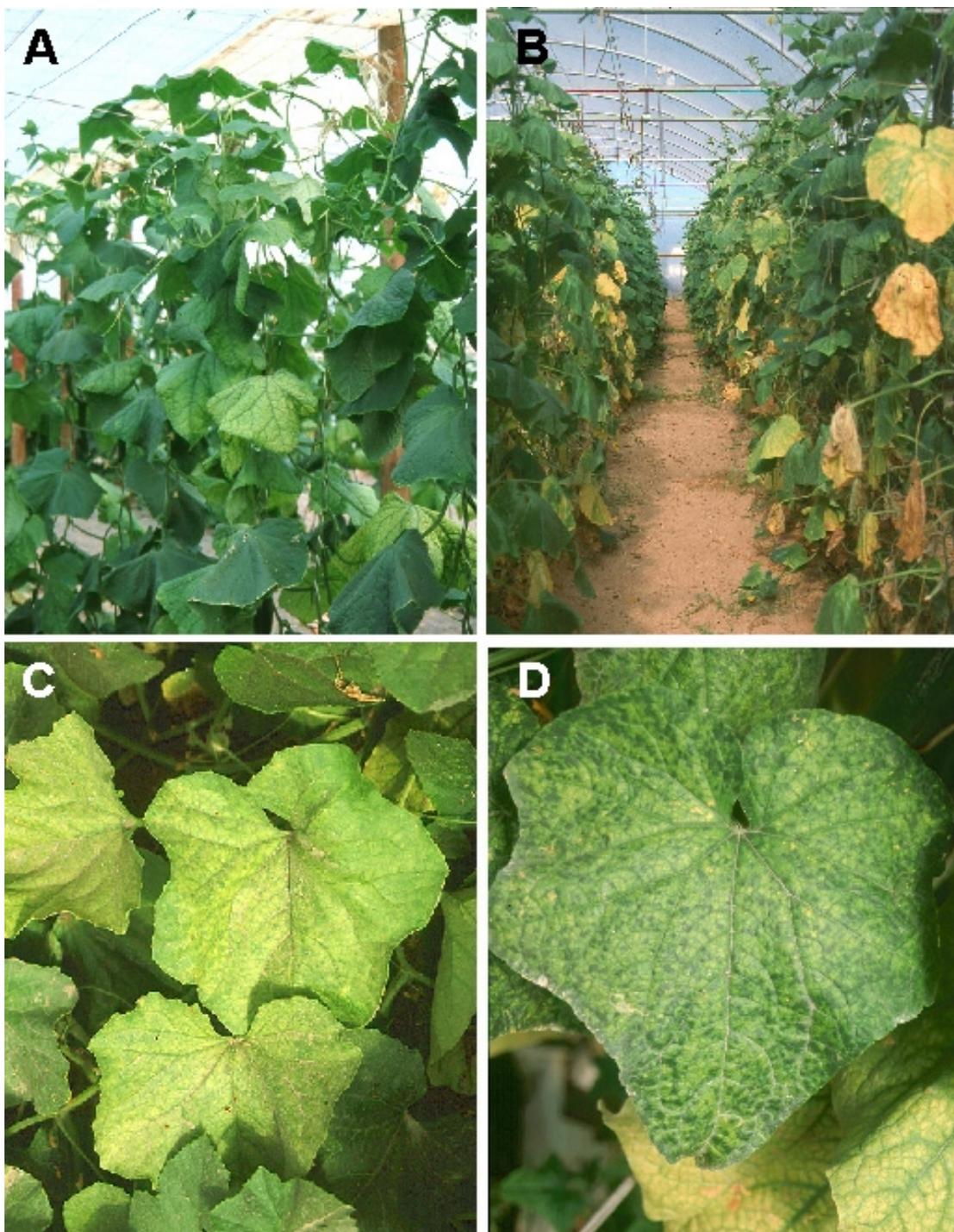


Figura 9. Síntomas observados en las muestras de melón y pepino procedentes del Sudeste Español. A y B: plantas de pepino con amarilleo. C: plantas de melón con amarilleo. D: Detalle de una hoja de melón con amarilleo.

4.2. Detección de *Beet pseudo-yellows virus* y *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

4.2.1. Mediante serología

En los ensayos de condiciones, los antisueros contra BPYV no reaccionaron con los testigos positivos procedentes de EE.UU (hojas de lechuga infectadas), ni tampoco reaccionaron, en posteriores ensayos, con las dos muestras de melón procedentes del sudeste español en las que se había confirmado su presencia mediante técnicas moleculares. El antisuero contra LIYV, que se utilizó por su detectada reacción cruzada con CYSDV, no reaccionó con los controles de melón y pepino con CYSDV, pero en cambio sí que lo hizo con las muestras con LIYV (proporcionadas por el Dr. Bryce W. Falk). En ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de LIYV.

4.2.2. Extracción y análisis del ARN bicatenario

En los análisis electroforéticos de los productos de la extracción de las muestras de melón sanas e infectadas con BPYV no se observaron diferencias entre los ácidos nucleicos extraídos, de sana y enferma, que además se hidrolizaron con los tratamientos con ribonucleasa (Fig. 10). En cambio, tanto la extracción como los tratamientos con ARNasa del ARNbc fueron altamente satisfactorios en el caso del maíz infectado con MRDV (Fig. 10).

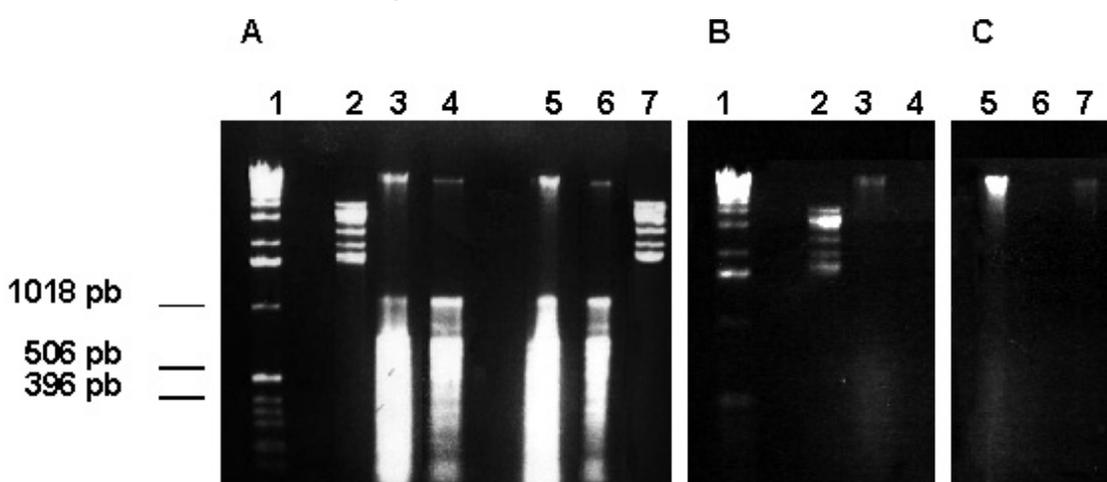
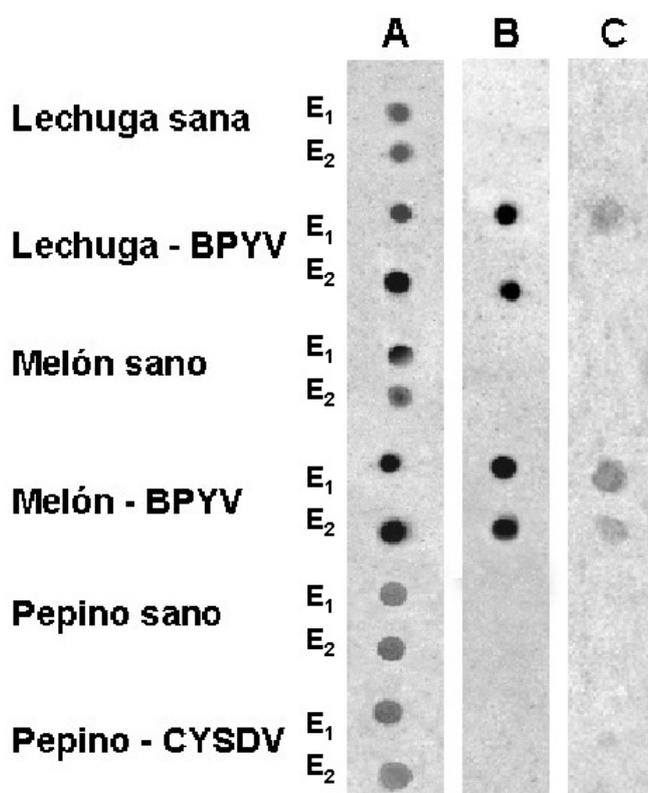


Figura 10. Análisis de la extracción del ARN bicatenario. A. Productos de la extracción en maíz infectado con *Maize rough dwarf virus* (MRDV) (carriles 2 y 7), en melón infectado con *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV) (carriles 3 y 5) y melón sano (carriles 4 y 6), carril 1: marcadores. B. Gel incubado con ARNasa a elevada concentración salina, Carriles 1: marcadores; 2: maíz

con MRDV; 3: melón con BPYV; 4: melón sano. C. Incubación con ARNasa a baja concentración salina. Carriles 5: melón con BPYV; 6: melón sano; 7: maíz con MRDV.

4.2.3. Hibridación

Para BPYV, en las pruebas previas realizadas con la sonda de ARN de polaridad negativa y los ARNs totales extraídos con tampón salino y desproteinizados, se observó hibridación específica en los testigos positivos (Fig. 11). La sonda de polaridad positiva, empleada como control, no hibridó. Pero, la reproductibilidad de esta técnica se vio dificultada por la aparición de señales de hibridación inespecífica en los testigos negativos y en los infectados con CYSDV. Estas señales, aunque no



se pudieron cuantificar, presentaron una mayor intensidad en los testigos infectados con BPYV.

Figura 11. Hibridación con sondas de ARN de *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV) en ARNs totales de plantas sanas e infectadas con BPYV y *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV). Panel A, sonda de polaridad negativa; Panel B, sonda de polaridad negativa hidrolizada; Panel C, sonda de polaridad positiva hidrolizada. E₁: ARN's totales extraídos con tampón salino y desproteínización; E₂: ARN's totales extraídos con el sistema comercial.

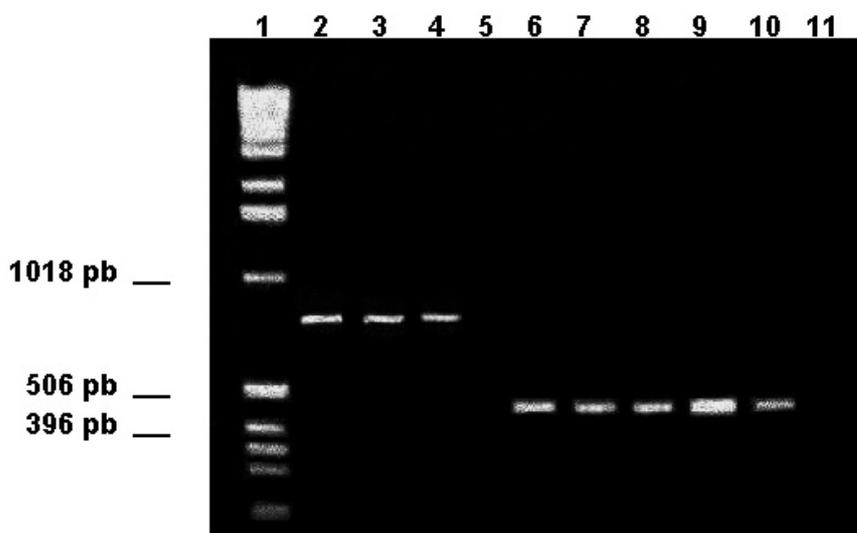
Con el fin de ajustar las condiciones del Dot-Blot para la detección de BPYV, se realizaron distintas experiencias ensayando varios métodos de extracción de ARN

total y además hibridaciones Dot-Blot con sondas de ADN y ARN hidrolizadas (Fig. 11). Se observó que tanto con los ARNs totales obtenidos con precipitación con LiCl como los procedentes de la clarificación no se producía hibridación. Cuando se emplearon los ARNs extraídos con el sistema comercial la sonda hibridó únicamente con los testigos positivos. Por lo que esta metodología de extracción se eligió para llevar a cabo las siguientes experiencias. En el Dot-Blot con sondas de ADN no se produjo hibridación. Las pruebas realizadas con las sondas de ARN hidrolizadas, la de polaridad negativa hibridó únicamente con los testigos positivos, y con la de polaridad positiva se observó fondo en algunas muestras (Fig. 11).

En el caso de CYSDV, en los ensayos realizados con las dos sondas y con los ARNs extraídos con el sistema comercial, no se observó hibridación ni en los testigos positivos ni en los negativos. Estos resultados se repitieron tanto al emplear la sonda de ADN como las respectivas sondas de ARN hidrolizadas (datos no mostrados).

4.2.4. Amplificación del ARN viral

BPYV se detectó únicamente en las muestras recogidas durante el primer año, obteniéndose productos de amplificación en dos muestras de melón procedentes de la provincia de Murcia y de Granada. En el caso de CYSDV se detectó en los dos años, en un total de ocho muestras, dos de melón y seis de pepino, todas procedentes de invernaderos de la provincia de Almería (Fig. 12). No se detectaron infecciones mixtas



con estos dos virus (cuadro 5).

Figura 12. Gel de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos a partir de ARNs totales y empleando las parejas de oligonucleótidos específicas de *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV) (carril 2-5) y *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) (carril 6-11). Carriles, 1: Marcadores; 2: Control BPYV; 3 y 4: muestras de melón; 5: melón sano; 6: control CYSDV, 7 y 8: muestras de melón; 9 y 10: muestras de pepino; 11: melón sano.

Cuadro 5. Resultados de los análisis de *Beet pseudo-yellows virus* y *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa, en las muestras recogidas durante los dos años de estudio.

Año	Especie	Nº de muestras	BPYV	CYSDV
1998	Melón	7	2	2
	Pepino	15	0	2
	Total	22	2	4
1999	Pepino	22	0	4
	Total	22	0	4
	TOTAL	44	2	8

BPYV: *Beet pseudo-yellows virus*; CYSDV: *Cucurbit yellow stunting disorder virus*.

4.3. Propagación de *Beet pseudo-yellows virus* y *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

Durante el tiempo que se mantuvo el ensayo, las plantas de melón y pepino expuestas al inóculo y al vector *T. vaporariorum* no mostraron síntomas de amarilleo internervial. En cambio, en las plantas expuestas a *B. tabaci*, después de 2-3 semanas se observaron puntos cloróticos en las hojas cercanos a las nerviaduras que, posteriormente, dieron lugar a un amarilleo internervial (Fig. 13). Estos síntomas se observaron de nuevo en los ensayos realizados sucesivamente. En los controles, no se observaron síntomas de amarilleo ni en las plantas expuestas únicamente a los vectores no virulíferos, ni en las plantas que se mantuvieron aisladas de estos insectos.

La comprobación mediante RT-PCR de las infecciones con estos dos virus, demostró la presencia de CYSDV, tanto en las plantas fuente de inóculo como en las obtenidas

en las sucesivas transmisiones. En cambio, no fue así para BPYV, ya que en las plantas empleadas como fuente de inóculo no se detectó su presencia. En las plantas procedentes de los ensayos control no se detectaron infecciones producidas por los virus ensayados.

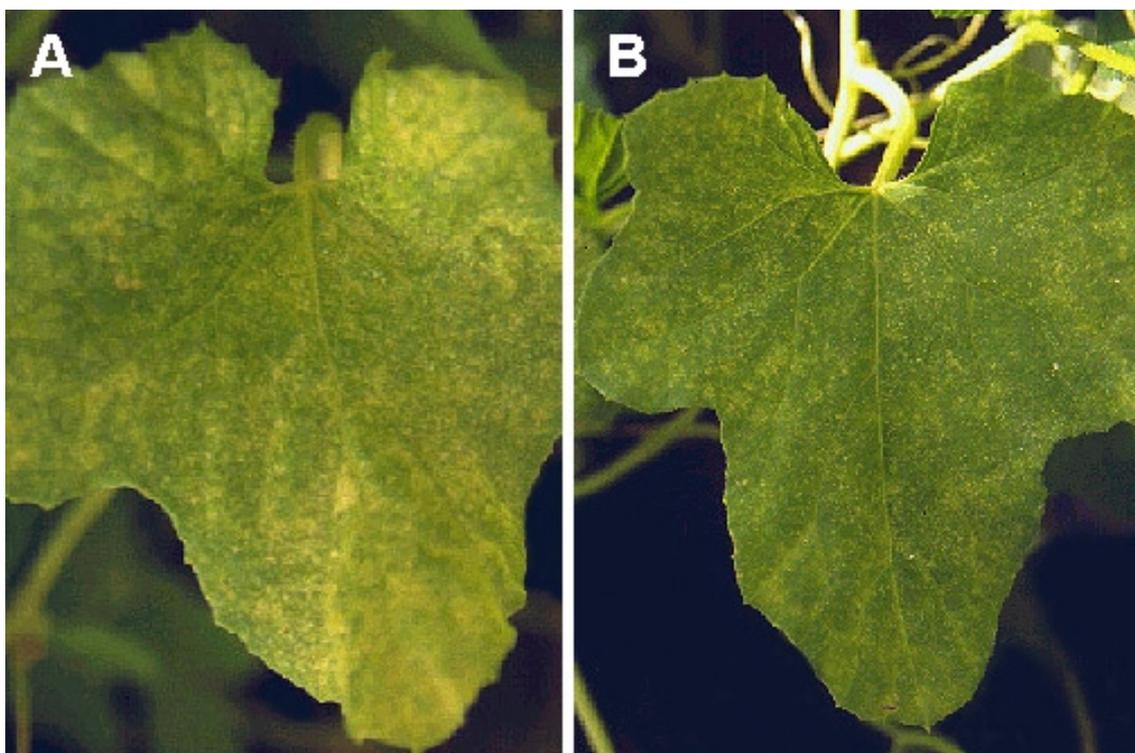


Figura 13. Síntomas observados en las plantas de melón (A) y pepino (B) expuestas al inóculo y al vector *Bemisia tabaci*

5. DISCUSIÓN

De las técnicas ensayadas para la detección tanto de BPYV como de CYSDV la más fiable y reproducible es la RT-PCR.

Los resultados de las pruebas serológicas fueron negativos para ambos virus obedeciendo probablemente a diferentes causas. En general, la limitación en la detección de los métodos serológicos, al utilizar antisueros contra purificados de *Closteroviridae*, puede ser consecuencia de los bajos rendimientos que se obtienen en el proceso de purificación de estos virus, ya que al estar limitados al floema, dando antisueros de baja titulación (Karasev, 2000). A ello se puede añadir la fragilidad y tendencia a la agregación que presentan las partículas alargadas y flexuosas de los

Closteroviridae, como ha sido demostrado para BPYV (Liu y Duffus, 1990). Estas podrían ser algunas de las causas de la nula reacción de los antisueros contra BPYV, aunque existieron algunos problemas referenciados por el obtentor, durante su prolongada conservación, que pudieron afectar a su viabilidad.

Pese a ello, teniendo en cuenta que en estudios de inmunolocalización al microscopio electrónico de transmisión muchas veces se obtienen resultados discriminantes que no son significativos en un ELISA previo, los antisueros no fueron aun totalmente descartados para otras experiencias de la Tesis Doctoral.

Los resultados obtenidos con el antisuero contra LIYV muestran la ausencia de reacción cruzada con el material infectado con CYSDV presente en España, pero, sin otras pruebas adicionales, no se debiera descartar su utilidad con otros aislados de CYSDV.

En las extracciones de ARNbc, no se observaron ácidos nucleicos de esta naturaleza en las muestras de melón infectadas con BPYV como ocurre en los trabajos realizados por Guerra-Sánchez y Cuadrado (1996). En algunos casos, aunque en los análisis electroforéticos se detecta la presencia de una banda de gran peso molecular que no se hidroliza, su tamaño difiere considerablemente del descrito por Célix *et al.* (1996) y Tian *et al.* (1996) en otros *Crinivirus*, por lo que parece probable pensar que éste ácido nucleico sea ADN.

En el caso de las sondas de ARN de CYSDV, por motivos que se desconocen, no se produjo hibridación, pero los resultados obtenidos con las sondas de BPYV, suficientemente discriminantes, si permiten abordar al menos, estudios de localización subcelular de BPYV mediante hibridación *in situ*.

Dado que la RT-PCR mostró una mayor fiabilidad y reproducibilidad, las sondas de ARN no se emplearon para el diagnóstico. Estas experiencias se llevaron a cabo con ARNs totales extraídos con el sistema comercial, ya que como describen Dudareva *et al.* (1996) se obtiene un rendimiento cualitativo mayor que con las otras metodologías y, además, se evita la posible interferencia de componentes de las plantas como polisacáridos o polifenoles. Las metodologías descritas por Achón (1993) y Pallás *et al.* (1998) parecen tener una mejor aplicación para la extracción de ARNs totales de

plantas herbáceas infectadas con *Potyvirus* y de especies leñosas infectadas con *Ilarvirus* y *Comovirus*, respectivamente. En el método de Célix *et al.* (1996), descrito para la extracción de ARNs totales de cucurbitáceas infectadas con CYSDV, podría ser probable que la concentración de ARN viral en el tejido haya actuado como factor limitante del proceso.

La finalidad del muestreo realizado no era la de establecer niveles de incidencia, ya que las características del mismo limitan tal posibilidad. Sin embargo, los resultados obtenidos coinciden, con los obtenidos por Berdiales *et al.* (1999) y Rubio *et al.* (1999). BPYV se detecta en muestras que proceden de zonas apartadas del área de producción de Almería, en las que todavía existen poblaciones de su vector (Livieratos *et al.*, 1999). Célix *et al.* (1996) ya señalaron que el desplazamiento progresivo de las poblaciones de *T. vaporariorum* por poblaciones de *B. tabaci* en la zona de Almería tiene una correlación con la mayor presencia de CYSDV frente a BPYV (Janssen *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2001). Esta situación parece que se esté produciendo en el resto de áreas de producción del sudeste español, ya que, las infecciones producidas por el virus de la clorosis del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) (gén. *Crinivirus*) en la provincia de Málaga están asociadas a las poblaciones de *B. tabaci* (Navas-Castillo *et al.*, 2000), a pesar de que *T. vaporariorum* también es su vector (Wisler *et al.*, 1998). El elevado porcentaje de muestras con amarilleo internervial (77%), que no muestran la presencia de ninguno de los dos virus ensayados, es similar, también, al obtenido por Berdiales *et al.* (1999). Estos autores, aunque no descartan la presencia de algún otro agente patógeno infectando estos cultivos, sugieren que en muchos casos los síntomas de amarilleo pueden estar producidos por problemas fisiológicos.

Se ha conseguido propagar CYSDV, pero en cambio, BPYV no, debido a una falta de sincronía entre los ensayos de transmisión y la disposición de inóculo y a la pérdida posterior del inóculo mantenido en Murcia.

Cuadro 4. Descripción de las reacciones de transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizadas con las parejas de oligonucleótidos específicas de *Beet pseudo yellows virus* y *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

Virus	Parejas Oligonucleótidos	Concentración RT-PCR (μ M)	Condiciones de las reacciones		Productos de amplificación	
			RT	PCR	Tamaño (pb)	Localización
BPYV	172 (5'- CTTTGTGCTCCCAACTCAAC- 3')	0,66	30 ' 65°C	40 ciclos:	780	ORF 1b
	175 (5'- CTTAGTGATTCCAAGCC- 3')	0,77		30" a 93°C 30" a 55°C 1' a 70°C		
				1 ciclo:		
				7' a 70°C		
CYS DV	410L (5'- TTGGGCATGTGACAT- 3')	0,8	30 ' 65°C	40 ciclos:	480	HSP70
	410U (5'- AGAGACGGTAAGTAT- 3')	0,8		30" a 93°C 30" a 55°C 1' a 70°C		
				1 ciclo:		
				7' a 70°C		

BPYV: *Beet pseudo-yellow virus*; CYS DV: *Cucurbit yellow stunting disorder virus*

RT: transcripción reversa; PCR: reacción en cadena de la polimerasa

ORF: secuencia con fase de lectura abierta

HSP70: homólogo de las proteínas de choque térmico