

localiza en el floema de las muestras infectadas, y principalmente en las células intermediarias de las venas menores (Fig. 25 A). En estas células se observó inmunomarcaje en las agregaciones de partículas virales que ocupaban la totalidad del citoplasma (Fig. 25 B y C). También se observó marcaje específico en distintas zonas del citoplasma (Fig. 26 A) y, en algunos casos, en unas estructuras laminares que recuerdan a las lamelas de los cloroplastos (Fig. 26 B). Algunas células mostraban, asociados a los depósitos de calosa, depósitos de material electrodensos en la cara externa del plasmalema, semejantes a los observados previamente en BPYV (ver apartado 4.1.1, capítulo III) y marcaje en su citoplasma (Fig. 27 A-B). También aparecieron las estructuras semejantes a vacuolas con estructuras electrodensas en su interior, observándose marcaje tanto en el citoplasma de estas células como en el interior de estas estructuras (Fig. 27 C).

Las pruebas de ISH para microscopía óptica solo se revelaron con el sistema de inmunodetección enzimático. En estas experiencias se obtuvieron señales de hibridación únicamente con la sonda sintetizada con la ARN polimerasa T3. Esta sonda produjo hibridación en las células del floema de las muestras infectadas, y en ocasiones también en las del xilema (Fig. 28 B) que se localizaron de nuevo en el mismo lugar en las repeticiones realizadas con las secciones seriadas. La sonda de polaridad positiva no produjo hibridación ni en las muestras sanas ni en las infectadas (Fig. 28 C-D).

Las observaciones al MET mostraron que, tanto en las muestras de melón como de pepino, las señales de hibridación se localizan en el citoplasma de las células intermediarias de las venas menores (Fig. 29 A-B). En algunas de estas células se observó hibridación en estructuras semejantes a las del retículo endoplasmático (Fig. 29 C-D). También se observó señales de hibridación en las vacuolas de algunas células del floema y del mesófilo, tanto de las muestras infectadas como de los controles sanos.

Los resultados de estas pruebas, muestran que tanto la proteína de CP como el ARN viral se localizan en el tejido del floema, presentando una distribución en el citoplasma de las células infectadas similar y una asociación con estructuras laminares semejantes a las lamelas de los cloroplastos o al retículo endoplasmático.

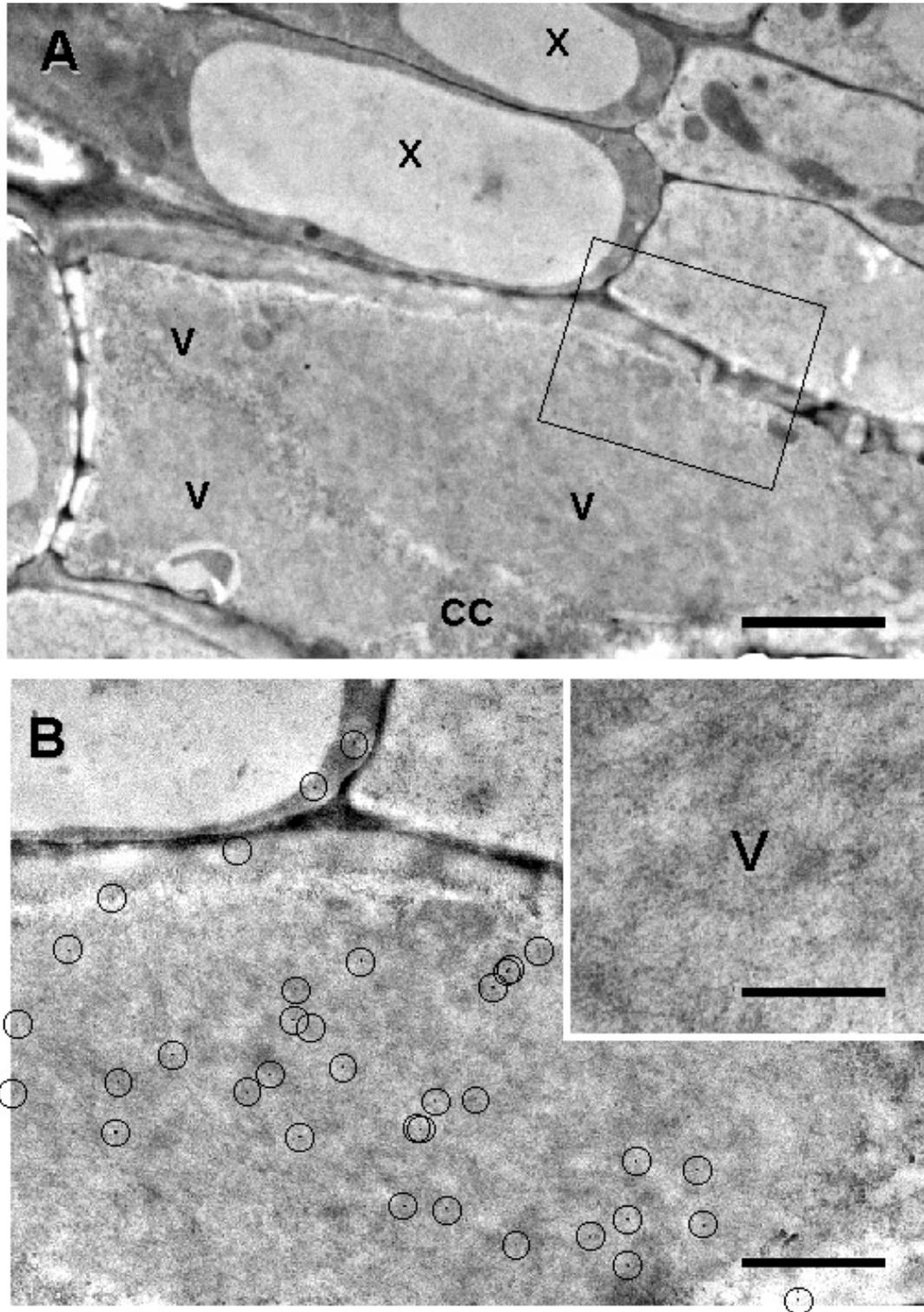


Figura 25. Inmunolocalización de la proteína de cubierta de *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) en tejido vegetal. A: vena menor del floema. B: detalle de A, célula acompañante con masas de partículas de CYSDV, el oro coloidal aparece marcado con círculos. C: detalle de B, partículas virales de CYSDV. (CC: célula acompañante; V: partículas virales; X: xilema. Barras, A: 2,5 μ ; B: 1,5 μ ; C: 600 nm. Tamaño de las partículas de oro coloidal 10 nm).

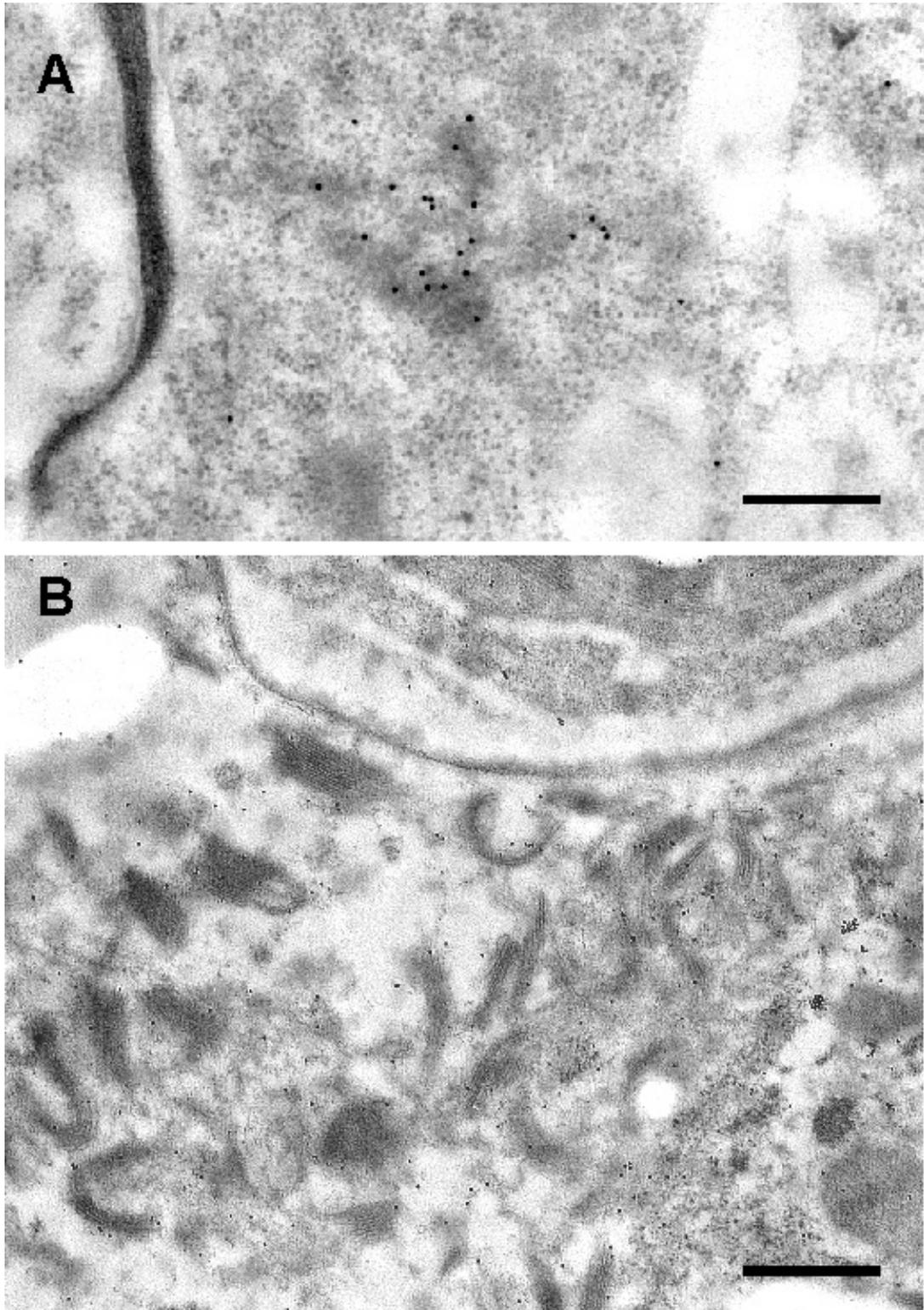


Figura 26. Inmunolocalización de la proteína de cubierta de *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) en tejido vegetal. A: célula acompañante con marcaje en el citoplasma. B: inmunomarcaje de unas estructuras laminares en el citoplasma de una célula acompañante. (Barras, A: 620 nm; B: 1 μ . Tamaño de las partículas de oro coloidal en A = 10 nm y en B = 25 nm).

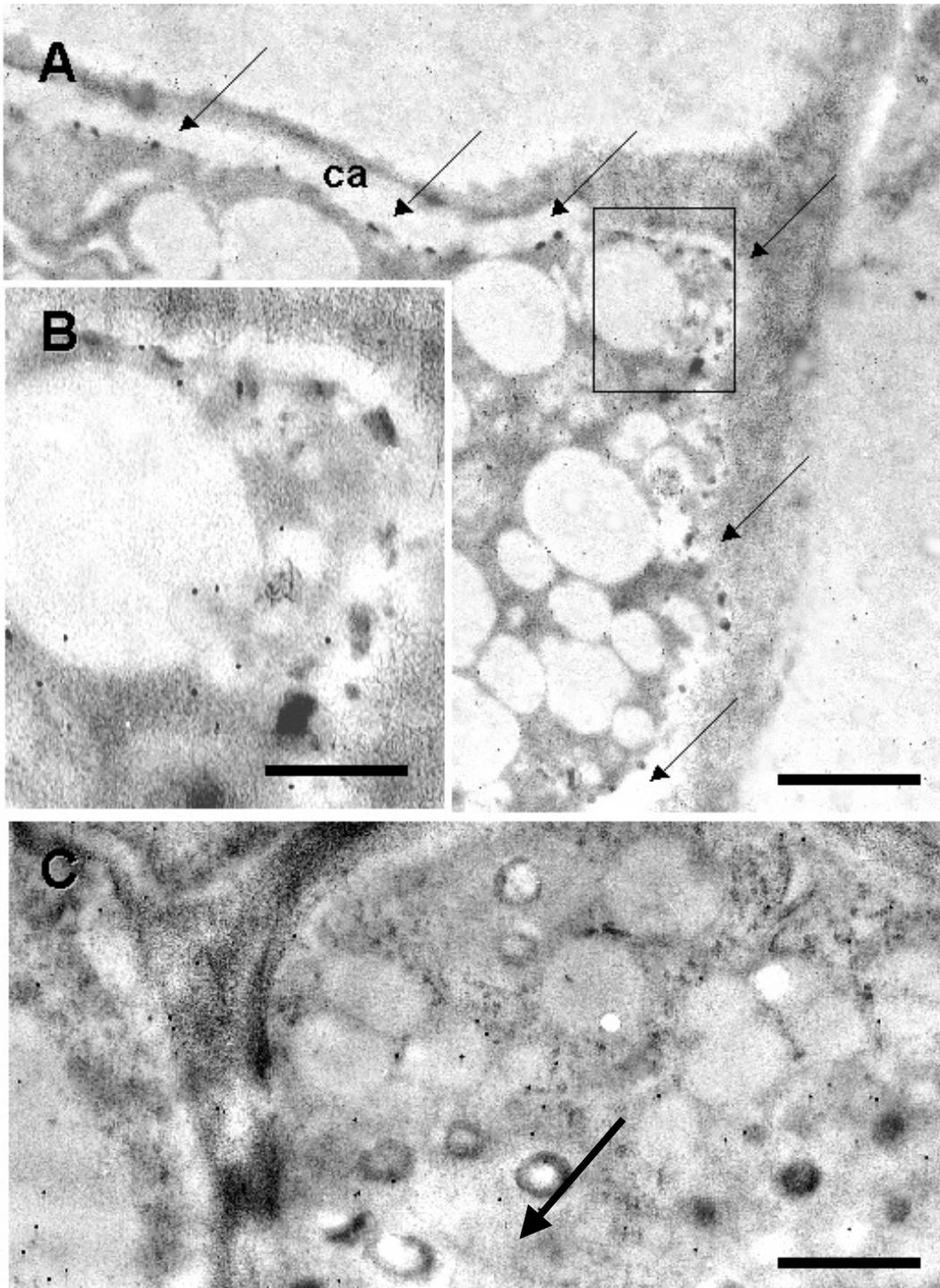


Figura 27. Inmunolocalización de la proteína de cubierta de *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) en tejido vegetal. A: célula acompañante con depósitos electrodensos en la cara externa del plasmalema (flechas) dispuestos entre la calosa. B: detalle de A; depósitos y marcaje en el citoplasma. C: inmunomarcaje en el citoplasma de una célula con una estructura similar a una vacuola con estructuras electrodensas en su interior (línea discontinua) (ca: calosa. Barras: A: 860 nm; B: 318 nm; C: 780 nm. Tamaño de las partículas de oro coloidal 10 nm).