

UNIVERSITAT DE LLEIDA  
E.T.S. D'ENGINYERIA AGRARIA

EL VIRUS DEL MOSAICO  
ENANIZANTE DEL MAIZ (MDMV)  
EN CATALUÑA

ACHON SAMA, M. ANGELES  
Prod. Vegetal i C.F.  
10/02/94  
93/94 I SI

UNIVERSITAT DE LLEIDA  
Biblioteca



1600116265

M<sup>a</sup>

ANG

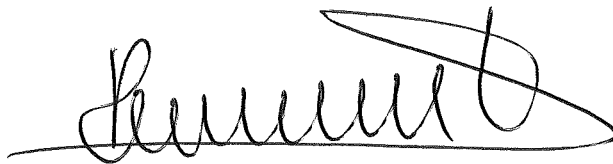
SAMA



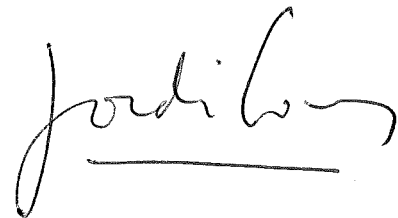

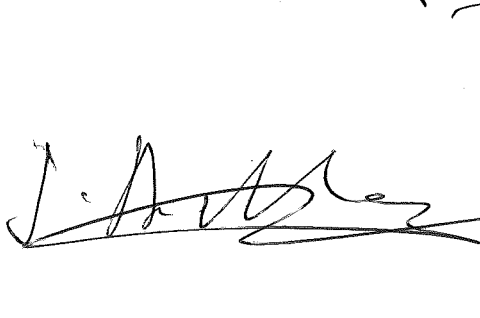
(043) "1993" Ach

1600116205 X

UNIVERSITAT DE LLEIDA  
E. T. S. D'ENGINYERIA AGRARIA



F. C. Arenas



EL VIRUS DEL MOSAICO ENANIZANTE DEL  
MAIZ (MDMV) EN CATALUÑA



TESIS DOCTORAL  
M<sup>a</sup> ANGELES ACHON SAMA  
LLEIDA, 1993

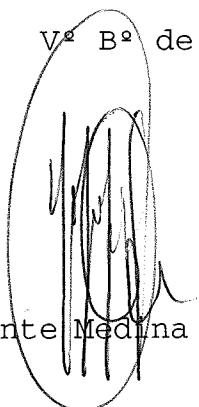
0032-06560

Tesis escrita y presentada para optar al grado de Doctor  
en la Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària de la  
Universitat de Lleida.

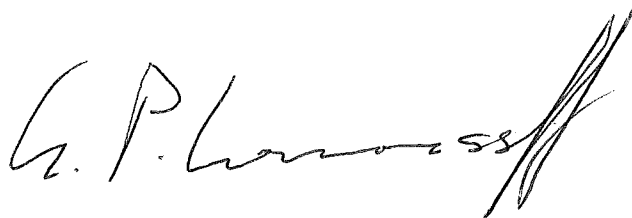
La Doctoranda

Fdo. M<sup>a</sup> Angeles Achón Sama

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup> de los Directores de la Tesis



Fdo. Vicente Medina Piles



Fdo. George P. Lomonosoff

## Agradecimientos

A Vicente Medina y George P. Lomonosoff, directores de esta Tesis, por su eficaz labor, estímulo y paciencia a lo largo de su realización.

A Juan Antonio Martín por sus consejos en el cultivo del maíz, transmisión por semilla y gestiones para la obtención del material vegetal.

A Michael Shanks por su inestimable y continuada ayuda en las técnicas de Biología Molecular.

A Ignacio Romagosa por su colaboración en los análisis estadísticos.

A Esther Sin por su ayuda en la transmisión por semilla y manejo de programas estadísticos.

A Guillem Puertas y Joan Serra por la siembra, cultivo y cesión gratuita de los campos experimentales.

A Xavier Pons por su apoyo en la identificación y cría de pulgones.

A Concepción Jorda por su constante ayuda en las técnicas generales de Virología y por la obtención del antisuero utilizado en las pruebas serológicas.

A Marion S. Pinner por su colaboración en las técnicas de Microscopía Electrónica.

A Enrique Moriones y Ramon Albajes por su ayuda en la discusión y revisión del manuscrito.

A Rosa Serra y Joaquín Royes por su colaboración en los descensos de producción y determinación de los huéspedes experimentales de MDMV, respectivamente.

A Xavier Goñi y a los miembros del departamento de fotografía del John Innes Institute por la realización de las fotografías.

A Ferran Riba y Consuelo Soler el haberme proporcionado muchas de las semillas de las especies vegetales utilizadas en este trabajo.

A John M. Clark y R. Baudin, por la secuencia de la proteína de cubierta de MDMV-A y por el antisuero contra SCMV-D, respectivamente.

A los Centros UdL-IRTA y John Innes Institute por permitirme la utilización de sus instalaciones, en particular, a los miembros de los departamentos de informática y personal de mantenimiento de sus invernaderos.

A la CIRIT, CICYT, Instituto de Estudios Ilerdenses, "La Caixa" y UPC-Olivetti por el soporte económico durante la realización de este trabajo.

Y finalmente a todas aquellas personas que han colaborado, de una forma u otra, en la presente Tesis.

## Abreviaturas

AMPS: persulfato amónico

BSA: albúmina de suero bovino

CAPS: ácido 3-(cyclohexylamino)-1-propano-sulfónico.

cDNA : ácido desoxirribonucleico complementario

cv/cvs : cultivar/s

dCTP: 5'-trifosfato de 2'-desoxicitidina

dNTP: 5'-trifosfato 5'-desoxinucleótido

ddTTP: 5'-trifosfato 2- dideoxitimidina

Denhardt: 0,02 % BSA; 0,02% Ficoll 400, 0,02%  
polivinilpirrolidona, 5 mM EDTA, pH 8

DNA: ácido desoxirribonucleico

dsDNA : DNA bicatenario

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

Hepes: ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico

IPTG : isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico

NaDIECA: dietilditiocarbamato sódico

ORF : fase de lectura abierta

PEG: polietilen glicol

PAGE : electroforesis en geles de policriamida

RNA: ácido ribonucleico

rpm : revoluciones por minuto

SDS : dodecilsulfato sódico

ssDNA : DNA monocatenario

TEMED : N,N,N',N', tetrametiletildiamino

Tris: trihidroximetilaminometano

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

**INDICES**

## Indice general

### 1. INTRODUCCION

1. 1. Potyvirus: situación taxonómica.....	2
1. 1. 1. Características biológicas del grupo.....	3
1. 1. 1. 1. Transmisión.....	3
1. 1. 1. 2. Citopatología.....	4
1. 1. 2. Morfología y composición de las partículas.....	6
1. 1. 3. Organización y expresión del genoma.....	6
1. 1. 4. Funciones de los productos génicos.....	9
1. 2. Problemática en la identificación de potyvirus.....	13
1. 3. Subgrupo del virus del mosaico de la caña de azúcar.....	15
1. 3. 1. Taxonomía del subgrupo.....	15
1. 3. 2. Identificación en Europa y particularmente en España.....	17
1. 4. Virus del mosaico enanizante del maíz.....	19
1. 4. 1. Descripción.....	19
1. 4. 2. Epidemiología de MDMV.....	21
1. 4. 3. Control.....	23
1. 4. 4. Efecto sobre la producción.....	25
1. 5. Objetivos .....	27

### 2. MATERIAL Y METODOS

2. 1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	29
2. 1. 1. Material vegetal.....	29
2. 1. 2. Condiciones de cultivo.....	29
2. 2. Origen de los aislados del virus.....	31
2. 3. Transmisión mecánica.....	32
2. 4. Transmisión por pulgones.....	35
2. 5. Transmisión por semilla.....	36
2. 6. Purificación del virus.....	38
2. 7. Serología.....	39
2. 8. Microscopía electrónica.....	40



2. 8. 1. Preparaciones de extractos crudos y purificados del virus.....	40
2. 8. 2. Preparaciones de material vegetal para su observación al microscopio electrónico.....	40
2. 8. 3. Inmunomarcado con oro coloidal.....	41
2. 9. Extracción del RNA genómico.....	43
2. 10. Síntesis y clonación de cDNA.....	44
2. 10. 1. Síntesis de cDNA.....	44
2. 10. 2. Clonación de cDNA.....	46
2. 10. 3. Preparación de ssDNA recombinante.....	47
2. 10. 4. Preparación de la forma replicativa de DNA recombinante.....	48
2. 11. Hibridación RNA-DNA.....	49
2. 12. Secuenciación de DNA.....	50
2. 13. Electroforesis de proteínas.....	51
2. 14. Inmunoblot.....	52
2. 15. Secuenciación de proteínas.....	53

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

3. 1. Presencia de MDMV en campos experimentales y comerciales.....	55
3. 1. 1. Presencia en campos experimentales.....	55
3. 1. 2. Presencia en campos comerciales.....	67
3. 2. Características de los aislados.....	68
3. 2. 1. Transmisión mecánica: condiciones óptimas.....	68
3. 2. 2. Transmisión por pulgones.....	73
3. 2. 3. Transmisión por semilla.....	74
3. 2. 3. 1. Infección en las plantas madre.....	74
3. 2. 3. 2. Transmisión a la descendencia.....	76
3. 2. 4. Huéspedes.....	79
3. 2. 5. Citopatología y morfología de las partículas.....	86
3. 2. 6. Secuencia de la región 3' del RNA viral.....	92
3. 2. 6. 1. Lugar de procesamiento del gen de la proteína de cubierta.....	96

3. 2. 6. 2. Hibridación molecular con la sonda MDM5 con los aislados MDMV-L y MDMV-Gs.....	99
3. 2. 7. Heterogenidad en tamaño de la proteína de cubierta.....	100
3. 3. Descensos de producción y altura de las plantas inducidos por MDMV.....	103
3. 3. 1. Infección en los cultivares inoculados y no inoculados con el virus.....	104
3. 3. 2. Descensos en la producción.....	109
3. 3. 3. Reducciones en altura de las plantas.....	114
4. CONCLUSIONES.....	117
5. BIBLIOGRAFIA.....	122

## Indice de figuras

	pág.
Figura 1. Diagrama del procesamiento de la poliproteína potyviral.....	10
Figura 2. Planta de maíz con síntomas de mosaico en franjas.....	57
Figura 3. Planta de maíz con síntomas de mosaico en toda la superficie de la hoja.....	58
Figura 4. Porcentaje de plantas infectadas por MDMV, en el estado de llenado de grano, en campos experimentales del SEA.....	63
Figura 5. Planta de sorgo con mosaico, lesiones necróticas y estriado de color púrpura.....	64
Figura 6. Evolución en el tiempo del porcentaje de plantas infectadas por MDMV, de forma natural, en distintos cultivares.....	66
Figura 7. Tiempo de aparición de síntomas y porcentaje de plantas infectadas en los cvs. G-4507, AE-703, Moltó, AD-640, M-770, Futuro, P-3183 y X1-72 inoculados con el virus.....	70
Figura 8. Tiempo de aparición de síntomas y % de plantas infectadas según el estado fenológico de la planta en el momento de la inoculación.....	72
Figura 9. Cambios de infectividad con el tiempo de postinoculación en la extracción del inóculo.....	72
Figura 10. Evolución en el tiempo del porcentaje de plantas infectadas en las líneas puras MO-17 y B-73 inoculadas y no inoculadas con MDMV. ....	75
Figura 11. Nascencia de las semillas procedentes de parentales inoculadas y no inoculados con el virus.....	78
Figura 12. Síntomas inducidos por los aislados MDMV-L y MDMV-Gs en distintos cultivares de sorgo.....	85
Figura 13. Células del mesófilo infectadas con MDMV-G.....	89

Figura 14. Células del mesófilo infectadas con MDMV-G.....	90
Figura 15. Partículas virales de MDMV.....	91
Figura 16. A: RNA purificado. B: síntesis cDNA. C: Tamaño de los clones.....	94
Figura 17. Extremo 3' de los clones M13-MDM8, M13-MDM5, M13-MDMr.....	95
Figura 18. Secuencia de nucleótidos del extremo 3' del RNA del aislado MDMV-G y la secuencia de aminoácidos deducida a partir de ésta.....	97
Figura 19. Hibridación molecular con la sonda MDMV5 de los aislados MDMV-L y MDMV-Gs.....	102
Figura 20. Tamaño proteína de cubierta.....	102
Figura 21. Evolución en el tiempo del porcentaje de plantas infectadas, en los cvs. AD-640, P-3183 y Moltó inoculados y no inoculados con el virus en dos localidades en 1990.....	107
Figura 22. Evolución en el tiempo del porcentaje de plantas infectadas, en los cvs. AD-640, P-3183 y Moltó inoculados y no inoculados con el virus en dos localidades en 1991.....	108
Figura 23. Producción en los cvs. AD-640, P-3183, Moltó inoculados y no inoculados con el virus.....	112
Figura 24. Altura de las plantas en los cvs. AD-640, P-3183, Moltó inoculados y no inoculados con el virus.....	116

## Índice de tablas

pág.

Tabla 1. Funciones de los productos génicos del grupo Potyvirus.....	12
Tabla 2. Relación de especies ensayadas como posibles huéspedes de MDMV y procedencia de las mismas.....	30
Tabla 3. Ensayo de condiciones de transmisión mecánica, tratamientos y condiciones particulares en los mismos.....	34
Tabla 4. Secuencias de nucleótidos del gen de las NIB (106-120 nt del extremo 3') de los 4 potyvirus que se diseñó el oligonucleótido.....	45
Tabla 5. Resultados de las pruebas realizados para determinar la presencia de MDMV en 1989 en campos experimentales.....	59
Tabla 6. Resultados de la prueba ELISA para determinar la presencia de MDMV en 1990 y 1991 en campos experimentales.....	59
Tabla 7. Medias del porcentaje de plantas infectadas por MDMV, de forma natural, en los tres años de estudio en los campos experimentales en la localidad de Termens.....	60
Tabla 8. Medias del porcentaje de plantas infectadas por MDMV, de forma natural, en los tres años de estudio en los campos experimentales en la localidad de Mas Badia.....	61
Tabla 9. Resultados de la presencia de MDMV mediante ELISA en campos comerciales en 1991.....	67
Tabla 10. Medias de los ensayos de transmisión mecánica: respuesta de los distintos cultivares, estado fenológico planta, diluciones y tampón de extracción.....	68
Tabla 11. Resultados en porcentajes de la transmisión por pulgones de los aislados MDMV-L y MDMV-G.....	73
Tabla 12. Resultados de las pruebas realizadas con las plantas con amarilleos y reducción en la nascencia de las semillas de parentales inoculados con el virus frente a los no inoculados.....	76

Tabla 13.	Estudio comparativo de la reacción que inducen los aislados MDMV-L, MDMV-G, MDMV-Gs en el juego de cv. de sorgo y avena diferenciadores de los miembros del subgrupo del SCMV y otras gramíneas espontáneas.....	81
Tabla 14.	Resultados de la susceptibilidad de distintas especies de gramíneas al aislado MDMV-L.....	83
Tabla 15.	Transiciones detectadas entre los clones M13-MDMV-5, M13-MDMV-8 y M13-MDMV-r.....	93
Tabla 16.	Homología entre la región 3'no codificante y la secuencia de aminoácidos de la proteína de cubierta del aislado MDMV-G y la de otros miembros del subgrupo de SCMV.....	98
Tabla 17.	Resultados de la prueba ELISA, con el antisuero MDMV-L, de las muestras analizadas en el estudio de los descendos de producción.....	104
Tabla 18.	Medias del porcentaje de plantas infectadas, en los cvs. Moltó, P-3183, AD-640 inoculados y no inoculados con el virus, e incrementos relativos de infección en dos años de estudio y en dos localidades.....	105
Tabla 19.	Medias de producción, en los cvs. Moltó, P-3183, AD-640, y descendos relativos de producción inducidos por la inoculación de MDMV en dos localidades y en dos años de estudio.....	110
Tabla 20.	Coefficientes de correlación entre de producción y altura e infección.....	113
Tabla 21.	Medias de la altura de las plantas, en los cvs. Moltó, P-3183, AD-640, y reducciones de altura inducidos por la inoculación de MDMV en dos localidades y en dos años de estudio.....	115

## 1. INTRODUCCION

## 1. INTRODUCCION

La presencia del virus del mosaico enanizante del maíz (maize dwarf mosaic virus, MDMV) en las comarcas cerealícolas de Lleida (Noguera, Garrigas, Segriá y Urgell) se considera una de las causas principales de la disminución de la producción del maíz en esta comarca (SEA, 1983; Puertas, 1986).

A lo largo de este apartado se describirá en primer lugar las características del grupo potyvirus y la problemática de su clasificación. Después la situación actual de los miembros del subgrupo del mosaico de la caña de azúcar, (subgrupo del sugarcane mosaic virus, SCMV) y el gran avance que ha experimentado la reclasificación de los aislados americanos y australianos de los virus de este subgrupo, así como la poca información disponible de los aislados europeos. Finalmente el tema se centrará en el caso de MDMV.

### 1. 1. Potyvirus: situación taxonómica

El Subcomité de Virus Vegetales del ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) aprobó recientemente denominar al grupo Potyvirus familia *Potyviridae* (Barnett, 1992). Esta familia comprendería tres grupos o géneros definitivos y uno posible: el grupo Potyvirus (subgrupo 1) que incluye a todos los potyvirus transmitidos de forma no persistente por pulgones, con el virus Y de la patata (potato virus Y, PVY) como miembro tipo; el grupo Bymovirus compuesto por los transmitidos por hongos, con el virus del mosaico amarillo de la cebada (barley yellow mosaic virus, BYMV) como miembro tipo y el grupo Rymovirus compuesto por los transmitidos por ácaros, con el virus del mosaico del *Lolium* (ryegrass mosaic virus, RMV) como miembro tipo. El posible grupo, sería Ipomovirus que incluiría a los



transmitidos por moscas blancas.

El grupo de los potyvirus representa del 30-36% de todos los virus vegetales y es por su número el más importante de los 34 grupos de virus vegetales admitidos. Los miembros del mismo causan enfermedades en plantas agrícolas, pratenses y ornamentales (Ward y Shukla, 1991; Shukla y Ward, 1989a; Shukla y col., 1989b; Shukla y col., 1991).

### **1. 1. 1. Características biológicas del grupo**

#### **1. 1. 1. 1. Transmisión**

Como ya se ha indicado se transmiten de forma no persistente por pulgones. Experimentalmente son de fácil transmisión mecánica (Hollings y Brunt, 1981) y algunos miembros del grupo son transmitidos con gran eficiencia por el minador de hoja *Liriomyza sativae* Blanchard (Zitter y Tsai, 1977). Recientemente, se ha comprobado la transmisión de forma natural de la cepa B de MDMV por las esporas de *Puccinia sorghi* Schwein (von Wechmar y col., 1992).

Según Berger (1992), la especificidad potyvirus-vector es muy baja, existen numerosos ejemplos en la literatura de que unos determinados aislados difieren tanto en la eficiencia como en la transmisión por una determinada especie de pulgones. Este mismo autor indica que tales diferencias pueden deberse a las condiciones en que se realiza el bioensayo, a los diferentes biotipos del insecto, a la dificultad de mantener clones de pulgones estándar y a la conducta del insecto, más que a la incompatibilidad virus-vector.

En la transmisión no persistente, los pulgones adquieren el virus después de un período de adquisición de pocos segundos; la eficiencia de ésta decrece con el incremento

del tiempo de adquisición, el virus se transmite inmediatamente. En principio, los tiempos de retención en este tipo de transmisión son bajos (Pirone y Harris, 1977) y varían considerablemente con la temperatura y la conducta del vector (Raccah, 1987); sin embargo Berger y col., (1987) y Zeyen (1990) comprueban que pulgones virulíferos pueden retener el virus durante largos períodos y por tanto difundirlo a largas distancias. Los tiempos de adquisición, inoculación y retención varían en función de: la especie y biotipo del pulgón, del huésped, la temperatura y la cepa del virus (Pirone y Harris, 1977).

En la transmisión por vectores están implicados el llamado factor de transmisión ("helper component", HC) codificado por el gen HC-pro del RNA potyviral (Govier y col., 1974a; Sako y col., 1981; Thornbury y col., 1983, 1985; Pirone y col., 1983, 1984) y la proteína de cubierta (Allison y col., 1985; Pirone y col., 1983; Atreya y col., 1990; 1991; 1992). El mecanismo por el cual interactúan la proteína de cubierta con el factor de transmisión se desconoce; el extremo N-terminal, de la proteína de cubierta, localizado en la superficie de la partícula, es la región que se ha postulado interactúa con el factor de transmisión durante la adquisición del virus por el vector (Salomon y Raccah, 1990).

Algunos de los miembros que infectan a leguminosas son transmitidos a través de la semilla, así como el virus del mosaico de la lechuga (lettuce mosaic virus, LMV); también se ha citado esta forma de transmisión en el caso de MDMV, (Brunt, 1992).

### **1. 1. 1. 2. Citopatología**

Todos los miembros de la familia Potyviridae examinados inducen la formación de inclusiones cilíndricas (CI) en el

citoplasma de las células infectadas. Estas inclusiones en secciones transversales aparecen como rosetas ("pinwheels") y en secciones longitudinales como haces ("bundles") (Edwardson, 1974). Esta propiedad se considera como el criterio fenotípico más importante para asignar un virus a esta familia ( Shukla y Ward, 1991; Ward y Shukla, 1991).

Las inclusiones citadas están formadas por capas curvadas de una proteína, codificada por un gen del virus, con los extremos internos convergentes y los externos divergentes para formar un tubo central; unidos a este tubo central hay otras capas de proteína enrolladas en forma de círculos ("scrolls") o en forma de agregados laminares (Lesemann, 1988); algunos potyvirus inducen la formación de inclusiones que tienen la forma de agregados laminares cortos y curvados (Edwardson y col., 1984). Según los tipos de inclusiones cilíndricas que inducen los potyvirus se han incluido en cuatro subdivisiones: I: rosetas y círculos; II: rosetas y agregados laminares; III: rosetas, círculos y agregados laminares; IV: rosetas, círculos y agregados laminares cortos y curvados (Edwardson y col., 1984). El tipo de inclusiones es característico de cada cepa e independiente del huésped (Edwardson, 1992).

Algunos miembros del grupo inducen la formación en el citoplasma de las células infectadas, de otros tipos de inclusiones citoplasmáticas, que presentan formas irregulares, las denominadas inclusiones amorfas. Estudios bioquímicos e inmunocitológicos indican que la proteína del factor de transmisión se localiza en estas inclusiones (de Mejia y col., 1985a y b; Baumoch y Hari, 1990).

En células infectadas con varios miembros del grupo se ha observado la presencia de inclusiones nucleares. Estudios de inmunoprecipitación e inmunocitológicos han demostrado que estas inclusiones contienen dos proteínas, la proteína de las inclusiones nucleares grandes (NIB) y la de las

inclusiones nucleares pequeñas (NIa) (Dougherty y Hierbert, 1980a).

### **1. 1. 2. Morfología y composición de las partículas**

La morfología de la partículas es filamentosa, ligeramente flexuosa de 11-15 nm de diámetro y aproximadamente 750nm de longitud; la longitud y el grosor de las mismas está influenciada por la presencia de iones divalentes metálicos en el medio (Govier y Woods, 1971; Huttinga y Mosch, 1974). Las partículas tienen un coeficiente de sedimentación de 150-160S y un coeficiente de extinción comprendido entre 2,4-2,9 (mg/ml)/cm a 260nm (Hollings y Brunt, 1981).

Los viriones contienen un 5% de RNA y 95% de proteína (Hari, 1981; Hollings y Brunt, 1981). La proteína de cubierta está formada por, aproximadamente, 2000 copias de un solo polipéptido de 30-36 kDa (Shukla y Ward, 1989a; Shukla y col., 1991), presentan simetría helicoidal, con un paso de hélice de aproximadamente 3,4 nm. Esta proteína encapsida una única molécula de RNA de cadena sencilla y de sentido positivo, que en el extremo 5' lleva adherida una proteína, llamada VPg (Hari 1981; Siaw y col., 1985; Riechmann y col., 1989; Murphy y col., 1990) y en el extremo 3' una cola de poliadenina (Hari y col., 1979).

### **1. 1. 3. Organización y expresión del genoma**

El conocimiento, de la organización del genoma, ha experimentado un gran avance en los últimos años gracias a la determinación de la secuencia completa en 11 cepas de 7 potyvirus: tobacco etch virus (TEV) (Allison y col., 1986); tobacco vein mottling virus (TVMV) (Domier y col., 1986); plum pox virus (PPV) (Maiss y col., 1989; Teycheney y col., 1989; Laín y col., 1989); Potato virus Y (PVY)

(Turpen, 1989; Robaglia y col., 1989); pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) (Johansen y col., 1992); soybean mosaic virus (SbMV) (Jayaran y col., 1992); turnip mosaic virus (TuMV) (Nicolas y Labiberte, 1992).

El genoma potyviral posee una única fase de lectura abierta (ORF) que codifica para una larga poliproteína (Dougherty y Carrington, 1988); el tamaño de esta proteína precursora oscila entre 340-368 kDa. La región codificante está flanqueada por dos no-codificantes de longitud variable, en los extremos 3' y 5'. El inicio de la traducción tiene lugar en un codón AUG interno (Riechmann y col., 1991).

En la Figura 1 se representa un diagrama de la maduración de la poliproteína potyviral (Riechmann y col., 1992). Estudios *in vitro* e *in vivo* han puesto de manifiesto que la poliproteína precursora es procesada proteolíticamente en al menos 8 productos por acción de proteasas codificadas por el genoma viral (Dougherty y Carrington, 1988; García y col., 1989a, Carrington y col., 1989b; Dougherty y col., 1989b). El orden de estos productos es: **P1**: proteína primera; **HC**: factor de transmisión; **P3**: proteína tercera; la posible **6K<sub>1</sub>**, péptido de 6K; **CI**: proteína de las inclusiones cilíndricas; otro péptido de 6K: **6K<sub>2</sub>**; **N1a**: proteína de las inclusiones nucleares pequeñas, que incluye en su extremo N-terminal la **VPg**; **N1b**: proteína de las inclusiones nucleares grandes; **CP**: proteína de la cubierta. Tan sólo la proteína de la cubierta y la VPg se detectan en las partículas virales. CI, N1a, N1b y HC han sido aisladas de plantas infectadas y caracterizadas. Las proteínas P1, P3, y las supuestas 6K<sub>1</sub> y 6K<sub>2</sub> no se han detectado por el momento en plantas infectadas (Shukla y col., 1991).

En la región 5' no-codificante, de los potyvirus secuenciados, hasta el momento, se han observado bloques de nucleótidos altamente conservados, ello ha sugerido que

estas secuencias podrían jugar un papel importante en el ciclo de los potyvirus, en fases tales como encapsidación, traducción y replicación ( Riechmann y col., 1992).

La región 3' no-codificante es variable tanto en longitud como en secuencia y rica en residuos de adenina y uracilo; aunque, pese a la gran variabilidad observada en esta región se ha comprobado que, entre cepas de un mismo virus, está más conservada incluso que el gen de la proteína de cubierta (Wetzel y col., 1991; Cervera y col., 1993; Frenkel y col., 1989). Rodríguez-Cerezo y col. (1991) pusieron de manifiesto la implicación de esta región en la determinación de la severidad de síntomas.

Los estudios realizados en TEV ( Carrington y Dougherty, 1987a; 1987b; 1988; Carrington y Herndon, 1992; Carrington y col., 1988; 1989; 1990; Dougherty y Carrington, 1988; Dougherty y Parks, 1989; 1991; Dougherty y col., 1988, 1989a; 1989b; Oh y Carrington, 1989; Parks y Dougherty, 1991; Parks y col., 1992) y en PPV (García y col., 1989a, b y c; 1990; 1992; García y Laín, 1991) indican que, al menos, son necesarias tres proteasas diferentes para completar el procesamiento de la poliproteína precursora.

La proteína de las inclusiones nucleares pequeñas (NIa) está involucrada en el procesamiento del extremo C-terminal de dos terceras partes de la poliproteína precursora (Fig. 1); cataliza tanto maduración cis como trans (Carrington y Dougherty, 1987; Chang y col., 1988; Hellman y col., 1988; Garcia y col., 1989b; Ghabrial y col., 1990). El dominio de esta proteasa reside en la mitad carboxílico (Hellman y col., 1988), y es separado del N-terminal de la NIa por proteólisis post-traducciona; aunque este procesamiento no parece ser esencial para la actividad de la misma (Dougherty y Parks, 1991; Parks y col., 1992, García y Laín, 1991). Los lugares que reconoce esta proteasa son secuencias de heptapéptidos muy conservadas,

específicas de cada virus (García y col., 1989a, 1991; Himmler y col., 1990; Carrington y col., 1988, Dougherty y col., 1989a y b). El lugar de procesamiento P3+6K<sub>1</sub> fue puesto de manifiesto *in vitro* en el caso de PPV (García y col., 1992) y parcialmente *in vivo* en el caso de TVMV (Rodríguez-Cerezo y col., 1991); el heptapéptido consensuado de este lugar de procesamiento, también se encuentra presente en el caso de TuMV (Nicolas y col., 1992). Sin embargo, en el caso de TEV, este lugar no se ha detectado (Parks y col., 1992).

La segunda proteasa implicada en el procesamiento de la poliproteína es la HC-proteasa; responsable de su propio procesamiento a nivel del extremo C-terminal y reconoce el dipéptido G-G (Carrington y col., 1989a). El dominio de esta proteasa se localiza en la mitad del C-terminal del HC (Carrington y col., 1989a y b). Esta proteasa autocataliza la producción de P1-HC, que posteriormente es procesado dando lugar a HC y P1. Carrington y col. (1990) encontraron que para la producción de estos dos productos se necesita una tercera proteasa, la propia P1, que autocataliza su separación por su extremo C-terminal (Lain y col., 1990; Verchot y col., 1991). Verchot y col., (1991) determinan que es necesario otro factor, para la completa separación de la proteína P1, postulando que este factor podría ser la P3.

#### **1. 1. 4. Funciones de los productos génicos**

Las funciones de los productos génicos han sido objeto de recientes revisiones Dougherty y Carrington (1988a); Riechmann y col. (1992) y Shukla y col. (1991). En la Tabla 1 se resumen las funciones de los mismos.

El gen mejor conocido es el gen de la proteína de cubierta, del que se conoce la secuencia de unos 50 potyvirus (Ward

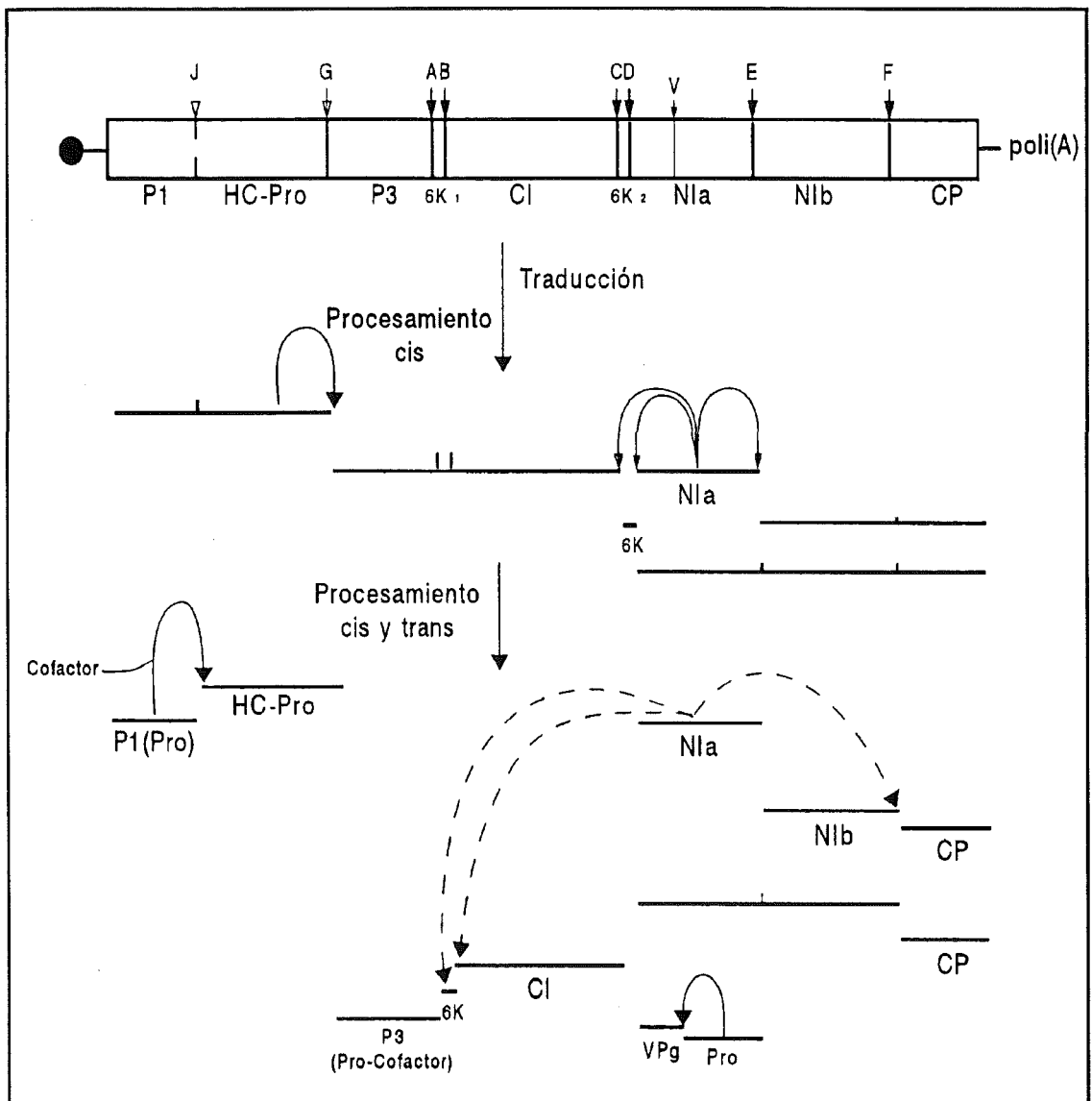


Figura 1. Diagrama del procesamiento de la poliproteína potyviral basado en el modelo Carrigton y col. (1989) y modificado por Riechmann y col. (1992). P1: proteína 1; HC: Helper component-proteasa; P3: Proteína 3; 6K1: Péptido; CI: Proteína de las inclusiones cilíndricas; 6K2: Péptido; NIa: Proteína de las inclusiones nucleares pequeña; N1b: Proteína de las inclusiones nucleares grande; CP: Proteína de cubierta.

∇: Lugar de procesamiento P1; ↓: Lugar de procesamiento de la HC-pro.;  
 ↓: Lugar de procesamiento de la NIa.



y Shukla, 1991). La región más variable de este gen se localiza en el extremo N-terminal, extremo que junto con el C-terminal se localiza en la superficie de la partícula (Allison y col., 1985b; Shukla y col., 1988a). La eliminación de los extremos N y C-terminal no afecta ni a la forma de la partícula, ni a la transmisión mecánica del virus ( Shukla y col., 1988a; Jagadish y col., 1991). La región central, de este gen, es la más conservada y presenta alta homología entre todos los miembros del grupo.

Las únicas funciones demostradas de este gen son la transmisión por vectores y la encapsidación del RNA. La primera de ellas fue puesta de manifiesto por mutagénesis dirigida (Atreya C. D. y col., 1990; Atreya P. L. y col., 1991; Gal-On y col., 1992); la región implicada es la región N-terminal de esta proteína, los residuos implicados son (I/V)DAG y adyacentes (Atreya P. L. y col., 1991). La implicación del triplete de aminoácidos DAG en la transmisión por pulgones también se basa en el hecho de que todos los aislados secuenciados, transmisibles por pulgones, presentan este triplete y los no transmisibles difieren en el último aa del triplete. Sin embargo los aislados, no transmisibles por pulgones PVY-18 (Shukla y col., 1988d) y ZYMV-C (Grumet y Fang, 1990) presentan también este triplete, probablemente la no transmisibilidad de estos aislados radique en el factor de transmisión.

Poco se sabe acerca del mecanismo de encapsidación del RNA; parece ser que en éste sólo interviene el núcleo central de la proteína. Así, los residuos R y D, altamente conservados, localizados aproximadamente en los residuos 194 y 228, y adyacentes a éstos son los que están implicados en el ensamblaje de la cápside (Jagadish, y col., 1991, 1993).

Se ha postulado que, en el extremo N-terminal de la proteína de cubierta podría localizarse también el

determinante del rango de huéspedes (Shukla y col., 1991). Dos aislados de Soybean mosaic virus (Jayaram y col., 1991), que presentan diferencias a nivel de huéspedes, sólo difieren en esta región en un aminoácido. En este sentido, cabe destacar que en el caso de tobamovirus un sólo punto de mutación en el gen de la proteína de cubierta cambia la expresión de los síntomas (Knorr y Dawson, 1988).

**Tabla 1. Funciones de los productos génicos del grupo Potyvirus**

<b>Producto génico</b>	<b>Función</b>
P1	Movimiento célula-célula?
HC-Pro	Maduración poliproteína (proteasa) N-Terminal:transmisión vectores C-terminal:proteasa
P3	Maduración poliproteína?(cofactor)
6K1	Replicación?
CI	Replicación?(RNA helicasa)
6K2	Replicación?
NIa	N-Terminal:VPg Replicación? C-terminal: proteasa
NIb	Replicación?
CP	RNA polimerasa RNA dependiente Encapsidación RNA Transmisión por vectores

P1:proteína uno ; HC-pro: factor de transmisión-proteasa; P3 :proteína tres; 6k1: polipéptido 6K; CI:proteína de las inclusiones cilíndricas; 6K2: polipéptido 6K; NIa:proteína de las inclusiones nucleares pequeñas; NIb:proteína de las inclusiones nucleares grandes; CP: proteína de cubierta.

En cuanto a las funciones de los demás productos génicos el conocimiento es menor, aparte de las funciones ya mencionadas (Tabla 1).

El producto génico HC-pro, tiene una doble función, como ya se ha mencionado. El motivo implicado en la transmisión por vectores parece ser que se localiza en el dominio central de la proteína (Atreya C. D. y col., 1992).

Los productos génicos 6K1, CI, 6k2, VPg-NIa, NIb, se supone que intervienen en la replicación del virus (Riechmann y

col., 1992). Así mismo, se ha postulado que las proteínas P1 (Domier y col., 1987) y la de las inclusiones cilíndricas (Langenberg, 1986) podrían estar involucradas en el movimiento célula a célula. Las recientes obtenciones de clones infecciosos de distintos potyvirus (Domier y col., 1989; Riechmann y col., 1990; Gal-On y col., 1991; Maiss y col., 1992; Stram y col., 1993) ayudará a la determinación de las funciones de estos genes.

## **1. 2. Problemática en la identificación de potyvirus**

La mayor necesidad, en la taxonomía de cualquier grupo de virus, radica en establecer criterios que permitan determinar si un virus pertenece o no al grupo, y los que permitan discriminar entre virus y cepas dentro del grupo. La secuencia del genoma, es sin lugar a dudas, el criterio más sólido para determinar si un virus pertenece a un grupo en concreto. No obstante, el fenotipo (morfología de la partícula, citopatología, transmisión, huéspedes) es un criterio indispensable en la primera identificación de cualquier patógeno.

En el caso de los potyvirus se ha encontrado que la homología, determinada a partir de la secuencia completa de nucleótidos de 5 cepas de cuatro potyvirus alcanza niveles del 30-60% entre virus y superior al 95% entre cepas (Shukla y col., 1991). A nivel de los distintos genes P1 es el más variable, seguido de P3; por el contrario, el producto génico más conservado es la NIb, seguido de las CI, NIa y HC. El gen de la proteína de cubierta, como ya se ha mencionado, posee un núcleo altamente conservado y una zona altamente variable en el extremo N-terminal; esta región presenta un alta homología entre cepas y es variable entre virus, con algunas excepciones (Frenkel y col., 1991, Xiao y col., 1993).

Hasta que se determinen las secuencias completas, de un mayor número de potyvirus, y se establezca su valor en la sistemática de este grupo, el gen de la proteína de cubierta y la región 3' no codificante pueden ser buenos indicadores taxonómicos (Atreya, 1992). La hibridación molecular con sondas del genoma completo no parece ser una buena herramienta para discriminar entre distintos potyvirus (Ward y Shukla, 1991). Otros criterios que se han sugerido para diferenciar entre potyvirus, son: los genes que codifican para la proteína P1 y P3 (Jayaram y col., 1992), la región 5' no codificante y las secuencias de los genes que codifican para el resto de las proteínas no estructurales (Atreya 1992).

La utilización de anticuerpos policlonales, obtenidos contra la proteína de cubierta se enfrentan con el problema de la reacción cruzada entre distintos potyvirus y a la no reacción entre cepas (Shukla y col., 1992a). El conocimiento de la secuencia de la proteína de cubierta de varios potyvirus, ha permitido explicar la inespecificidad de estas reacciones. La localización en la superficie de la partícula de los extremos N y C-terminal, determinante de los epitopos específicos de cada virus y la pérdida de estas regiones por degradación, durante la purificación y el almacenamiento del virus, podrían explicar la pérdida de especificidad de los antiseros (Shukla y col., 1988b). Antiseros producidos contra el núcleo central de la proteína de cubierta, reaccionan, si bien no con todos, con un elevado número de potyvirus (Shukla y col., 1991).

El uso de anticuerpos obtenidos contra la región N-terminal de la proteína para discriminar entre virus y cepas ha tenido en algunos casos buenos resultados (Shukla y col., 1989b), sin embargo, en otros casos, estos antiseros parecen ocasionar problemas similares a los obtenidos en contra de la proteína de cubierta completa (Boss, 1992).

El problema puede radicar en el hecho de que, en el extremo N-terminal, se observan también bloques conservados entre potyvirus (Uyeda y col., 1991).

La utilización de anticuerpos monoclonales para discriminar entre virus y cepas requiere la utilización de una combinación entre anticuerpos obtenidos contra epítomos específicos de la cepa y epítomos comunes (Derks, 1992).

El uso de anticuerpos, obtenidos contra las proteínas no estructurales, parecen tener los mismos problemas que el caso de la estructural en la discriminación entre cepas, dada la alta homología que presentan entre ellas (Purcifull y col., 1992).

La amplificación, mediante PCR, de las regiones más variables del genoma puede constituir una herramienta muy útil en la identificación de potyvirus. Así como la hibridación molecular con sondas de regiones concretas del genoma (Shukla y col., 1991; Derks, 1992).

El uso de las propiedades biológicas ha sido ampliamente discutido por constituir criterios que, en principio, no permiten distinguir entre virus. Sin embargo, su utilización, como ya se ha mencionado, puede ayudar a distinguir entre cepas y la variabilidad dentro de estas (Berger, 1992; Dijkstra, 1992).

### **1. 3. Subgrupo del virus del mosaico de la caña de azúcar**

#### **1. 3. 1. Taxonomía del subgrupo**

Los miembros del grupo potyvirus que infectan a maíz, sorgo, caña de azúcar han sido designados como cepas del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) (Abbot y Tippet, 1966) o de MDMV (Louie y Knoke, 1975) dependiendo

del huésped, del que originariamente se aislaron. Por otra parte, en base a relaciones serológicas, algunas cepas de MDMV fueron asignadas al grupo del SCMV (Shepherd, 1965; Snazelle y col., 1971; Pirone, 1972; Jarjees y Uyemoto, 1984).

Sin embargo, recientes estudios realizados con aislados americanos y australianos de SCMV y de MDMV, analizados mediante anticuerpos específicos contra el extremo N-terminal de la proteína de cubierta de estos virus, digestiones con tripsina de la proteína de cubierta (Shukla y col., 1989c; McKern y col., 1991) y reacciones en distintos cultivares de sorgo y avena (Tosic y col., 1990) han sugerido que estos virus originarios de U.S.A. y Australia son cuatro potyvirus distintos: virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV), virus del mosaico de *Sorghum halepense* (L.) Pers (johnsongrass mosaic virus, JGMV), virus del mosaico enanizante del maíz (maize dwarf mosaic virus) y el virus del mosaico del sorgo (sorghum mosaic virus, SrMV). Se incluyen como cepas de SCMV: MDMV-B, SCMV-A, B, D, E, SC, BC, Sabi; dentro de MDMV, las cepas MDMV-A, D, E, F; en JGMV se incluye SCMV-JG, MDMV-O, MDMV-KSI; y SrMV incluiría las cepas SCMV-I, H y M.

Posteriores estudios basados en, traducción de RNA en sistemas libres de células, morfología y serología de las inclusiones cilíndricas (Lesemann, 1992), secuencia de aa de la proteína de cubierta, hibridación molecular con sondas correspondientes a la región 3' no codificante y comparación de la secuencia de esta región, entre algunas de las cepas de estos cuatro virus, han confirmado la citada taxonomía del subgrupo del mosaico de la caña de azúcar (Shukla y col., 1992b).

Las características biológicas que, distinguen estos cuatro virus se encuentran a nivel de huéspedes y de las inclusiones cilíndricas. A nivel de huéspedes, SCMV y SrMV

pueden separarse de JGMV y MDMV, porque los primeros no infectan a *S. halepense*. JGMV y MDMV se pueden separar entre si porque el primero infecta a *Avena sativa* L. y el segundo no. La diferenciación entre SCMV y SrMV mediante el juego de cvs. utilizados por Tosic y col. (1990) no parece tan clara.

En cuanto a los tipos de inclusiones cilíndricas (Lesemann y col., 1992). JGMV, MDMV, y SrMV inducen inclusiones cilíndricas en roseta y círculos; además SrMV induce también inclusiones amorfas; y SCMV induce inclusiones en roseta, círculos y agregados laminares.

A nivel del conocimiento del genoma de estos virus, se han publicado las secuencias del gen de la proteína de cubierta de JGMV-JG (Gough y col., 1987), SCMV-MDB (antes MDMV-B) y SCMV-SC (Frenkel y col., 1991). También se conocen las secuencias, aunque no han sido publicadas, del mismo gen, de MDMV-A, JGMV-MDKSI (antes MDMV-KSI), JGMV-MDO (antes MDMV-O), SrMV-SCH (antes SCMV-H). La comparación de la secuencia del núcleo de la proteína han revelado que SCMV, MDMV están más relacionados entre ellos que con JGMV (Shukla y col., 1992b)

### **1. 3. 2. Identificación en Europa y particularmente en España**

Se dispone de poca información acerca de los aislados procedentes de Europa de estos mismos virus. En Francia Signoret (1974) identificó un aislado de MDMV-B y, Kerlan y col., (1974) un aislado de MDMV, cuyos huéspedes son bastante similares a los de la cepa A. Panayotou (1980) identificó un aislado de MDMV en Grecia. En Italia, Yugoslavia y Francia se ha citado la presencia del virus del estriado rojo del sorgo (sorghum red stripe virus, SRSV), que infecta maíz, sorgo y *S. halepense* (Lovisoló,

1992).

En España se ha identificado la presencia de MDMV y SCMV (Rubies, 1982; Peña-Iglesias y Fresno, 1986). Sanchez y col. (1993) detectan la presencia de tres potyvirus diferentes, en las regiones de Castilla-La Mancha y Extremadura, que tentativamente clasifican como dos cepas de MDMV y una de SCMV o SrMV, mediante inoculación mecánica a *S. halepense*, Avena y un cv. de maíz.

Peña Iglesias y Fresno (1986) identifican la presencia de las cepas A y B de MDMV en varias regiones españolas, incluida Cataluña, mediante inoculación mecánica a cvs. de sorgo y tipo de inclusiones cilíndricas, y la cepa D de SCMV solamente en Andalucía. Rubies (1982) confirma la presencia de MDMV-A en Calatunya mediante transmisión mecánica a *S. halepense*.

Aun contando con estas citas, se desconoce la importancia de este subgrupo en Cataluña. Marín y col. (1992) estiman, por sintomatología, que la incidencia de MDMV en campos comerciales, es del orden del 8,3±5,7 %.

Los estudios de identificación de los aislados procedentes de Europa se han basado en ensayos biológicos parciales y no comparativos entre ellos. Cabe destacar, no obstante, los trabajos llevados a cabo por Tosic y col. (1990) en los que determina la igual reacción, en distintos cultivares de sorgo, de los aislados procedentes de Yugoslavia y los aislados americanos de MDMV y los citológicos de Lesemann y col., (1992), con algunos aislados de MDMV europeos y americanos.



## 1. 4. Virus del mosaico enanizante del maíz

### 1. 4. 1. Descripción

El virus del mosaico enanizante del maíz fue descrito por primera vez por Janson y Ellett (1963) y posteriormente por Williams y Alexander (1965). Miembro definitivo del subgrupo de SCMV (Ford y col., 1989), ocasiona serios problemas en maíz y sorgo. Probablemente se halla presente en todas las áreas donde se cultivan estas plantas; es difícil determinar, por las referencias en la literatura, si la causa del mosaico del maíz o sorgo en un determinado país, es un aislado de MDMV o de SCMV (Ford y col., 1989). Los huéspedes naturales de este virus están restringidos a maíz, sorgo y *S. halepense* (cañota) a los que induce mosaico sistémico, ocasionalmente lesiones necróticas y enanismo. Experimentalmente, se ha comprobado que muchas especies de gramíneas son susceptibles a este virus (Tosic y col., 1972; Rosenkranz 1977, 1978, 1980, 1983, 1987).

Actualmente se reconocen cinco cepas: A (cepa tipo), C, D, E, F (Louie y Knoke, 1975). Se distinguen, entre ellas, por los síntomas característicos que inducen en la línea pura de maíz N 20 y sus frecuencias de transmisión por *Acyrtosiphon pisum* (Harris) y *Myzus persicae* (Sulzer). Son indistinguibles por la longitud de la partícula, reacciones serológicas con el antisuero anti MDMV-A y estabilidad en extracto crudo. Los ensayos de inmunoblot con antisueros policlonales contra el extremo N-terminal de la proteína de cubierta, han mostrado las relaciones serológicas entre las cepas A, D, E y F de USA (Shukla y col., 1988a; 1989c)

Las especies de pulgones que transmiten este virus han sido ordenadas de mayor a menor eficiencia por Ford y col., (1989): *Schizaphis graminum* (Rondani), *Aphis maidiradicis* Forbes, *A. craccivora* Koch, *A. fabae* Scopoli, *A. pisum*,

*M. persicae*, *A. gossypii* Glover, *Theorionaphis maculata* (Buckton), *Sitobion avenae* (Fabricius), *Rhopalosiphum padi* (L.), *R. poae*, *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *R. maidis* (Fitch), *Brevicoryne brassicae* (L.), *R. fitchii* (Sanderson) (Knoke y Louie, 1981).

Una característica que no comparte con los otros miembros del subgrupo de SCMV, es su transmisión a través de semilla. Las tasas de transmisión citadas son bajas del 0,007%-0,4% (Sherpherd y Holdeman, 1965; Williams y col., 1968; ; Hill y col., 1974; Straub, 1982; Mikel y col., 1984), aunque algunos autores no detectan este tipo de transmisión (Panayotou, 1981 ). La no transmisión de MDMV a través del polen fue determinada por Mikel y col. (1982), aunque indican que ésta puede tener lugar. Mikel y col. (1983) detectan MDMV en el pericarpo, raramente en el endosperma y embrión a los 21 días después de la polinización; sin embargo, no detectan el virus en el embrión en el grano maduro, aunque ocasionalmente, sí lo detectan en el endosperma y pericarpo en este estado. La pérdida del virus durante la maduración del grano podría explicar las bajas tasas de transmisión, pero si la infección del embrión es un prerrequisito para la transmisión por semilla, la no infección del mismo podría explicar la nula transmisión detectada para este virus según Mikel y col. (1983). Sin embargo, estos autores indican que el número de muestras ensayadas es insuficiente para determinar la presencia o no de MDMV en el embrión, dadas las bajas proporciones de transmisión.

La morfología de la partícula fue estudiada por Williams y Alexander (1965). La composición de la partícula viral de la cepa A determinada por Berger y col. (1989b) y es típica de los miembros del grupo (una molécula de ssRNA de  $3.32 \times 10^6$  daltons que representa el 5% del peso total). El peso molecular de la proteína de cubierta oscila entre 30.700 y 35.000 daltons (von Baumgarten y Ford, 1981;

Jensen y col., 1986).

#### 1. 4. 2. Epidemiología de MDMV

Los tres factores mayores incluidos en el denominado "triángulo epidemiológico" son el patógeno, los huéspedes y el ambiente. El conocimiento de las cepas de virus presentes en una área determinadas, los posibles reservorios, y los vectores, son de gran utilidad para facilitar el estudio epidemiológico.

La epidemiología de MDMV ha sido ampliamente estudiada en Estados Unidos. La presencia de MDMV en este país, en los cultivos de Sorgo y maíz ha estado generalmente asociada a la presencia de *S. halepense*; sin embargo MDMV también se ha identificado en el norte del país, donde esta especie no está presente (Hill y col., 1977). La presencia de MDMV en estas áreas se ha atribuido a la dispersión de pulgones virulíferos, desde el sur, por el viento (Stromberg y col., 1978; Timian y col., 1978; Zeyen y col., 1987). Sin embargo, el tiempo requerido por los pulgones para introducir el virus en los cultivos del norte es mucho mayor que el comprobado, de forma experimental, en que éstos podían retener el virus (Thongmeearkom y col., 1976). Otras hipótesis que se han postulado para explicar la presencia de MDMV en el norte de Estados Unidos han sido: la transmisión por semilla (Gordon y col., 1978), que aunque muy bajas fuesen suficientes; que fueran otros huéspedes invernales la fuente primaria de inóculo (Ford y Tomic, 1972); o que las tasas de transmisión por semilla de malas hierbas anuales fuesen suficientes como para servir de fuente de inóculo para MDMV (Timian y col., 1978).

A favor de la hipótesis de transporte de pulgones virulíferos a largas distancias están los experimentos de

Berger y col. (1987) que demuestran, con distintos tratamientos de inmovilización que *S. graminum* puede retener MDMV más de 21 h, incluso hasta 70h si el número de pulgones ensayados es elevado. *Dactynotus ambrosiae*, *M. euphorbiae*, *R. maidis* y *M. Persicae* pueden retenerlo durante períodos superiores a 18h. Zeyen y col. (1987) aportan nuevos datos acerca de la hipótesis del transporte a largas distancias y concluyen que las condiciones climáticas juegan un papel importante en el mismo.

Knoke y col. (1974) encuentran una correlación positiva entre el incremento de las poblaciones de vectores y la incidencia de MDMV. La incidencia de MDMV decrece con la distancia de la fuente de inóculo, pero no se observa ningún efecto con la dirección de la misma (Knoke y col., 1983; Madden y col., 1986).

En la comarca de la Noguera (Lleida), *S. avenae* y *R. padi* son, probablemente, las especies más importantes en la epidemiología de MDMV, dada la elevada densidad de sus poblaciones en maíz (Albajes y col., 1985). Estos mismos autores destacan que de las cuatro especies predominantes encontradas en maíz (*S. avenae*, *R. padi*, *Metapolophium dirhodum* (Walker), *S. graminum*), excepto *M. dirhodum*, todas aparecen en la primera semana de muestreo en la cañota; y señalan que *S. graminum* se observó antes en la mala hierba que en el cultivo del maíz. Es probable que la cañota por su fenología más avanzada respecto a la del maíz, en los márgenes de las parcelas, constituya uno de los primeros habitats de los pulgones cuando éstos abandonan los cultivos de invierno, y ayude a optimizar la transmisión desde la fuente de inóculo primaria al cultivo.

### 1. 4. 3. Control

El control o reducción en la incidencia de MDMV puede llevarse a cabo por: uso de cultivares resistentes, eliminación de los huéspedes reservorios, adecuar la época de siembra para evitar la exposición temprana del cultivo a los vectores y control de los mismos.

La medida de control más eficaz, es el uso de cultivares resistentes (Raccah, 1987). Se ha encontrado resistencia en maíz a MDMV, debida a genes dominantes (Findley y col., 1977; Scott y Rosenkranz, 1982; Roane y col., 1983; Mikel y col., 1984). La línea Pa405 es una de las mejores fuentes de resistencia conocidas para este virus; raramente muestra síntomas después de la inoculación mecánica del virus o con la transmisión con pulgones ( Lei y Agrios, 1986; Louie, 1986). Los experimentos con esta línea han permitido establecer que en la resistencia a este virus en maíz están implicados de uno a 5 genes (Findley y col., 1977; Rosenkranz y Scott, 1984; Scott y Rosenkranz, 1982; Mikel y col., 1984b).

Recientemente, se han obtenido plantas transgénicas de maíz que expresan el gen de la proteína de cubierta de SCMV-MDB y, en los primeros ensayos, han mostrado resistencia no sólo a esta cepa sino también a MDMV-A y a maize chlorotic mottle virus (MCMV) (Murry, y col., 1993)

Desde 1982, a raíz del brusco descenso que venía experimentando la producción de maíz en la comarca de la Noguera (Puertas, 1986), fecha que ya se ha indicado, se detectó la presencia de MDMV en la misma, conjuntamente con el virus del enanismo rugoso del maíz (maize rough dwarf virus, MRMV), reovirus del género Fijivirus (Peña y Fresno, 1986); el Servicio de Extensión Agraria (SEA) de la provincia de Lleida está llevando a cabo ensayos para estimar la tolerancia o susceptibilidad de distintos

cultivares a estos dos virus, estimando distintos grados de susceptibilidad y tolerancia entre los cultivares ensayados.

La utilización de insecticidas para controlar las poblaciones de vectores no ha dado buenos resultados en el control de esta virosis (Kuhn y col., 1975; Albajes y col., 1985). Seifers y col. (1989) determinaron que el tratamiento con carbofuran en sorgo incrementa la infección de MDMV. El uso de aceites minerales (Ferro y col., 1980) y el de aceite mineral más piretroides han resultado ser los tratamientos más efectivos (Raccah, 1987); sin embargo, Bell (1989) detecta un efecto positivo sobre la incidencia de otro potyvirus con estos mismos tratamientos.

La forma, el tiempo y la intensidad de la difusión de la enfermedad dependen de la cantidad de la fuente de inóculo y de la distancia de éste al cultivo (Thresh, 1981) y del estado fenológico del mismo (Genter y col., 1973; Jarjees y Uyemoto, 1983; Tu y Ford, 1971). De estos puntos se desprende que las medidas culturales a utilizar son: adecuar la época de siembra, para evitar la coincidencia de los primeros estados fenológicos del cultivo con las densidades máximas de población vectores, eliminar las fuentes de inóculo primarias (cañota y otros posibles reservorios) y sembrar semilla sana, en la medida en que ésta constituya una fuente de inóculo primaria.

Pons y Albajes (1986) indican que las siembras tempranas en las comarcas de Lleida podrían disminuir la incidencia de MDMV al coincidir los máximos poblacionales de vectores, que se dan en Junio, con los estados fenológicos del cultivo más avanzados. Sin embargo, estos mismos autores apuntan que no se disponen de datos sobre el comportamiento de los pulgones ante siembras especialmente tempranas y que, si bien es cierto que en Mayo los pulgones son menos numerosos, también el crecimiento del maíz es mucho más

lento. Por tanto las plantas jóvenes se hallarían expuestas durante más tiempo a la acción de alados virulíferos, teniendo en cuenta que la cañota ya ha brotado en Mayo en las condiciones citadas.

Puertas (1986) en su estudio sobre el efecto de la época de siembra en la incidencia de MDMV y MRMV, no detecta diferencias significativas entre siembras realizadas entre el 25 de Abril y el 13 de Mayo. Sin embargo sí encuentra diferencias entre las siembras realizadas el 12 de Mayo y el 25 del mismo mes, en otra localidad próxima, estima que el porcentaje de plantas raquílicas y enanas fueron superiores en la época de siembra más tardía y que las producciones fueron mayores en la primera época de siembra. Sin embargo, en el caso del sorgo en Italia, las siembras más tardías tienen un efecto negativo sobre la incidencia de MDMV (Tosic y col., 1977).

#### **1. 4. 4. Efecto sobre la producción**

Uno de los métodos más utilizados para estimar los descensos de producción por un determinado virus es mediante la inoculación de éste en campo. Método igualmente utilizado en los estudios de resistencia y tolerancia varietal.

En Estados Unidos el efecto de MDMV sobre la producción de maíz dulce y grano, así como en sorgo ha sido y es objeto de continuo estudio. En general los descensos que produce sobre la producción de estos cultivos están influenciados por el cultivar, la infección y el estado en que se lleva a cabo la inoculación del virus, oscilando entre 7-46% (Genter y col., 1967; Louie y Darrah, 1980; Cole y col., 1969; Rosenkranz y Scott, 1978)).

Scott y col. (1988) estiman que los descensos de producción

inducidos por MDMV, pueden ser de un 2,4 % por cada 10 % de infección.

En Europa los estudios del efecto sobre la producción son escasos, Signoret (1974) estima que éstos pueden ser de alrededor del 10% e incluso del 50%. En España y más concretamente en Cataluña, la situación es similar. Puertas (1986) estima que las pérdidas ocasionadas por MDMV y MRMV pueden llegar a ser de hasta un 50% en campos comerciales.



## 1. 5. Objetivos

El presente trabajo se encuadra en el comienzo de una línea de investigación, que lleva a cabo el Area de Protección de Conreus del Centro UdL-IRTA, y abarca los aspectos básicos del conocimiento del virus del mosaico enanizante del maíz, el conocimiento de los cuales puede constituir la base de estudios posteriores.

Los objetivos que se plantean en esta Tesis se concretan en los siguientes puntos:

1. Confirmación de la presencia de MDMV en las comarcas catalanas de mayor producción de maíz y de su incidencia en campos experimentales.

2. Análisis de las características de los aislados de MDMV presentes en las áreas arriba mencionadas: óptimas condiciones de transmisión mecánica, transmisión por semilla y pulgones, huéspedes experimentales, citopatología y estudio del gen de la proteína de cubierta.

3. Estimación del efecto sobre la producción y la altura de la planta, inducidos por la inoculación mecánica de MDMV.

## 2. MATERIAL Y METODOS

## **2. MATERIAL Y METODOS**

### **2. 1. Material vegetal y condiciones de cultivo**

#### **2. 1. 1. Material vegetal**

Las especies utilizadas y su procedencia se relacionan en la Tabla 2. Las especies se propagaron a través de semilla a excepción de *Arundo donax* L. y *Phragmites communis* L..

#### **2. 1. 2. Condiciones de cultivo**

##### **Invernadero**

El cultivo de las plantas se llevó a cabo en el invernadero del Centro UdL-IRTA, a excepción de las propagaciones del virus y algunos ensayos que se realizaron en los invernaderos del JII. La temperatura media de los mismos fue de 18-25°C en otoño-invierno, en verano se encalaban para bajar la temperatura. Las plantas dispusieron de luz natural o artificial 16 h diarias. Quincenalmente se realizaba un tratamiento con pirimicarb ( ZZ-Aphox, ICI) en el del Centro UdL-IRTA y con nicotina en los invernaderos del JII.

Las semillas se sembraron en macetas de cerámica o plástico de 5-20 cm de diámetro, a razón de 1 a 5 semillas por maceta según su tamaño. El substrato utilizado un preparado comercial de turba (pH 5,5-6,5; 1% N, 0,2% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,2% de K<sub>2</sub>O (Neuhaus Humin-Substrat<sup>R</sup>, Klasmann & Deilmann).

##### **Campo**

Los ensayos de campo se llevaron a cabo durante los años 1989, 1990 y 1991. Los campos experimentales se localizaron en los términos municipales de Termens y Balaguer comarca

Tabla 2. Relación de especies ensayadas como posibles huéspedes de MDMV y procedencia de las mismas.

ESPECIES	PROCEDENCIA
<i>Aegilops ovata</i> L. <sup>a</sup>	BGM <sup>1</sup>
<i>A.triuncialis</i> L. <sup>a</sup>	BGM
<i>A.ventricosa</i> Tauscha	BGM
<i>Arundo donax</i> L.	-
<i>Avena barbata</i> Lk.	BGM (NC-22333)
<i>A.fatua</i> L.	DHJB <sup>2</sup>
<i>A.longiglumis</i> Durieu	BGM (NC-22368)
<i>A.sativa</i> L. cv.Clintland	NSGC <sup>3</sup>
<i>A.sativa</i> L. cv.Saladin	JII <sup>4</sup>
<i>A.sterilis</i> L.	BGM (NC-22354)
<i>Bromus alopecurus</i> Poiret	DHJB
<i>B.diandrus</i> Roth	DHJB
<i>B.fasciculatus</i> C.Presl.	DHJB
<i>B.rubens</i> L.	DHJB
<i>B.squarrosus</i> L.	DHJB
<i>B.sterilis</i> L.	DHJB
<i>B.tectorum</i> L.	DHJB
<i>Dactylis glomerata</i> L.	SEA (Galicia)
<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.	DHJB
<i>Echinaria capitata</i> (L.) Desf.	DHJB
<i>Echinochloa crus-galli</i> (L.) Beauv.	DHJB, JII
<i>Elymus caninus</i> (L.) L.	BGM (155G)
<i>E.curvifolius</i> (Lange) Melderis	BGM
<i>E.elongatus</i> (Host) Runemark	BGM (422G)
<i>Festuca arundinacea</i> Schreb. cv.Tima	SEA (Extremadura)
<i>Hordeum murinum ssp.murimum</i> L.	BGM (337G)
<i>H.murinum ssp.leporium</i> L.	BGM (NC-22328)
<i>H.vulgare</i> L. cv.dobla	-
<i>Leptochloa dubia</i> (N.B.K.) Ness	DHJB
<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	
cv.Vitesse, cv.Tewera	SEA (Galicia)
<i>L.perenne</i> L.cv.Brigantia	SEA (Galicia)
<i>L.rigidum</i> Gaud.	DHJB
<i>Panicum capillare</i> L.	DHJB
<i>Paspalum dilatatum</i> Poiret	JII
<i>Phalaris canariensis</i> L.	DHJB
<i>Phelum phleoides</i> (L.) Karsten	DHJB
<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Steudel	-
<i>Setaria verticillata</i> (L.) Beauv.	JII
<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	
cvs. Atlas, Rio, BT398, TX2786	CIMIT
cv.Nectar, Dorado	MARP <sup>5</sup>
<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers	DHJB
<i>Triticum aestivum</i> (L.) cv.Anza	-
<i>Zea mays</i> L.	
cvs. M-770, Futuro, AD-640, Molto <sup>b</sup>	Semillas Fitó
cvs. P-3183, Bianca, Ivana <sup>b</sup>	Pioneer
cv. AE-703 <sup>b</sup>	Agrar S.A.
cv. XL-72 <sup>b</sup>	Dekald S.A.
cvs. G-4507, Dracma <sup>b</sup>	Funk's
cv. Alios <sup>b</sup>	Semillas Batlle
cvs. Mo-17, B-73 <sup>c</sup>	BEAD <sup>6</sup>

a: dos poblaciones distintas; b: híbrido simple; c: línea pura; 1: Banco de Germoplasma Madrid; 2: Dpto. de Hortofruticultura, Jardinería y Botánica (ETSEAL); 3: National Small Grain Collection ( USA); 4: John Innes Institute; 5: Dpto. d' Agricultura, Ramadería i Pesca (Secció de llavors i planters) Generalitat de Catalunya; 6: Estación Experimental Aula Dei.

de la Noguera (Lleida), donde tradicionalmente se habían localizado los mayores problemas, supuestamente, ocasionados por virus y en la estación experimental de Mas Badia comarca del Baix Empurdà (Girona).

Las siembras se efectuaron entre el 3 y el 12 de Mayo, a excepción de un ensayo en Mas Badia-1991 que se efectuó el 14 de Abril.

Cada parcela elemental o subparcela constaba de dos líneas separadas 70 cm y una distancia entre plantas de 18 cm, con una superficie de 12 m<sup>2</sup>, a excepción del ensayo de producción de semilla híbrida que se indicara en el apdo. 2. 5.

En todos los ensayos se realizaron las labores de preparado del terreno y abonado de fondo típicas de las zonas. El tratamiento herbicida se realizó en preemergencia (Primextra 5l/ha), y el tratamiento insecticida (Dursban 5G) en el suelo antes de la siembra y aproximadamente a finales de Junio.

## **2. 2. Origen de los aislados del virus**

Los distintos estudios se llevaron a cabo principalmente con dos aislados, uno de ellos aislado de maíz infectado naturalmente de los campos experimentales del SEA en la comarca de la Noguera (Lleida), aislado MDMV-L, y otro aislado de Girona (Baix Empurdà), MDMV-G, aislado también, de maíz de campos comerciales. Si bien en alguno de los estudios se ha utilizado otro aislado, MDMV-Gs, aislado de sorgo en la comarca del Baix Empurdà.

Los aislados fueron mantenidos en el laboratorio por sucesivas transmisiones mecánicas. Las plantas antes y

después de ser inoculadas con cada uno de los aislados se mantenían en jaulas separadas de estructura metálica (1 x 1 x 1 m) recubiertas de tela de visillo y con aperturas en dos laterales.

En cada pasaje de transmisión mecánica se guardaban hojas infectadas liofilizadas que después eran almacenadas con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  a 4°C o bien se deshidrataban directamente con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  a 4° C.

## **2. 3. Transmisión mecánica**

### **Laboratorio**

Los ensayos que fijan las condiciones óptimas de propagación de los miembros del subgrupo de SCMV son escasos y se han llevado a cabo principalmente sobre cvs. de sorgo o maíz dulce. Con el fin de conocer las mejores condiciones en maíz y concretamente en cultivares que se utilizan en Cataluña, se realizaron una serie de ensayos, antes de realizar la propagación a mayor escala, para fijar: la mejor dilución, estado fenológico de la planta para la inoculación, tiempo de postinoculación para la extracción de inóculo, y el tampón de extracción.

La extracción del inóculo a partir de plantas infectadas fue manual, las hojas se desnervaban y se troceaban antes de homogeneizarlas, con la mano y el mortero y después se añadía el tampón de extracción. A continuación el extracto se filtraba a través de dos capas de muselina. La aplicación del inóculo a la planta se realizaba, con ayuda de muselina, por frotamiento de las hojas, previamente espolvoreadas con el abrasivo carborundum (600 mallas).

El diseño experimental de los distintos ensayos fue de bloques al azar con cuatro repeticiones, con 25 plantas por

bloque y tratamiento, y 30 plantas con testigos negativos por ensayo. En el ensayo del tiempo de postinoculación en la fuente de inóculo no se utilizó este diseño, y se utilizaron 100 plantas por tratamiento y 20 como testigos negativos. En el estudio del efecto del estado fenológico las semillas se sembraron en cinco fechas consecutivas, a partir de que las plantas de la primera siembra tenían una hoja.

En la Tabla 3 se resumen las condiciones para los distintos ensayos. A los 5-8 días de la inoculación se contaron el número de plantas con mosaico y después a intervalos periódicos según el ensayo.

### Campo

La fuente de inóculo fue una mezcla equitativa de hojas infectados (3-4 semanas postinoculación) con los aislados MDMV-L y MDMV-G. La extracción del inóculo se realizó como se ha indicado en el apartado anterior, la dilución de extracción 1:2 en el tampón fosfato Na-K, 0,05 M pH 7 + 1%  $\beta$ - mercaptoetanol (v/v). El extracto se mantuvo a 4°C hasta su aplicación.

La inoculación se llevó a cabo cuando las plantas tenían 5 hojas, y ésta tuvo lugar como se ha indicado anteriormente salvo que el abrasivo se añadió al extracto antes de su aplicación en la proporción 1: 100 (p/v).

El diseño experimental utilizado, en la estimación de los descensos de producción y altura, fue de parcelas subdivididas (Split-plot) con cuatro repeticiones (bloques). El factor principal era el cultivar, y el factor secundario inoculación o no inoculación con el virus.

En el momento de la inoculación se contaron el número de plantas con mosaico y después a intervalos de 15-20 días.

**Tabla 3. Ensayo de condiciones de transmisión mecánica, tratamientos y condiciones particulares en los mismos.**

Ensayo	Tratamientos	Cv	D	EF	TPFI	TE
Cultivares	Futuro, AD-640, AE-703, G-4507, XL-72, Moltó, M-770, P-3183	--	1:5	2-3 H	3 s	F+M
Diluciones	1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:10 <sup>2</sup> , 1:2x10 <sup>2</sup> , 1:5x10 <sup>2</sup> , 1:10 <sup>3</sup> , 1:5x10 <sup>3</sup> , 1:10 <sup>4</sup>	G-4507	--	1,5 H	3 s	F+M
Estado fenológico	Inoculación en estado de 1, 2, 3, 4, 5 hojas	G-4507	1:2	--	2 s	F+M
Tiempo de postinoculación en la fuente de inóculo	Extracción a los 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 32, 39, 54, 69, y 84 días postinoculación	G-4507	1:2	2 H	--	F+M
Tampón de extracción	Tampón F+ M Tampón F Tampón AD	G-4507	1:2	2 H	2 s	--

E F : estado fenológico en la inoculación; H: hojas; D: dilución inóculo (p/v) ; TPFI: tiempo de postinoculación en la fuente de inóculo; Cv: cultivar; T E: tampón de extracción; F+M: tampón fosfato Na-K, 0,05 M pH 7 + 1%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v) (Hill y col., 1973); F: tampón fosfato Na-K, 0,05 M pH 7; AD: Agua destilada;



En el recuento que se realizó, aproximadamente, 100 días después de la siembra, fecha en la que el cultivo se halla en el estado de llenado de grano (Bonciarelli, 1987), se recogieron hojas con síntomas de mosaico y sin ellos para su análisis en el laboratorio.

## **2. 4. Transmisión por pulgones**

### **Cría de pulgones**

Todas las especies, fueron recogidas directamente de los campos experimentales. Antes de proceder a su cría se multiplicaron, para ello se colocaron grupos de 5 a 10 pulgones (ápteros adultos) sobre un disco de papel de filtro previamente humedecido en el interior de una placa de Petri, y se mantuvieron en la oscuridad hasta la aparición de ninfas; éstas se depositaron, a continuación, sobre plantas sanas de trigo duro y maíz. La cría se realizó en el invernadero en el interior de jaulas metálicas recubiertas con tela de visillo (32x 40x 40 cm), con apertura lateral y dos mangas en el centro de la misma. Se sembraron mezcladas semillas de maíz y trigo en bandejas rectangulares de plástico (32x42 cm). Las plantas se renovaban cada 15-30 días.

### **Transmisión**

Antes de iniciar la transmisión los pulgones, y después de ser retirados de las plantas por sacudidas más o menos vigorosas de las hojas, se sometían a un período de ayuno de 1-2 h en cápsulas de Petri. Después del ayuno los pulgones se depositaban sobre la superficie de la hoja infectada de maíz recién cortada. A partir de que su movilidad fuese mínima, se cronometraba un minuto, transfiriéndose a continuación con ayuda de un pincel a la

planta (10 pulgones/planta ), y ésta se protegía para evitar la dispersión de los pulgones. El período de inoculación fue de 16 horas, transcurrido el cual los pulgones se eliminaban con el aficida pirimicarb 1% p/v (ZZ-Aphox<sup>R</sup>, ICI), a una dosis de un 1 g/l de agua.

El número mínimo de plantas ensayadas en cada transmisión fue de 25-30. El estado fenológico de las mismas de una hoja no expandida. En los experimentos comparativos con dos especies de pulgones a la vez, se transmitían primero 5 plantas con una especie, a continuación 5 con la otra y así sucesivamente.

## **2. 5. Transmisión por semilla**

La semilla que se utiliza, en maíz es, en su práctica totalidad híbrida. Por ello se procedió a la obtención de la misma, a partir de las líneas MO-17 y B-73 inoculadas con el virus, la elección de éstas se basó en que constituyen los parentales de alrededor del 80% de los híbridos de maíz cultivados en la zona (J. A. Martín Sánchez, comunicación personal).

### **Producción de semilla**

La producción de semilla híbrida se llevó a cabo durante dos años consecutivos. El primer año se dispuso de dos parcelas, separadas aproximadamente 4 km y en una zona donde la producción de maíz es prácticamente nula, para evitar la contaminación con polen extraño. En una de las parcelas se utilizó como parental femenino B-73 y en la otra parcela MO-17, cada parcela se dividió en dos subparcelas: inoculada (157 m<sup>2</sup>) y testigo (45 m<sup>2</sup>), con una separación entre ambas de 10 m. Cada subparcela constaba de tres líneas; en la línea central se sembró el parental femenino y en los laterales el masculino; la distancia

entre líneas y plantas fue la misma que la indicada en el apartado 2. 1. 2. El segundo año el diseño de la experiencia fue el mismo pero las dos parcelas solo se hallaban separadas por 4 metros. Las dos líneas puras se sembraron con 4 días de diferencia debido a que MO-17 tiene un ciclo más corto que B-73.

Para la obtención de híbridos, el primer año en cada una de las parcelas se eliminaron las inflorescencias masculinas del parental femenino antes de la antesis, permitiendo que la polinización fuera libre. De esta forma en cada parcela se obtuvo semilla de un híbrido y una línea pura, la del parental masculino. El segundo año debido a la proximidad de las parcelas la obtención de híbridos fue dirigida, para ello las dos inflorescencias, masculina y femenina, se protegían con bolsas de papel, la primera antes de que apareciesen los estigmas y la segunda antes de la antesis; la polinización tenía lugar vertiendo el polen recogido en la bolsa sobre los estigmas de la mazorca del parental femenino y protegiendo la mazorca con la misma bolsa.

La inoculación mecánica, conteos de las plantas con mosaico y los controles se realizaron como se ha indicado en el apartado 2. 3. (campo).

### **Transmisión a la descendencia**

Esta experiencia se realizó en invernadero en el interior de dos jaulas (250 x 80 x 80 cm) recubiertas de muselina. Las semillas se sembraron en bandejas de plástico con 28 tiestos de capacidad; los 4 tiestos de las esquinas se sembraron el cv. G-4507 como testigo. Se ensayaron tanto las semillas de las plantas madres inoculadas como de las no inoculadas. Las bandejas se distribuían al azar dentro de las jaulas y se mantuvieron en las mismas aproximadamente un mes; transcurrido este tiempo se contó

el número de plantas nacidas, y la presencia de mosaico o cualquier sintomatología dudosa. Las plantas, que presentaron una sintomatología dudosa se probaron por transmisión mecánica a plantas indicadoras de maíz, y por ELISA.

## **2. 6. Purificación del virus**

El método seguido fue básicamente el descrito por von Baugarten y col. (1981), con pequeñas modificaciones para optimizar el proceso. La extracción se realizó mediante homogeneizador, previa fragmentación de las hojas de maíz (10-15 días postinoculación) que se añadían al tampón de extracción (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaDIECA pH 9), en la proporción 1:4 (p/v). El homogeneizado se filtraba a través de 4 capas de muselina, y el extracto se clarificaba con cloroformo al 5% (10 min en agitación) y centrifugación a 10.000 rpm (rotor GSA/SS34). La primera concentración del virus se realizó con PEG al 4% más 0.3 M ClNa y centrifugación a baja velocidad. El precipitado se resuspendía en el tampón de resuspensión (TR) (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA pH 8), y clarificado de nuevo con una centrifugación a baja. Al ser esta clarificación un factor limitante en el rendimiento de la purificación, el precipitado de ésta se resuspendía en un pequeño volumen de tampón y se volvía a centrifugar, el sobrenadante se añadía al obtenido en la primera clarificación. La segunda concentración del virus se realizaba por ultracentrifugación (1,5 h a 27.000 rpm, rotor tipo 30) y el precipitado se resuspendía en TR, seguido de una clarificación. Antes de la purificación final, se realizaba otro ciclo de centrifugación diferencial en colchón de sacarosa al 30% (3 h a 27.000 rpm, rotor tipo 30). La última purificación se realizaba mediante gradientes de ClCs (16 h a 35.000 rpm, rotor tipo 45). La zona

birrefringente se recogía con una jeringuilla hipodérmica y se dializaba en tampón de resuspensión. La concentración del virus se estimaba con el espectrofotómetro utilizando como coeficiente de extinción de 2,4 a  $A_{260}$  .

## **2. 7. Serología**

Se dispuso de dos antisueros : uno obtenido a partir del aislado MDMV-L por C. Jorda ( ETSIA de Valencia) y el segundo contra SCMV-D proporcionado gratuitamente por R. Baudin (INRA de Montpellier). La purificación de inmunoglobulinas y conjugación con el enzima (fosfatasa alcalina, Sigma) siguió el método descrito por Clark y Bar-Joseph (1984).

El tipo de ensayo serológico realizado fue el ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) directo en su modalidad DAS (double antibody sandwich). El protocolo utilizado fue el descrito por Clark y Bar-Joseph (1984). El soporte sólido eran placas de poliestireno. Los pocillos de los bordes de la placas se descartaban y cada muestra se colocaba en tres pocillos; el testigo negativo y positivo en seis. La extracción de la muestra era manual y se clarificaba durante 1 min en microcentrífuga a 10.000 rpm. La lectura de la densidad óptica se realizó en un lector automático (Titertek Multiskan), a una longitud de onda de 405 nm. Se consideraron positivas aquellas muestras con una densidad óptica media, al menos dos veces superior a la media de los controles negativos.

## **2. 8. Microscopía electrónica**

### **2. 8. 1. Preparaciones de extractos crudos y purificados del virus**

Las rejillas utilizadas fueron de cobre (400 mallas) recubiertas con parlodión (3,5 %) o piroxilina (4%) y posteriormente carbonatadas.

La obtención del extracto crudo vegetal se realizó en 0,05 M tampón fosfato Na-K pH 7 1:10 (p/v) y posteriormente se centrifugó 1 min a 10.000 rpm.

Las rejillas se incubaban media hora sobre una gota de 25 µl de extracto crudo o de purificado del virus. Después se procedía a dos lavados con agua destilada. La tinción se realizó con acetato de uranilo (2%) o ácido fosfotúngstico (1%) durante 30 segundos. Posteriormente se lavaban y secaban al aire para eliminar el exceso de agua.

### **2. 8. 2. Preparaciones de material vegetal para su observación al microscopio electrónico**

La inclusión del material vegetal en la resina hidrofílica (London Resin Woking, U.K.) tuvo lugar de dos formas distintas según el material hubiera de ser incluido para una observación estándar o para su inmumonomarcado con oro coloidal (apartado 2.8.3). En este apartado se describirá el protocolo seguido en el primer caso.

Pequeños fragmentos de hojas (infectadas y sanas) se fijaban 16 horas con 2,5% glutaraldehído en 0,05 M tampón cacodilato pH 7, y postfijados con tetróxido de ósmio al 1% durante 1,5 h. Después de dos lavados con H<sub>2</sub>O destilada, se mantenían 5 min en acetato de uranilo seguido de deshidratación en una serie de cambios de alcoholes de 15

min cada uno: 30%, 50%, 70% (saturado con acetato de uranilo), 80% y 90%; la deshidratación final se realizó en alcohol absoluto en tres tiempos, dos de 1h y uno de 16h.

La infiltración se realizó a 4°C; las muestras se colocaban una hora en resina:alcohol absoluto (1:1) y después en resina al 100% en tres tiempos, de 2,5, 4 y 16 h. Finalmente las muestras se transferían a las cápsulas (BEEM) pre-rellenas de resina y la polimerización tenía lugar a 60°C durante 12 h.

Las muestras se seccionaban en un ultramicrotomo (ULTRACUT E) con cuchilla de vidrio de 45°. Las secciones ultrafinas se colocaban sobre las rejillas de cobre preparadas como se ha indicado en el apartado 2. 8. 1.

Las secciones se teñían con citrato de plomo (1 min) y a continuación se observaban en un ME marca Siemens Elmiskop 1A o en un Jeol 1200.

### **2. 8. 3. Inmunomarcado con oro coloidal**

Para preservar las propiedades antigénicas de las proteínas las muestras de material vegetal se incluían en frío (-20° y -35 °C) en una caja fría con N<sub>2</sub> líquido y la fijación se realizaba sin tetróxido de ósmio para no provocar cambios conformacionales de las proteínas (Roth, 1983).

La fijación de las muestras se realizó como se ha indicado en el apartado 2. 8. 2, pero sin la postfijación. La deshidratación se realizó en la misma serie de alcoholes que la indicada en el apartado 2. 8. 2, pero el tiempo que se mantenían en cada uno de ellos era de una hora y el proceso tenía lugar a 4°C en el primer alcohol, a -20°C en el segundo y a -35° en el resto de alcoholes en la caja fría.

La infiltración en la resina más el 0,5 % de benzoil metil éter se llevó a cabo en varias etapas (1:1, 2:1, 3:1 resina:etanol y 100% resina) de una hora cada una a - 20°C. Las muestras se mantenían toda la noche en la resina (100%), después se realizaba un nuevo cambio de la resina al 100% durante 8 h a la misma temperatura, a continuación, las muestras se transferían a cápsulas llenas de resina pre-enfriadas a -20°C.

La polimerización se iniciaba en la misma caja fría con radiación U.V. durante 16 h y finalizaba a temperatura ambiente durante el mismo período y con la misma radiación.

La obtención de secciones y la preparación de la rejillas se realizó como se ha indicado en el apartado anterior, con la excepción que las rejillas eran de oro.

El inmunomarcado tenía lugar tapizando primero las rejillas con el antisuero anti MDMV-L (1:100) en 200 mM Tris-ClH, pH 7,4 que contenía 1% de BSA, 0,1% de gelatina y 1% de Tween 20, durante 16 h a 4°C. Después se lavaban con H<sub>2</sub>O durante 1 min, seguidamente se incubaban con el segundo anticuerpo anticonejo (producido en cabra, Sigma) marcado con oro coloidal, a la dilución 1:50 en la solución más arriba indicada, durante 1 h. a temperatura ambiente. Después del lavado se procedía a la tinción primero con acetato de uracilo al 2% durante 30 min, seguido de un lavado y luego teñido con citrato de plomo durante 5 min. Antes de la observación al ME se procedía al último lavado y se secaban al aire.

Este mismo procedimiento de tapizado se utilizó para la observación de partículas virales purificadas inmunomarcadas con el mismo antisuero.



## 2. 9. Extracción del RNA genómico

El aislamiento del RNA genómico se realizó siguiendo el método descrito por Wang y col. (1992), con algunas modificaciones. El precipitado resultante del colchón de sacarosa ( ver apdo. 2. 6.) se resuspendía en 20 mM Tris-ClH pH 8,2, al que se añadía igual volumen de 200 mM Tris-ClH 2 mM EDTA pH 9. La disociación de las partículas se realizó por incubación durante 15 min a 37°C y 5 min a 65°C, previa adición de SDS al 2% y pronasa (Calbiochem) 100 ug/ml. Las proteínas se eliminaron mediante fenol-cloroformo (2 veces). El RNA se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol 100% frío y 1/10 volumen 3 M acetato sódico pH 5,5 e incubación a -20°C un mínimo de una hora y, centrifugación ( 15 min a 10.000 rpm) después de un lavado con etanol y re-centrifugación (10 min), el RNA se secaba al vacío y se resuspendía en H<sub>2</sub>O.

Alternativamente, y en especial cuando la extracción del RNA se llevaba a cabo a partir de la primera concentración del virus, el precipitado de ésta se resuspendía en 100 mM Tris-Cl pH 8, que contenía 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, y 1% SDS, e incubación durante 5 min a 50° C. La separación del RNA de las proteínas se realizaba como se ha indicado anteriormente.

La presencia de RNA entero se verificó en geles de agarosa al 1% en 20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico, 1 mM EDTA y 2,8% (p/v) de formaldehído (Lehrach y col., 1977). El RNA se mezclaba, en la proporción 1:3 (v/v), con la mezcla de carga (67% formamida, 13% formaldehído, en 25 mM MOPS, 6,5 mM acetato sódico, 1,3 mM EDTA y 0,1 mg/ml de bromuro de etidio, a continuación se desnaturalizaba (5 min a 60°C) y se añadían 2µl de naranja G. Las muestras se resolvían a una intensidad constante de 80 mA, después de la electroforesis el gel se visualizaba a U.V.

## 2. 10. Síntesis y clonación de cDNA

### 2. 10. 1. Síntesis de cDNA

Antes de la síntesis de cDNA, y para eliminar cualquier traza del DNA del huésped, el RNA se incubaba a 37°C durante 30 min en presencia de DNasaI en el tampón 50 mM Tris-ClH pH 7,5 más 10 mM MgCl<sub>2</sub>, la reacción se paraba con la adición de 10 mM EDTA pH 7,5.

La doble cadena de cDNA específica de la región 3' del RNA viral se sintetizó por el procedimiento descrito por Frohman y col. (1988). La primera cadena se sintetizó con el oligonucleótido GACTCGAGTCGACATCGA(T<sub>17</sub>), complementario a la cola de poly (A) del extremo 3' del RNA viral, más los lugares de restricción XhoI, SalI, ClaI; utilizando 1µg de RNA, 25 unidades de retrotranscriptasa (AMV), 50 pM del oligonucleótido, en 20 µl del tampón de retrotranscripción (0,5 mM dNTP, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-ClH pH 8,4). La reacción se incubaba 60 min a 42°C.

Para amplificar la región del RNA viral que se suponía que codifica parte del gen NIB y el gen de la proteína de cubierta se diseñó y sintetizó un oligonucleótido degenerado a partir de las secuencias de 4 potyvirus (Tabla 4) a las que se les añadió la secuencia BamHI.

El segundo cebador, para la reacción de amplificación, fue la secuencia de los lugares de restricción XhoI, SalI, ClaI. Las reacciones tuvieron lugar en un termociclador (Techne PHC-3), con 10-15µl del producto de retrotranscripción (1:500), 2,5 unidades de *Taq DNA polimerasa* en 50 µl de tampón (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8,5, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) que contenía 50 pM de cada cebador y 200µM de cada dNTP. Las condiciones de los ciclos fueron en los tres primeros ciclos: desnaturalización a 94°C 1 min, hibridación a 30°C 1 min, y extensión 3 min a 72°C;

en los ciclos 4-33 las mismas condiciones que en los primeros ciclos, pero la temperatura de hibridación se incrementó hasta 57°C y un último ciclo de extensión a 72°C durante 10 min.

**Tabla 4. Secuencias de nucleótidos del gen de las NIB (106-120 nt del extremo 3') de los 4 potyvirus que se diseñó el oligonucleótido.**

	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>N/K</b>	
<b>SCMV-SC</b>	GAA	ACA	GCG	CTT	CGT	AA	
<b>MDMV-B</b>	GAG	ACA	GCA	CTC	CGT	AA	
<b>SCMV-JG</b>	GAG	ACA	GCT	CTA	CGG	AA	
<b>ZYMV</b>	GAG	ACA	GCA	CTT	CGT	AA	
<b>Oligonucleótido:</b>	5' G	<u>GGA TCC</u>	GAA ACA	GCT	CTT	CGT AA	3'
		<i>BamHI</i>	G	A	A	A	
				C	C	C	
				G	G	G	

La síntesis de cDNA se verificaba en minigeles de agarosa al 1% en TBE (134 mM Tris, 44 mM ácido bórico, 2,5 EDTA, pH 8,8) ó TEAc (40 mM Tris-Acetato, pH 7,5, 20 mM acetato sódico, 2 mM EDTA).

Después de la verificación y para completar la síntesis del cDNA, el producto de la reacción se incubaba media hora a temperatura ambiente en presencia de DNA polimerasa (fragmento de Klenow) y 40 µM de dNTP.

## 2. 10. 2. Clonación de cDNA

Antes de la digestión el cDNA se sometía a una extracción fenol-cloroformo y precipitación con etanol, para cambiar de tampón y eliminar las proteínas. El cDNA se digirió con los enzimas BamHI y SalI bajo las condiciones recomendadas

por la casa comercial, el producto de la digestión se cargaba en un gel de agarosa al 1% en TEAc y electroforesis a 80 mA. Después de la tinción con bromuro de etidio, las bandas se visualizaban por exposición a U.V. en el transiluminador, se cortaban y aislaban por electroelución (Sambrook y col., 1989). El DNA fue finalmente purificado mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, previa eliminación del bromuro de etidio con dos extracciones con butanol.

Los fragmentos de restricción (10-100 ng) se ligaban con 50 ng del fago M13mp18, liniarizado con los mismos enzimas y desfosforilado (1/2 h a 37°C) con 0,1 unidades de CIAP (fosfatasa alcalina del intestino de ternero) en el mismo tampón de restricción, en presencia de una unidad de DNA ligasa del fago T4, en el tampón suministrado por la casa comercial del enzima. La reacción se incubaba durante 16 h a 4°C. El DNA ligado se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* JM 101 (Genotipo: *supE thi Δ (lac-proAB) F' [traD36 pro AB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15]*).

Las células competentes se preparaban por el procedimiento de la permeabilización celular con CaCl<sub>2</sub> descrito por Hanahan (1983). 50 ml de medio 2 X TY (1,6 % Bactotripton, 1% de extracto de levadura, 0,5% de NaCl) se incubaban con 1/100 volúmenes de cultivo estacionario de la bacteria en agitación a 37°C durante 1,5-2 h. Las células se centrifugaban a 2000 rpm (Sorvall RT6000) durante 5 min, y resuspendidas en la mitad del volumen original en 50 mM de Cl<sub>2</sub>Ca frío. Este paso se repetía, pero el volumen de resuspensión se reducía al 1/10 del volumen original y las células se mantenían 1-2 h en hielo. 200 μl de células competentes se añadían a cada mezcla de ligamento, la mezcla se dejaba en reposo 45 min, seguido de un choque térmico a 45°C durante 2 min. Cada mezcla de transformación se añadía a 3 ml HST (1 % Bactotripton, 0,5% de NaCl) que contenía 40μl de X-Gal (solución al 20 mg/ml en dimetil

formamida), 20µl de IPTG (20 mg/ml) y 100 µl de JM101 en fase estacionaria. La mezcla se vertía sobre placas de AH (1% Bactotripton, 0,5% de NaCl, 1,25% bactoagar ), después del secado de las mismas a temperatura ambiente, se incubaban a 37°C 16 h. Las células transformadas que contenían insertos se identificaban por el test de complementariedad *lac*.

### **2. 10. 3. Preparación de ssDNA recombinante**

El aislamiento se llevó cabo por el método descrito por Sanger y col. (1980). Se partía de 1 ml de cultivo en crecimiento exponencial de JM101 inoculado con una calva recombinante e incubado en continua agitación durante 4-5 h. Las células se precipitaban por centrifugación a baja velocidad. El fago se concentraba con PEG, a 800µl de sobrenadante se añadió 200µl de solución que contenía 20% de PEG y 2,5 M NaCl, seguido de incubación 30 min a temperatura ambiente. El fago se precipitaba por centrifugación (10 min) y el sobrenadante se eliminaba con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío. Para evitar cualquier resto de PEG, se re-centrifugaba brevemente y se eliminaba los restos de sobrenadante. El precipitado del fago se resuspendía en 100 µl de TE pH 7,5 (10 mM Tris-ClH pH 7,5 y 0,1 mM EDTA), las proteínas se eliminaban con 100µl de fenol neutralizado. El DNA se recuperaba por precipitación con etanol absoluto y lavado con etanol al 70%, después de seco se resuspendía en 50 µl de TE.

### **2. 10. 4. Preparación de la forma replicativa de DNA recombinante**

Se partió de distintos volúmenes de cultivo en crecimiento exponencial (1, 500 ml) según el aislamiento fuera a

realizarse a pequeña o gran escala. El cultivo en crecimiento exponencial se preparaba por inoculación de 2µl del fago en solución por ml de cultivo e incubación durante 16 h a 37°C en agitación.

### **Minipreparaciones**

Como ya se ha indicado más arriba se partía de 1 ml de cultivo en crecimiento exponencial y para el aislamiento se procedió según el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979) y modificado en Sambrook y col. (1989).

Las células se precipitaban por centrifugación a baja velocidad y se resuspendían en 100µl de solución de lisis (25 mM Tris-ClH pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM de glucosa y lisozima 2 mg/ml) y se mantenían 30 min a temperatura ambiente, seguidamente se añadían 200µl de 0,2 M NaOH y 1% SDS y se dejaba 5 min en hielo. El DNA del huésped se precipitó por centrifugación durante 5 min después de la adición de 150 µl de 3 M acetato sódico pH 5,2 y mantenido durante media hora en hielo. El dsDNA del fago se precipitaba con etanol y se resuspendía en 1 M acetato sódico pH 5,2 y 5 mM Tris-ClH pH 8, seguido de una re-precipitación con etanol. El RNA se eliminaba por tratamiento con RNasa A (100 µg), para ello el precipitado de la re-precipitación se resuspendía en 100 mM ClNa, 10 mM Tris-ClH pH 7,5 y 10 mM EDTA pH 8 y se incubaba 30 min a 37°C. La desproteización se realizaba con proteinasa K (20 µg) e incubación a 37°C durante 1 h y extracción con fenol-cloroformo. El DNA se recuperaba de la fase acuosa por precipitación con etanol y una vez seco se resuspendía en 40 µl de agua.

### **Maxipreparaciones**

El procedimiento seguido para la extracción de la forma replicativa del fago a gran escala fue el mismo que el

descrito en el caso de las, minipreparaciones, a excepción que la desproteínización y la eliminación del RNA se realizaba mediante dos ciclos de centrifugación en gradientes de ClCs, en presencia de bromuro de etidio (Sambrook y col., 1989).

## **2. 11. Hibridación RNA-DNA**

### **Preparación de las sondas**

Para el marcaje del DNA se siguió el procedimiento descrito por Feinberg y Vogelstein (1984). Las sondas se preparaban a partir dsDNA aislado según se indica en el apartado 2. 10. 4. (maxipreparaciones) previa digestión con los enzimas BamHI y SalI. Los insertos se separaban de DNA del fago en geles de agarosa y se recuperaban por electroelución.

El DNA a marcar se desnaturalizó a 100°C durante 3 min pasándose seguidamente a hielo. La reacción se realizó en un volumen de 50 µl, con 25 ng de inserto de DNA en 13µl de H<sub>2</sub>O estéril, 5µl de tampón OLB (250 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dNTP, 0,004 % β-mercaptoetanol, 0,5 mg/ml hexanucleótidos al azar, 1 M HEPES pH 6,6), 1µl de BSA (10 mg/ml), 5 unidades del fragmento de Klenow y 50 µCi de [α - <sup>32</sup>P]dCTP. La reacción se incubó durante 15-16 h a temperatura ambiente. Los nucleótidos no incorporados se eliminaban a través de una columna de Sephadex G50 previamente equilibrada con TE.

### **Transferencia del RNA al filtro**

La transferencia al filtro (Cellulosenitrat, E, 0,45µm) se realizó por capilaridad (Sambrook y col., 1989). Una vez finalizado la electroforesis del RNA, sin teñir con bromuro de etidio y para mejorar la transferencia del RNA, el gel

se agitaba durante 20 min en presencia de 50 mM NaOH. A continuación la solución se cambiaba por la de transferencia 20 x SSC ( 3 M NaCl, 300 mM citrato sódico) y se mantenía en agitación otros 45 min. La transferencia al filtro tenía lugar durante 16 h, después se fijaba al filtro por radiación UV en un "Stratagene Stratalinker".

### **Hibridación**

El filtro se pre-hibridaba de 2-4 h a 65°C con 25 ml de la mezcla de hibridación (3 x SSC, 4x Denhardt y 0,5 mg de DNA de timo de ternero (desnaturalizado). Transcurrido este tiempo se añadía la sonda previamente desnaturalizada, seguido de incubación durante 16 h, a la misma temperatura más arriba mencionada. Después de la hibridación el filtro se lavaba tres veces en 2 x SSC y 0,1 SDS, durante 30 min a 65 °C, y un a vez con 1 x SSC y 0,1 SDS. Después del secado del filtro, se exponía a la película autoradiográfica a - 70°C.

### **2. 12. Secuenciación de DNA**

La secuenciación se llevó a cabo sobre la forma de cadena simple de M13mp18 por el método "dideoxy" con una variedad de oligonucleótidos para "caminar" a lo largo del DNA y, el kit de secuenciación Sequenase 2.0 ( U.S. Biochemical). Para determinar la secuencia de la cadena opuesta los clones se subclonaban en M13mp19. Las reacciones de secuenciación se separaban en geles desnaturalizados de poli(acrilamida) al 6% (38% Acrilamida: 2% N,N'-metilenbisacrilamida) en TBE (134 mM Tris, 44 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA) que contenía 6 M de urea y polimerizados con la adición de 0,08 (p/v) AMPS y TEMED. Las dimensiones de los geles eran 20 cm x 40 cm x 0,3 mm. Cada muestra se insertaba en tres tiempos (3 µl en cada uno) y se sometían a una intensidad constante de 30 mA durante 6,5, 3,5 y 1,5-



2 h. Después del secado (80°C) se exponían a la película autorradiográfica.

Cuando se querían leer las secuencias cercanas al cebador además de seguir el procedimiento indicado en el manual del kit, las muestras se resolvían en geles al 12% de acrilamida.

## 2. 13. Electroforesis de proteínas

Se realizaron dos tipos de geles de proteínas: Geles SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y geles Tricina-SDS-PAGE (Schägger y col., 1987).

Las características de los primeros eran una capa de gel separación al 15% en 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 SDS, y la del gel de concentración 1,5% en 0,14 M Tris-ClH pH 6,8 y 0,1% SDS, para ambas capas de gel se utilizó una solución de monómeros al 30% acrilamida y 1% N, N'metilen-bisacrilamida. El tampón de electroforesis contenía 192 mM glicina, 0,1% SDS y 25 mM Tris-ClH pH 8,3. Las muestras se incubaban a 100°C durante 5 min, en el tampón de carga (2% SDS, 10% glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 46 mM Tris-HCl, pH 6,8 y 0.01 azul de bromofenol). Después de la electroforesis el gel de separación se teñía 1/2 h en una solución que contenía 0,4% Coomasie brilliant blue R-250, 15% metanol y 7% ácido acético glacial, a continuación se desteñían en la misma solución pero sin Coomasie.

Los geles de Tricina-SDS-PAGE utilizados permiten separar proteínas de peso molecular comprendidos entre 36-10 kDa, las características de los mismos fueron las siguientes: la capa del gel de separación contenía 16,5% de acrilamida en 1 M Tris-ClH pH 8,45 que contenía 6 M de urea y 0,1% SDS; la capa del gel de concentración 4% en el mismo tampón pero sin urea. En ambos geles se utilizó la misma solución



de monómeros 46,5% acrilamida y 3% N, N'-metilen-bisacrilamida. Los tampones de electroforesis eran distintos para el ánodo y el cátodo: ánodo 0,2 M Tris-ClH pH 8,9; cátodo: 100 mM tricina y 100 mM Tris-ClH pH 8,25 y 0,1 % SDS. La disociación de las partículas virales, y tinción de los geles fue la misma que en los geles SDS-PAGE.

## 2. 14. Inmunoblot

Después de la electroforesis los geles eran retirados de las placas y mantenidos en agitación durante media hora en el tampón de transferencia (25 mM Tris, 150 mM glicina, 10% de metanol, pH 8,3). La transferencia de las proteínas a los filtros (Cellulosenitrate (E), 0,45  $\mu$ m) se realizaba en Trans-blot™ Cell (BIO RAD) durante 30-45', con un intensidad de 5 mA/cm<sup>2</sup>. A continuación el filtro se incubaba 16h, en agitación orbital a 4°C, con el antisuero anti MDMV-L (1:1000) en PBS (30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13 mM NaCl, pH 7,2 ) conteniendo leche deshidratada en polvo al 5% y 0,1 Tween 20. Después del lavado del filtro, cuatro veces durante 10 min, en el mismo tampón de incubación, se incubaba (2 h a temperatura ambiente) con el segundo antisuero conjugado con fosfatasa alcalina (anti-conejo, SIGMA) a la dilución 1:500 en la misma solución descrita más arriba. Antes del revelado, el filtro se lavaba tres veces (10 min) en PBS-Tween y una en 100 mM Tris-HCl pH 9,5, a continuación el filtro se incubaba en 100 mM Tris-HCl pH 9,5 conteniendo 0,1 mg/ml de azul de nitrotetrazolina, 0,05 mg/ml de fosfato de bromocloroindol y 4 mM de MgCl<sub>2</sub> hasta la aparición del color y después se lavaba con abundante agua destilada y se secaba al aire.

## 2. 15. Secuenciación de proteínas

Se llevó a cabo por el método de degradación automática de Edman en el Institute of Animal Physiology and Genetics Research, (Cambridge) en un secuenciador Applied Biosystems 470A. A partir de 50  $\mu\text{l}$  (0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de virus parcialmente purificado, aplicados a una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride, ProSpin<sup>TM</sup>), o a partir de la resolución de las partículas virales en geles tricina-SDS y transferidas a la membrana más arriba mencionada. Para ello, después de la electroforesis los geles se agitaban en el tampón de transferencia (10 mM CAPS pH 11, 10% de metanol) y la transferencia se realizaba de igual forma que en el apdo. anterior. Las proteínas se detectaban con Coomassie (30 segundos) y se desteñían en metanol al 50%, a continuación las bandas se cortaron para determinar su secuencia.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **3. 1. Presencia de MDMV en campos experimentales y comerciales**

##### **3. 1. 1. Presencia en campos experimentales**

Este estudio se llevó a cabo en los campos experimentales del SEA en la comarca de la Noguera y en la comarca del Baix Empurdà. El primer año en la comarca de la Noguera se dispuso de dos campos situados en los términos municipales de Termens y Balaguer. Los años siguientes el estudio se realizó en un campo situado en cada de las comarcas más arriba mencionadas.

El número de cultivares que el SEA ensayaba cada año oscilaba entre 24-30 cultivares, algunos de estos variaron en los años y localidades en que se llevó a cabo este trabajo. Para el estudio de la incidencia se eligieron cvs. considerados como susceptibles (AD-640, XL-72, AE-703) tolerantes (P-3183, M-770) y otros de reciente introducción (Alios, Bianca, Moltó, Dracma, Ivana) (Puertas, 1986; Puertas, comunicación personal). El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro repeticiones y las características de las parcelas las descritas en el apdo. 2. 1.

El estudio de la incidencia se realizó por sintomatología, se recontaban el número de plantas infectadas cada 15-20 días. Para verificar que los síntomas observados eran inducidos por MDMV u otro miembro del subgrupo del sugarcane se realizaron distintas pruebas. El primer año estas pruebas consistieron en: transmisión mecánica al cv. G-4507, en dos estados del desarrollo del cultivo, estado de encañado y estado de llenado del grano (Bonciarilli, 1987) y observación de los extractos crudos al ME; los años siguientes mediante la prueba ELISA con el antisuero anti

MDMV-L y SCMV-D en el estado de llenado del grano, como testigos positivos se utilizaron los aislados MDMV-L y MDMV-G.

### **Sintomatología observada y determinación del agente causal**

La síntomas de mosaico en maíz se observan en las Figuras 2, 3. El mosaico en franjas siguiendo la dirección de las nerviaduras (Fig. 2), se transformaba con el tiempo en un mosaico en toda la superficie de la hoja (Fig. 3). A medida que las plantas avanzan en su desarrollo el mosaico se difumina y las hojas se vuelven amarillas (mosaico difuso), esta sintomatología coincide con la descrita por William y Alexander (1965) en USA y por Signoret (1986) en Francia. El enanismo robusto sólo se detectó a medida que las plantas alcanzaban la madurez, este último iba acompañado de un color verde intenso y de agallas en el envés de la hoja, síntomas atribuidos al virus del enanismo rugoso del maíz (MRDV).

En las Tablas 5 y 6 se resumen los resultados de las pruebas llevadas a cabo para verificar de presencia del agente causal de la sintomatología observada. Estos resultados indicaron : (1) que el mosaico es inducido probablemente por MDMV u otro miembro del subgrupo del SCMV, hecho ya detectado por Rubies (1982); (2) que el raquitismo no es un síntoma atribuible, en principio, a este virus. El raquitismo era mucho más frecuente (datos no mostrados) en la localidad de Termens, puede deberse a la práctica de la resiembra que se efectuaba en estos campos, dado el bajo índice de la nascencia producido por encrostamiento del suelo y daños ocasionados por los pájaros (SEA, 1990 publicación de régimen interno); (3) que el enanismo robusto tampoco está inducido por este potyvirus.



Figura 2. Planta de maíz con síntomas de mosaico en franjas.