

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^a ANGELES ACHON SAMA
LLEIDA, 1993

0032-06560



Figura 3. Planta de maíz con síntomas de mosaico en toda la superficie de la hoja.

Tabla 5. Resultados de las pruebas realizados para determinar la presencia de MDMV en 1989 en campos experimentales.

Síntomas	ME	T. mecánica	
		1	2
Mosaico sistémico	+	2/6	10/20
Mosaico en franjas	+	3/6	--
Mosaico difuso	--	--	7/20
Sin síntomas	-	0/6	0/20
Raquitismo	-	--	0/20
Enanismo robusto	-	--	0/20
Controles	-	0/6	0/20

Controles: tampón más el abrasivo y abrasivo sólo ; 1: transmisión cuando las plantas infectadas estaban en el estado de encañado; 2: transmisión en el estado de llenado de grano; + partículas flexuosas de 715-790nm; - ningún tipo de partículas; --: no realizado.

Tabla 6. Resultados de la prueba ELISA para determinar la presencia de MDMV en 1990 y 1991 en campos experimentales.

Origen	Número de muestras	Antisueros	
		MDMV-L	SCMV-D
Mas Badia			
Maíz	3	+++	---
Sorgo	2	+++	-
<i>S.halepense</i>	1	+++	-
Termens			
Maíz	6	+++	--- ^b
<i>S.halepense</i>	1	+++	-
Sin síntomas	2	---	---
Raquitismo	2	---	---
Controles		+++	---

Controles positivos: aislados MDMV-L, MDMV-G;+++: positiva valor de la D.O. más del doble del negativo; ---: negativo ; -: no realizado; b: sólo tres muestras.

Incidencia

El análisis estadístico se llevó a cabo por localidad, dadas las diferencias que se observan entre las dos localidades (Tabla 7 y 8) y con el porcentaje de plantas infectadas en el estado de llenado de grano. Para el análisis de la varianza los porcentajes se transformaron mediante $\arcsen \sqrt{\cdot}$. Las hipótesis se han evaluado de acuerdo a un modelo mixto en que el cultivar se ha considerado factor fijo y, año y bloque aleatorios.

No se ha incluido la separación de medias de la localidad de Balaguer ya que sólo se estudió un año, y el comportamiento de los cultivares fue el mismo que en la localidad de Termens (Figura 4).

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.

	1989	1990	1991	Medias
AD-640	27	48	50	41,6 a
AE-703	28	51	47	42,0 a
XL-72	24	42	34	33,3 b
Ivana	-	16	32	24,0 c
Alios	12	26	18	23,6 cd
Bianca	9	35	27	23,6 cd
P-3183	15	30	22	22,3 cd
M-770	15	27	19	20,3 cd
Dracma	-	22	10	16,0 e
Moltó	11	21	19	17,0 e
Total	17,6 c	30,9 a	27,8 b	26,3

Medias con la misma letra entre cultivares y años no presentan diferencias a un nivel de significación $\alpha < 0,05$ en la prueba de DUNCAN.

La incidencia en el conjunto de los cultivares estudiados en la localidad de Termens fue del 26,3 % (Tabla 7). El año

1989 fue el de menor incidencia y el de mayor 1990.

En el comportamiento de los cultivares frente a la infección de MDMV se observan cuatro niveles; AD-640 y AE-703 presentaron los niveles más altos de infección seguidos de cerca por el cv. XL-72. La mayor sensibilidad a virosis, en general, de estos cultivares ya ha sido indicada por Puertas (1986).

En un nivel intermedio se sitúan los cvs. P-3183, M-770 y los de reciente introducción Ivana, Alios, y Bianca. Los que presentaron niveles más bajos de infección fueron los cvs. Moltó y Dracma.

En la localidad de Mas Badia, la infección de MDMV, no alcanzó el 0,4 %, no presentándose diferencias significativas entre cultivares, ni tampoco entre años (Tabla 8).

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.

	1989	1990	1991	Medias
AD-640	0	1	0	0,3 a
Ivana	-	1	0	0,3 a
Alios	0	1	1	0,6 a
Bianca	0	1	1	0,6 a
P-3183	0	0	0	0,0 a
M-770	0	1	1	0,6 a
Dracma	-	1	1	1,0 a
Moltó	0	0	0	0,0 a
Total	0 a	0,75 a	0,37 a	0,37

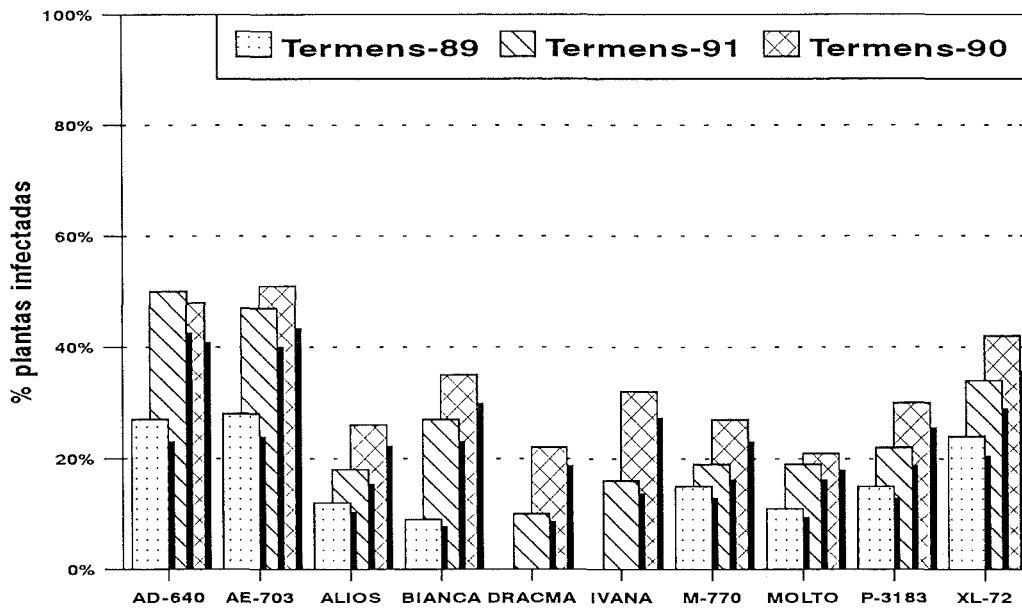
Medias con la misma letra entre cultivares y años no presentan diferencias a un nivel de significación $\alpha < 0,05$ en la prueba de DUNCAN.

La diferencia entre localidades podría deberse a la presencia de menor cantidad de malas hierbas en los campos de Mas Badia que en los de Termens, tanto en los márgenes como en el interior de los campos.

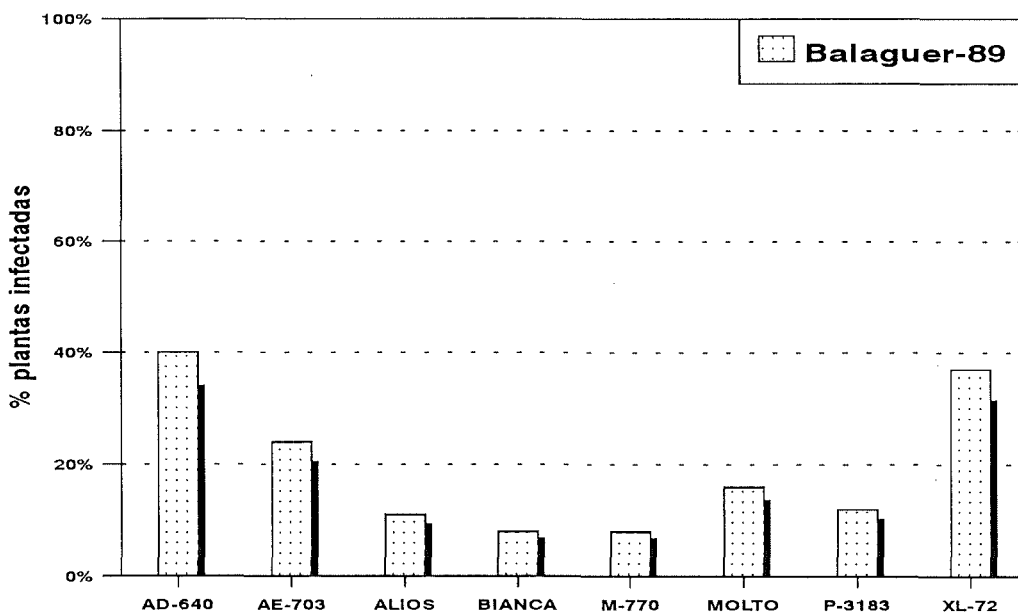
Otro factor que explicaría tal hecho, aunque no se dispone de registros de las poblaciones de pulgones en maíz en la provincia de Girona, es que las poblaciones de pulgones fuesen muy bajas en esta localidad y especialmente en los primeros estados de desarrollo del cultivo. En este sentido cabe destacar, en primer lugar, que el % de plantas infectadas se mantuvo constante en todas las fechas de muestreo.

En segundo lugar, en 1991, año en que la incidencia en esta localidad fue de 0,37% (Tabla 8); en el mismo campo, y cuando el maíz se hallaba en el estado de formación de la espiga, se observó una elevada presencia de sorgo con mosaico, lesiones púrpura y necróticas (Figura 5). Síntomas que posteriormente se comprobó que eran inducidos por MDMV (aislado MDMV-Gs, véase apdo. 3. 2). Si bien este dato no deja de ser anecdótico, en un principio indicaría que ese año las poblaciones de vectores pudieron ser más abundantes cuando el maíz se encontraba en un estado más avanzado de desarrollo y por tanto la incidencia fue menor, según indican Jarjees y Uyemoto (1974).

Los síntomas observados en sorgo coinciden con los descritos por Lovisolo (1992) en otros países europeos inducidos por el virus del estriado rojo del sorgo (sorghum red stripe virus, SRSV). Las distintas pruebas realizadas con el aislado MDMV-Gs (véase apartado 3. 2.), indican que este aislado es muy similar a los otros aislados de MDMV aislados de maíz, lo que indicaría que MDMV induce en sorgo la sintomatología descrita por Lovisolo (1992).



Cultivares



Cultivares

Figura 4. Porcentaje de plantas infectadas por MDMV, en el estado de llenado de grano, en campos experimentales del SEA.

La presencia de mayor cantidad de malas hierbas, reservorios de MDMV, y la colonización en Mayo y Junio por las distintas especies de pulgones (Albajes y col., 1986; Comas y col., 1992) pueden explicar la mayor incidencia de MDMV en la comarca de la Noguera.



Figura 5. Planta de sorgo con mosaico, lesiones necróticas y estriado de color púrpura.

Evolución en el tiempo del porcentaje de plantas infectadas

En la Figura 6 se representan algunas curvas de la evolución en el tiempo de plantas con mosaico en la localidad de Termens. En éstas se observa, que el % de plantas infectadas siguió una tendencia creciente a partir de que se detectaron las primeras, aproximadamente a los 50 días después de la siembra (20-25 de Junio). Fecha que coincide con la indicada por Albajes y col. (1986) y Comas y col. (1992) con los máximos poblacionales de pulgones en maíz.

En los cvs. AD-640, XL-72, AE-703 el incremento en el tiempo es más acusado que en P-3183 y M-770. En el caso del cv. Moltó el porcentaje de plantas infectadas varía poco. Estos resultados podrían indicar distintos grados de susceptibilidad de estos cvs. frente a MDMV.

Los cambios algo bruscos que se observa en los muestreos, y en especial en el último, en los cuales se observa un declive en el % de las plantas infectadas, cambios que pueden deberse, probablemente, al método utilizado. El mosaico, como ya se ha mencionado, es muy patente en los primeros estados del desarrollo de la planta, pero después se vuelve difuso acompañado de un amarilleo. Además las plantas después de la polinización están sucias debido a la escasez de lluvias durante ese período; la expresión de síntomas disminuye en las hojas más viejas. El declive de plantas infectadas que se observa en los cultivares en el año 1989, pudo estar influenciado por el pedrisco, que dificultó el muestreo.

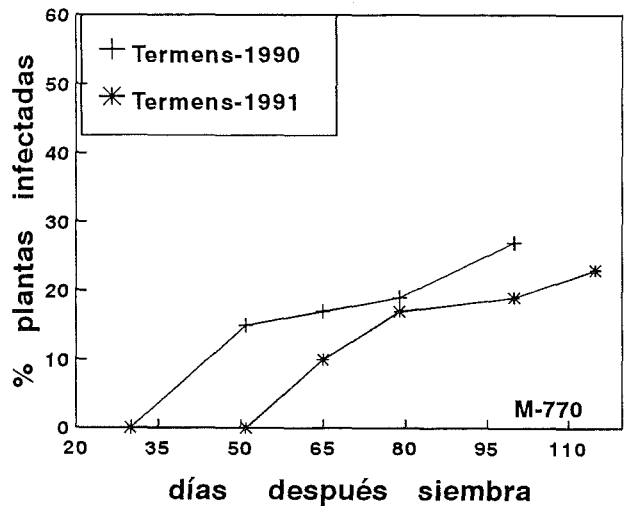
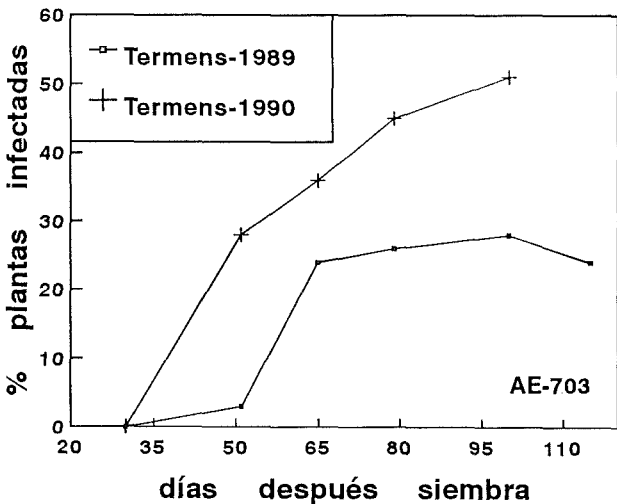
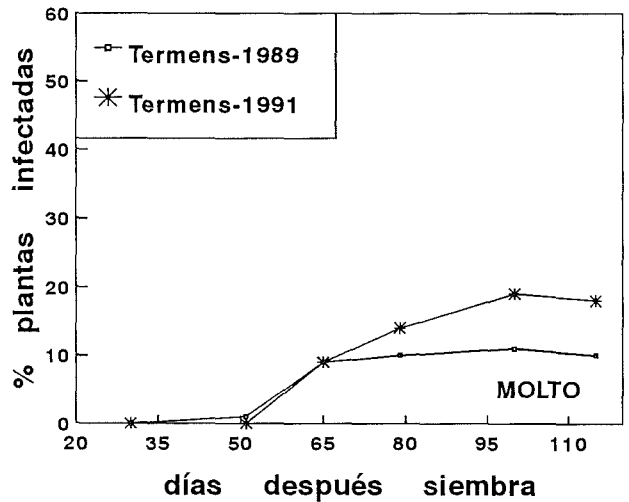
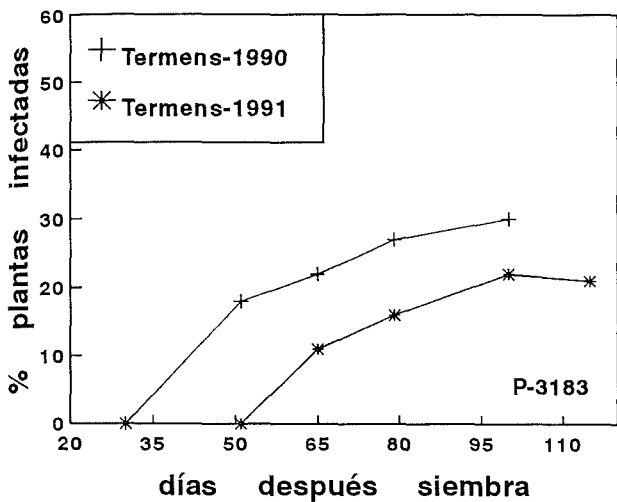
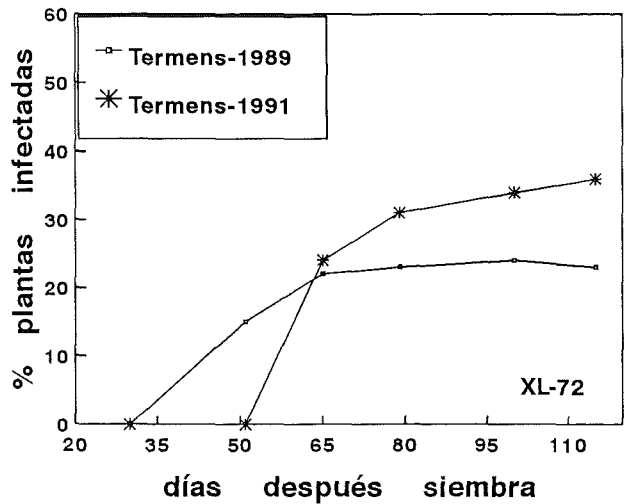
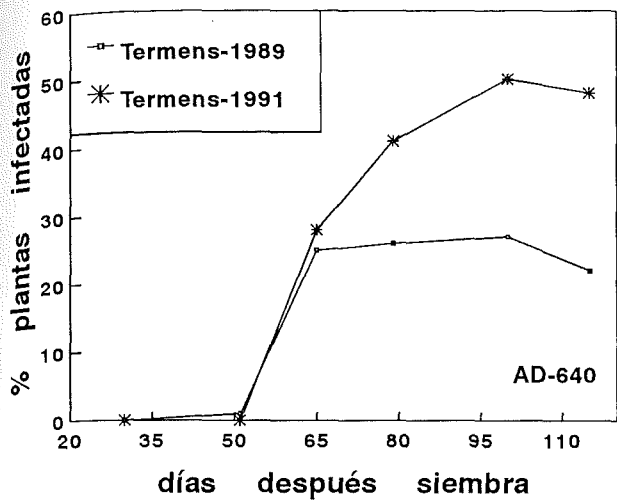


Figura 6. Evolución en el tiempo del porcentaje de plantas infectadas por MDMV, de forma natural, en distintos cultivares.

3. 1. 2. Presencia en campos comerciales

El estudio de la presencia de MDMV en campos comerciales se llevó a cabo en 1991 y fue totalmente dirigido en campos próximos a los campos experimentales o en zonas donde se observaron campos con síntomas de mosaico. Las muestras se recogieron cuando el cultivo del maíz se encontraba en el estado de llenado de grano.

El diagnóstico se realizó mediante ELISA y como testigos positivos los indicados en el apartado anterior.

Tabla 9. Resultados de la presencia de MDMV mediante ELISA en campos comerciales en 1991.

Origen	Número de muestras	Antisueros	
		MDMV-L	SCMV-D
Alcolege			
Maíz	2	+++	-
<i>S.halepense</i>	3	+++	---
Almacellas			
Maíz	1	+++	---
Baix Empurdà			
Maíz	1	+++	-
Sorgo	1	+++	-

+++ : positiva valor de la D.O. más doble del negativo; --- : negativo ; - : no realizado.

Aunque estos datos no dejan de ser puntuales, indican la presencia uniforme de MDMV y la no presencia de SCMV-D en las muestras analizadas.

3. 2. Características de los aislados

3. 2. 1. Transmisión mecánica: condiciones óptimas

Este estudio se realizó con el aislado MDMV-L. Los análisis de la varianza se realizaron con el porcentaje de plantas infectadas del último recuento, a excepción del ensayo del estado fenológico de la planta a inocular, en el que se consideraron todas las fechas de recuento y con la transformación indicada en el apdo. 3. 1.

Tabla 10. Medias de los ensayos de transmisión mecánica: respuesta de los distintos cultivares, estado fenológico planta, diluciones y tampón de extracción.

Ensayo	Medias		
Cultivares	M-770	96,07	a
	Futuro	86,94	a
	AD-640	79,45	a
	Moltó	87,14	a
	P-3183	87,96	a
	AE-703	81,69	a
	XL-72	85,69	a
	G-4507	89,05	a
Estado fenológico	1 hoja	62,5	b
	2 hojas	75,5	a
	3 hojas	37,2	c
	4 hojas	24,0	d
	5 hojas	22,2	d
Diluciones	1:2	60	a
	1:10	31	b
	1:5	29	b
	1:20	9	c
	1:50	4	d
	1:10 ²	2	d
	1:2x10 ²	0	
	1:10 ³	0	
	1:5x10 ³	0	
1:10 ⁴	0		
Tampón extracción	F+M	41	a
	F	29	b
	AD	27	b

Medias con la misma letra no presentan diferencias a un nivel de significación $\alpha < 0,05$ en la prueba de DUNCAN. F+M: tampón fosfato Na-K más mercaptoetanol; F: tampón fosfato; AD: agua destilada.

Los ocho cultivares mostraron la misma respuesta frente a la inoculación del virus (Tabla 10). La aparición de síntomas tuvo lugar a los 10 días postinoculación a excepción de los cvs. Moltó y M-770 en que se retrasó tres días (Figura 7); pero en todos los casos la aparición de síntomas se encuentra dentro del nivel de tolerancia intermedio indicado por Thompson y Herbert (1970) (susceptibles 4,7- 7,3 días; resistentes 18-31 días). Estos mismos autores indican que la infección para susceptibles es del 38- 75% y para resistentes entre 0-21%, lo que implicaría que según este criterio todos los cultivares probados serían susceptibles. Indicar, no obstante, que en caso del G-4507 en otros ensayos los síntomas aparecieron a los 8 días postinoculación. Otro punto que destacan estos mismos autores en su estudio es la mayor intensidad de síntomas en cvs. susceptibles que en resistentes, diferencia no observada en los cultivares ensayados; ya que todos presentaron un mosaico sistémico.

Seifers (1984) determinó en sorgo el efecto de la edad de la hoja en el % de plantas infectadas, indicando que este es mayor cuando la inoculación tiene lugar en la primera hoja 6 días después de la emergencia de la planta, en la segunda dos días después y en la tercera 14 días después de la emergencia de la planta. En el ensayo del estado fenológico se ha determinado que la aparición de síntomas se da antes en plantas inoculadas en estados de 2, 1, 3 hojas (Figura 8), y que la infección es también mayor en estas plantas que en las inoculadas en 4 y 5 hojas. Otro punto a destacar es que la expresión de síntomas fue mayor en las plantas inoculadas en los estados más jóvenes.

La dilución punto final se sitúa entre 10^{-2} y 10^{-3} (Tabla 10), por debajo de la determinada por otros autores 10^{-5} : Williams y Alexander (1965); 10^{-3} - 10^{-4} : Tomic y Ford, (1974). La mejor dilución es la 1:2; no existen diferencias significativas entre las dos diluciones siguientes (1:5 y

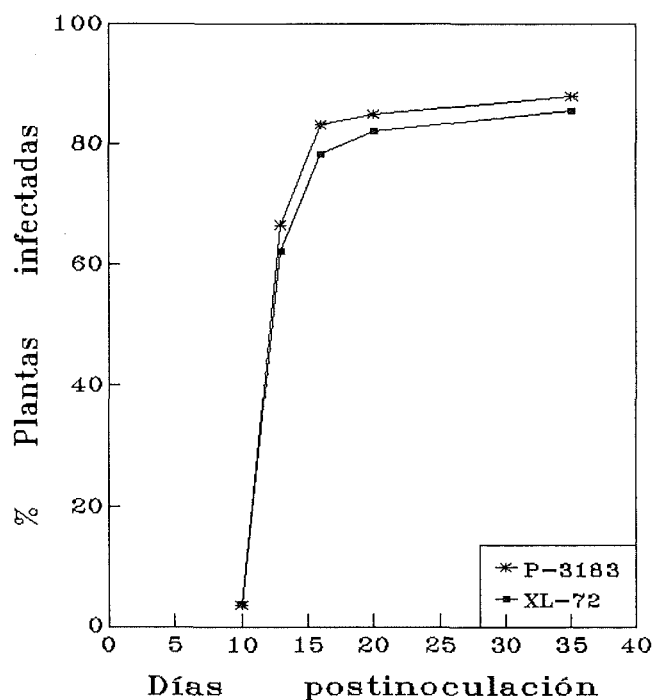
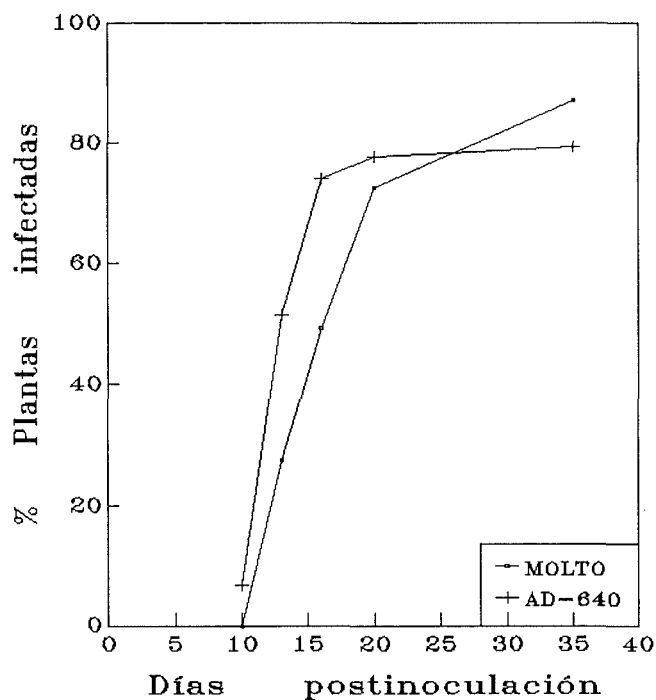
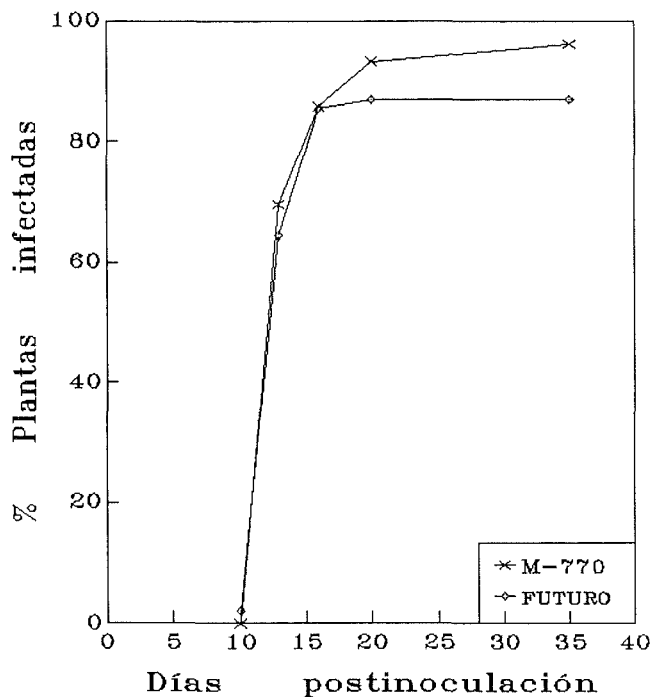
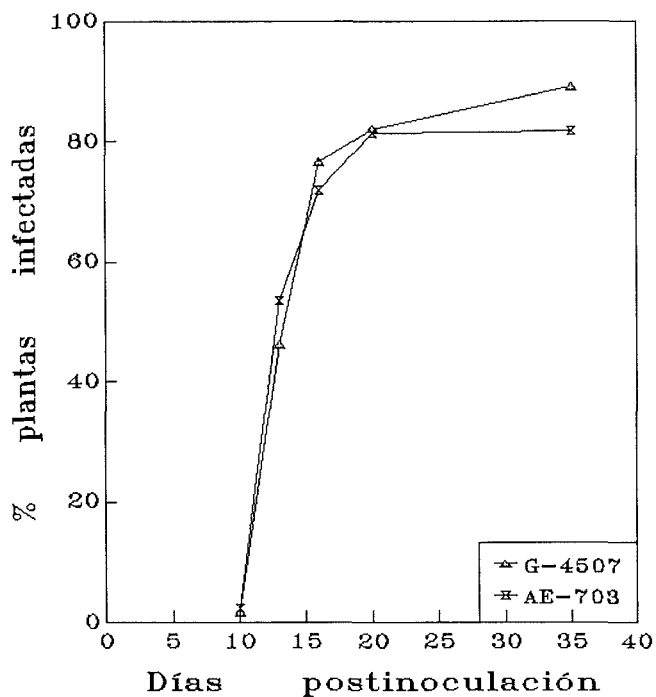


Figura 7. Tiempo de aparición de síntomas y porcentaje de plantas infectadas en los cvs G-4507, AE-703, Moltó, AD-640, M-770, Futuro, P-3183 y X1-72 inoculados con el virus.

1:10).

En la Figura 9 se representan los cambios de infectividad con el tiempo de postinoculación en la fuente del inóculo. Para la elaboración de la misma se ha calculado el incremento relativo de plantas infectadas ($\Delta = \frac{IN - II}{II} \times 100$) donde IN = % pl. infectadas; II = % pl. infectadas en la fuente de inóculo). El período óptimo para la extracción de inóculo se sitúa entre 10 y 20 días postinoculación; estos resultados son similares a los obtenidos por Seifers (1984) en sorgo, que comprobó que este tiempo se sitúa a los 10 días. Tu y Ford (1969) también encuentran que la infectividad decrece con la edad de la planta e indican que este declive puede ser debido a que con el tiempo hay menos partículas virales libres y mayor proporción de partículas agregadas en inclusiones (Krass y Ford, 1969). Otro factor, a tener en cuenta en este declive, es que con la edad de la planta la eficacia en la extracción del inóculo puede ser menor debido al incremento de la cantidad de fibra de la misma.

El número de plantas infectadas fue mayor, cuando el inóculo se extrajo en tampón fosfato Na-K más mercaptoetanol (Tab. 10), los otros dos no presentan diferencias significativas entre ellos. No obstante, el hecho de que se obtuviera % de transmisión bastante similares con agua, y la alta toxicidad del mercaptoetanol, llevó a realizar un ensayo con los mismos tampones pero reduciendo el n° de plantas a inocular (32 por tratamiento) y aplicando primero el inóculo extraído con agua; el resultado de este ensayo fue el siguiente : agua 68%, tampón fosfato 70%, tampón fosfato más mercaptoetanol 76%. Estos resultados indican que para inoculaciones rutinarias y de pequeño volumen se puede utilizar el agua y para extracciones de inóculo voluminosas y con gran número de plantas a inocular era mejor el tampón fosfato más el mercaptoetanol.

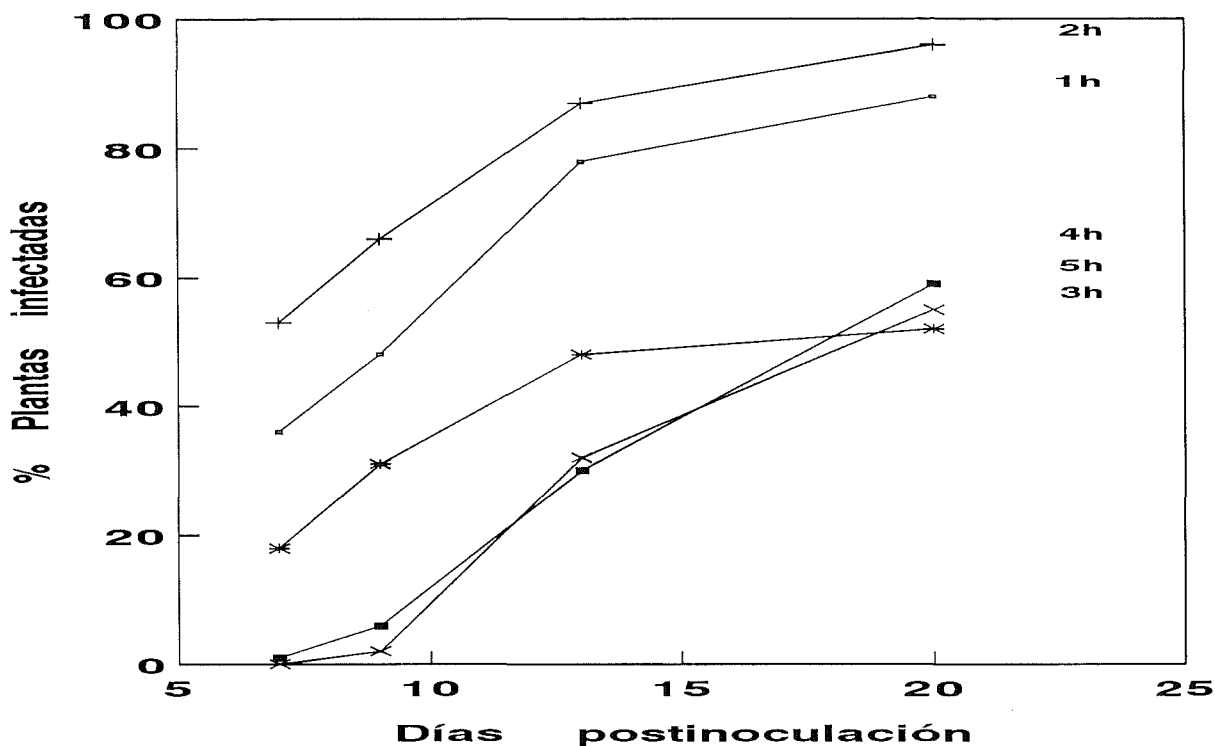


Figura 8. Tiempo de aparición de síntomas y % de plantas infectadas según el estado fenológico de la planta en el momento de la inoculación.

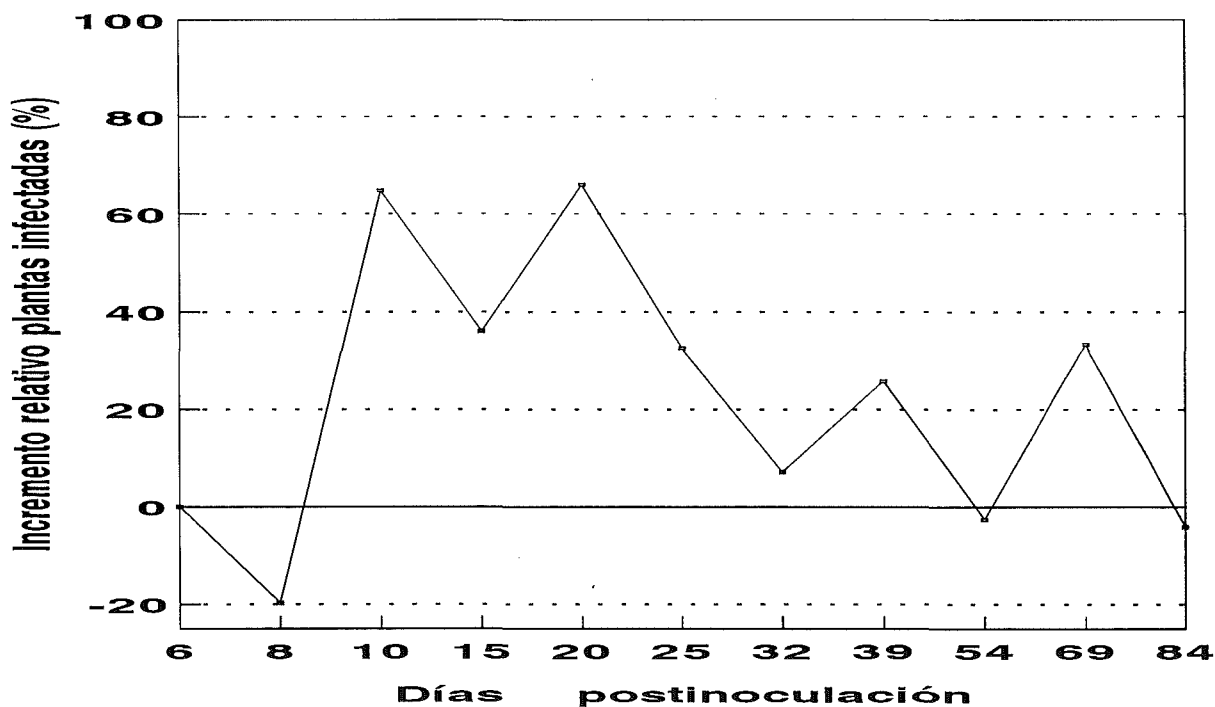


Figura 9. Cambios de infectividad con el tiempo de postinoculación en la extracción del inóculo.

3. 2. 2. Transmisión por pulgones

En la Tabla 11 se resumen los resultados de las transmisiones con los dos aislados y del estudio comparativo llevado a cabo para el aislado MDMV-L por las distintas especies en relación a *R. padi*, que confirma la eficiencia de transmisión por las distintas especies. Los porcentajes de transmisión son ligeramente inferiores en el caso del aislado MDMV-G. *S. graminum* es la especie que transmite el virus con mayor eficiencia seguido de *R.maidis* y, *S. avenae* es el vector que lo transmite con menor eficiencia.

Tabla 11. Resultados en porcentajes de la transmisión por pulgones de los aislados MDMV-L y MDMV-G.

Especies	Aislados		
	MDMV-G	MDMV-L	
<i>Rhopalosiphum padi</i>	24,2	27,2	a
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	42,8	44,0	44/8
<i>Schizaphis graminum</i>	61,2	66,6	66/40
<i>Sitobion avenae</i>	13,3	20,0	4/15

a: estudio comparativo con las distintas especies frente a *R. padi*, el denominador transmisión con esta especie, numerador transmisión con la especie indicada.

La mayor eficiencia de transmisión de MDMV por *S.graminum* se ha puesto de manifiesto para otros aislados de MDMV (Shaunak y col., 1973; Louie y col., 1975; Ford y col., 1989).

Thongmeearkon y col. (1976) no detectan diferencias entre *R.padi* y *R.maidis* como transmisores de la cepas A de MDMV y SCMV-MDB, en cambio Ford y col. (1989) indican que el primero es más eficiente que *R.maidis*.

Louie y col. (1975) en su estudio comparativo con ocho especies de pulgones y las cepas A, C, D, E, F de MDMV y

SCMV-MDB, encuentra que *R.padi* no es transmisor de las cepas A, D y E y que *S.avenae* no lo es de las cepas D y F de MDMV y de SCMV-MDB. Un aislado francés de MDMV es transmitido por *R.padi* pero no por *S.avenae* (Kerlan y col., 1974), esta especie también ha sido citada como más eficiente que las dos especies de *Rhopalosiphum* aunque no especifican que cepas (Ford y col., 1989).

3. 2. 3. Transmisión por semilla

3. 2.. 3. 1. Infección en las plantas madre

Durante los dos años se obtuvo semilla híbrida; en el año 1991 no se pudo obtener semilla con parental femenino MO-17 debido a la no coincidencia con el parental masculino.

En la Figura 10 se representa la evolución del % de plantas infectadas en las dos líneas puras en los dos años de estudio. En 1990 se observa una mayor separación que en 1991, entre testigos e inoculadas, en el muestreo después de la inoculación del virus. Este hecho puede deberse a que a que la infección natural en el momento de la inoculación era elevado y, además, en el campo se observó una elevada presencia de *S. halepense* con síntomas muy severos de MDMV. Las dos líneas, B-73 y MO-17, se comportan de forma similar frente a la inoculación del virus, pero MO-17 presentó en los dos años de estudio un mosaico más patente acompañado de un fuerte amarilleo.

En el ensayo de transmisión mecánica que se llevó a cabo en el último recuento de las plantas infectadas, se recuperó el virus de todas las plantas que mostraban síntomas (datos no mostrados).

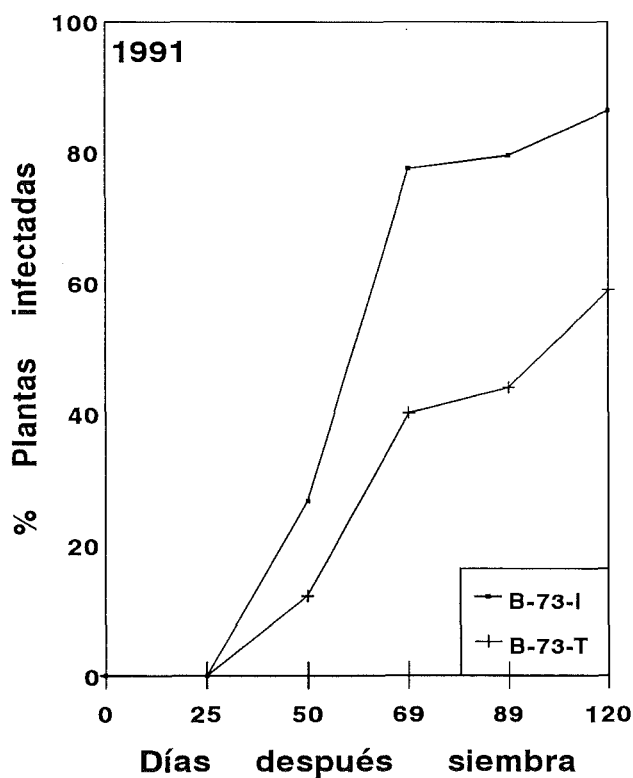
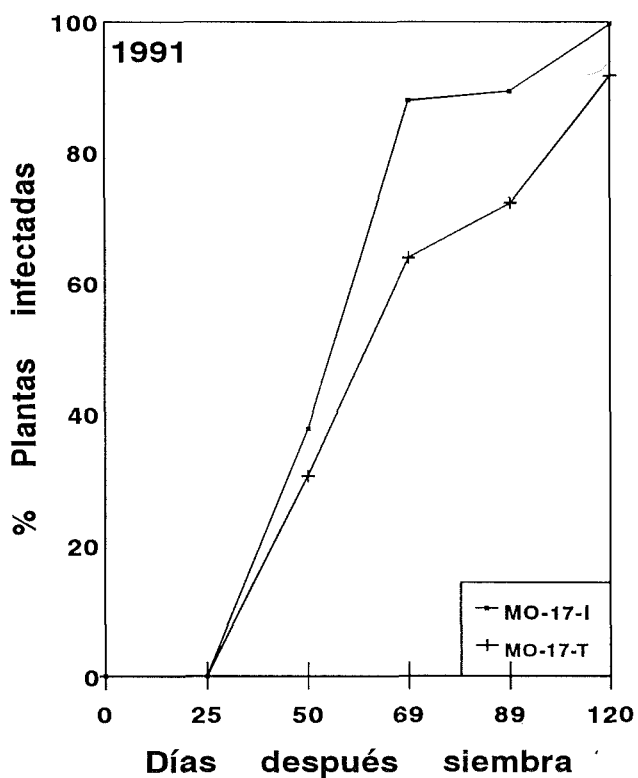
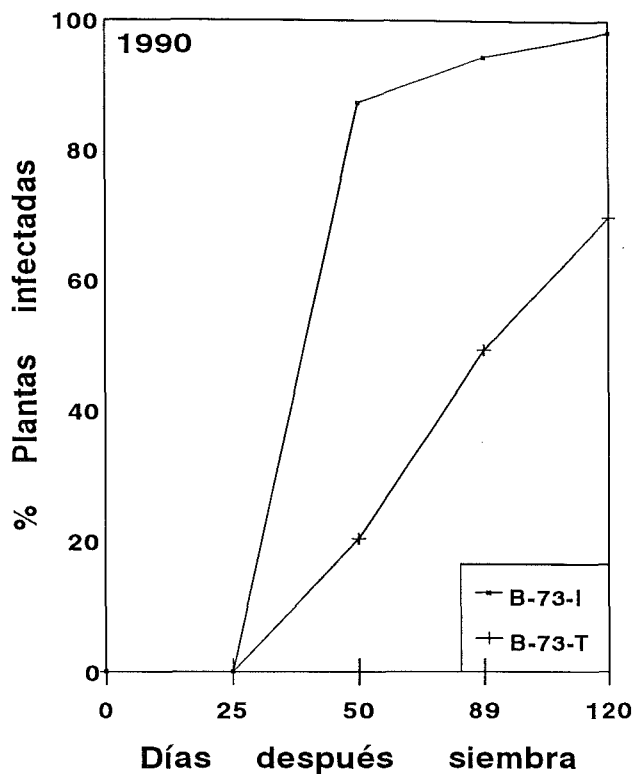
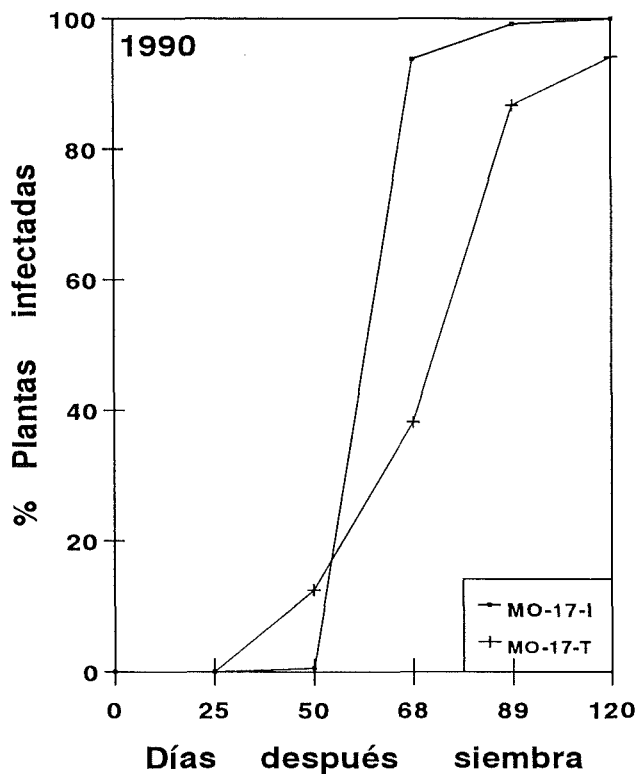


Figura 10. Evolución en el tiempo del porcentaje de plantas infectadas en las líneas puras MO-17 y B-73 inoculadas y no inoculadas con MDMV. I: inoculadas; T: no inoculadas.

3. 2. 3. 2. Transmisión a la descendencia

Se sembraron un total de 5184 semillas obtenidas durante el año 1990 y 1152 de las obtenidas al año siguiente. La única sintomatología observada en las plantas fue amarilleos que también se observaron en los testigos (Cv.G-4507). No obstante con algunas de las plántulas que presentaban estos síntomas más acusados se realizaron transmisiones mecánicas al cv. G-4507 y ELISA con el antisuero anti MDMV-L, los resultados de estos se muestran en la Tabla 12.

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.

Parental	T	S	TM	ELISA	Reducción en la nascencia	
					1990	1991
B-73*MO-17	I	7	-	-	8,5	2,2
B-73*MO-17	N	3	-	-		
B-73	I	2	-	-	6,7	11,3
B-73	N	2	-	-		
MO-17*B-73	I	6	-	-	20,3	-
MO-17*B-73	N	2	-	-		
MO-17	I	4	-	-	32,8	34,6
MO-17	N	7	-	-		

T=Tratamiento; I= Inoculadas; N= Testigos; S=Plantas con amarilleos; TM=Transmisión mecánica ; -= negativo; descensos relativos de nascencia calculados según: $[(I-T):T] \times 100$;

Los resultados obtenidos indican que la transmisión por semilla de estos aislados de MDMV es inferior a las citadas por Shepherd (1965) del 0.06-0,44 %; Boothroyd (1978) 0,5 % en maíz dulce. Y que en caso de que se hubieran probado más semillas y que se obtuviese un resultado positivo, las tasas de transmisión estarían más próximas a las encontradas por Williams y col. (1968) y Mikel y col.

(1984) del 0.006 %; o tasa de transmisión nula como las citadas para éste mismo virus por Panayotou (1981).

En la Figuras 11 se representa la menor nascencia de la semilla entre parentales inoculados y no inoculados; y en la Tabla 12 las reducciones relativas en porcentajes de parentales inoculados y no inoculados. Las semillas más afectadas son las de MO-17 en los dos años, tanto la línea pura como el híbrido, las diferencias que se observan entre las semillas obtenidas durante los dos años pueden ser debidas a diferencias en las condiciones de maduración de la semilla.

Panayotou (1981) y, Stakic y col. (1984) comprobaron una reducción en el crecimiento de las raíces y en la emergencia del brote en semillas cuyos parentales habían sido afectadas por MDMV, lo que representaría un efecto perjudicial en la nascencia de las semillas.

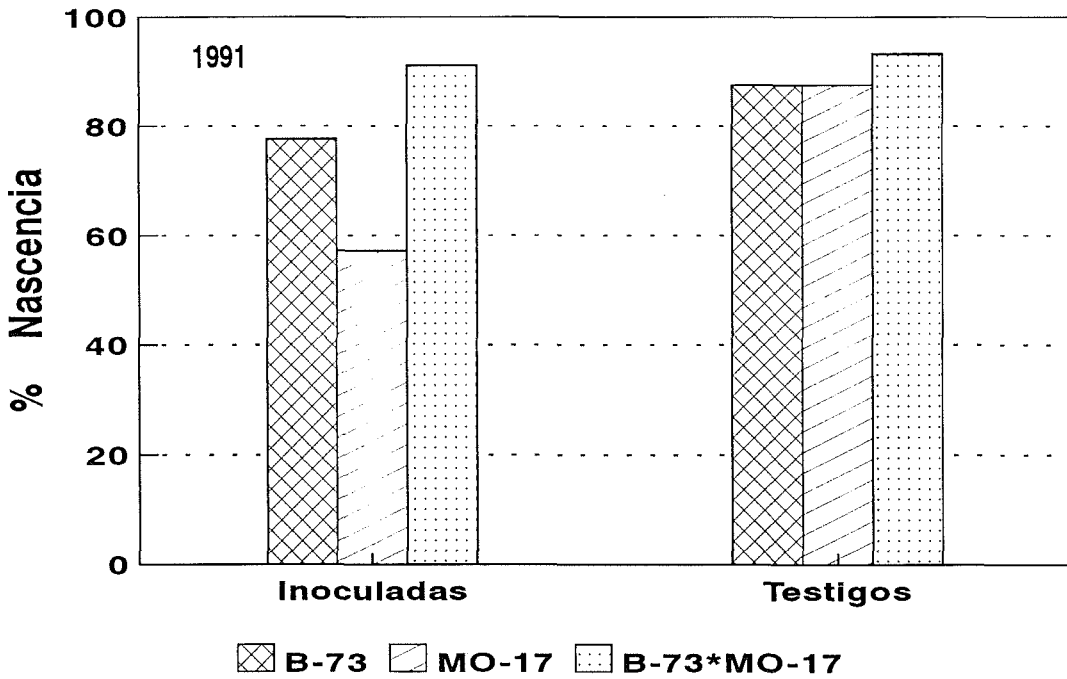
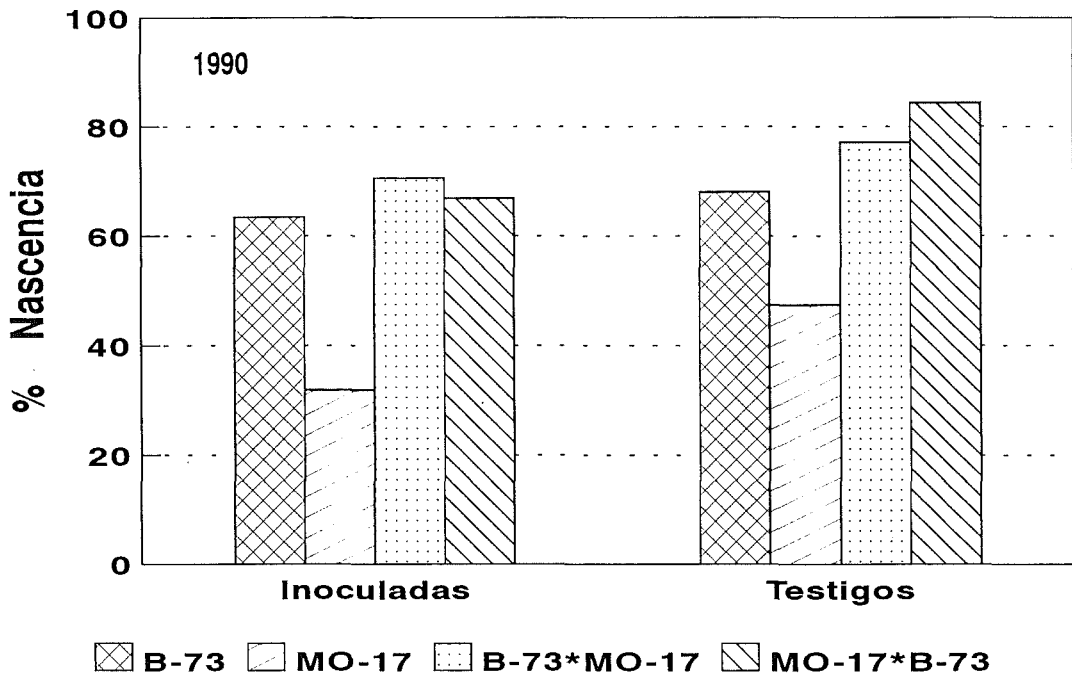


Figura 11. Nascencia de las semillas procedentes de parentales inoculadas y no inoculados con el virus. T: no inoculado; I: inoculado.

3. 2. 4. Huéspedes

Se probaron especies que forman parte de la flora arvense de los campos de maíz en Cataluña y de los márgenes de los mismos (Izquierdo 1985), así como diferenciadoras de los virus del subgrupo de SCMV (Tosic y col., 1990; Persley y col., 1985). La determinación de los huéspedes se realizó por inoculación mecánica en el estado de 2-4 hojas y reinoculación a maíz cv.G4507 de todas aquellas especies que al cabo 20-30 días postinoculación no mostraron síntomas o éstos eran confusos. El tampón de extracción fue agua destilada en la proporción 1:2 (p/v). El número de plantas a ensayar se vio reducido, en algunos casos, por la baja nascencia de las semillas y en otros por la escasez de las mismas.

En primer lugar se realizó un estudio comparativo, con los aislados MDMV-L, MDMV-G y MDMV-Gs utilizando la mayor parte el juego de cvs de Sorgo y el cv. de *A. sativa* (Tosic y col., 1990) diferenciadores de los cuatro virus del subgrupo del SCMV, también se incluyeron *Sorghum halepense*, y dos cvs. de *Sorghum bicolor* cultivados en Cataluña.

En la tabla 13 se detallan las reacciones de los aislados MDMV-L, MDMV-G, y MDMV-Gs. MDMV-G indujo una reacción distinta a los otros dos aislados en cv. TX2786, por ello se hizo una comprobación posterior conjuntamente con MDMV-L. El resultado fue inesperado; ya que MDMV-G no infectó a este cultivar y la reacción en MDMV-L fue un mosaico difuso. Esta nueva reacción pudo estar influenciada por que la procedencia de las semillas era distinta, de muy baja nascencia (11%) y la época en que se llevó a cabo, invierno, distinta a la primera realizada en primavera; una nueva confirmación de estos resultados no se ha podido llevar a cabo por falta de semillas del cv.TX2786.

En los estudios realizados por Tosic y col. (1990) todos

los aislados de MDMV inducen mosaico en cv. TX2786, también SCMV-A. JGMV induce en este cv. un mosaico difuso y no es infectado por SrMV. Persley y col. (1985) hacen una recopilación de los distintos síntomas obtenidos en distintos países, con distintos aislados algunos procedentes de Europa, los síntomas son variables pero ninguno es asintomático en este cv.. Las reacciones con los otros cultivares fueron similares a las obtenidas por Totic y col. (1990) y a las recopiladas por Persley y col. (1985). No obstante estos resultados indican que los tres aislados estudiados estarían dentro de MDMV, ya que infectan a *S. halepense* y no *A.sativa*. La distinta reacción de MDMV-G en TX2786 podría ser atribuida a que se tratase de un aislado menos virulento.

Se consideró interesante detectar, a nivel de huéspedes, la posible variabilidad entre aislados. Por lo que se continuó el estudio comparativo con los aislados MDMV-L y G. Se probó la susceptibilidad de los mismos con *Bromus rubens* por su susceptibilidad a ciertos aislados de la cuenca mediterránea (Kerlan y col., 1974; Antignus, 1987) y la no-susceptibilidad con 10 aislados americanos de MDMV-A (Totic y Ford, 1972). También se ensayaron con *Lolium rigidum* especie no citada por otros autores y abundante en nuestras latitudes, y con otras especies que figuran en la Tabla 13. Los resultados obtenidos con *B.rubens* coinciden con los obtenidos por los autores mencionados con otros aislados de MDMV-A de la cuenca mediterránea. La reacción en *L.rigidum*, fue asintomática, siendo esta la primera vez que se cita la susceptibilidad de esta especie frente a MDMV. Estos resultados indican que estas dos especies podrían actuar como reservorios invernales de MDMV.

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.

ESPECIES	AISLADOS											
	MDMV-G			MDMV-L			MDMV-Gs					
	I	RT	S	I	RT	S	I	RT	S	I	RT	S
<i>Sorghum bicolor</i>												
cv. ATLAS	34/36	--	MNn	27/31	--	MNn	36/39	--	MNn	36/39	--	MNn
cv. RIO	32/34	--	MPN(n)	31/33	--	MPN(n)	32/39	--	MPN(n)	32/39	--	MPN(n)
cv. BT398	33/35	--	MP	25/25	--	MP	40/41	--	MP	40/41	--	MP
cv. TX2786	0/11	10/25	as	4/5	--	MPN	8/10	--	MPM	8/10	--	MPM
cv. NECTAR	21/23	--	M(PN)	23/23	--	M(PN)	2/2	--	M(PN)	2/2	--	M(PN)
cv. DORADO	1/2	--	M(PN)	2/2	--	M(PN)	20/20	--	M(PN)	20/20	--	M(PN)
<i>Sorghum halepense</i>	35/38	--	M	37/39	--	M	31/36	--	M	31/36	--	M
<i>Avena sativa</i>												
cv. CLINTLAND	0/52	0/40	-	0/53	0/40	-	0/52	0/40	-	0/52	0/40	-
cv. SALADIN	0/60	0/40	-	0/60	0/40	-	--	--	--	--	--	--
<i>Bromus rubens</i>	14/21	15/16	mo	20/21	12/14	mo	--	--	--	--	--	--
<i>Digitaria sanguinalis</i>	21/24	--	M	24/24	--	M	--	--	M	--	--	M
<i>Echinochloa crus-galli</i>	3/20	--	M	5/20	--	M	--	--	M	--	--	M
<i>Lolium rigidum</i>	0/20	14/14	as	0/20	14/14	as	--	--	as	--	--	as
<i>Panicum capillare</i>	20/21	--	M	20/20	--	M	--	--	M	--	--	M
<i>Paspalum dilatatum</i>	13/17	--	M	14/17	--	M	--	--	M	--	--	M
<i>Setaria verticillata</i>	17/20	--	M	16/17	--	M	--	--	M	--	--	M

I: infección, denominador plantas inoculadas y en el numerador plantas con síntomas; RT: transmisión mecánica al cv. G-4507; S: síntomas; M:mosaico; mo: moteado; N:necrosis hojas viejas; n:necrosis hojas nuevas; P:estrias purpura hojas viejas; p:estrias púrpura hojas nuevas,(): no siempre; as:asintomático; -: negativa reinoculación; --:ensayo no realizado.

D. sanguinalis, *E. crus-galli*, *S. verticilata*, *P. capillare* y *Paspalum dilatatum* son especies susceptibles a los virus del subgrupo de la caña de azúcar (Rosenkranz, 1977, 1980, 1987; Tosic y Ford, 1972; Kerlan 1974). Así, se muestra con los aislados estudiados en este trabajo. Las cuatro primeras son especies abundantes de la flora arvense de los campos de maíz catalanes y pueden contribuir por su carácter anual a un aumento en la fuente de inóculo. *Paspalum dilatatum*, junto con *S. halepense*, pueden constituir reservorios permanentes del virus por su naturaleza perenne.

En la Tabla 14 se resume la susceptibilidad de distintas especies de gramíneas al aislado MDMV-L. Solamente una población de *Aegilops ventricosa* (Granada) fue susceptible a este aislado; la experiencia se repitió en dos ocasiones para comprobar el resultado. La variabilidad entre poblaciones podría ser la causa de esta diferente reacción dentro de la especie (C. Soler, comunicación personal). No se conocen citas de la susceptibilidad del género *Aegilops* frente a MDMV, únicamente se conoce la baja susceptibilidad de *A. cylindrica* Host. de un aislado americano de MDMV-A (Tosic y Ford, 1972).

La no infección de este aislado a las distintas especies de *Avena* indican que este aislado no es un aislado de JGMV (McDaniel y col., 1985; Tosic y col., 1990).

En el caso de las especies del género *Bromus*: *B. alopecurus*, *B. diandrus* y *B. fasciculatus*, no se conocen estudios previos, por lo que es la primera vez que son ensayadas acerca de su susceptibilidad a MDMV. En el caso de *B. squarrosus* los resultados del presente trabajo no coinciden con los obtenidos para otros aislados de MDMV (Tosic y Ford, 1972; Rosenkranz, 1977); la susceptibilidad de *B. tectorum* coincide con la detectada para aislados húngaros (Gáborbányi y Duons, 1991), y norteamericanos de

Tabla 14. Resultados de la susceptibilidad de distintas especies de gramíneas al aislado MDMV-L

Especies	Plantas infectadas	Ensayo maíz	Síntomas
<i>Aegilops ovata</i>	0/84 ^{ab}	0/91	-
<i>Aegilops triuncialis</i>	0/40 ^c	0/52	-
<i>Aegilops ventricosa</i> (1)	37/42 ^c	49/50	mo
<i>Aegilops ventricosa</i> (2)	0/41 ^c	0/52	-
<i>Arundo donax</i>	0/7	0/18	-
<i>Avena barbata</i>	0/21	0/28	-
<i>Avena longiglumis</i>	0/21	0/28	-
<i>Avena fatua</i>	0/36	0/57	-
<i>Avena sterilis</i>	0/21	0/28	-
<i>Bromus alopecurus</i>	8/22	7/24	scon
<i>Bromus diandrus</i>	0/51	14/43	as
<i>Bromus fasciculatus</i>	0/21	3/30	as
<i>Bromus squarrosus</i>	0/21	0/21	-
<i>Bromus sterilis</i>	0/21	18/35	as
<i>Bromus tectorum</i>	0/21	17/21	as
<i>Dactylis glomerata</i>	0/21	0/28	-
<i>Echinaria capitata</i>	0/21	4/27	-
<i>Elymus caninus</i>	0/21	0/9	-
<i>Elymus curvifolius</i>	0/21	0/10	-
<i>Elymus elongatus</i>	0/21	0/12	-
<i>Festuca arundinacea</i> cv. TIMA	0/21	0/12	-
<i>Hordeum murinum</i> subsp. leporium	0/21	0/28	-
<i>Hordeum murinum</i> subsp. murinum	0/21	0/28	-
<i>Hordeum vulgare</i> cv. DOBLA	0/21	0/13	-
<i>Leptochloa dubia</i>	16/36	---	M
<i>Lolium multiflorum</i> cv. TEWERA	0/21	0/13	-
<i>Lolium multiflorum</i> cv. VITESSE	0/21	0/27	-
<i>Lolium perenne</i> cv. BRIGANTIA			
<i>Phalaris canariensis</i>	38/42	21/26	M
<i>Phleum phleoides</i>	0/17	0/13	-
<i>Phragmites australis</i>	0/9	0/15	-
<i>Triticum aestivum</i> cv. ANZA	0/21	0/13	-

a : numerador plantas que mostraron síntomas, denominador plantas inoculadas ;
b: suma de dos repeticiones y dos poblaciones; c: suma de dos repeticiones; M:
mosaico; mo: moteado; scon: síntomas poco patentes; as: asintomático; -:
negativo. (1): población procedente de Granada; (2): población procedente de
Segovia

MDMV (Tosic y Ford, 1972; Rosenkranz, 1983), sin embargo esta especie no es susceptible a un aislado francés (Kerlan y col., 1974).

Las especies del género *Bromus* podrían desempeñar un papel importante en la epidemiología de MDMV, al ser especies abundantes en las comunidades ruderales, de campos de cereales de invierno y frutales con nascencia a finales de octubre; tal momento coincide con la colonización del cereal por los pulgones procedentes del maíz (Pons, 1986; Comas y col., 1992).

La infección de *Echinaria capitata* por el aislado MDMV-L constituye la única referencia conocida acerca de la susceptibilidad de esta especie frente a MDMV y al ser una especie invernal podría actuar como reservorio del virus durante este período.

Los resultados obtenidos con las especies de los géneros *Elymus*, *Festuca*, *Hordeum*, *Leptochloa*, *Phalaris*, *Phleum*, *Phragmites* y *Triticum* coinciden con los obtenidos por Rosenkranz (1980, 1983, 1986) y Tosic y Ford 1972.

Las citas sobre la susceptibilidad *Lolium multiflorum* y *L. perenne* (Rosenkranz, 1983, 1986; Tosic y Ford 1972; Kerlan y col., 1974) son variables, debido a que los distintos autores utilizaron distintos cultivares.



Figura 12. Síntomas inducidos por los aislados MDMV-L y MDMV-Gs en distintos cultivares de Sorgo.

3. 2. 5. Citopatología y morfología de las partículas

En secciones ultrafinas de hojas de maíz infectadas con el aislado MDMV-G se observaron (Figura 13) las cuatro formas de inclusiones citoplasmáticas cilíndricas descritas por Edwarson (1984): rosetas (Fig.13 B5 y C); círculos (Fig. 13 B3 y C), agregados laminares (Fig. 13 B1 y A), agregados laminares cortos y curvados (Fig. 13 B4 y A).

Lesemann y col. (1992) encuentran una relativa uniformidad entre las inclusiones cilíndricas inducidas por cuatro aislados de MDMV. En las células infectadas con estos aislados observan rosetas, círculos, e indican que probablemente también agregados laminares cortos y curvados.

Un aislado MDMV-A (USA) induce además inclusiones en forma de aguja ("needle-like"). La primera referencia de este tipo de inclusiones, inducidas por MDMV, es de Krass y Ford (1969). La forma de este tipo de inclusiones, sin embargo, es muy similar al de las laminares descritas por Edwarson (1974) bajo nuestro punta de vista. En la figura 13A se observa la asociación de agregados laminares y laminares curvados con una roseta.

Las distintas formas de inclusiones citoplasmáticas están en un principio unidos al tubo central de la roseta y después se separan (Lesemann, 1988), este hecho podría influir en la observación de las inclusiones en forma de aguja dispersas en el citoplasma de las células infectadas, que no serían más que las laminares dispersas.

La expresión del gen que codifica para las inclusiones cilíndricas en un sistema heterogéneo *in vivo* y estudios inmunocitológicos podrían ayudar, en un futuro, a esclarecer la naturaleza de estas inclusiones en forma de aguja.

En este tipo estudios influyen múltiples factores como el estado de infección que podría ocasionar roturas de las inclusiones, número de muestras estudiadas etc. (Lesemann, 1988). Además Langenberg y col. (1973) encuentran que la forma de las inclusiones cilíndricas está influenciada también por el tipo de fijación.

Los resultados obtenidos indican, en principio, que este aislado no pertenecería a ninguno de las tres subdivisiones establecidas por Edwardson y col. (1984).

No se ha encontrado, en ninguna de las secciones examinadas, las inclusiones citoplasmáticas amorfas ni las inclusiones nucleares, si bien como se verá en el apartado 3. 2. 6., se halla presente uno de los genes que codifica para una de ellas. Teakle y col. (1989) atribuyen la no detección en tejidos infectados por otros potyvirus de las inclusiones nucleares, a que éstas no forman agregados estables.

En secciones inmunomarcadas con oro coloidal previamente tratadas con el antisuero anti MDMV-L sólo se marcaron partículas virales y ninguna de las inclusiones cilíndricas. Figura 14 B y C se observan madejas de partículas virales fuertemente inmunomarcadas con oro coloidal. En la parte superior la Figura 14 A rosetas en sección longitudinal y transversal.

Se observaron partículas virales en todos los tejidos de la planta: epidérmico, floemático, donde también se han detectado pinwheels en las células acompañantes del mismo (figuras no mostradas). No se han detectado partículas virales ni inclusiones en cloroplastos, mitocondrias o núcleo.

En la figura 15 se observan diferentes preparaciones de partículas virales a partir extracto crudo o purificados

de virus con diferentes tinciones: A: clarificado teñido con ác. fosfotúngstico; B: purificado parcial teñido con acetato de uranilo. El tamaño de las partículas oscila entre 720-780 nm. En la Fig. 15 D, E, F y G preparaciones a partir de purificaciones parciales. D madejas de partículas virales después de dos semanas almacenadas a -20°C; en E partículas hinchadas por la presencia de Mg^{2+} en el tampón. En F y G partículas inmunomarcadas con oro; en F con el antisuero diluido 1:1000 y G 1:100. En ésta última se observa un elevado ruido de fondo, no obstante la densidad de partículas de oro es mucho más elevado rodeando a las partículas virales.