

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

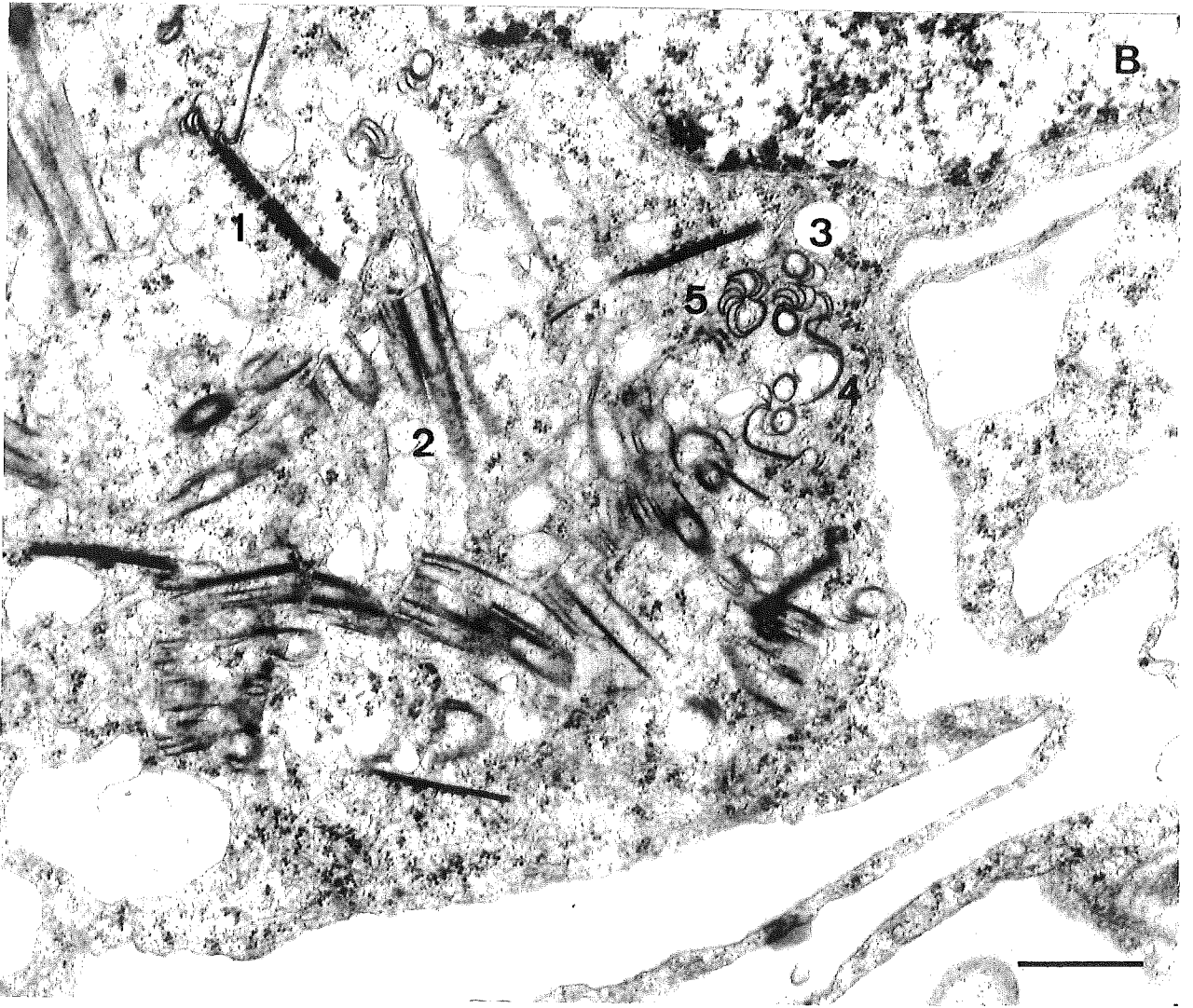
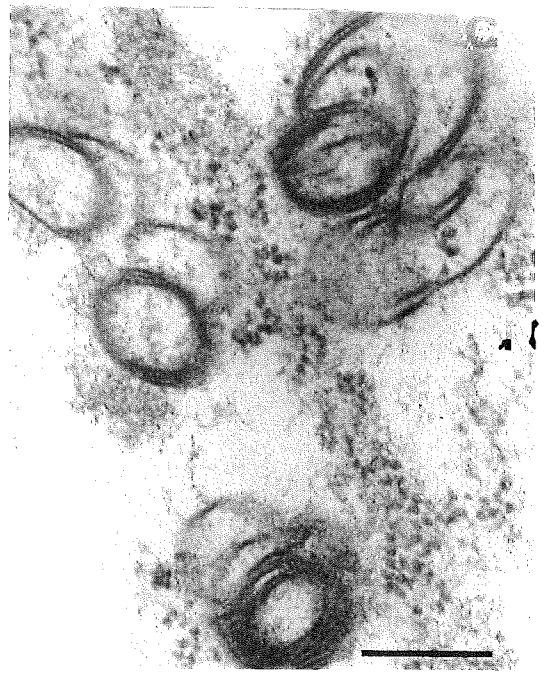
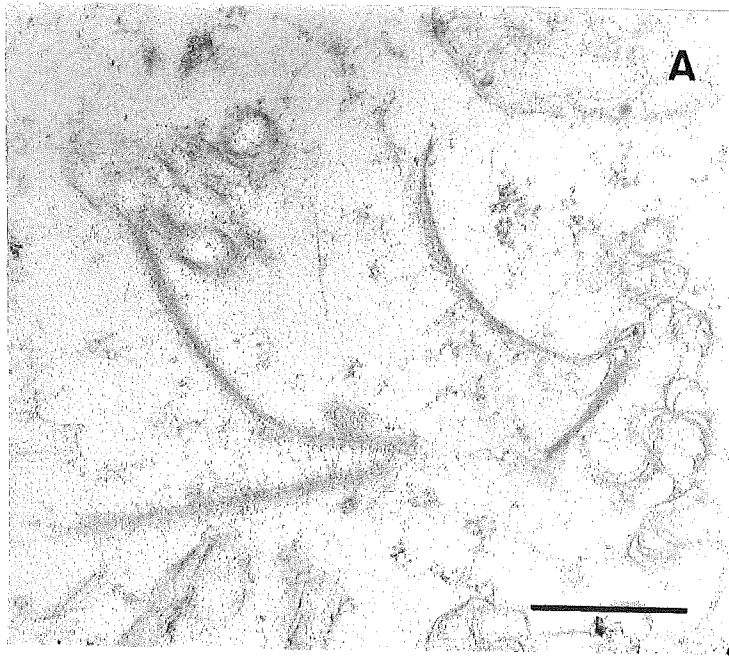


Figura 13. Células del mesófilo infectadas con MDMV-G. B5 y C: inclusiones en roseta; B3 y C: círculos; A y B1: agregados laminares; B4 y A: agregados laminares cortos y curvados. Barra en A y B 500nm; C 200nm.

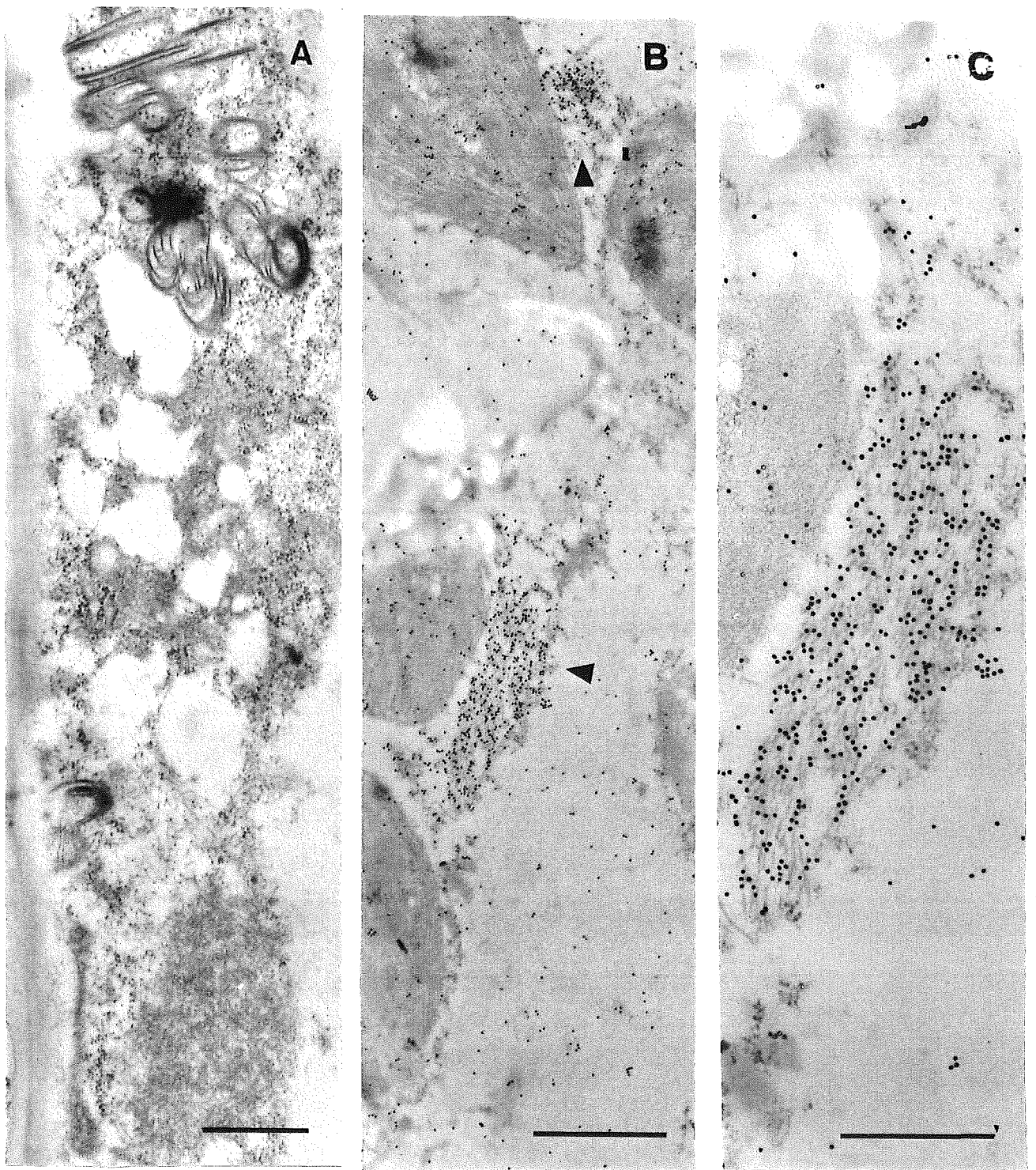


Figura 14. Células del mesófilo de maíz infectadas con MDMV-G; B y C madejas de partículas virales inmunomarcadas con oro coloidal; A: inclusiones en roseta en sección longitudinal y transversal. Barras en A y C 500nm; B: 1 μ m.

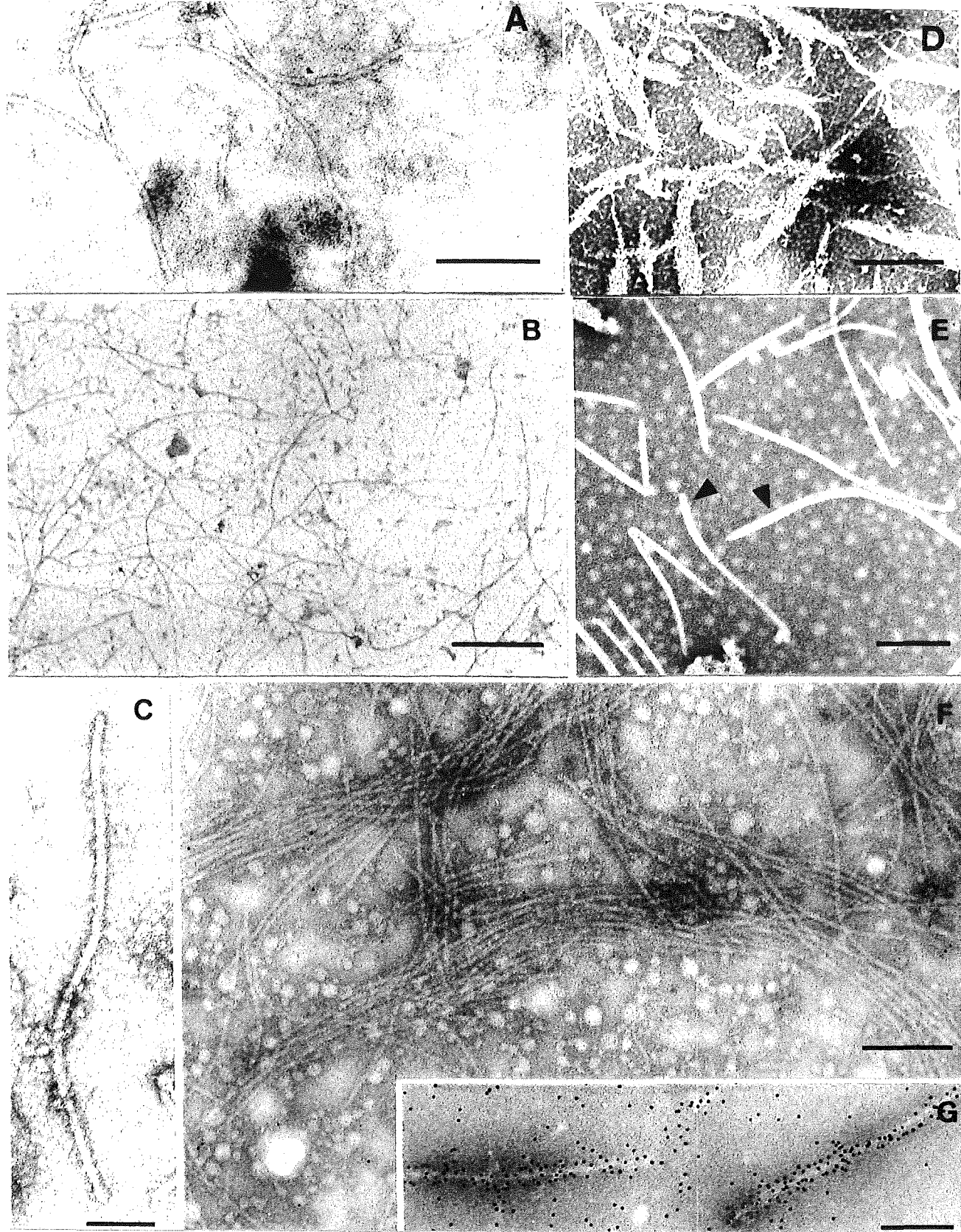


Figura 15. Partículas virales de MDMV de 720-780 nm. A y C preparaciones a partir de extracto clarificado teñido con ácido fosfotúngstico. B, D, E, F y G preparaciones a partir de purificaciones parciales, B teñidas con acetato de uranilo; D madejas de virus almacenadas a -20°C ; E partículas hinchadas por la presencia de Mg^2 en el tampón; F y G partículas inmunomarcadas con oro; F con el antisuero diluido 1:1000, G 1:100. Barras A,E,F,G 200 nm; B 500nm; en C 100nm; D 1 μm .

3. 2. 6. Secuencia de la región 3' del RNA viral.

El cDNA se sintetizó a partir del aislado MDMV-G, dadas las diferencias encontradas a nivel de huéspedes y citopatológicas entre este aislado y la cepa A de MDMV. El análisis de los productos de la PCR en geles de agarosa reveló la síntesis de cDNA de tres fragmentos de alrededor de 1,6, 1,2, y 0,4 pb, siendo la síntesis de los dos últimos más pobre, no se observó síntesis en los controles (Figura 16B).

La clonación se llevó a cabo a partir de los fragmentos de 1,2 y 1,6 pb. Los clones conteniendo poly (A) se identificaron por "T-track" (método "dideoxy" utilizando únicamente como inhibidor ddTTP). Dos clones contenían insertos de 1,6 pb (M13-MDMV-5 y M13-MDMV-8), mientras que un tercero contenía un inserto de solo 1,2 pb (M13-MDMV-r) (Figura 16C). La verificación de que estos clones eran complementarios al RNA viral se realizó mediante hibridación con las sondas sintetizadas a partir de los clones M13-MDM8 y M13-MDMr.

El análisis de la secuencia de estos clones ha indicado que M13-MDMV-5 y M13-MDMV-8 contienen 1570 nucleótidos excluyendo la poly (A), ambos contienen secuencia del cebador en el extremo 5' y longitudes distintas de poly (A) (Figura 17). Estos clones difieren en su secuencia en 5 nucleótidos (Tabla 15). M13-MDMV-r, contiene 1123 nt sin contar la cola de poly (A), el extremo 3' adyacente a ésta corresponde a una secuencia interna (posición 1102, Figura 18) dentro de los clones M13-MDMV-5 y M13-MDMV-8, y se extiende de la secuencia de éstos en 596 nucleótidos. En un examen detallado de la secuencia que precede al extremo 3' M13-MDMV-r, se observa la presencia de una zona muy rica en residuos de adenina, parece lógico asumir que el oligonucleótido de la primera cadena se hibridó en esta posición dando lugar a una aparente poly (A) (Fig.17) El

extremo 5' de los clones M13-MDMV-5 y M13-MDMV-8 se situó 200 nucleótidos más arriba de la posición esperada. En el caso del extremo 5' de M13-MDMV-r, se debió al uso de un oligonucleótido degenerado, hecho que además, pudo estar favorecido por la baja temperatura de hibridación.

A partir de los clones más arriba mencionados se determinó la secuencia de 2143 nucleótidos del extremo 3' del RNA del aislado MDMV-G (Fig. 18), cada nucleótido se determinó un mínimo de 4 veces en la región no solapante entre los clones, y un mínimo de ocho en el resto. En la secuencia final se eliminaron las secuencia del cebador de la síntesis de la segunda cadena del cDNA.

La elección de un nucleótido u otro en las transiciones detectadas entre los clones, se realizó por comparación con la secuencia de la proteína de cubierta y región 3' no codificante de MDMV-A, proporcionada amablemente por el Dr. J. M. Clark (antes de su publicación). En el caso de la transición en posición 618 se escogió T, porque ésta también se determinó en M-13-MDMr.

Tabla 15. Transiciones detectadas entre los clones M13-MDMV-5, M13-MDMV-8 y M13-MDMV-r.

Posición	clon	nt	aa	aa consenso
618	M13-MDM5	T	F	
	M13-MDM8	C	L	
	M13-MDMr	T	F	F
1196	M13-MDM5	A	E	
	M13-MDM8	G	K	K
1298	M13-MDM5	C	H	
	M13-MDM8	T	Y	H
1306	M13-MDM5	T	D	
	M13-MDM8	C	D	D
1543	M13-MDM5	A	P	
	M13-MDM8	G	P	P

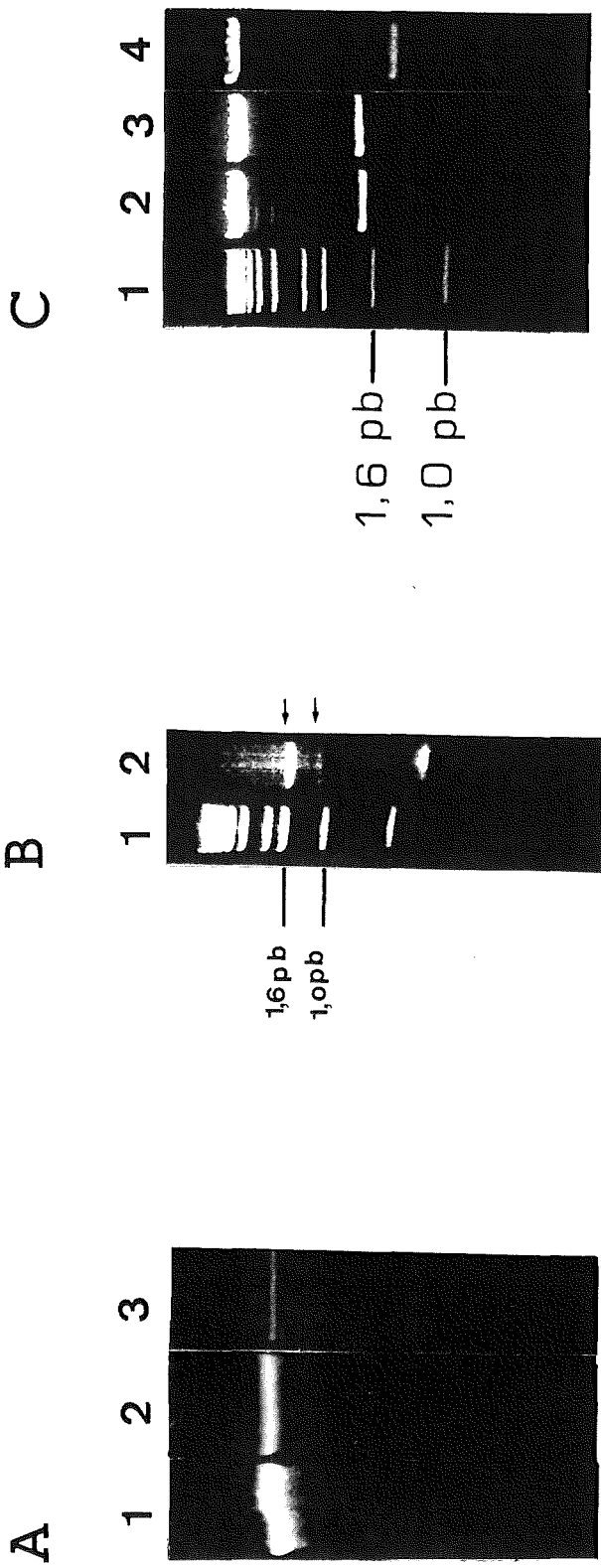
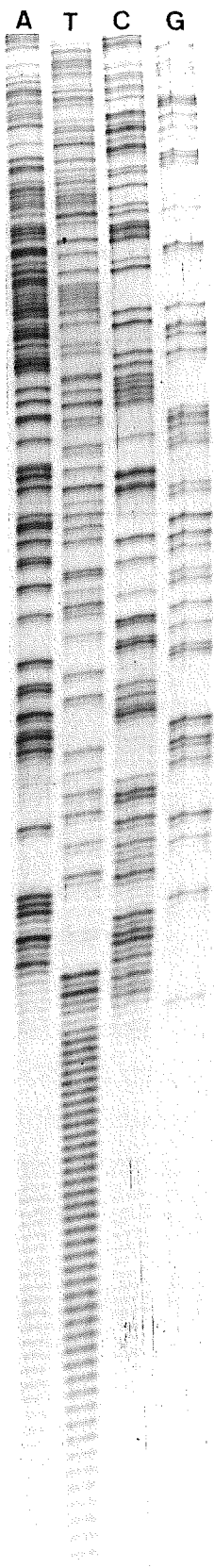
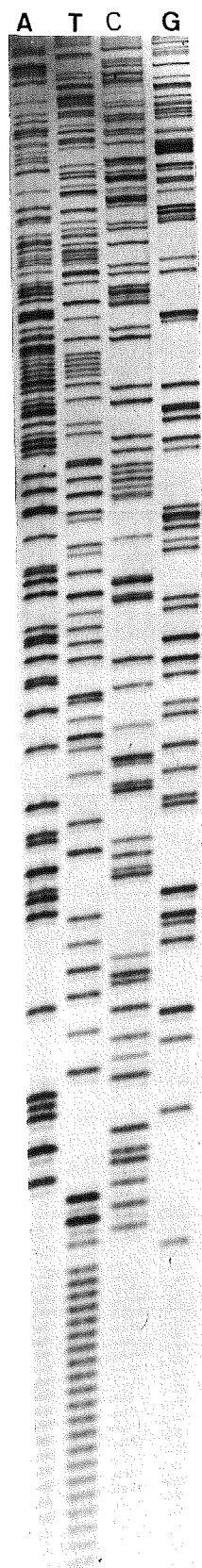


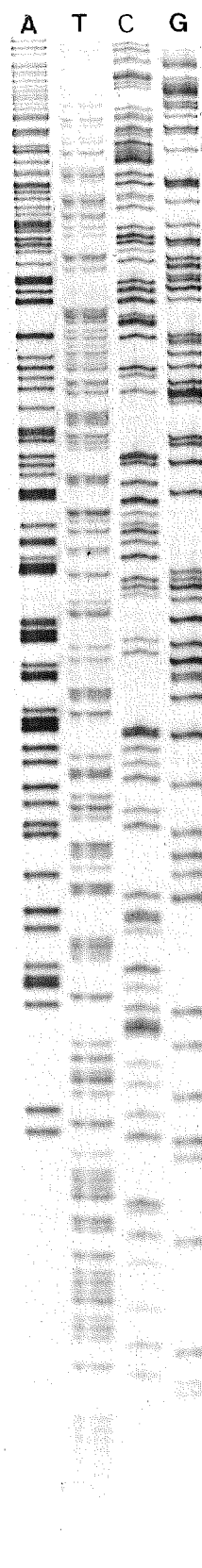
Figura 16. A: RNA purificado, 1: psbMV; 2: aislado MDMV-G; 3: aislado MDMV-L.- B: Síntesis de cDNA, 1: marcadores DNA; 2: cDNA sintetizado a partir del RNA del aislado MDMV-G.- C: Tamaño de los clones, 1: marcadores; 2: clon M13-MDM8; 3: M13-MDM5; 4: M13-MDMr.



M13-MDM5



M13-MDM8



M13-MDMr

Figura 17. Extremo 3' de los clones M13-MDM8, M13-MDM5, M13-MDMr.

El análisis por ordenador de la secuencia indicó la existencia de una única fase de lectura abierta (ORF) en la cadena positiva, el codón de paro (TGA) se localiza en la posición 1907. La región no codificante del extremo 3' tiene una longitud de 237 nt seguido de poly (A). Esta organización genética es la típica que presentan los potyvirus (Dougherty y Carrington, 1988; Riechmann y col., 1992)

3. 2. 6. 1. Lugar de procesamiento del gen de la proteína de cubierta

La determinación de la secuencia del N-terminal de la proteína de cubierta intacta determino el lugar de procesamiento entre el gen que codifica la proteína de cubierta y el de las inclusiones nucleares grandes (NIb). Este se sitúa en la posición 1033: Q/A (Fig. 18). El procesamiento a nivel de este dipéptido lo presentan otros potyvirus (Puurand y col.,1992; Gal-on y col.,1990; Robaglia y col.,1989; Laín y col., 1988) y es uno de los motivos que reconoce la proteasa NIa (Garcia y col., 1989a; Hellmann y col.,1988; Robaglia y col., 1989).

La secuencia de aminoácidos, determinados a partir de la proteína de cubierta coincide con los determinados a partir de la secuencia de nucleótidos. La longitud del gen que codifica para la proteína de cubierta es de 873 nt que codifican 291 aa. Su peso molecular calculado a partir de esta secuencia es de 32.682 daltons, el cual es aproximadamente el mismo que el determinado a partir de las partículas virales en geles SDS-PAGE al 15%. Posee el mismo número de nucleótidos que el aislado de MDMV-A (USA), cuya secuencia, como ya se ha mencionado anteriormente, fue proporcionada por el Dr. J. M.Clark.

```

P I E K T E A N K T R T F T A A P L E T L L A G K V C V D D F N N Q F Y S Q H L
ACCCATAGAGAAAACGGAGGCAAAATAAAACAAGAACATTCACAGCTGCACCACGGAAACATTTATAGCAGGTAAGTTTGCCTGATGATTTCAACAATCAATTCACTCGCAACACCT
10 30 50 70 90 110

N G P W T V G I T K F Y G G W N K L L E K L P D G W I Y C D A D G S Q F D S S L
GAATGCTGATGGACGGTTGGAAATTACCAAGTTCACGGTGGATGGAAACAAGCTACTCGAGAAAGCTGCCAGATGGCTGGATTTATTTGTTGATCGGATGGTTCAACAATTCGAATGATTCAC
130 150 170 190 210 230

T P Y L I N A V L N I R L Q F M E P W H I G E Q M L K N L Y T E I V F T P I A T
CACCTCGGTATTTGATAAAATGCAGTTCCTCAACATTCGATTCACAGTTCATGGAGCCATGGCATATTTGGTGAACAAATGCTCAAGAAATTTGTATACGGAATTCGTTTTCACACCAATTCGAAC
250 270 290 310 330 350

P D G S V I K K F K G N N S G Q P S T V V D N T L M V I I A F N Y A L L S C G I
ACCCGATGATCTGTTATCAAGAAGTTCAGGGCAACAATAGCCGCAACCGTCAACAGTTGTTGATTAACACATGATGGTAAATCATAGCATTCACATATGCATATATATCTGTCGCACT
370 390 410 430 450 470

D L K E A D E V C R M Y A N G D D L L I A V N P A H V D I L D E F G K H F A T L <
CGACTTGAAGGAGCTGATGAAGATATCCGAAATGTAAGCAATGGGATGATTTGCTAACTCGCAGTAAACCCAGCACATGTTGACATTCATAGATGAGTTTGGTAAACACTTCGCAACCTT
490 510 530 550 570 590

G L N F E F E S R T K D K S E L W F M S T R G I E H E G I Y I P K L E M E R I V
AGGACTAAACTTCGAATCGAATCACGAACAAGACAAATCAGAACTATGGTATTATGCTAACCCGAGGCAATCGAACACAGGGAATATACATTCACAAAATTCGGAATTCGAACGAATCTG
610 630 650 670 690 710

A I L E W D R S L L P Q Y R L E A I C A A H V E A W G Y K D L L H E I R K F Y A
TGCAATCCCTGAGTGGGATCGATCGCTACCTCCCTCAATACCCCTCTGGAGCCATTTGTCAGCAATGGTTGAGCGCTGGGGATATAAGGATTTGCTCCATGAGATACGATAAATTTTATGC
730 750 770 790 810 830

W L L E H Q P F A G L A K E G L A P Y I A E S A L K N L Y T G A K V S E D E L N
ATGTTGCTCGAAAATGCACCTTTCTGCTGCTGCTGGCAAAAAGAGGATAGCACCATACATAGCTGAATCGACCCCTCAAAAATTTATACACTGGTGTAAAAGTTTCGGAAGATGAGTTGAA
850 870 890 910 930 950

V Y A R Q F F D D L P N Y L A D E V I D V K H Q A G E N V D A G Q K T D A Q K E
TGTTCAGCCGCAAAATTCCTTTGACGATCTCTCAAACTATTTGGCTGATGAAGTCTATAGATCTCAAACTCAAGCTGGTGA AAAATTTGATGCGGGACAGAAGACTGATGCACAAAAGGA
970 990 1010 1030 1050 1070

A E K K A A E E K K A K E A E A K Q K E T K D K A T E K A D T G G S T G K D K D
AGCAGAAAAGAAAAGCAGCCGAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAGCTGAGCCCAAGCAAAAAGAAAATTAAGGATAAAGCAACTGAAAAGGCTGATGATGTTGGATCTACAGGAAAAGACAAAAG
1090 1110 1130 1150 1170 1190

V D A G T S G S M S V P K L K A M S K K M R L P Q A K G K N I L H L D F L L K Y
TGATAGTCTGGAAGTTCAGGTTCAATGTCAGTACCGAAGCTTAAAGCTATGCTAAGAAAGATGCTTTACCCTCAGGCAAAAAGAAAAGAACATTCCTCCTCCTGCTTCCTTTTGAATA
1210 1230 1250 1270 1290 1310

K P Q Q Q D L S N T R A T R A E F D R W Y E A V Q K E Y E L D D T Q M T V V M S
TAAACCACAACAAGATTTATCAAAACCCGAGCAACCAGGGCTGAATTTGATAGGTGGTATGAAGCAGTACAGAAAAGAAATACGAATTCGATGACACACAAAATGACAGTTGTCATGAG
1330 1350 1370 1390 1410 1430

G L M V W C I E N G C S P N I N G V W T M M D G D E Q R T F P L K P V I E N A S
TGGACTGATGGTTGGTGTATGAAAACGGTTCACCGCAACAATCAATGGTGTCTGGACCATGATGGACGGAGATGAACAGAGAACAATTCCTTTAAAACAGTTTGAAGATGCACT
1450 1470 1490 1510 1530 1550

P T F R Q I M H H F S D A A E A Y I E Y R N S T E K Y M P R Y G L Q R N L T D F
TCCAACTTTCAGACAAATTTATGCAATTCATTTAGTGTGACGATGAGCGTGAAGCGTATTCGAGTATAGAACTCAACAGAAAATAATATGCCAGGATGGAATTCAGCCCAACTTAAACGACTT
1570 1590 1610 1630 1650 1670

S L A R Y A F D F Y E I S S R T P V R A K E A H M Q M K A A A V R G S N T R L F
TAGCCTTGCACCTTATGCAATTTGATTTCTATGAGATATCATCTCGAACTCCAGTGCCTGCAAAAAGAAAGCCACATGCAGATGAAGGAGCAGCAGTCCGTGGTTCAAACACACGGTTGTT
1690 1710 1730 1750 1770 1790

G L D G N V G E A H E N T E R H T A G D V S R N M H S L L G V Q Q G H *
TGGTCTTGAATGGGAATGTCGGAGAAGCCACGAAAATACAGAACCCTATACAGCTGGCGATGTTAGTGGCAATATGCACCTCCCTCTGGGAGTTCAAGCAGGGCACTGAGACGGGGTTGA
1810 1830 1850 1870 1890 1910

ACTCTACGCGTAATTTAGTAATATATACGTAAGCTATTTGTTGGTGGGTTTACCCTGCTAGTTTATATATATATATATATGCTATGTTCTACTATGTCGCAAGTGAAGTGAAGTTAC
1930 1950 1970 1990 2010 2030

CTCGACACTTATGGTAGGCATACTACAGCTTCGAATCACGATACGGACGGTCCATTTGATGGTTCTACCACGAGGATGCAGCAGTTCCTGGTGGTGAAGAC--poly(A)
2050 2070 2090 2110 2130

```

Figura 18. Secuencia de nucleótidos del extremo 3' del RNA del aislado MDMV-G y la secuencia de aminoácidos deducida a partir de esta. (****) secuencia del N-terminal de la proteína de cubierta entera determinada por secuenciación de proteínas y el lugar de procesamiento entre los genes Nib y proteína de cubierta.(++++): N-terminal de la proteína de cubierta degradada < : extremo 5 'de los clones M13-MDMV5 y 8; > extremo 3' del clon M13-MDMVr.

La comparación de la secuencia de la región 3' no codificante obtenida con la de otros miembros del subgrupo de SCMV (Tabla 16); la mayor homología se observa con MDMV-A (94,9), MDMV-G presenta dos deleciones (posiciones 2113-2115) en relación con MDMV-A. Esta mayor homología con MDMV-A se observa, también a nivel de la proteína de cubierta, presentan el mismo número de aa y sólo difieren en 11 aa; de los cuales 7 se localizan en el N-terminal. La variabilidad en esta región se ha comentado en el introducción.

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.

Virus	Región 3' no codificante	Proteína de cubierta
MDMV-A	94,9%	96,2
SCMV-MDMV-B	45,8%	65,85
SCMV-SC	51,3%	69,9

Las homologías determinadas por Shukla y col. (1992) entre tres cepas de JGMV en la región 3' no codificante son del 96-99%, en dos de SCMV de 88% y entre éstos y MDMV-A, y la cepa H de SrMV oscilan entre 44 y 61 %. La homologías entre secuencias de aa de la proteína de cubierta entre estos mismos virus y cepas se sitúa entre el 93 y 99% para las cepas de JGMV y sólo del 79% para las dos cepas de SCMV; y entre éstos y MDMV-A y SrMV-H del 51-71 %. Tales homologías se encuentran dentro del rango determinado por Freenkel y col. (1989) para la región no-codificante y las homologías a nivel de la secuencia de aminoácidos de la proteína de cubierta definida por Shukla y col. (1988c),

a excepción de la homología entre las dos cepas del SCMV.

Con la homología encontrada entre MDMV-A y MDMV-G, parece lógico asumir que el aislado MDMV-G es una cepa de MDMV o subcepa de MDMV-A.

En la secuencia del gen de la proteína de cubierta de MDMV-G se hallan presentes los bloques altamente conservados en los potyvirus implicados en funciones específicas de esta proteína. En el extremo N-terminal, el bloque VDAG implicado en la transmisión por vectores (Shukla y col., 1991; Riechmann y col., 1992). En las posiciones 1571-3, 703-5, 1574-1574-6 nt, los residuos altamente conservados, R, D y Q respectivamente, implicados en el ensamblaje de la cápside (Dolia y col., 1991; Jagadish y col., 1991, 1993).

En la secuencia de las dos terceras partes de la putativa RNA polimerasa RNA dependiente (NIB) se encuentran los dos motivos (nt 392 -540) que se cree que forman parte también del núcleo de las polimerasas (Karmner y Argos, 1984; Domier y col., 1987)

3. 2. 6. 2. Hibridación molecular con otros aislados.

Con los RNA genómicos de los aislados MDMV-L y MDMV-Gs, parcialmente purificados, se llevó a cabo una prueba de hibridación molecular con la sonda sintetizada a partir del clon M13-MDM5, los resultados de la misma se representan en la Figura 19. Estos resultados indican que estos dos aislados son muy similares a MDMV-G.

3. 2. 7. Heterogenidad en tamaño de la proteína de cubierta.

Existen numerosas referencias bibliográficas acerca de la heterogenidad en tamaño de la proteína de cubierta de un determinado potyvirus, esta heterogenidad ha sido atribuída a la degradación *in situ*: por las proteasas del huésped (Moghal y col., 1976; Huttinga y col., 1974; Hiebert y col., 1984; Shukla y col., 1988b), por contaminantes del huésped o por proteasas microbianas durante la purificación y almacenamiento (Huttinga y col., 1974; Hierbert y col., 1984; Shukla y col., 1988b). También se ha postulado en el caso de PPV podría ser una de las proteasas virales: NIa (Laín y col., 1988).

Tal heterogenidad, también, se ha observado en distintas preparaciones virales de los aislados estudiados, con el fin de determinar mejor estas diferencias de tamaño se analizaron a distintos tiempos de almacenamiento a 4° C el tamaño de la proteína de cubierta.

En la Figura 20 se puede observar la degradación que experimentó la proteína de cubierta del virus de los dos aislados durante un período de 12 días. Esta degradación es más rápida que la observada en otros potyvirus (Hiebert y col., 1984; Shukla y col., 1988b; Laín y col., 1988). La banda de mayor movilidad electroforética (29.000 daltons) se detecta en nuestro caso a los 4 días de mantener las purificaciones virales a 4°C.

Para de determinar mejor la naturaleza de este polipéptido de mayor movilidad; las preparaciones virales almacenadas a durante 10 días a 4°C se separaron en geles de tricina-SDS-PAGE. En estos geles además de los polipéptidos de aproximadamente 32 y 29 kDa se observan tres polipéptidos de menor tamaño, cuyo peso molecular no se ha determinado (fig. 20). En los dos tipos de geles, se observa que la

banda, del péptido de 32kD, va desapareciendo a medida que se prolonga el almacenamiento a 4°C al mismo tiempo que se engrosa la de 29kD.

La secuencia de los 10 primeros aminoácidos del N terminal de los péptidos de 29 y 32 kDa del aislado MDMV-G reveló que, la secuencia N-terminal del péptido de 32kD, se corresponde con la de la proteína de cubierta intacta y que la secuencia N-terminal del péptido de 29kDa se sitúa en la posición 1151 de la secuencia determinada, dentro del gen de la proteína de cubierta. Su secuencia coincide con la determinada a partir de la secuencia de nucleótidos (Figura 18). Por tanto, el péptido de 29 kDa es el resultado de la degradación de la proteína de cubierta por pérdida de un de 39 aa. Este péptido de 39 aa, que se pierde con el almacenaje, sería el responsable de los epitopos específicos del N-terminal de este aislado y el que se localizaría en la superficie de la partícula (Hiebert y col., 1984, Shukla y col., 1988b). Esta degradación explicaría la diversidad de tamaño encontrado por von Baumgarten y col. (1981) de la proteína de cubierta MDMV-A. Este estudio constituye además, la primera referencia acerca de la degradación de la proteína de cubierta de MDMV y no coincide con los resultados obtenidos por Salomon (1992), en los que, la proteína de cubierta permanece intacta durante meses.

El antisuero anti MDMV-L detecta los péptidos de 32 y 29kD, de los aislados MDMV-G y MDMV-L, y la proteína de cubierta del aislado MDMV-Gs. No se observa la degradación de la proteína de cubierta de este último aislado, debido, probablemente, a que cuando se realizó el inmunoblot era una preparación fresca. Estos resultados indican que este antisuero reconoce tanto la proteína de cubierta intacta como la degradada.



Figura 19. Hibridación molecular con la sonda MDMV5, 1 y 2 aislado MDMV-G; 3:aislado MDMV-L; 4:aislado MDMV-Gs.

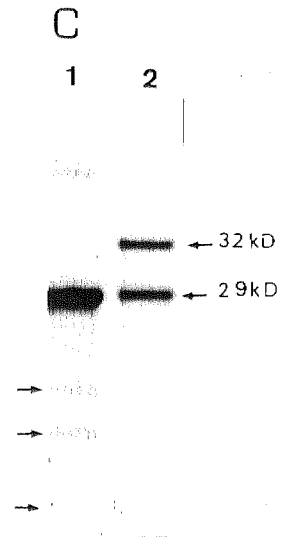
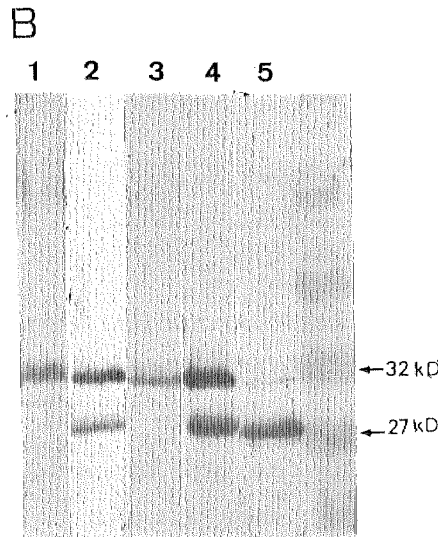
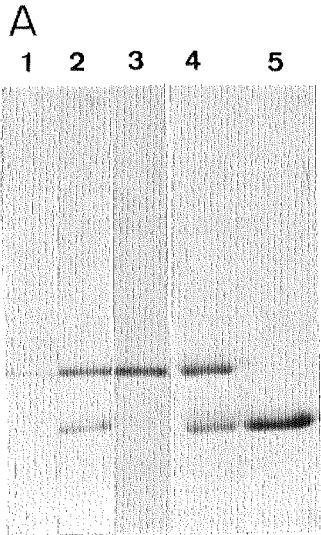
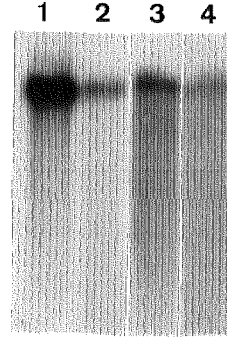


Figura 20. Tamaño proteína de cubierta. A: Gel SDS-PAGE al 15%, 1: aislado MDMV-Gs; 2: aislado MDMV-L mantenida 4 días a 4 °C; 3, 4, 5: aislado MDMV-G, 4 y 5 mantenida a 4° C 4 y 10 días respectivamente; B.- Inmunoblot gel A con el antisuero anti MDMV-L.- C: gel Tricina-SDS aislado MDMV-G, 1: 10 días a 4°C; 2: 4 días a 4° C.

3. 3. Descensos de producción y altura de las plantas inducidos por MDMV

La estimación de los descensos de producción y altura de las plantas inducidos por MDMV se llevó a cabo en las mismas localidades en que se estudió la incidencia, durante los años 1990 y 1991; mediante la inoculación mecánica del virus sobre los cvs AD-640, P-3183, y Moltó. La inoculación del virus se realizó como se ha indicado en el apdo. 2, en estado de 5 hojas, a excepción de la localidad de Termens-1990 en que el estado era de 8 hojas.

Los análisis de la varianza se han realizado por año y localidad, dado que el análisis conjunto determinó diferencias significativas entre año y localidad, así como la interacción (datos no mostrados). La separación de medias entre cultivares y el factor inoculación dentro de cada localidad y año se ha calculado con la prueba de DUNCAN. La separación de medias entre testigos y inoculados dentro de un mismo cultivar se ha calculado según t , $x \sqrt{(2 \times CMe)/n}$ ($t=t$ student; CMe =cuadrados medios del error, $n=n^\circ$ de repeticiones=4).

3. 3. 1. Infección en los cultivares inoculados y no inoculados con el virus.

En todas las muestras analizadas se detectó la presencia del virus como se resume en la Tabla 17. Tanto en las muestras con mosaico bien definido como en las que presentaban mosaico difuso, no fue así en las muestras que no presentaban síntomas o raquitismo.

El porcentaje de plantas infectadas siguió una tendencia creciente a partir del momento de la inoculación (Figuras 21 y 22). No obstante en Mas Badia 1990 se observó un declive en el último recuento.

Tabla 17. Resultados de la prueba ELISA, con el antisuero MDMV-L, de las muestras analizadas en el estudio de los descendos de producción.

Síntomas	Número de muestras	Inoculados	Testigos
Mosaico	12	+++	+++
Mosaico difuso	12	+++	+++
Sin síntomas	12	---	---
Raquitismo	6	---	---

+++ positivo, valor de la D.O. más del doble que el negativo;
 ---: negativo.

En la tabla 18 se representan las medias del porcentaje de plantas infectadas de la prospección realizada, aproximadamente, 100 días después de la siembra. En todos los casos se observa diferencias entre testigos e inoculados con el virus.

Tanto la infección natural como la inducida por la inoculación del virus fue más elevada en el primer año de estudio. La natural siempre fue más elevada en la localidad Termens. En el año 1991, en ésta misma localidad, los testigos presentaron una elevada infección natural; a pesar de que en el momento de la inoculación no se observó ninguna planta infectada (Fig. 22). Esto pudo verse influenciado por la presencia de los vectores que difundieron la infección.

Moltó fue el cultivar que menor infección natural presentó en la localidad de Termens y mayor incremento de infección como resultado de la inoculación en los dos años de estudio (Tabla 18).

En la localidad de Mas Badia, en el primer año de estudio, no se observaron diferencias entre cultivares, tanto en la infección natural como la inducida. En cambio, en 1991, el

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.

	Termens			Mas Badia		
	T	I	Δ	T	I	Δ
AD-640 a	70,9 b	<u>1990</u> 85,8 a	21	AD-640 a	<u>1990</u> 95,0 a	483
P-3183 b	55,9 b	87,7 a	57	P-3183 a	93,1 a	361
Moltó c	30,2 b	80,3 a	166	Moltó a	95,4 a	334
Inoculación	52,3 b	84,6 a	81	Inoculación	94,5 a	392
AD-640 a	44,6 b	<u>1991</u> 68,4 a	53	AD-640 a	<u>1991</u> 42,7 a	916
P-3183 b	30,0 b	36,3 a	21	P-3183 b	26,3 a	13050
Moltó c	17,0 b	28,1 a	65	Moltó c	7,3 a	2333
Inoculación	30,5 b	44,5 a	46	Inoculación	25,4 a	5433

Medias con la misma letra entre cultivares y inoculación dentro de una misma localidad no presentan diferencias a un nivel de significación $\alpha < 0,05$ en la prueba DUNCAN. Medias con la misma letra entre inoculados y testigos dentro de un mismo cultivar no presentan diferencias a un nivel de significación $\alpha < 0,05$ con la prueba de la mínima diferencia significativa. T: testigo (no inoculados); I: inoculados; Δ : incrementos relativos de infección calculados según: [(I-T):T]x100;

comportamiento de éstos frente a la infección, siguió la misma pauta que en la localidad de Termens (Tab. 18). La mayor infección, natural e inducida, la presento el cv. AD-640, la natural muy similar en los otros dos cultivares y la inducida menor en Moltó.

La menor infección inducida en 1991 en las dos localidades, pudo deberse a una menor eficiencia de la inoculación del virus por una progresiva degradación del virus por dificultades de tiempo, tanto en la extracción como en la aplicación del inóculo. Otro factor que pudo contribuir a la degradación fue que la inoculación tuvo lugar en horas (13-14 h) con temperatura ambiental más elevada que el primer año, en que ésta finalizó a las 10-11 h. Rosenkranz y col. (1987) indican una menor eficiencia de la inoculación en campo cuando esta tiene lugar al mediodía.

Los resultados obtenidos en este apartado podrían indicar que los tres cultivares presentan diferentes grados de susceptibilidad a MDMV. Frente a una elevada presencia del mismo los tres se comportan de forma similar (Mas Badia 1990), pero frente a una menor cantidad de inóculo se observa que Moltó es el que presenta un infección menor, seguido de P-3183 y el que mayor AD-640.

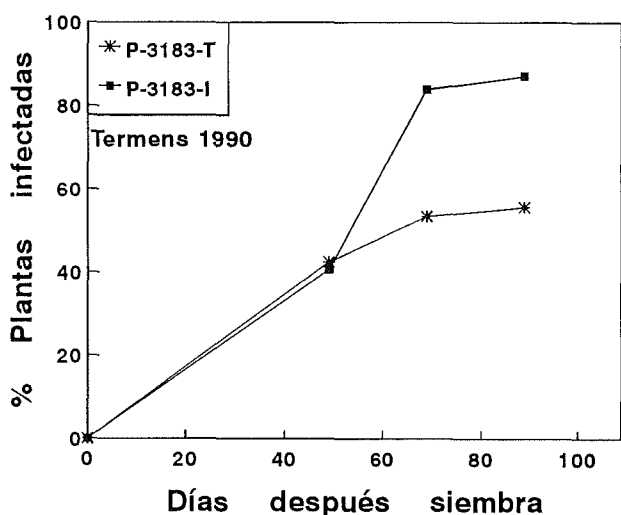
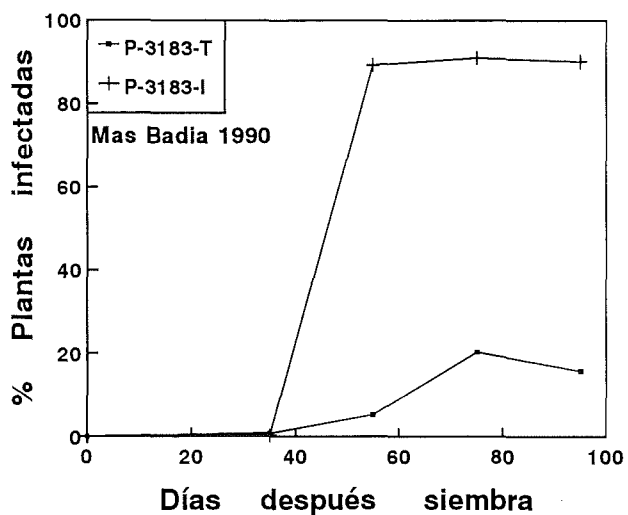
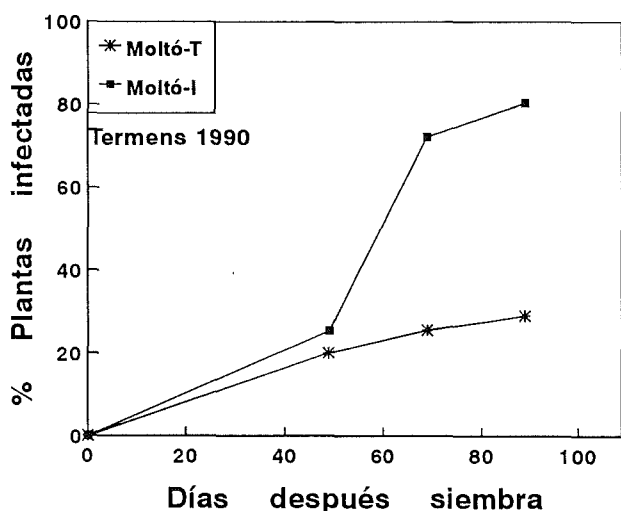
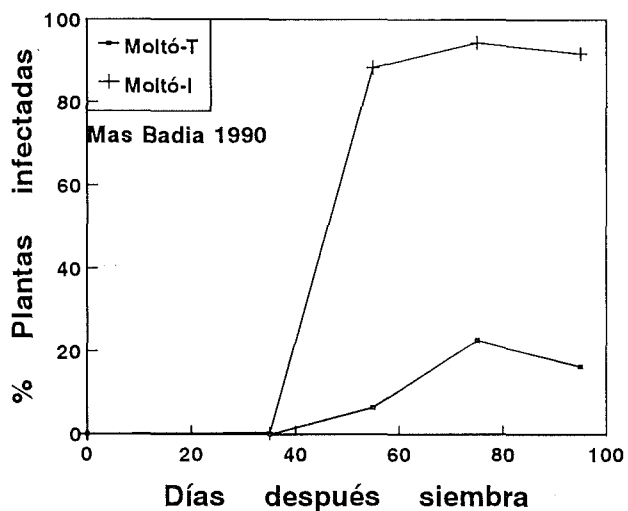
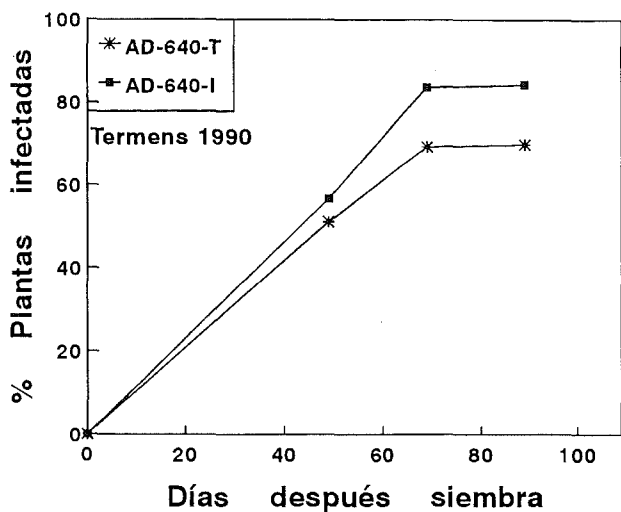
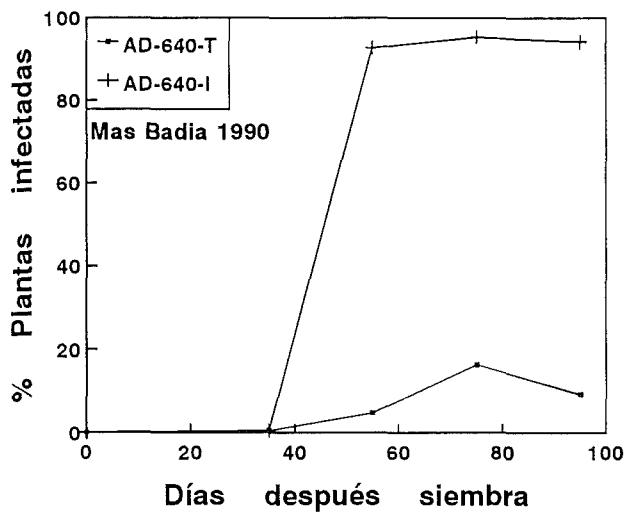


Figura 21. Evolución en el tiempo del porcentaje de plantas infectadas en los cvs. AD-640, P-3183 y Moltó inoculados y no inoculados con el virus en dos localidades en 1990. I: inoculados con el virus; T: no inoculados.

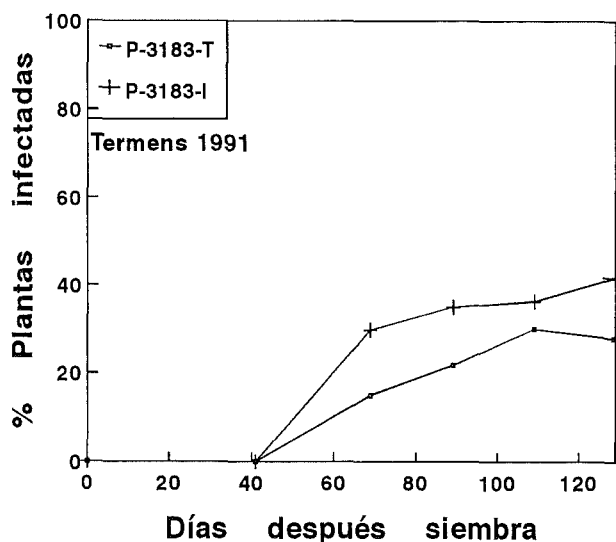
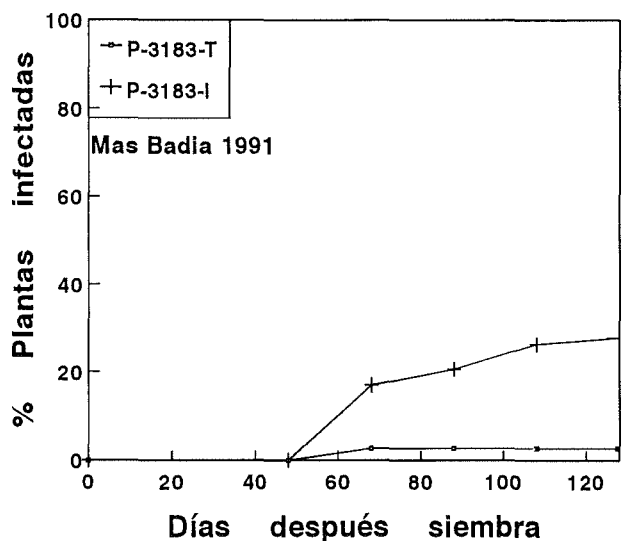
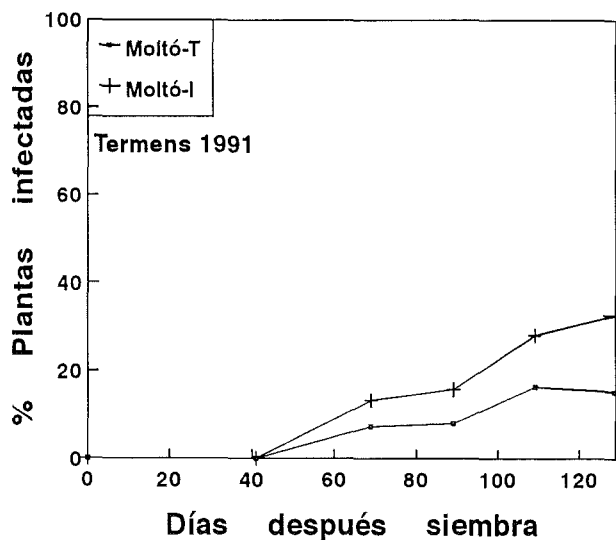
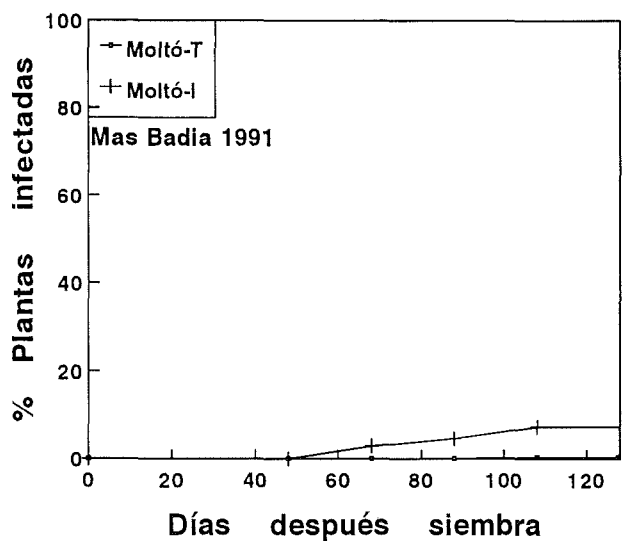
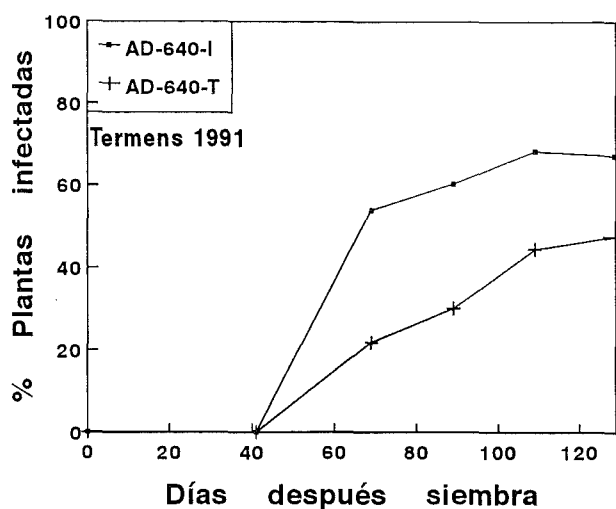
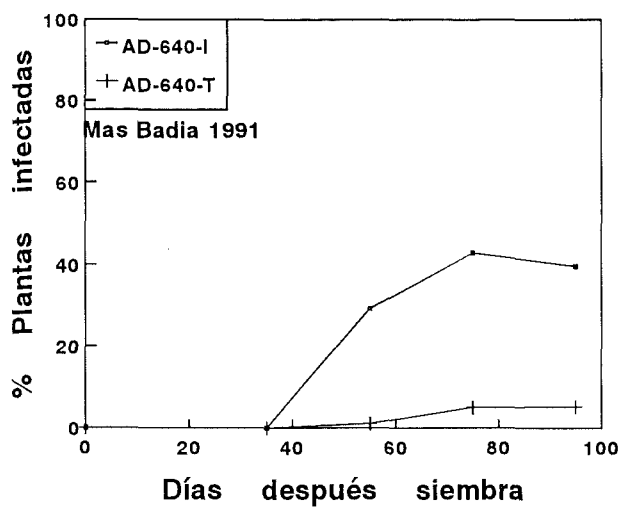


Figura 22. Evolución en el tiempo del porcentaje de plantas infectadas en los cvs. AD-640, P-3183 y Moltó inoculados y no inoculados con el virus en dos localidades en 1991. I: inoculados con el virus; T: no inoculados.

3. 3. 2. Descensos en la producción

La producción se convirtió en kg/ha y a un 14% de humedad mediante la fórmula $P_{14} = P_H (100-H)/86$, donde P_{14} = producción al 14% de humedad, P_H = Producción a la humedad de recolección; H = humedad del grano en la recolección.

En la tabla 19 se representan las medias de producción de en los dos años de estudio y en las dos localidades. Los tres cultivares son menos productivos en la localidad de Termens (Figura 23). El cv. AD-640 fue el menos productivo en las dos localidades y en los dos años de estudio. P-3183 y Moltó no presentan diferencias significativas de producción en el primer año de estudio en las dos localidades. No obstante Moltó, fue más productivo en la localidad de Termens.

En Termens-1991, se observan diferencias de producción entre los tres cultivares, también, Moltó fue el más productivo (Tabla 19).

En la localidad de Mas Badia, P-3183 y Moltó no presentaron diferencias significativas entre ellos, aunque Moltó presentó una producción menor que P-3183, esta diferencia fue más acusada en 1991.

La inoculación de MDMV no indujo diferencias significativas en ninguno de los cultivares en Termens-1990 (Tab. 19), debido, probablemente, a que la inoculación tuvo lugar en el estado de 8 hojas. Distintos autores (Mikel y col., 1981; Scheifele, 1969; Jarjees y col., 1983; Ronsenkranz y col., 1978) han señalado la no reducción de producción cuando la inoculación tiene lugar en el estado de 8 hojas.

En términos de descensos relativos la inoculación del virus, no tuvo prácticamente ningún efecto sobre la producción de P-3183 (0,8 %), sin embargo AD-640 y Moltó

Tabla 19. Medias de producción, en los cvs. Moltó, P-3183, AD-640, y descensos relativos de producción inducidos por la inoculación de MDMV en dos localidades y en dos años de estudio.

	Termens			Mas Badia		
	T	I	▼	T	I	▼
AD-640 b	4839 a	<u>1990</u> 4161 a	14,0	11284 a	<u>1990</u> 9099 a	19,3
P-3183 a	8853 a	8776 a	0,8	13886 a	11172 b	19,5
Moltó a	10662 a	8990 a	15,6	13765 a	11685 a	15,1
Inoculación	8118 a	7039 a	13,2	12979 a	10652 b	17,9
AD-640 c	3291 a	<u>1991</u> 1993 b	39,4	11760 a	<u>1991</u> 9646 b	17,9
P-3183 b	4805 a	4165 a	13,3	14298 a	11665 b	18,4
Moltó a	6696 a	5241 b	21,7	12604 a	11196 a	11,1
Inoculación	4930 a	3800 b	24,8	12887 a	10835 b	15,9

Medias con la misma letra entre cultivares y inoculación dentro de una misma localidad no presentan diferencias a un nivel de significación $\alpha < 0,05$ en la prueba de DUNCAN. Medias con la misma letra entre inoculados y testigos dentro de un mismo cultivar no presentan diferencias a un nivel de significación $\alpha < 0,05$ con la prueba de la mínima diferencia significativa. T: testigo (no inoculados); I: inoculados ; ▼ : descensos relativos de producción calculados según: [(I-T):T]x100;

experimentaron descensos del 14% y 15% respectivamente.

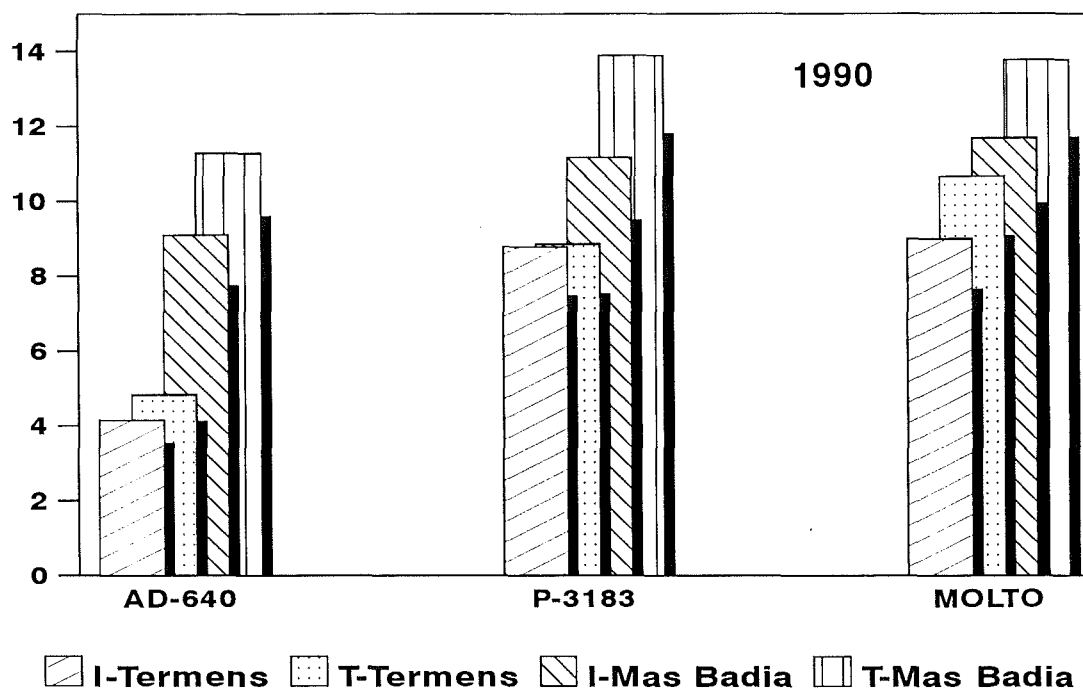
En 1991, en esta misma localidad, también fue P-1383 el cv. que menor descenso relativo presentó como resultado de la inoculación, y el único en que no se observan diferencias significativas entre testigos y inoculados, no obstante, presentó un descenso relativo del 13%. El cv. AD-640 experimentó el mayor descenso relativo determinado y alcanzó un 39%.

En la localidad de Mas Badia, el comportamiento de los tres cultivares fue bastante uniforme en los dos años de estudio. P-3183 fue el cv. que mayores descensos relativos de producción experimentó en los dos años, seguido de cerca por AD-640.

El cv. P-3183 fue el único que presentó diferencias significativas, en los dos años, entre testigos e inoculados. En cambio, Moltó, no presentó diferencias en los dos años (Tab.19).

Las reducciones en la producción determinadas por inoculación de MDMV por otros autores con infecciones que oscilan entre un 17-100%, oscilan entre 19-45%; 19% (Sheifele, 1969; Cole y col., 1969); 22% (Olson y col., 1990); 34% (Genter y col., 1973); 23% (Ronsenkranz y col., 1978); 18-45% (Louie y col., 1980). Estas reducciones, aunque en cultivares distintos, son similares a las obtenidas en los cultivares estudiados en este trabajo.

Producción Tm/Ha(14% H)



Producción Tm/Ha(14% H)

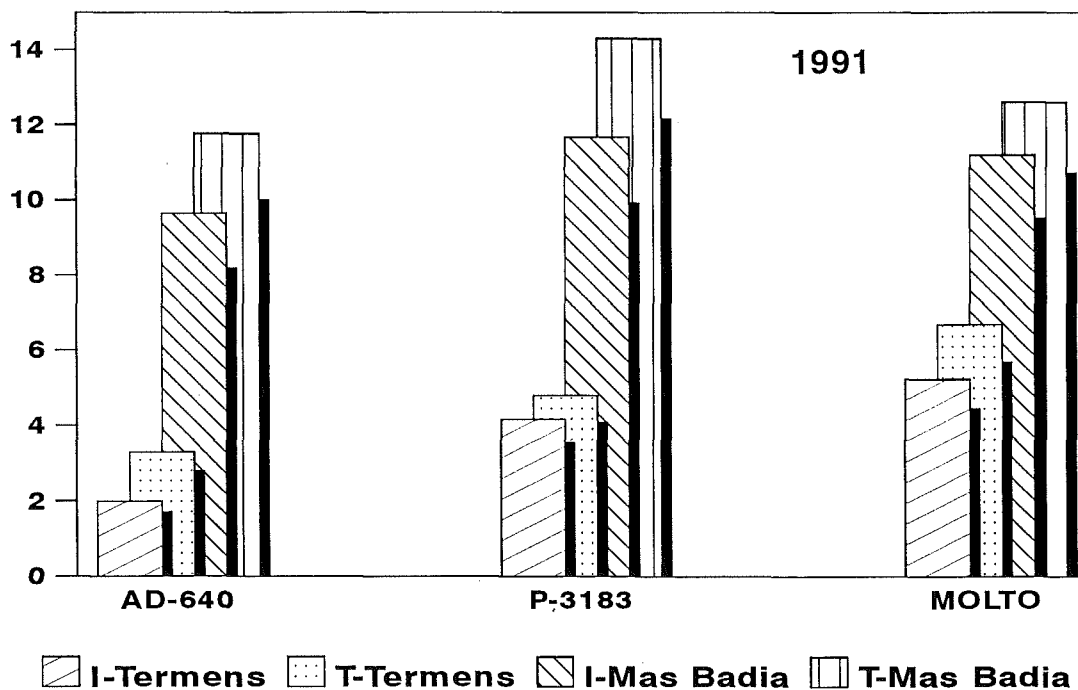


Figura 23. Producción en los cvs. AD-640, P-3183, Moltó inoculados y no inoculados con el virus. I:inoculados, T: no inoculados.

Tabla 20. Coeficientes de correlación entre de producción y altura e infección.

	Infección			
	Term.-90	Term.-91	MBadia-90	MBadia-91
Producción	-0,52 **	-0,86 **	-0,55 **	-0,66 **
Altura	-0,41 *	-0,59 **	-0,62 **	-0,45 *

Niveles de significación: **($\alpha < 0,01$); *($0,01 < \alpha < 0,05$).

La infección de MDMV esta correlacionada significativamente y de forma negativa con la producción (Tabla 20). El coeficiente de correlación más elevado entre estas dos variables se observa en la localidad de Termens en 1991.

El diferente comportamiento de los cultivares estudiados, frente a la infección de MDMV, en las dos localidades, podría indicar que en la menor producción de éstos en la localidad de la comarca de la Noguera, influyen, además de la elevada infección natural del virus, otros factores.

Olson y col. (1990) estudiaron el efecto del déficit hídrico conjuntamente con la infección de MDMV y determinaron que ambos tenían un efecto aditivo y negativo sobre el rendimiento del maíz.

Los menores descensos relativos de producción del cv. Moltó en la localidad de Mas Badia y la mayor producción de éste en la localidad de Termens, podrían indicar que este cultivar es el más idóneo frente a la infección de MDMV.

3. 3. 3. Reducciones en altura de las plantas

La altura de las plantas se determinó a partir de 15 plantas escogidas al azar de cada subparcela. La altura se midió desde el primer nudo visible hasta la inflorescencia masculina.

A excepción de Termens-1991, no se observan diferencias significativas entre los tres cultivares (Tabla 21, Figura 24).

El factor inoculación del virus, no muestra diferencias significativas en la localidad de Termens, en los años de estudio y tampoco dentro de cada cultivar en particular. La mayor reducción en altura (7-8,7%), en esta localidad, la presentó el cv. AD-640. Los otros dos cvs. las presentaron muy similares.

En la localidad de Mas Badia, el factor inoculación muestra diferencias significativas en los dos años de estudio. P-3183 fue el cv. que presentó diferencias significativas y el que mayores reducciones relativas. En cambio, en el cv. Moltó no se observan diferencias significativas.

La reducción en altura inducida por MDMV en estos tres cultivares es similar a la que determinaron Rosenkranz y col. (1978) del 3,5-7,1 %, según el híbrido e independiente del estado de inoculación. La máxima reducción en altura citada es del 14% (Genter y col., 1973).

La infección de MDMV está significativamente correlacionada y de forma negativa con la altura (Tabla 20).