

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Estudio y caracterización mediante microscopía electrónica
de nuevos virus vegetales en España**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Victoria Díaz Múgica

Madrid, 2015

D 581.2
DIA
est

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología

BIBLIOTECA UCM



5303491117

**ESTUDIO Y CARACTERIZACION
MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA
DE NUEVOS VIRUS VEGETALES EN
ESPAÑA**



R.- 17.906

María Victoria Díaz Múgica

Madrid, 1992

Colección Tesis Doctorales. N.º 69/92

© María Victoria Díaz Múgica

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1992.
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-6573-1992**

1531122106

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
DE NUEVOS VIRUS VEGETALES EN ESPAÑA

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR MARIA VICTORIA DIAZ MUGICA
DIRECTOR DE LA TESIS DR. JOSE RAMON DIAZ RUIZ

MADRID 1990

I

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en la Unidad de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. de Madrid.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Director del trabajo, Profesor Dr. José Ramón Díaz-Ruiz por la ayuda y valiosas sugerencias recibidas durante la realización del presente trabajo.

Igualmente quiero agradecer a la Dra. M^a Teresa Serra Yoldi su inestimable ayuda y colaboración. Al Profesor Dr. Miguel Rubio-Huertos, por su amistad, enseñanzas y consejos.

Agradezco muy especialmente al Profesor Dr. Dimas Fernández-Galiano su amabilidad al aceptar la ponencia de esta tesis y sobre todo, por el interés que despertó en mí hacia la Microbiología en los ya muy lejanos años de alumna universitaria.

Quiero agradecer también a las personas del Servicio de Microscopía Electrónica, y a José Blanco Marcos del Servicio de Fotografía del C.I.B., con cuya inestimable colaboración se ha realizado este trabajo.

De forma muy particular, quiero agradecer a Sacramento Peñalver su ayuda en la realización de las técnicas para microscopía electrónica, y a todas las personas de la Unidad de Fitopatología por su amistad y colaboración.

A Nacho y Ernesto, por sus dibujos y a la Dra. Ramona Beltrá, por su cariño y continuo estímulo.

Al C.S.I.C., por las facilidades que me ha prestado para la realización del presente trabajo.

Por último, agradezco a mis hijos Coral y Manuel su comprensión.

III
I N D I C E

	<u>Pág.</u>
<u>I.-INTRODUCCION</u>	
I.1.- CLASIFICACION DE LOS VIRUS DE PLANTAS.....	3
I.2.- MANIFESTACIONES MACROSCOPICAS DE LA INTERACCION VIRUS-HUESPED.....	4
I.3.- ASPECTOS MICROSCOPICOS DE LA INTERACCION VIRUS-HUESPED.....	5
I.3.1.-Localización intracelular de las partículas virales.....	5
I.3.2.-Inclusiones celulares producidas por los virus.	7
I.3.3.-Formaciones vioplásmicas	9
I.3.4.-Movimientos de los virus en las plantas infectadas	10
I.3.5.-Localización de los virus en los tejidos vegetales	12
I.4.- MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA DE LAS PARTICULAS VIRALES	13
 <u>II.- MATERIALES Y METODOS</u>	
II.1.- TAMPONES Y SOLUCIONES	16
II.2.- METODOS DE INOCULACION DE VIRUS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE PLANTAS.....	19
II.2.1.-Inoculación mecánica	19
II.2.2.-Otros métodos	19
II.2.3.-Condiciones de cultivo de las plantas de ensayo	19
II.3.- METODOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA	20
II.3.1.-Tinciones negativas	21
II.3.2.-Cortes ultrafinos	24

IV

	<u>Pág.</u>
II.4.- METODOS DE PURIFICACION DE VIRUS	31
II.4.1.-Purificación del virus del mosaico de la calabaza (SqMV).....	31
II.4.2.-Purificación del virus del mosaico del pepino (CMV).....	34
II.4.3.-Cuantificación de los virus purificados.....	36
II.5.- METODOS DE EXTRACCION DE LOS ARNs DE SqMV Y CMV .	36
II.5.1.-Cuantificación de los ARNs purificados.....	39
II.6.- METODOS ELECTROFORETICOS PARA EL ANALISIS DE PROTEINAS Y ACIDOS NUCLEICOS	39
II.6.1.-Electroforesis de las proteínas de SqMV en geles de poliacrilamida al 12,5% y al 15% con SDS	39
II.6.2.-Determinación de los pesos moleculares de las proteínas de la cubierta de SqMV	41
II.6.3.-Electroforesis de los ARNs de SqMV y CMV en geles de poliacrilamida al 2%, agarosa al 0,5%	42
II.6.4.-Electroforesis de los ARNs de SqMV y CMV desnaturalizados, en geles de agarosa al 1%....	43
II.6.5.-Determinación de los pesos moleculares de los ARNs de SqMV y CMV	44
II.7.- METODOS INMUNOLOGICOS	45
II.7.1.-Obtención de inmunosueros frente al aislado C1 de SqMV.....	45
II.7.2.-Doble inmunodifusión en geles de agar.....	47
II.7.3.-Absorción intragel	49
II.7.4.-Inmunodetección de las proteínas separadas de la cubierta de los aislados de SqMV.....	50
<u>III.- RESULTADOS Y DISCUSION</u>	

	<u>Pág.</u>
III.1.- POTYVIRUS INFECTANDO CRUCIFERAS (LUNARIA ANNUA L. Y CUCURBITACEAS (<u>CUCURBITA PEPO L.</u>)	55
III.1.1.-Origen y sintomatología de las muestras	56
III.1.2.-Gama de huéspedes	57
III.1.3.-Microscopía electrónica	59
Potyvirus infectando <u>Lunaria annua L.</u>	59
Potyvirus infectando <u>Cucurbita pepo L.</u> var."Calabacín americana".....	60
Potyvirus infectando <u>Cucurbita pepo L.</u>	61
III.1.4.-Discusión	84
III.2.- RHABDOVIRUS INFECTANDO <u>RYONIMUS JAPONICA THUNE.</u>	88
III.2.1.-Origen y sintomatología de las muestras	89
III.2.2.-Gama de huéspedes	90
III.2.3.-Microscopía electrónica	91
III.2.4.-Discusión	114
III.3.- VIROSIS MULTIPLE INFECTANDO <u>CUCURBITA PEPO L.</u>	117
III.3.1.-Origen y sintomatología de las muestras	118
III.3.2.-Gama de huéspedes	118
III.3.3.-Microscopía electrónica	119
III.3.4.-Purificación y análisis electroforético de los ARNs de CMV	126
III.3.5.-Discusión	128
III.4.- EL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DEL PIMIENTO (PMMV) INFECTANDO <u>CAPSICUM ANNUUM L.</u>	131
III.4.1.-Origen y sintomatología de las muestras	132
III.4.2.-Gama de huéspedes	132
III.4.3.-Microscopía electrónica	136
III.4.4.-Discusión	144

VI

	<u>Pág.</u>
III.5.- EL VIRUS DE LAS MANCHAS BRONCEADAS DEL TOMATE (TSWV) INFECTANDO <u>CAPSICUM ANNUUM L.</u>	146
III.5.1.-Origen y sintomatología de las muestras	147
III.5.2.-Gama de huéspedes	147
III.5.3.-Microscopía electrónica	152
III.5.4.-Discusión	162
 III.6.- EL VIRUS DEL MOSAICO DE LA CALABAZA (SqMV) INFECTANDO CUCURBITACEAS	 165
III.6.1.-Origen y sintomatología de las muestras	166
III.6.2.-Gama de huéspedes.....	167
III.6.3.-Microscopía electrónica.....	176
III.6.4.-Purificación de los aislados de SqMV	179
III.6.5.-Análisis electroforético de las proteínas y ácidos nucleicos de los aislados de SqMV.....	191
III.6.6.-Análisis estructural de los viriones purificados de SqMV.....	194
III.6.7.-Obtención y titulación de los inmunosueros...	208
III.6.8.-Caracterización serológica de los aislados SqMV-C1 y SqMV-C3	208
III.6.9.-Inmunodetección de las proteínas de la cubierta viral de SqMV	212
III.6.10-Discusión	220
 <u>IV.- RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	 225
 BIBLIOGRAFIA.....	 233



INTRODUCCION

-2-
MORFOLOGIA DE LOS VIRUS DE PLANTAS

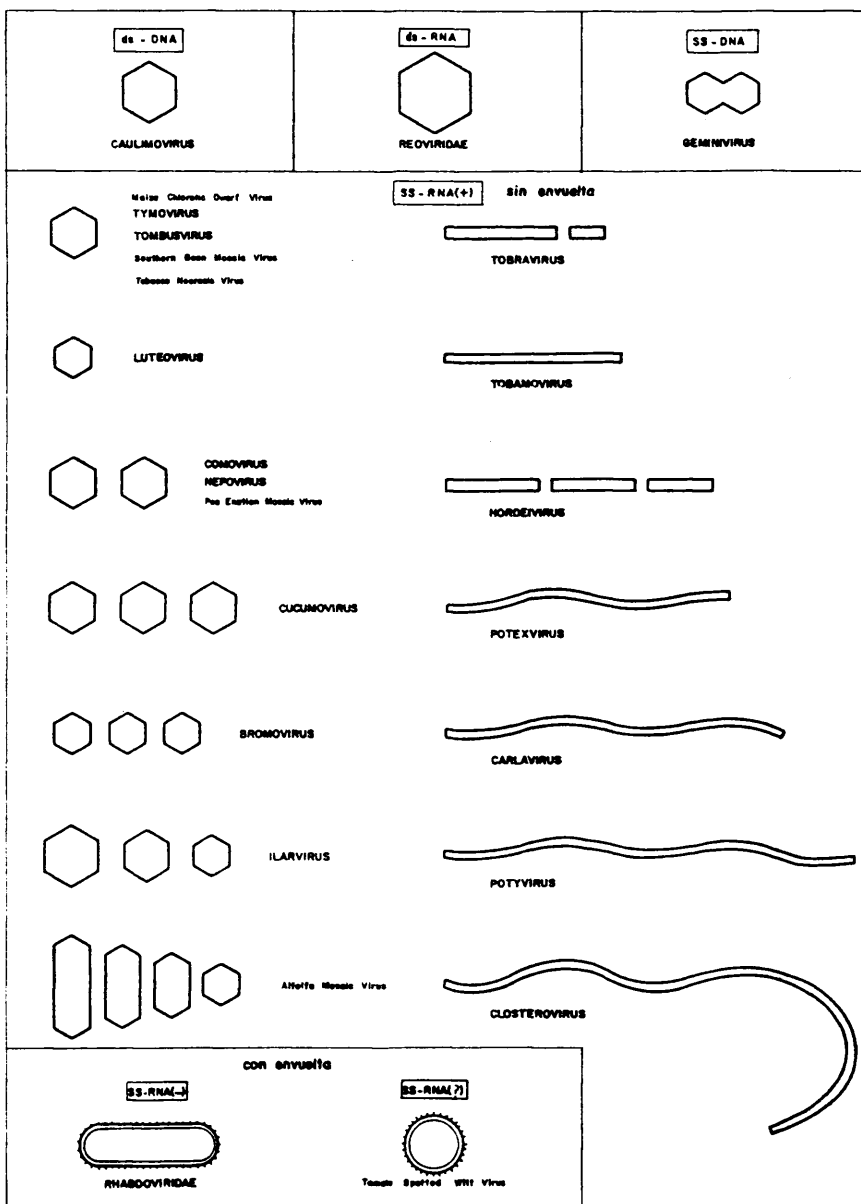


Figura 1.

I.- INTRODUCCION

I.1.- CLASIFICACION DE LOS VIRUS DE PLANTAS

Desde la creación en 1951 del Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (CITV), aún no ha sido posible el establecimiento de criterios definitivos para una adecuada clasificación de los virus de plantas. Categorías como la de familia, no han sido generalmente aceptadas entre los virólogos de plantas, prefiriendo la más ambigua de "grupo" (Matthews,1987). En la actualidad, los más de 700 virus vegetales conocidos se agrupan oficialmente en 26 grupos y dos familias en base a la naturaleza del genoma viral (el 92% de los virus de plantas poseen ARN de sentido positivo), a la presencia o no de envueltas lipoprotéicas y a la morfología de los viriones. La distinción entre los miembros de un grupo, generalmente se establece teniendo en cuenta el tipo de vectores, la gama de huéspedes, las propiedades fisicoquímicas de las partículas, las alteraciones citopáticas o inclusiones que inducen en las células del huésped, y las relaciones serológicas.

En la figura 1 se muestra un diagrama ilustrativo de los diferentes grupos de virus de plantas según el CITV (Matthews,1982)

El avance registrado en los últimos años en el conocimiento de los procesos de replicación y expresión de los genomas virales, unido al establecimiento de secuencias nucleotídicas y aminoácidas en gran número de grupos de virus, han llevado a nuevos planteamientos en la taxonomía de éstos (Matthews,1987). La comparación de secuencias, principalmente de las replicasas virales, sugieren un antecesor común para todos los virus ARN tanto de animales como de plantas, independientemente de la morfología de sus partículas (Goldbach,1986; Strauss y Strauss,1988). Actualmente se admiten, para los virus ARN, cuatro superfamilias que agrupan familias de virus animales y grupos de virus de plantas que se suponen están evolutivamente relacionadas (Goldbach,1986; Strauss y Strauss,1988).

La superfamilia I, cuyas replicasas presentan homologías de secuencia aminoacídica con las de los Alphavirus, incluye entre los virus de plantas a los grupos Tobamovirus, Tobravirus, Bromovirus, Ilarvirus y Cucumovirus. La superfamilia II con secuencias de las replicasas semejantes a las de los Picornavirus, incluye los grupos Comovirus, Nepovirus y Potyvirus. La superfamilia III agrupa a los virus con ARN de sentido negativo y envuelta con glicoproteínas e incluye entre otras, las familias Rhabdoviridae y Bunyaviridae con la que se relaciona estrechamente el virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV). La superfamilia IV incluye los virus con ARN de doble cadena, principalmente la familia Reoviridae.

Los nuevos criterios filogenéticos aplicados a la taxonomía de los virus permitirán en breve conocer su historia evolutiva y las relaciones entre los distintos grupos de virus. Sin embargo, en el estado actual de los conocimientos sigue teniendo vigencia para la identificación de los virus vegetales la aplicación de los clásicos criterios o normas establecidos por el CITV (Matthews, 1982).

I.2.- MANIFESTACIONES MACROSCOPICAS DE LA INTERACCION VIRUS-HUESPED

Los virus son parásitos moleculares que están obligados a utilizar los sistemas bioquímicos y enzimáticos de las células del huésped para poder multiplicarse, lo que puede producir modificaciones visibles en las plantas que se reconocen como síntomas, y que son el reflejo de la respuesta del huésped a la infección (Zaitlin y Hull, 1987).

La primera relación entre virus y planta huésped consiste en la entrada de éstos en alguna célula del huésped, encontrándose con la eficaz barrera de las paredes celulósicas, por lo que la transmisión de los virus en la naturaleza se realiza generalmente a través de lesiones en las plantas o mediante vectores tales como hongos, insectos o nemátodos. Una vez en el interior de una célula para que la infección viral tenga éxito, el genoma del virus ha de ser capaz de desprenderse de la cápsida y realizar un ciclo de multiplicación para formar una nueva progenie viral. Las respuestas

macroscópicas que permiten detectar la infección se inician cuando la progenie viral además es capaz de extenderse a las células adyacentes. Estas respuestas visualizadas como síntomas, consisten fundamentalmente en cambios en el color de las hojas, como clorosis o zonas verde claro que alternan con zonas de color verde intenso a modo de mosaicos, o bien alteraciones del crecimiento, como excrecencias y enanismos (Esau,1967; Van Loon,1987). Otras veces, las plantas se defienden aislando rápidamente las células infectadas en un entorno de células muertas formando las llamadas lesiones necróticas (Rubio-Huertos,1950).

La determinación de la gama de huéspedes y sintomatología fueron en el pasado criterios utilizados en la clasificación de los virus, lo que ha quedado reflejado en su denominación en clara alusión al huésped y al síntoma. Actualmente estos criterios han perdido valor taxonómico, si bien son de gran utilidad como complementarios de otros referidos directamente a las características intrínsecas de los propios virus así como para diferenciar virus dentro de un mismo grupo.

I.3.- ASPECTOS MICROSCOPICOS DE LA INTERACCION VIRUS-HUESPED

El estudio mediante microscopía electrónica de las infecciones virales en plantas, ha permitido poner de manifiesto las alteraciones microscópicas que se producen en las células infectadas. Puesto que estas alteraciones son el resultado de la interacción huésped-patógeno, en la que el virus juega un papel primordial, tienen en muchos casos valor diagnóstico y taxonómico (Rubio-Huertos,1972; Martelli y Russo,1977a; Edwardson y Christie,1978; Martelli y Russo,1984).

I.3.1.- LOCALIZACION INTRACELULAR DE LAS PARTICULAS VIRALES

Los datos obtenidos del estudio de las infecciones virales mediante microscopía electrónica, demuestran que el citoplasma es el lugar más frecuente de acumulación de las partículas virales, las cuales pueden presentarse distribuidas al azar o formando

inclusiones como agregados de partículas en haces de aspecto filamentosos o empaquetamientos paracrystalinos (Rubio-Huertos, 1972). Estas agregaciones de partículas o inclusiones tienen en muchos casos valor diagnóstico y taxonómico (Martelli y Russo, 1984).

Con frecuencia las partículas virales atraviesan el tonoplasto y se acumulan en la vacuola distribuyéndose también allí al azar o formando agregados de partículas e incluso formaciones cristalinas, como sucede con muchos virus isométricos (Esau, 1967; Rubio-Huertos, 1972; Martelli y Russo, 1977a).

No suele ser frecuente la presencia de partículas virales en el núcleo (Esau, 1967). Cuando las partículas virales completas, aisladas o formando haces, o bien nucleocápsidas desnudas se localizan en el nucleoplasma, generalmente producen vesiculaciones anormales, aumento del tamaño del núcleo o alteraciones morfológicas en los nucleolos (Martelli y Russo, 1977a). Algunos grupos de virus, particularmente Rhabdovirus, forman grandes acumulaciones de partículas en el espacio perinuclear. Generalmente sucede en los Rhabdovirus de origen nuclear los cuales toman la membrana interna del núcleo para su proceso de maduración (Francki, 1973; Rubio-Huertos y Rubio-Saez, 1986).

En algunas infecciones virales las partículas forman característicos grupos en el interior del retículo endoplásmico, como en el caso del virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV) (Francki y Hatta, 1981) y en los Rhabdovirus de ensamblaje citoplásmico. En todo caso, dada la comunicación existente entre el enquilema del retículo con el espacio perinuclear, membrana plasmática y plasmodesmos, es probable que éste sea también camino para el desplazamiento intracelular de algunos virus o de sus componentes. El posible papel de los plasmodesmos en los movimientos "célula a célula" de los virus, lo presentamos con más detalle en el apartado I.3.4.

Con frecuencia las infecciones virales producen alteraciones en el número y tamaño de los cloroplastos, así como alteraciones morfológicas consistentes en la destrucción de los sistemas lamelares, vacuolización del estroma y alteraciones en los procesos de síntesis de azúcares y aminoácidos (Magyarosy *et al.*, 1973) y que

están relacionadas con los síntomas de mosaico y clorosis (Martelli y Russo,1985). La presencia de partículas virales en el interior de los cloroplastos que es característica de algunas cepas de TMV (Martelli y Russo,1977a;Edwardson y Christie,1986b;Zaitlin y Hull,1987), no suele ser frecuente en otros virus. Tampoco en las mitocondrias se localizan partículas virales, siendo frecuente sin embargo alteraciones morfológicas en ellas tales como la disminución o desaparición de las crestas, hinchamiento de la matriz y degeneración de las mitocondrias. También los lisosomas sufren alteraciones en tamaño y número en relación con la infección viral (Rubio-Huertos,1972).

I.3.2.- INCLUSIONES CELULARES PRODUCIDAS POR LOS VIRUS

Uno de los cambios más específicos en las células del huésped inducidos por las infecciones virales, consiste en la producción de cuerpos o estructuras microscópicas que difieren de cualquier otra estructura existente en las células normales (Rubio-Huertos,1972).

Estas estructuras formadas "ex novo", denominadas inclusiones, pueden contener virus, proteínas codificadas por el virus, o constituyentes celulares; localizarse en el núcleo o en el citoplasma, y ser amorfas o cristalinas. En todo caso, su apariencia y constitución suele ser característica de determinados grupos de virus (Rubio-Huertos,1972).

INCLUSIONES NUCLEARES

Aunque no son frecuentes, algunos virus inducen la formación de inclusiones nucleares. Así, en infecciones producidas por algunos virus del grupo Potyvirus se han observado cuerpos de naturaleza protéica asociados al nucleolo; inclusiones en forma de placas y grandes prismas cristalinos características del virus del grabado del tabaco (TEV) así como inclusiones fimbriadas en el caso de Zucchini yellow fleck virus (ZYFV). Estas inclusiones protéicas localizadas en el núcleo, no están relacionadas serológicamente con las proteínas de la cápsida viral ni con las de las inclusiones citoplásmicas cilíndricas que simultáneamente

producen estos Potyvirus (Martelli y Russo,1984).

INCLUSIONES CITOPLASMICAS

Gran número de virus producen características inclusiones citoplásmicas de valor taxonómico en muchos casos. Quizás las de mayor valor diagnóstico sean las producidas por todos los Potyvirus que consisten en la formación de estructuras protéicas a modo de láminas que pueden soldarse en bandas densas a los electrones, formar rollos, cilindros excéntricos o "scrolls", y molinetes o "pinwheels" (Rubio-Huertos y López Abella,1966;Edwardson,1966). La proteína constitutiva de dichas inclusiones está codificada por el genoma viral y no está relacionada serológicamente con la proteína de la cápsida (Hollings y Brunt,1981b). El papel que desempeñan las inclusiones cilíndricas (ICC) no es bien conocido, aunque se supone que es para aislar estas proteínas que, de otra forma, podrían ser perjudiciales para el funcionamiento celular. No obstante, se sabe que su morfología es característica de determinados virus y que ésta no cambia en el transcurso de la enfermedad, lo que les confiere un importante valor taxonómico dentro del grupo de los Potyvirus (Edwardson,1974; Edwardson y Christie,1978; Edwardson et al., 1984; Edwardson y Christie,1986a). En el apartado III.1, se presenta un estudio detallado de estas inclusiones cilíndricas.

Determinados Potyvirus, como el virus del mosaico de la sandía, estirpe I (WMV-1), inducen además inclusiones amorfas posiblemente formadas por proteínas y ARN, presentes en todos los aislados, lo que les confiere valor diagnóstico diferencial para WMV-1(Martelli y Russo,1976).

Algunas cepas del virus del mosaico del tabaco (TMV), inducen la formación de grandes cuerpos de inclusión amorfos, denominados "cuerpos X", y constituidos por material citoplásmico, ribosomas, mitocondrias, retículo endoplásmico y una masa de túbulos de naturaleza protéica y de mayor tamaño que las partículas del virus, que también tienen valor diagnóstico (Rubio-Huertos,1972; Edwardson y Christie,1978;Martelli y Russo,1984;Edwardson y Christie,1986b).

Igualmente, el virus X de la patata, miembro tipo del grupo

Potexvirus, induce la formación de características inclusiones amorfas formadas por elementos del citoplasma, partículas de virus y unas laminillas multiestratificadas alternadas con corpúsculos esféricos que confieren aspecto granular a la inclusión (Rubio-Huertos, 1972; Martelli y Russo, 1977a; Edwardson y Christie, 1978).

I.3.3.- FORMACIONES VIROPLASMICAS

A diferencia de las inclusiones, los viroplasmias consisten en regiones modificadas de la célula infectada y en las que se cree tienen lugar los procesos de replicación y/o de ensamblaje viral.

En general están formados por membranas o vesículas entremezcladas con partículas virales y ribosomas, conteniendo o no formaciones más densas a los electrones y localizados con frecuencia en las proximidades del núcleo celular y tienen en muchos casos valor diagnóstico (Martelli y Russo, 1977a).

Característicos viroplasmias se producen, por ejemplo, en el caso de los Comovirus, donde la infección viral está asociada a la formación temprana de estructuras citopáticas membranosas relacionadas con los procesos de replicación y expresión viral y no con los de acumulación de partículas (Rezelman et al., 1982). Estas estructuras, que se inducen igualmente en protoplastos infectados, están codificadas por el ARN-B viral que también codifica otras proteínas relacionadas con la replicación, actividad proteasa y encapsidación (Dorssers et al., 1984; Goldbach y Van Kammen, 1985).

En el grupo de los Rhabdovirus, se han observado viroplasmias conteniendo ribonucleoproteínas virales en el núcleo (Francki, 1973) o en el citoplasma (Rubio-Huertos y Peña Iglesias, 1973). De forma parecida, en las infecciones del virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV) se ha observado la presencia de material denso de aspecto estriado, formado por ribonucleoproteínas y entremezclado con vesículas, ribosomas y partículas virales (Verkleij y Peters, 1983). El material denso de aspecto estriado de los viroplasmias de TSWV, ha sido interpretado también como formas defectivas del virus (Ie, 1982).

I.3.4.- MOVIMIENTOS DE LOS VIRUS EN LAS PLANTAS INFECTADAS

La manifestación de los efectos de un virus en la planta huésped depende fundamentalmente de que éste sea capaz de propagarse a las células adyacentes o a otras partes de la planta (Hull,1989). A partir de las células infectadas inicialmente, los virus de plantas pueden extenderse "célula a célula" (movimiento a corta distancia) o a través de los sistemas vasculares mediante el llamado movimiento a larga distancia (Esau,1967; Zaitlin y Hull,1987). Ambos tipos de desplazamiento coexisten en muchos virus de los que producen infecciones sistémicas (Hull,1989).

En los desplazamientos a corta distancia de los virus de plantas, parece más que probable que el camino sea a través de los plasmodesmos, en los que han sido localizadas partículas virales (Esau,1967; Palukaitis y Zaitlin,1986), alteraciones de los desmotúbulos en relación con la infección viral (Kitajima y Lauritis,1967), y alteraciones en el tamaño y estructura de los plasmodesmos inducidos por proteínas codificadas por el virus (Atabekov y Dorokhov,1984; Wolf et al., 1989).

A partir de la primera evidencia de proteínas implicadas en los procesos del movimiento del ARN viral en una cepa de tomate de TMV (Nishiguchi et al.,1978), se han ido acumulando datos sobre proteínas responsables del movimiento "célula a célula" en diferentes grupos de virus. Se sabe que TMV codifica una proteína no estructural de 30K (Wolf et al.,1989), que se expresa activamente en los estadios tempranos de la infección decayendo poco después. La proteína ha sido localizada en el interior de los plasmodesmos (Tomenius et al.,1987). Por otra parte, en el virus del mosaico del chicharo (CpMV) que tiene el genoma dividido en dos piezas, se ha visto que el ARN-M codifica, además de las proteínas de cubierta, dos proteínas de 58K y 48K esenciales para el movimiento del virus (Rezelman et al., 1982; Wellink y Van Kammen,1989).

No se han encontrado homologías en las secuencias aminoácidas de las proteínas de 30K de TMV y las de 58K/48K de CpMV (Hull,1989).

Los mecanismos de acción de dichas proteínas en los procesos del movimiento viral a corta distancia, así como las posibles interacciones con las estructuras plasmodesmáticas, no son bien conocidas hasta ahora. Por una parte, Citovsky et al. (1990) proponen para TMV el paso a través de los plasmodesmos exclusivamente del ácido nucléico unido cooperativamente con unidades de la proteína de 30K, la cual, además de controlar el desplazamiento del ARN, lo protegería de la acción de las ribonucleasas y reconocería los plasmodesmos, sin inducir modificaciones estructurales adicionales.

Por otra, Van Lent et al. (1990) han sugerido para CpmV que el paso a través de los plasmodesmos se realizaría por el genoma encapsidado, utilizando unas estructuras tubulares en cuyo interior se han localizado las partículas virales y las proteínas de 58K/48K.

Parece evidente que existen entre los virus vegetales al menos dos mecanismos en el paso "célula a célula", uno en forma de ribonucleoproteína, como el descrito para Tobamovirus, y otro en forma de partículas completas, como el propuesto para los Comovirus (Zaitlin y Hull, 1987; Van Lent et al., 1990). En el caso de los virus de partículas de gran tamaño y que poseen envuelta lipoprotéica, es desconocido el mecanismo para su desplazamiento.

En cuanto al transporte a larga distancia de los virus de plantas, aunque no es bien conocido (Palukaitis y Zaitlin, 1986), generalmente se admite que sucede de forma pasiva a través de los elementos vasculares del floema y del xilema (Esau, 1967), produciéndose la replicación viral en los elementos inmaduros del sistema vascular o en las células acompañantes. Se sabe que formas defectivas en encapsidación de algunos virus que son capaces de moverse entre las células del mesófilo, pierden la capacidad para desplazarse a larga distancia, lo que hace pensar que este tipo de transporte se realiza mediante genomas encapsidados (Hull, 1989).

1.3.5.- LOCALIZACION DE LOS VIRUS EN LOS TEJIDOS VEGETALES

La localización de los virus en las plantas, no suele quedar restringida a un único tejido, sino que frecuentemente infectan células de epidermis, parénquimas, y elementos del floema. En los casos más frecuentes de síntomas de mosaico cuyo efecto más notorio es la relación de los virus con las células del mesófilo, no se excluye la afectación de otros tejidos (Zaitlín y Hull, 1987). En muchas necrosis generalizadas, las alteraciones iniciales suceden en las células parenquimáticas que rodean los haces vasculares, siendo seguidas por alteraciones en los elementos inmaduros del floema y finalmente en el floema y el xilema. Las degeneraciones del floema, generalmente asociadas con distorsiones y malformaciones de tallos y hojas, suelen estar originadas frecuentemente por virus transmitidos por insectos chupadores (Rubio-Huertos, 1956). En estos casos los virus, que se localizan también en las células acompañantes, producen proliferaciones anormales de los vasos, depósitos de calosa y otras alteraciones que afectan incluso a las células parenquimáticas (Esau, 1967). Pocos virus están aparentemente limitados al xilema. Generalmente son virus transmitidos por vectores por cuya inoculación alcanzan esos elementos vasculares (Hull, 1989).

En cuanto a los tejidos meristemáticos, generalmente se admite la ausencia de virus en los meristemas apicales, posiblemente por competencia entre los procesos implicados en la multiplicación celular y la multiplicación viral (Esau, 1967). Sin embargo, algunos virus han sido localizados en las células del meristemo de la raíz, o en el cambium. Tampoco suele ser frecuente la presencia de virus en el embrión (Alvarez y Campbell, 1978), seguramente por razones similares a las de los meristemas y por la ausencia de plasmodesmos entre el megagametofito y el esporofito antiguo, además de razones derivadas de las condiciones de deshidratación de las semillas (Esau, 1967). En las ocasiones en las que los virus infectan el microgametofito (Garret *et al.*, 1985), estas infecciones se transmiten entonces también a través de las semillas (Esau, 1967). No obstante, lo más frecuente en la

transmisión de virus por semillas, es que los virus permanezcan en las envueltas seminales.

En todo caso, parece comprobado que los virus pertenecientes a un mismo grupo tienden a distribuirse de igual manera en las células y tejidos de sus huéspedes, lo que puede servir de pauta en la identificación del grupo al que pertenecen (Esau,1967).

I.4.- MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA DE LAS PARTICULAS VIRALES

La microscopía electrónica ha permitido el conocimiento de la estructura de las partículas virales, necesario no sólo con fines de clasificación sino también para la comprensión de aspectos relacionados con la biología de los virus tales como la supervivencia de éstos fuera de las células, inicio de la infección y proceso de multiplicación viral (Matthews,1981). Se ha comprobado que la estructura de las cápsidas está mantenida por interacciones no covalentes proteína-proteína, proteína-ARN y ARN-ARN con intervención de cationes divalentes (Hull,1978).

A partir del conocimiento de la partícula de TMV, Crick y Watson (1956) formularon la hipótesis de que el ARN infectivo de la mayor parte de los virus de plantas, está protegido por una cubierta o cápsida protéica. Se sabe que la proteína de cubierta está codificada por el genoma viral (Matthews,1981;Savithri et al.,1989), y que las cápsidas pueden construirse más eficazmente con gran número de proteínas de pequeño tamaño en lugar de gran tamaño. De esta forma se hace más eficiente la utilización del material genético de los pequeños genomas de los virus isométricos (comprendidos entre 0,5 y 4 millones de daltons), codificar las proteínas de cubierta y las necesarias para completar su ciclo vital (Savithri et al.,1989) además de facilitar la construcción de cápsidas libres de error.

Para compaginar los datos obtenidos mediante microscopía electrónica sobre la morfología de las partículas virales con la organización de su estructura, Crick y Watson (1956) consideran también, que utilizando repetidamente la misma disposición de las subunidades protéicas en torno al ARN, únicamente existen dos

formas de disposición geométrica para la estructura de los virus: en forma de varilla o en forma de esfera. Los mismos autores consideran que si bien no existe límite teórico en cuanto al tamaño de los empaquetamientos en forma de varilla con simetría helicoidal, sin embargo, los virus esféricos estarían constituidos según una simetría cúbica con un número de subunidades múltiplo de 12. Si el icosaedro es la figura que, cumpliendo los requisitos, tiene la máxima simetría (5:3:2), sólo permite disponer 12, 24 o 60 subunidades idénticas como máximo, en las cápsidas. Caspar y Klug (1962) resuelven la discrepancia al postular la teoría de la "quasi-equivalencia", considerando que para construir estructuras estables es suficiente con la disposición idéntica de grupos de subunidades, lo que permite la construcción de cápsidas con 180, 240 y más subunidades. La teoría de la "quasi-equivalencia" es válida también para los virus en forma de varilla.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio, fundamentalmente mediante microscopía electrónica, de algunos virus vegetales presentes en España y de las alteraciones ultraestructurales que inducen en las células infectadas. La selección de los virus se ha realizado en base a alguno de los siguientes criterios:

a.- Ser representativos, por la morfología de sus partículas, de gran parte de los grupos establecidos en la actual clasificación de virus vegetales.

b.- Producir alteraciones citopáticas no descritas previamente.

c.- No haber sido detectados previamente en España.

d.- No haber sido descritos infectando las plantas donde han sido encontrados.

e.- Estar actualmente produciendo enfermedades en cultivos de importancia económica para el país.

MATERIALES
Y
METODOS

5303491117

II.- MATERIALES Y METODOS

II.1.- TAMPONES Y SOLUCIONES

TAMPON ACETATO VERONAL

Acetato sódico anhidro..... 11,7 gr
(Acetato sódico. 3H₂O..... 19,4 gr)
Veronal sódico..... 29,5 gr
H₂O hasta 1000 ml.
pH 6,9

TAMPON CITRATO 0.1M pH 3.5

Sol A: Acido cítrico. H₂O..... 21,0 gr/litro
Sol B:Na H₂ PO₄.H₂O..... 35,63 gr/litro
Añadir a la Sol A, la B hasta pH 3.5

TAMPON CITRATO 0.5M pH 6.5

Ac. Cítrico 0,5M
Citrato Na 0,5M
Mezclar 1,4 vol. de Ac.Cítrico 0,5M + 18,6 vol. de Citrato
sódico 0,5M

TAMPON CITRATO/TIOGLICOLICO

Es el Tampón Citrato 0,5M, pH 6.5 conteniendo 0,1% de
Ac.Tioglicólico.

TAMPON TRIS ACETATO EDTA "TAE" pH 7.8

Tris..... 40 mM
Acetato Sódico..... 20 mM
Na₂ EDTA..... 2 mM
pH 7.8 ajustado con ácido acético.

TAMPON DE INOCULACION

Es el tampón Fosfato sódico 20 mM pH 7.0

TAMPON FOSFATO SODICO:Solución estándar 200mM

Sol.A 200mM pH 4
Na H₂ PO₄.H₂O 27,0 gr. o bien
Na H₂ PO₄.2H₂O 31,2 gr.
H₂O hasta 1000 ml

Sol. B 200mM pH 9.2

Na₂ H PO₄.2H₂O 35,61 gr. o bien
Na₂ H PO₄.7H₂O 53,70 gr.
Na₂ H PO₄.12H₂O 71,64 gr.
H₂O hasta 1000 ml.

Mezclar las soluciones A y B en las proporciones que se indican para obtener los pH deseados:

<u>pH</u>	<u>Sol A ml</u>	<u>Sol B ml</u>
6.4	73,5	26,5
6.6	62,5	37,5
6.8	51,0	49,0
7.0	39,0	61,0
7.2	28,0	72,0
7.4	19,0	81,0
7.6	13,0	87,0

TAMPON FOSFATO SODICO: Solución estándar 1M pH 8.0

Sol A: Na H₂ PO₄. H₂O 138 gr/litro
Sol B: Na₂ H PO₄.12 H₂O 358,2 gr/litro

Mezclar 2,6 ml Sol. A + 47,4 ml Sol. B

TAMPON PALADE

Tampón acetato Veronal 40%
0,1N HCl 20%
H₂O 40%

pH 6,9

TAMPON DE TRANSFERENCIA pH 8.3

Tris-HCl 25 mM
Glicina 192 mM
SDS 0,1%
Metanol 20% v/v

TAMPON TRIS-GLICINA-SDS

Tris..... 25mM
Glicina..... 192mM
SDS..... 0,1%
pH 8.3

SOLUCION DE AZIDA SODICA

Azida sódica..... 15mM

SOLUCION AMIDOBBLACK

solución de 0,1% amidoblack en 45% Metanol y 10% acido acético.

SOLUCION AZUL DE COOMASSIE G-250

Azul de Coomassie G-250..... 0,25gr
Metanol absoluto..... 45ml
Acido acético..... 9,2ml
H2O..... 45ml

SOLUCION AZUL DE COOMASSIE R-250

Azul de Coomassie R-250..... 0,25g
Etanol absoluto..... 20%
Acido Tricloroacético..... 10%
H2O..... 69,75%

SOLUCION DECOLORANTE

Metanol..... 3 vol
Acido acético..... 1 vol
H2O..... 7 vol

SOLUCION DISOCIADORA

625mM Tampón Tris-HCl, pH 6.8..... 113ul
SDS 20%..... 113ul
2-mercaptoetanol..... 23ul
Azul de Bromofenol al 0,0025%

SOLUCION SALINA TAMPONADA (PBS) 10 mM Fosfato pH 7.2

NaCl..... 8gr
HNa2PO4.2H2O..... 1,34 gr.
H2NaPO4.2H2O..... 0,4 gr.
H2O hasta..... 1000 ml.

II.2.- MÉTODOS DE INOCULACION DE VIRUS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE PLANTAS

II.2.1.- INOCULACION MECANICA

Como pauta general, las inoculaciones en las plantas de ensayo se realizaron mecánicamente, según el método descrito por Gibbs y Harrison (1976). Como abrasivo, se utilizó Celite Type 535 (Tierra de diatomeas de 0,01 a 0,04 mm), y como tampón de inoculación, el tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7.0 (aptdo II.1).

En los ensayos de transmisión de Rhabdovirus, alternativamente se utilizó tampón fosfato sódico 20 mM conteniendo 0,1% de 2-mercaptoetanol (Lockhart et al., 1985)

Como inóculos se utilizaron extractos crudos de planta obtenidos por trituración de las muestras en mortero, con el tampón de inoculación (aptdo II.1). Las inoculaciones se efectuaron en las hojas cotiledónicas o en primeras hojas de plantas jóvenes. Los utensillos requeridos se trataron con lejía y posteriormente se autoclaclavaron para esterilización.

II.2.2.- OTROS METODOS

Se realizaron ensayos de transmisión de Rhabdovirus infectando Evonymus japónica Thunb. (aptdo III.3) mediante:

a) Inoculación por injerto: piezas del tallo de plantas de Evonymus sanas fueron reemplazadas por otras de plantas infectadas (Rodríguez et al., 1987).

b) Inoculación por incisión: con ayuda de una lanceta, se realizaron incisiones en los tallos de Evonymus con forma de cuadrícula y de 2 a 3 mm de profundidad, sobre las que se colocó el inóculo.

II.2.3.- CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS PLANTAS DE ENSAYO

Las plantas de ensayo se hicieron germinar sobre un sustrato

de turba libre de patógenos, en cámara de cultivo a 25°C, 60% de humedad relativa, 11.000 lux de intensidad e iluminación continua.

Las plantas inoculadas y las de control, crecieron y se mantuvieron en cámara de cultivo en las condiciones arriba descritas, con un fotoperiodo de 16 hr.

II.3.- MÉTODOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El elevado poder de resolución de los microscopios electrónicos los convierte en el instrumento idóneo en el estudio de los virus. Permite el estudio ultraestructural de las partículas aisladas, de las células infectadas, la localización celular de viriones o estructuras con ellos relacionadas y su interacción con los orgánulos celulares.

Los estudios de la presente tesis doctoral, se realizaron en un microscopio Philips modelo EM-300 de 100Kv, 3,4 A° de resolución y 500.000 aumentos. El estudio seriado de las partículas del virus del mosaico de la calabaza (SqMV), se realizó en un microscopio Philips EM-420, de 120Kv, 3 A° de resolución y 800.000 aumentos, dotado de goniómetro Ucentrico $\pm 45^\circ$, todos ellos del Servicio de Microscopía electrónica del CIB, CSIC de Madrid.

El material biológico, en general de bajo número atómico, contribuye poco a la formación de imágenes, por lo que es necesario añadir átomos pesados en la preparación de las muestras (tinciones electrónicas), para aumentar el contraste de las mismas. El soporte de las muestras consistió en rejillas de cobre o níquel electrolítico de 3 mm de diámetro y de 200 a 400 mallas (mesh), recubiertas por una fina película de plástico de polivinilformal al 4% en 1-2 dicloroetano (formvar), de 100 a 200 A° de espesor (Hall, 1970), reforzada por carbón vaporizado al vacío, en un vaporizador Siemens.

Las técnicas utilizadas consistieron en tinciones negativas

de extractos crudos de plantas y de virus purificados y cortes ultrafinos de tejidos.

II.3.1.- TINCIONES NEGATIVAS

Esta técnica introducida por Hall (1955) y desarrollada por Brenner y Horne (1959), consiste básicamente en embeber la muestra líquida en una solución de algún metal pesado que ocupará los espacios vacíos entre las macromoléculas de la muestra. Los electrones pasarán sólo a través de las moléculas biológicas por lo que éstas aparecerán bien delimitadas en contraste negativo. En determinadas condiciones, la muestra puede interaccionar químicamente con el colorante, produciendo un efecto de tinción positiva. La sal del metal a utilizar debe tener gran solubilidad, ser amorfa, y estable a la acción del haz de electrones. Las más utilizadas son las de tungsteno, uranio o molibdeno.

La preparación de tinciones negativas de extracto crudo de plantas infectadas, consistió en triturar sobre un porta una pequeña porción de la muestra mezclándola a partes iguales con la solución del colorante electrónico elegido (Brandes, 1957). Se colocó una gota de la mezcla sobre la rejilla y después de 1 ó 2 minutos, se eliminó el exceso de líquido con una pipeta pasteur estirada. La rejilla se dejó secar al aire protegida del polvo.

Para tinciones negativas de virus purificados se mezclaron, a partes iguales, la solución conteniendo los virus y el colorante, procediendo como en el caso anterior.

A continuación se describen las diferentes tinciones negativas utilizadas en el desarrollo del presente trabajo.

A) ACIDO FOSFOTUNGSTICO (PTA): Fosfotungstato sódico o potásico. El método descrito por Brenner y Horne (1959), ha resultado ser la tinción más general, puesto que proporciona alto contraste de imagen, es muy soluble en un amplio rango de pH y es relativamente estable. Habitualmente se prepara en solución acuosa al 2%, ajustando el pH a 7 con NaOH ó KOH. El PTA neutro tiene el

inconveniente que produce daño o destruye las partículas de algunos virus como Cucumovirus, Geminivirus, Ilarvirus, Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), Rhabdovirus, Fijivirus, Virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV) y algunos Closterovirus (Francki et al., 1984).

A pH entre 3.0 y 4.5, el PTA no produce daños en las partículas, pero las preparaciones resultan poco contrastadas y de baja calidad, por lo que es preferible prefijar las muestras.

B) ACETATO DE URANILO (UA):

Solución acuosa desde el 2% al 0,1%. El pH no se ajusta y está en torno a 4.2. Cuando la tinción se utiliza cuidadosamente, proporciona mejor contraste y resolución de imagen que ninguna otra, no resultando dañada por el haz de electrones y pudiendo almacenar las preparaciones durante varios meses. Únicamente las partículas de Rhabdovirus resultan dañadas por el UA (Milne, 1984).

La tinción tiene el inconveniente de formar precipitados a pH inferior a 5.5 y, en presencia de extracto crudo de planta (Milne, 1984; Christie et al., 1987), lo que puede obviarse fijando el extracto a la rejilla y lavando una vez seco con Tampón fosfato 0,01M pH 7.0 previamente a la tinción.

El UA se altera por la acción de la luz, es ligeramente radioactivo y no se puede conservar durante más de dos semanas, siendo preferible prepararlo en el momento.

C) FORMIATO DE URANILO (UF):

La tinción es similar a la del UA aunque resulta más alterada por acción de los electrones. Puede ser la tinción de elección si se quiere resaltar detalles ultraestructurales (Christie et al., 1987). Muy inestable a la luz, precipita en muchos disolventes incluido el agua. Soluble en metanol, a 20°C la solución está saturada al 4%. Puede almacenarse durante un mes como solución sobresaturada en metanol.

La solución stock de UF se preparó siguiendo el método descrito por Christie et al., (1987), consistente en disolver 2gr de UF en 5ml de metanol durante 1 hr en agitación y oscuridad, seguido

por 10 min. de reposo. Sin remover el sedimento se separó el sobrenadante en alíquotas, sellando los tubos y conservándolos en oscuridad a temperatura ambiente.

La tinción se preparó en pocillos de porcelana blanca. En uno de ellos se colocaron unas gotas de UA como control colorimétrico; en otro, unas gotas de la sol. saturada de UF a la que se añadió gota a gota, agua bidestilada estéril hasta que el color fué de un amarillo semejante al del UA (Christie et al., 1987). La muestra se tiñó como se ha descrito anteriormente.

D) MOLIBDATO AMÓNICO (AM):

Tinción muy estable, produce menores daños a las partículas virales pero proporciona peores contrastes y resolución de imagen que el PTA o el UA. Habitualmente se utiliza en solución acuosa al 2% resultando un pH 5.5 que se puede llevar a pH 4 con HCl, y hasta pH 9 con NH₄⁺

Puede resultar la tinción de elección para Rhabdovirus, virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV) u otros virus que resulten alterados por la acción del PTA (Milne, 1984).

E) FIJACION PREVIA A LAS TINCIONES NEGATIVAS.

En aquellas preparaciones en las que se sospechó que la tinción pudiera producir daños a las partículas virales, se procedió a una fijación previa con glutaraldehído al 1% o formaldehído al 2%, en tampón fosfato 0,01M pH 7.0. Martelli y Russo (1984), aconsejan preparar el formaldehído a partir del sólido paraformaldehído. Para ello, se preparó una solución concentrada que se calentó a 60°C y a la que se añadieron unas gotas de 1N NaOH hasta que la solución quedó transparente. Antes de usarla, se diluyó en tampón fosfato 0,01M pH 7.0.

Las muestras se prepararon mezclando a partes iguales la solución fijadora con el extracto crudo de planta o, con la solución conteniendo los virus purificados, dejándolos actuar durante un minuto y, tiñendo después como habitualmente.

II.3.2.- CORTES ULTRAFINOS

Esta técnica permite el estudio intracelular de los virus de forma complementaria a las técnicas de tinción negativa, así como de las alteraciones celulares inducidas por ellos (Rubio-Huertos, 1978; Martelli y Russo, 1984).

Esta información permite traspolar los efectos en términos de su significado funcional (Rubio-Huertos, 1978) y, como quiera que las alteraciones pueden ser más o menos específicas, constituyen un criterio más para la identificación del agente causal (Rubio-Huertos, 1978). La técnica permite también realizar cortes seriados de una misma zona infectada, pudiendo así establecer la secuencia citopatológica de la lesión (Milne, 1966). Además, cuando una infección viral detectada en plantas de campo no es posible transmitirla a huéspedes experimentales, la mejor información disponible para la identificación del agente causal la proporcionan las técnicas de microscopía electrónica, particularmente la de cortes ultrafinos.

En esta técnica se utilizan pequeños trozos de tejido preferentemente de hojas jóvenes y de la zona en la que los síntomas sean más patentes. El material se somete a un proceso de fijación con tetróxido de osmio, deshidratación en serie de acetonas e inclusión en una resina sintética tipo "epoxi" como describimos a continuación:

A) FIJACION DE LAS MUESTRAS

El proceso de fijación permite estabilizar las estructuras celulares de modo que no sufran grandes alteraciones frente a los drásticos tratamientos posteriores, incluido la exposición al haz de electrones (Martelli y Russo, 1984). Una prefijación con aldehidos permite estabilizar las proteínas, eliminando los daños durante la postfijación con tetróxido de osmio.

Las muestras fueron troceadas en piezas de 1 a 2 mm² sobre un

portaobjetos en presencia de glutaraldehído al 5% en tampón fosfato sódico 0,1M pH 7.0. La prefijación se realizó sumergiendo las piezas en un tubo ependorf conteniendo la solución de glutaraldehído, durante 2 horas a temperatura ambiente. Con el fin de facilitar la penetración de la solución fijadora se centrifugó a 5000 r.p.m durante 30 seg. en una microcentrífuga Heraeus sepatech, Biofuge A y alternativamente mediante vacío. El tiempo de la prefijación se prolongó en función de la naturaleza del tejido.

El glutaraldehído fué el prefijador elegido no sólo por el efecto estabilizador sobre las proteínas a las que hace insolubles mediante enlaces inter e intramoleculares, sino porque parece que preserva finas estructuras como microtúbulos que son destruidas cuando la fijación se realiza únicamente con tetróxido de osmio (Martelli y Russo, 1984).

La prefijación se detuvo lavando las muestras con tampón fosfato por 6 veces a intervalos de 30 minutos, eliminando así los restos de glutaraldehído que pudieran reaccionar con el tetróxido de ósmio y dar lugar a precipitados en el interior de los tejidos (Martelli y Russo, 1984).

A continuación se procedió a la postfijación o fijación propiamente dicha (siempre en el mismo tubo), con tetróxido de osmio durante 2 hr a 4°C (Palade, 1952). La solución fijadora de Palade se preparó mezclando inmediatamente antes de ser utilizada, solución acuosa al 2% de tetróxido de osmio con igual volumen del "tampón Palade" (aptdo II.1). El tetróxido de osmio tiene la propiedad de estabilizar los lípidos insaturados haciéndolos insolubles por establecer enlaces cruzados con ellos. El efecto primordial es sobre las unidades de membrana que aparecen nítidamente delimitadas, mientras que sin la fijación por el osmio, o por una deficiente fijación, la bicapa lipídica se solubiliza durante la deshidratación posterior, lo que dá lugar a imágenes negativas de los sistemas de membranas (Martelli y Russo, 1984). En las células prefijadas con aldehídos, la penetración del tetróxido de osmio es más lenta, proporcionando mayores ventajas.

B) DESHIDRATACION

La mayoría de las resinas utilizadas en la preparación del material biológico para cortes ultrafinos son insolubles en agua, por lo que es necesario sustituirla, del interior de los tejidos, por disolventes orgánicos. El agente deshidratador elegido fué acetona en soluciones de concentración creciente (Ryter y Kellenberger, 1958), por movilizar los fosfolípidos menos que el etanol y ser más compatible que éste con las resinas sintéticas tipo "epoxi" (Martelli y Russo, 1984).

El contraste de las estructuras celulares se incrementa cuando el material es tratado con soluciones de acetato de uranilo (UA) previamente a la inclusión en las resinas. La pauta de deshidratación y tinción de contraste que se siguió consistió en tratamientos sucesivos con acetona al 30%, acetona 50%, y acetona 70%. A continuación se procedió al tratamiento con la tinción de contraste (acetona 70% + solución acuosa al 2% de acetato de uranilo a partes iguales) durante 12 horas a toda la noche, seguido por nuevas deshidrataciones con Acetona 90% y acetona 100%. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente en el mismo tubo ependorf, utilizando una pipeta pasteur para el cambio de las acetonas. Para eliminar todo resto de agua en el disolvente, se preparó acetona al 100% sobre sulfato de cobre anhidro desecado en estufa. Esta acetona es la que se utilizó en las últimas etapas de la deshidratación.

C) INCLUSION EN RESINAS SINTETICAS

La inclusión de las muestras se realizó en una resina tipo "epoxi", el Durcupán ACM de la casa Fluka, que contiene como resina la Araldita (Glauert y Glauert, 1958). Las resinas "epoxi" se caracterizan por la presencia de grupos epóxido C-O-C que polimerizan por la adición de un agente entrecruzante, el acelerador. La dureza puede ser controlada por la adición previa de un endurecedor.

Las proporciones que se utilizaron para los distintos componentes de las resinas y su polimerización, fueron las sugeridas por la casa Fluka para el Durcupan ACM :

Durcupán ACM.....	10 ml
Endurecedor 964.....	10 ml
Dibutil Ftalato.....	0,1 a 0,2 ml
Acelerador 964.....	0,3 a 0,4 ml

Como sustancia puente entre la acetona y la resina se utilizó el óxido de propileno (Luft,1961), el cual se mezcló en proporciones crecientes con la mezcla "Araldita I" (que es la mezcla Durcupán sin acelerador, que se preparó y mantuvo en estufa a 50°C).

La pauta que se siguió consistió en tratar la muestra una vez deshidratada con óxido de propileno (4°C) y, mezclas sucesivas de éste con la "Araldita I" en proporciones 3:1; 2:2; 1:3 y, "Araldita I" donde permaneció a 50°C en estufa, de 2 hr a toda la noche.

La mezcla "Araldita II" contiene además el agente entrecruzante que va a actuar acelerando la polimerización, "el acelerador 964", por lo que se preparó 30 minutos antes de ser utilizada, manteniéndola en estufa a 50°C. Las piezas se sumergieron en la mezcla "Araldita II" durante hora y media a 50°C y se colocaron en el extremo piramidal de moldes los cuales se rellenaron con "Araldita II" y mantuvieron en estufa a 70°C durante 48 horas, para que la polimerización de la resina fuese total, quedando los bloques orientados y preparados para la realización de los cortes ultrafinos.

A continuación exponemos un breve esquema de la técnica descrita.

ESQUEMA DEL METODO DE PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA
CORTES ULTRAFINOS.

- Piezas de tejido de 1 a 2 mm²

1.- FIJACION

- Prefijación en glutaraldehído al 5% en 0,1M T.P pH 6.9 (previa centrifugación)..... 2 hr
- Lavados en 0.1M tampón fosfato pH 7.0 ... 6 X 15 minutos.
- Postfijación en 1% tetróxido de Osmio 2 hr (4°C).

2.- DESHIDRATACION Y TINCION DE CONTRASTE

- Acetona 30% ... 15 min.
 - Acetona 50% ... 30 min.
 - Acetona 70% ... 30 min.
- Acetona 70% + 2% AU ... 12 hr. a toda la noche
 - Acetona 90% ... 30 min.
 - Acetona 100% ... 30 min.
- Acetona 100% + CuSO₄ ... 2 X 30 min.

3.- INCLUSION

- Oxido de propileno ... 2 X 1 hr.(4°C).
 - Oxido de propileno + mezcla "Araldita I"(t° ambiente)
proporción 3:1 ... 2 hr
 - " 2:2 ... 2 hr a toda la noche
 - " 1:3 ... 2 hr
 - Mezcla "Araldita I" ... 2 hr (en estufa a 50°C)
 - Mezcla "Araldita I" ... 12hr a toda la noche(estufa a 50°C)
 - Mezcla "Araldita II" ... 1 hr (en estufa a 50°C)
 - Mezcla "Araldita II" ... 30 min.(en estufa a 50°C)
- Colocar las piezas en los moldes, rellenar con la mezcla "Araldita II" y dejar en estufa a 70°C durante 48 horas.

D) ULTRAMICROTOMIA

Para la obtención de cortes ultrafinos seriados del orden de 60 a 90 nm de grosor, se siguió la técnica introducida por Pease y Baker (1948) utilizando un ultramicrotomo LKB III 8.800, de iluminación vertical y avance automático. Los bloques de resina conteniendo las muestras, se colocaron en el soporte fijo del ultramicrotomo y se tallaron manualmente bajo lupa binocular dándoles forma de pirámide rectangular de menos de 0,5 mm de lado.

Los cortes se realizaron con cuchilla de vidrio 3,7 x 2,5 x 1cm, cuya arista afilada se obtiene seccionando por presión las barras comerciales rectangulares, según un ángulo de 45°. Comprobada a la lupa binocular la ausencia de estrias en el filo de la cuchilla, se le adhirió una cinta de aluminio al plano inclinado que debidamente parafinada, sirvió de recipiente para la balsa colectora de los corte. La balsa se formó con agua destilada más etanol al 10% para rebajar la tensión superficial. Una vez colocado el bloque en el soporte móvil del ultramicrotomo, los primeros cortes se obtuvieron por avance manual. El grosor relativo se midió por el color de interferencia de la resina sobre el agua, según la escala propuesta por Peachey (1958).

ESCALA DE COLORES DE PEACHEY	
(índice de refracción de la resina = 1.5)	
Color de <u>interferencia</u>	Espesor de <u>los cortes en nm</u>
Gris	< 60
Plateado	60 - 90
Dorado	90 - 150
Púrpura	150 - 190
Azúl	190 - 240
Verde	240 - 280
Amarillo	280 - 340

Cuando los cortes tuvieron las características deseadas, se colocó el avance automático a una velocidad de 1 a 2 mm/seg. Los cortes se estiraron con vapores de cloroformo y se recogieron por contacto sobre las rejillas, según el método descrito por Gettner y Hillier (1950). Los cortes se dejaron secar sobre papel de filtro protegidos del polvo.

E) TINCIÓN DE LOS CORTES

El contraste electrónico de las estructuras celulares se incrementa cuando las muestras que previamente han sido sometidas a la acción del tetróxido de osmio y del acetato de uranilo, se tratan con sales de plomo (Martelli y Russo, 1984).

Se cree que el mayor contraste es debido a que los iones positivos de plomo se unen a los grupos polares de los fosfolípidos cargados negativamente por el osmio reductor. El método utilizado fué el descrito por Reynolds (1963). En él, los átomos de plomo son quelados por citrato en exceso para evitar la formación, en presencia de CO₂, de precipitados de carbonato de plomo.

Se preparó agua libre de CO₂, hirviéndola durante 5 a 10 minutos, y se conservó en frío tapada con papel de aluminio. A 1,33 gr de nitrato de plomo y 1,76 gr de citrato sódico se añadieron 30 ml de agua libre de CO₂, agitando tapado durante 30 minutos para que el nitrato de plomo pasase a citrato de plomo. A continuación se incorporaron 8 ml de NaOH 1N preparado en el momento.

El volumen de la solución citrato de plomo + sosa se completó a 50 ml con agua libre de CO₂, y se agitó manualmente hasta que quedó completamente transparente. La solución se guardó tapada en nevera y de ella se extrajo la cantidad requerida cada vez.

Para teñir los cortes se colocó, sobre un disco de parafina, una gota de citrato de plomo filtrado. Sobre la gota y en contacto con los cortes, se dispuso la rejilla durante 12 minutos.

A continuación la rejilla se lavó inténsamente y la preparación se dejó secar protegida del polvo.

II.4.- MÉTODOS DE PURIFICACION DE VIRUS

La obtención de virus purificado en cantidad suficiente y libre de contaminantes, ha sido condición necesaria para determinaciones dirigidas a la identificación y caracterización de algunos de los virus estudiados, así como para la obtención de inamunosueros.

II.4.1.- METODO DE PURIFICACION DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA CALABAZA (SqMV).

Tras un amplio estudio de la gama de huéspedes (apdo III.6), se decidió utilizar como plantas para la propagación de los aislados del virus del mosaico de la calabaza (SqMV), Cucumis melo.L. var. "Melón amarillo" y Cucurbita pepo.L. var "Belleza negra", por ser ambas infectadas sistémicamente de un modo claro y comportarse mejor en las condiciones de las cámaras de cultivo.

El método seguido fué una ligera modificación del descrito por Klootwijk et al., (1977).

Las hojas con síntomas de infección se trituraron en una turmix, en presencia de tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7.0 en una proporción de 2ml de tampón por gramo de tejido. La concentración salina y de hidrogeniones del tampón está en relación con el punto isoléctrico de las partículas, para conseguir su solubilidad y estabilidad (Francki, 1972; Gibbs y Harrison, 1976). Los restos vegetales de mayor tamaño se eliminaron filtrando el homogenizado a través de cuatro capas de gasa y posterior centrifugación a 9.500 rpm durante 15 min. (4°C), en un rotor Sorvall GSA. Se utilizó una centrifuga Sorvall Inst. RC-5C. El sobrenadante conteniendo las partículas virales, se emulsionó mediante agitación magnética durante 1 a 2 min. (4°C), con 0,7 volúmenes de una mezcla v/v de cloroformo:butanol. El empleo del cloroformo/butanol permite desnaturalizar proteínas, separar los lípidos de la planta y por tanto, clarificar el extracto (Hamilton et al., 1981).

La emulsión se centrifugó a 9.500 rpm durante 15 minutos, con resultado de formación de tres fases: la inferior más densa y de color verde, conteniendo materiales lipofílicos como grasas, ceras y clorofilas; la intermedia, formada fundamentalmente por un precipitado de proteínas de la planta y, la fase superior acuosa, conteniendo sustancias hidrofílicas y virus en suspensión (Francki, 1972; Gibbs y Harrison, 1976).

A la fase acuosa conteniendo los virus (extraída con jeringa), se le añadió (relación peso/volumen), el polímero sintético polietilenglicol 6000 (PEG-6000) al 5% y NaCl 0,2M mezclándolo mediante agitación magnética durante 15 minutos (4°C), con el fin de precipitar las partículas virales. Para que las partículas formasen agregados, la mezcla se mantuvo en reposo durante 45 minutos. Los agregados se precipitaron centrifugando a 9.500 rpm durante 15 min. y se resuspendieron nuevamente en el tampón de extracción. Los materiales pertenecientes a la planta todavía presentes en la suspensión, fueron eliminados mediante centrifugación a 15.000 rpm (15 min. y 4°C), utilizando un rotor Sorvall SS-34. El sobrenadante conteniendo los virus se colocó sobre 1 ml de sacarosa al 40% (relación peso/volumen) en tampón de extracción, centrifugando a 50.000 rpm durante 2,5 hr. (4°C) en un rotor Beckman Ti-65. Se utilizó una ultracentrífuga Beckman L8-70.

El precipitado se disolvió en un pequeño volumen de agua desionizada estéril durante toda la noche a 4°C. Finalmente, para eliminar posibles contaminantes, la solución de virus se centrifugó a 9.2500 rpm durante 15 minutos (4°C), recuperando el sobrenadante.

La concentración de los virus en solución, se midió espectrofotométricamente (aptdo II.4.3) y se almacenó en nevera a 4°C. Para evitar contaminaciones en almacenamiento durante largo tiempo, se añadió azida sódica 1,5 mM.

A continuación exponemos un esquema del proceso

ESQUEMA DEL METODO DE PURIFICACION DE SgMV

- 1- X gr. de hojas infectadas
+ Tampón fosfato sódico 0,1M pH 7.0 2ml/gr X
Triturar en turmix de 1 a 5 minutos
Filtrar por 4 capas de gasa (con presión).
- 2- Centrifugación en rotor GSA a 15.000 g ó 9.500 rpm15 min.
Volumen de sobrenadante (S/N)
+ 0,7 volúmenes de Cloroformo:Butanol (1:1)
Agitación magnética de 1 a 2 min. a 4°C
- 3- Centrifugación en rotor GSA a 15.000 g ó 9.500 rpm15 min.
Recoger la fase acuosa con jeringa.
Volumen de la fase acuosa
+ 5% PEG-6000
+ 0,2M NaCl
Agitación magnética durante 15 min. a 4°C
Reposo durante 45 min. a 4°C
- 4- Centrifugación en rotor GSA a 15.000 g ó 9.500 rpm15 min.
Precipitado (P/P)
+ Tampón fosfato 0,1M pH 7.0 0.5ml/gr X
Resuspender mediante agitación magnética.
- 5- Centrifugación en rotor SS-34 a 27.000 g ó 15.000 rpm...15min.
Recuperar el sobrenadante
Colocar el S/N sobre 1ml de sacarosa al 40%
en Tampón fosfato 0,1M pH 7.0 (relación peso volumen).
- 6- Centrifugación en rotor 65 Ti a 150.000 g ó 50.000 rpm 2,5hr.
o bien rotor 50 Ti a 45.000 rpm 3 hr.
Resuspender el precipitado en 0,2 ml de H2O destilada
estéril durante toda la noche a 4°C
- 7- Centifugación en un rotor SS-34 a 10.000 g ó 9.250 rpm 15min.

Recoger el sobrenadante

Medir concentración (aptdo II.4.3).

Añadir azida sódica 1,5 mM

Almacenar a 4°C.

II.4.2.- METODO DE PURIFICACION DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV).

La purificación se realizó siguiendo el método propuesto por Lot et al., (1972). El material vegetal se trituró con 2ml/gr. de tejido de tampón citrato sódico 0,5M, pH 6.5 que contenía ácido tioglicólico al 0,1% y 2ml de cloroformo por gramo de tejido.

El tampón citrato facilita la extracción de las partículas virales al hacer insolubles constituyentes de la planta y actuar como agente quelante de iones Mg⁺⁺, degradando ribosomas; el ácido tioglicólico es aconsejable como antioxidante en el tampón de extracción, ya que CMV es un virus inactivable por productos de la polifenoloxidasasa.

Al triturar en presencia de cloroformo se forma, como en el método descrito para SqMV, una emulsión que se separa en tres fases mediante centrifugación a baja velocidad. Las partículas víricas se localizan en la fase acuosa menos densa.

A la fase acuosa, extraída con jeringa, se le añadió un 10%(peso/volumen) de Polietilenglicol 6000 (PEG 6000) a fin de precipitar las partículas de virus. Tras una centrifugación a 10.000 rpm, el sedimento se resuspendió en tampón citrato sódico 50 mM, pH 7.0 conteniendo 2% de Tritón X-100. Este detergente se emplea para destruir membranas celulares. Seguidamente se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm para clarificar el extracto y el sobrenadante se centrifugó a 39.000 rpm durante 2,5 hr. para precipitar el virus; el sedimento se suspendió en agua desionizada estéril y conservó a 4°C.

A continuación se realizó otro ciclo de centrifugación diferencial, precipitando en la baja restos vegetales y, en las de alta velocidad las partículas virales. Una vez purificados, los virus se mantuvieron a 4°C en agua estéril y azida sódica 1,5 mM para evitar contaminaciones bacterianas. En estas condiciones los CMV mantienen su integridad e infectividad durante meses.

A continuación se expone un esquema del método de purificación:

ESQUEMA DEL METODO DE PURIFICACION DE CMV

- 1- Triturar en frio
X gr tejido + 2X ml T.Citrato-Tioglicólico + 2Xml Cloroformo.
- 2- Centrifugación en rotor GSA a 9.150 g ó 7.500 rpm,...10 min.
Se forman tres capas y se recoge el sobrenadante (S/N)
X ml S/N + 10% PEG 6000
- 3- Agitación lenta 15 min. a 4°C
Reposo a 4°C durante 30 a 40 min.
- 4- Centrifugación en rotor GSA a 9.150 g ó 7.500 rpm,...20 min.
Recoger el precipitado(P/P) y resuspender en Tampon citrato 0,05M conteniendo 2% Tritón X100 en la proporción 0,5ml / gr tejido original.
- 5- Centrifugación en rotor GSA 16.300 g ó 10.000 rpm,...20 min.
Recoger el S/N
- 6- Centrifugación en rotor Ti-50 a 39.000 rpm,.....2,5 hr
Recoger el P/P
ó centrifugación a 27.000 rpm,.....4 hr
- 7- El P/P se resuspende en 1 ml de H2O destilada y se deja toda la noche a 4°C
- 8- Centrifugación en rotor GSA a 10.400 g ó 8000 rpm,...10 min.
Recoger el S/N
X ml S/N + Tampón citrato 0,5M pH 7, hasta llevarlo a 0,05M
- 9- Centrifugación en rotor Ti-50 a 39.000 rpm,.....2,5 hr
Recoger el P/P
ó centrifugación a 27.000 rpm,.....4 hr
- 10- El P/P se resuspende en 2ml de H2O destilada estéril y se deja toda la noche a 4°C.
- 11- Centrifugación en rotor GSA a 10.400 g ó 8.000 rpm,...10 min.
Recoger el S/N
- 12- Medir la concentración virus purificado (aptdo II.4)
Añadir azida sódica 1,5 mM
Almacenar a 4°C.

II.4.3- CUANTIFICACION DE VIRUS PURIFICADOS.

Debido a la capacidad de proteínas y ácidos nucleicos de absorber la luz ultravioleta como consecuencia de la presencia de componentes con anillos aromáticos, es posible hallar la concentración y grado de pureza de los virus y ácidos nucleicos purificados, mediante la determinación del espectro de absorción entre 220 y 300nm (Brakke,1967).

Las concentraciones, tanto de los virus purificados como de los ácidos nucleicos, se calcularon a partir del espectro de absorción en un espectrofotómetro Shimadzu, UV-160.

Para las partículas virales de SqMV se tomaron los valores dados por Van Kammen(1967) para el virus del mosaico del chicharo (CpMV) $E_{260} 0,1\% = 8,1$. La relación $A_{260}/A_{280} = 1,64$ determina la estimación de pureza para CpMV (Van Kammen y Jager,1978). Para CMV se tomó el valor $E_{260} 0,1\% = 5$, (Kaper et al.,1965).

II.5.- METODO DE EXTRACCION DE LOS ARNs DE SqMV Y CMV

Para la extracción de los ARNs de SqMV y CMV a partir de virus purificados, se empleó la técnica descrita por Van Kammen (1967).

La suspensión de viriones en H₂O bidestilada estéril se diluyó en tampón fosfato sódico 10mM, pH 7.0 hasta obtener una concentración de virus entre 4-5 mg/ml, añadiendo a continuación 0,1 vol. de SDS al 10%.

La acción del SDS favorece la disociación de los virus al interaccionar con los restos de los aminoácidos responsables del mantenimiento de la estabilidad de la partícula vírica (Boatman y Kaper, 1976).

Para SqMV, la solución se calentó a 100°C durante unos 20 segundos (hasta que se volvió completamente transparente), y se

enfrió rápidamente en agua/hielo. Para CMV, la disociación de la partícula se consigue sin necesidad de calentar. A continuación la solución con los viriones disociados se mezcló con igual volumen de fenol saturado en agua (Maniatis et al., 1982) y se agitó fuertemente en vortex durante 10 minutos para conseguir una buena emulsión, que fué centrifugada a 7500 rpm durante 15 minutos en un rotor Sorvall SS-34 y centrifuga Sorvall Inst. RC-5C.

La acción desnaturalizante del fenol sobre las proteínas hace que éstas precipiten en una interfase, quedando los ácidos nucleicos en la fase acuosa superior (Maniatis et al., 1982), que se recogió con pipeta pasteur. Para extraer el resto de las proteínas, la fase acuosa se sometió a uno o más ciclos de fenolización en función de la consistencia de la interfase. Los restos de fenol se retiraron lavando dos veces la fase acuosa con igual volumen de éter dietílico anhidro, retirando la fase éter superior. La fase acuosa resultante se mezcló con 0,1 volúmenes de tampón acetato sódico 3,3M, pH 4.5 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, manteniéndose a -20 °C durante 18 horas o durante 10 min. a -70 °C. La solución conteniendo los ácidos nucleicos precipitados, se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos. El precipitado, una vez decantado y desecado al vacío, se resuspendió en agua desionizada estéril. La concentración se midió espectrofotométricamente (apdo II.5.1). Los ARNs extraídos se almacenaron en congelador a -70 °C. En todo el proceso se utilizó material estéril y libre de RNAasas trabajando a 4 °C.

A continuación se expone un esquema del proceso:

ESQUEMA DEL METODO DE EXTRACCION DE ARNs A PARTIR DE VIRIONES DE SQMV Y CMV.

- 1- ml Virus purificado
+ Tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.0
+ 0,1 vol. SDS 10%
----- concentración menor a 5 mg Virus/ml solución
Para SqMV, calentar 100°C durante 20 seg. y enfriar en agua/hielo
- 2- Mezclar v/v Fenol saturado en H2O
Agitar con vortex 10 min.
- 3- Centrifugación en un rotor SS-34 6.780 g ó 7.500 rpm
..... 15 min.
- 4- Recoger fase acuosa con pipeta
Repetir los pasos 2, 3 y 4, dos veces
- 5- Fase acuosa conteniendo los ARNs
+ 0,1 vol. acetato sódico 3,3M, pH 4.5
+ 2,5 vol. etanol absoluto
mantener a -20 °C durante 18 hr.
- 6- Centrifugación en un rotor SS-34 12.100 g ó 10.000 rpm
..... 20 min.
- 7- Retirar rápidamente el etanol y secar el precipitado al vacío.
- 8- Resuspender el precipitado en H2O bidestilada estéril

Medir concentración y conservar a -70 °C.

II.5.1.- CUANTIFICACION DE LOS ARNs PURIFICADOS

Para medir la concentración de los los ARNs monocatenarios, se tomó el valor $E_{260} 0,1\% = 25$ (Kaper y Geelen, 1971). En los ácidos nucleicos, la relación $A_{260} / A_{280} = 2$ provee una estimación de la pureza de los mismos, puesto que la presencia de proteínas o fenoles disminuiría la relación de absorbancia.

II.6.- METODOS ELECTROFORETICOS PARA EL ANALISIS DE PROTEINAS Y ACIDOS NUCLEICOS

Las propiedades eléctricas de proteínas y ácidos nucleicos son utilizadas para su separación y análisis mediante las técnicas conocidas como de electroforesis. Estas técnicas introducen la utilización de una matriz sólida, gel, con cierta rigidez mecánica en la que el tamaño del poro que se forma está en relación con la concentración de la sustancia o sustancias utilizadas como matriz. De esta forma, la movilidad de las macromoléculas ionizadas va a depender de su propio tamaño, de la porosidad del gel, de la composición química y conformación de la macromolécula, y de la corriente eléctrica que se aplica. Los geles más utilizados en las electroforesis de proteínas y de ácidos nucleicos son los que el soporte es la poliacrilamida o la agarosa, combinadas o no con otras sustancias.

II.6.1.- ELECTROFORESIS DE LAS PROTEINAS DE SgMV EN GELES DE POLIACRILAMIDA AL 12.5% Y AL 15%. CON SDS.

Los geles de poliacrilamida se preparan por entramaje del monómero acrilamida con el agente entrecruzante N'N'-metilén-bis-acrilamida (Bis). La polimerización requiere también del catalizador N,N,N',N',tetrametil-etilén-diamina (TEMED) y del iniciador persulfato amónico. La acrilamida se prepara en soluciones concentradas en agua desionizada a la que se añade la proporción adecuada de Bis. La polimerización se realiza generalmente entre dos

placas de vidrio separadas por espaciadores de plástico de 1 a 2mm y selladas con agarosa al 1%.

Para caracterizar la cubierta protéica de los aislados del virus del mosaico de la calabaza (SqMV), los viriones purificados se analizaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS en placa (SDS-PAGE) utilizando el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970), dado que al alto poder de resolución de los geles de poliacrilamida se une la capacidad del SDS de romper los compuestos protéicos en sus cadenas individuales (Weber y Osborn, 1969). El sistema consistió en tres zonas separadas: la superior o muestra, la intermedia o gel concentrador; y la inferior o gel separador, cuya composición exponemos a continuación:

GELES DE POLIACRILAMIDA AL 12,5% CON SDS

Gel Separador acrilamida 12,5% Bis 0,33% Para 20 ml:

Agua desionizada.....	8,9ml
Tampón Tris HCl 3M pH 8.8.....	2,5ml
Acrilamida:Bis (30:0,8).....	8,3ml
SDS 10%.....	0,2ml
TEMED.....	10ul
Persulfato amónico 10%.....	0,1ml

Gel Concentrador acrilamida 4,5% Bis 0,12% Para 5 ml:

Agua desionizada.....	3,7ml
Tampón Tris HCl 1,25M pH 6.8....	0,5ml
Acrilamida:Bis (30:0,8).....	0,75ml
SDS 10%.....	50ul
TEMED.....	2,5ul
Persulfato amónico 10%.....	30ul

GELES DE POLIACRILAMIDA AL 15% CON SDS

Gel Separador acrilamida 15% Bis 0,4% Para 20 ml:

Agua desionizada.....	6,9ml
Tampón Tris HCl 3M pH 8.8.....	2,5ml
Acrilamida:Bis (30:0,8).....	10ml
SDS 10%.....	0,2ml
TEMED.....	10ul
Persulfato amónico 10%.....	190ul

Gel Concentrador acrilamida 4,5% Bis 0,12% Para 5ml:

Agua desionizada.....	3,7ml
Tampón Tris HCl 1,25M pH 6,8.....	0,5ml
Acrilamida:Bis (30:0,8).....	0,75ml
SDS 10%.....	50ul
TEMED.....	25ul
Persulfato amónico 10%.....	30ul

Las muestras se prepararon calentando durante 5 minutos a 100°C una solución que contenía 4ug de virus en 20ul de agua bidestilada estéril y 5 ul de solución disociadora para proteínas conteniendo azul de bromofenol (aptdo II.1). A la muestra una vez enfriada, se le añadieron 20 ul de sacarosa al 60% (de modo que la concentración final quedase al 20%) y se sometió a una breve centrifugación en una microcentrifuga Biofuge A (Heraeus sepatech). Los 45 ul resultantes fueron colocados en cada uno de los pocillos.

La electroforesis se realizó en cubetas verticales (Bio-Rad) con placas de 160 x 120 x 1,2 mm en tampón Tris-Glicina-SDS, pH 8.3 (aptdo II.1). Mientras las muestras atravesaron el gel concentrador se aplicó una corriente de 20 mA de intensidad constante utilizando como fuente de alimentación una Bio-Rad Model 1420 B. Se aumentó la intensidad a 30 mA cuando las muestras pasaron al gel separador. Para visualizar las proteínas, el gel se tiñó durante 2 hr en agitación, con una solución de Coomassie R-250 al 0,25% (aptdo II.1). El exceso de colorante se retiró sumergiendo el gel en un baño con solución decolorante (aptdo II.1) durante 24 hr. y agitación, deteniendo el proceso con ácido acético diluido al 7%.

II.6.2.- DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEÍNAS DE LA CUBIERTA DE SqMV.

Las técnicas de electroforesis permiten estimar los pesos moleculares de las proteínas por comparación con otras de peso molecular conocido (Weber y Osborn, 1969). Para la determinación de los pesos moleculares de los polipéptidos de cubierta de los

aislados del virus del mosaico de la calabaza, se utilizaron geles de poliacrilamida al 12,5% y al 15% con SDS, empleando como marcadores de peso molecular los que suministra Bio-Rad, cuyas características describimos:

<u>P R O T E I N A</u>	<u>PESO MOLECULAR</u>
Lisozima.....	14.000 Daltons
Inhibidor de Tripsina.....	21.000 Daltons
Anhidrasa Carbónica.....	31.000 Daltons
Ovoalbúmina.....	45.000 Daltons
Albúmina Bovina.....	66.000 Daltons
Fosforilasa B.....	92.000 Daltons

II.6.3.- ELECTROFORESIS DE LOS ARNs DE SqMV y CMV EN GELES DE POLIACRILAMIDA AL 2%, AGAROSA AL 0,5%.

Este sistema se utilizó para la caracterización de los ácidos nucleicos tanto de SqMV como de CMV. La solución para geles de 130 x 100 x 1,2 mm se preparó con:

<u>20% acrilamida 1% Bis</u>	
Agua desionizada.....	7,2ml
Tampón 10X TAE pH 7.8.....	2,5ml
Acrilamida:Bis (19:1).....	2,5ml
1% Agarosa fundida.....	12,5ml
TEMED.....	5ul
Persulfato amónico 10%.....	250ul

El tampón de electroforesis fué TAE pH 7.8 (aptdo II.1) conteniendo 0,1% SDS. Las muestras se prepararon a partir de ARNs extraídos (aptdo II.5). Para un carril de 5 mm se mezclaron 10 ul de la solución conteniendo 2 ug de ARNs/banda, con 1,5 ul del tampón de carga formado por sacarosa al 40%; tampón fosfato 20 mM, pH 7.0; EDTA 25 mM, y azul de bromofenol al 0,1%. La electroforesis

transcurrió a 10 V/cm durante 2,5 hr hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel.

La tinción de los ácidos nucleicos en el gel se realizó con una solución de bromuro de etidio de 1ug por ml del tampón TAE, durante 20 minutos en agitación y, el exceso de colorante se extrajo lavando con agua bidestilada estéril durante otros 20 minutos. Los ácidos nucleicos se visualizaron sobre un transiluminador UVP inc. de luz ultravioleta. Las fotografías se hicieron con una Polaroid Land Camera.

II.6.4.- ELECTROFORESIS DE LOS ARNs DE ScMV Y CMV DESNATURALIZADOS, EN GELES DE AGAROSA AL 1%.

La movilidad de los ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida o agarosa depende entre otras cosas de la conformación de las moléculas. Eliminando la estructura secundaria o terciaria mediante sustancias desnaturalizantes, puede conseguirse que la movilidad sea función directa del peso molecular.

Para el análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes de los ARNs se siguió la técnica descrita por McMaster y Carmichael (1977). Previamente a ser separados electroforéticamente, los ácidos nucleicos fueron desnaturalizados mediante tratamiento con glioxal (etanediol). El glioxal forma compuestos de adición estables con la guanina, impidiendo el establecimiento de puentes de hidrógeno con la citosina a pH igual o inferior a 7. El glioxal se oxida rápidamente en contacto con el aire, por lo que previamente a su utilización, se desionizó mediante tratamiento con una resina intercambiadora (Analytical Grade Mixed Bed Resin (AG 501-X8D) Bio-Rad, de 20 a 50 mallas de porosidad media, hasta alcanzar un pH en torno a 5.5.

Se incubaron a 50°C durante 1 hr, 2 ug de ARNs / banda en presencia de glioxal 1M, pH 5.5 y tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.0, en un baño maría Haake D1 provisto de agitador magnético. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se mezcló con 25% de tampón de carga conteniendo glicerol al 50%; tampón fosfato sódico, pH 6.8 y 0,4% azul de bromofenol.

Las muestras se concentraron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 30 segundos, en una microcentrifuga Heraeus Biofuge A y se colocaron en un gel horizontal de agarosa al 1% en tampón fosfato 10mM, pH 6.8. El tampón de electroforesis fué tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.0 que hubo que renovar cada media hora para mantener su fuerza iónica.

El tamaño de los geles fué de 100 x 65 x 3 mm y la electroforesis transcurrió a 4 V/cm durante 3 hr hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel. Los ácidos nucleicos se tiñeron en el gel con una solución de bromuro de etidio de 1 ug/ml en 50 mM de NaOH durante 1 hr en agitación, y protegidos de la luz. El exceso de tinción se retiró lavando con agua bidestilada estéril durante otra hora y agitación y los ácidos nucleicos se visualizaron sobre un transiluminador de luz ultravioleta. Las fotografías se realizaron con una Polaroid Land Camera.

II.6.5.- DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES DE LOS ARNs DE SqMV Y CMV

Para la determinación de los pesos moleculares de los ácidos nucleicos de SqMV y CMV, se utilizaron sus ARNs desnaturalizados y resueltos electroforéticamente (aptdo II.6.4). Como marcadores de peso molecular se utilizaron los ARNs del virus del mosaico del pepino de Pm conocido: 1,01; 0,86; 0,68 y 0,33 millones de daltons y el satélite CARNA 5 de Pm 0,11 millones de daltons (Díaz-Ruiz y Kaper, 1977) así como el ARN del virus del mosaico del tabaco (TMV) de Pm 2 millones de daltons (Goelet et al., 1982) y el ARN del virus de la Sharka (PPV) de Pm 3,3 millones de daltons (Dougherty y Carrington, 1988).

II.7.- MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

Muchos virus de plantas tienen capacidad inmunogénica en animales de laboratorio, por lo que las técnicas inmunológicas en conjunción con otras, pueden desempeñar un importante papel en su caracterización y sobre todo, en el establecimiento de las relaciones de afinidad y parentesco entre diferentes aislados virales.

En este apartado describimos las técnicas que hemos utilizado para establecer el serotipo al que pertenecen los aislados españoles SqMV-C1 y SqMV-C3 del virus del mosaico de la calabaza.

II.7.1.- OBTENCIÓN DE INMUNOSUEROS FRENTE AL AISLADO C1 DE SqMV

A) PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO

Para la obtención de inmunosueros (Is) policlonales específicos frente al aislado C1 de SqMV, se utilizaron como antígenos (Ag) viriones purificados, puesto que tiene la ventaja de eliminar otras sustancias antigénicas de la planta y permite reproducir la concentración de virus en cada inyección (Matthews, 1967).

La solución antigénica se preparó inmediatamente antes de ser utilizada, disolviendo los virus purificados (apdo II.4) en solución salina estéril (NaCl al 9 por mil) en las proporciones que se señalan más adelante. Teniendo en cuenta que la respuesta inmune se ve potenciada con la presencia simultánea de adyuvantes y antígeno, se utilizaron los adyuvantes completo e incompleto de Freund (Freund, 1947) de Difco Lab. en las inmunizaciones posteriores a la primaria. En ambos casos se mezclaron inmediatamente antes de utilizarse, 1 ml de la solución salina conteniendo 2 µg de virus, con 1 ml del adyuvante. La mezcla se realizó en condiciones asépticas.



B) MANIPULACION DE LOS ANIMALES EN LA OBTENCION DE INMUNOSUEROS

Para la obtención de los Is se utilizaron conejos adultos, Oryctolagus cuniculus, raza Neozelandesa blanco albino de 4 Kg. de peso cada uno. Los animales se mantuvieron durante todo el proceso en jaulas separadas con temperatura y humedad controlada, en el Servicio de cria animal del C.I.B. del C.S.I.C.

Durante las inmunizaciones y extracciones de sangre, los animales se inmovilizaron en una caja semejante a la descrita por Matthews (1957). Las inyecciones intravenosas se efectuaron en la vena marginal de la oreja por su cara dorsal; las intramusculares y subcutáneas, en los flancos y cuello de los animales.

Para las extracciones se prefirió utilizar la arteria central de la oreja (Gordon.1981), por proveer de buenos volúmenes de sangre apenas hemolizada y no comportar riesgo accesorio al animal, obteniendo unos 30 ml cada vez. La sangría final se realizó mediante punción cardíaca.

C) PAUTA DE INMUNIZACION FRENTE AL AISLADO C1 DE SqMV

Antes de comenzar las inmunizaciones, los conejos se mantuvieron en observación durante dos semanas, periodo en el que se les efectuó la primera extracción con el fin de comprobar la ausencia de anticuerpos (Ac) específicos frente al aislado C1 de SqMV y obtener suero preinmune.

La inmunización se inició por vía intravenosa con 1 ml de la solución de virus en suero salino (2mg/ml), seguida por otra intravenosa en iguales condiciones a los 15 días. El día 23 se hizo la primera extracción para titulación del inmuosuero. El día 35 se les suministró por vía intramuscular una dosis de 2 mg. de antígeno con adyuvante completo de Freund seguida ocho días más tarde, por otra dosis con adyuvante incompleto por vía subcutánea. Una nueva extracción para titulación del inmuosuero se realizó el día 48 seguida a los tres días por una dosis de recuerdo por vía intravenosa de 200 ug de Ag. El día 60 se efectuó la sangría final mediante punción cardíaca. Los inmuosueros se conservaron a -20°C. A continuación mostramos un esquema de la pauta de inmunización.

ESQUEMA DE LA PAUTA DE INMUNIZACION FRENTE AL AISLADO C1 DE SqMV

Observación de los conejos

Obtención de Suero Preinmune

I N M U N I Z A C I O N

día 0 Primera Intravenosa
dosis: 2 mg Virus /ml sol. salina

día 15 Segunda Intravenosa
dosis: 2 mg Virus /ml sol. salina

día 23 Obtención de Inmunosuero para titulación

día 35 Intramuscular con Adyuvante Completo de Freund
dosis: 2 mg Virus /ml sol. salina v/v ACF

día 43 Subcutánea con Adyuvante Incompleto de Freund
dosis: 2 mg Virus /ml sol. salina v/v AIF

día 48 Obtención de Inmunosuero para titulación

día 51 Intravenosa de recuerdo
dosis: 200ug Virus /ml sol. salina

día 60 Punción intraventricular.
Obtención del Inmunosuero, Titulación y Almacenado

II.7.2.- DOBLE INMUNODIFUSION EN GELES DE AGAR.

La técnica descrita por Ouchterlony(1949), pone en juego la difusión simultánea de anticuerpos (Ac) y antígenos (Ag) a través de un medio sólido serológicamente neutro. El desplazamiento de las moléculas se realiza hacia el exterior del lugar del depósito por gradiente de concentraciones, estando limitado por el tamaño del poro del gel. La interacción entre epitopos y parátopos homólogos da lugar a la formación de los complejos Ag-Ac visibles en forma de línea de precipitación, que permanece estacionaria cuando el sistema está en equilibrio. La técnica permite, además de establecer

la especificidad de un inamosuero y su titulo, comparar antigenos e inamosueros, estableciendo las relaciones entre ellos en base a la coalescencia, cruzamiento, o interacción parcial de las lineas de precipitación.

Los geles se prepararon con agar Noble (Difco Laboratories) al 0,8% en solución salina tamponada pH 7.2 (PBS) (aptdo II.1) a la que se añadió Merthiolato (etil-mercuriotiosalicilato sódico) al 1/10.000. Alternativamente los geles se prepararon con agar Noble al 0,8% en H₂O bidestilada estéril. Como soporte se utilizaron placas niveladas (Gelman Inst. Co) de 2,7 x 27 cm. con portas de 2,7 x 7,5 cm para obtener geles de 0,18 cm. de espesor (Ouchterlony y Nilsson, 1986). Con un troquelador Gel-punch 71632 de Gelman Inst. Co., se hicieron pocillos de 3mm de diámetro y 12,7 ul de capacidad, en disposición octogonal y separados 5mm del pocillo central.

A) TITULACION DE LOS INMUNOSUEROS

Se considera el "titulo" de un inamosuero, la mayor dilución de éste que dá un precipitado visible (Matthews, 1967). Para determinar el titulo de los inamosueros obtenidos, se colocaron en el pocillo central del gel 45 ug del antígeno específico, disueltos en 15 ul de H₂O bidestilada estéril. En los pocillos perifericos se dispusieron diluciones sucesivas, a la mitad, en PBS pH 7.2., de los inamosueros. En ambos casos los pocillos se rellenaron en dos tandas con 7,5 ul cada una. El gel se incubó tapado a temperatura ambiente durante 24 hr al cabo de las cuales se observaron los primeros resultados, prosiguiendo la incubación dos o tres días más. Las fotografías se realizaron en un transiluminador de fondo negro.

B) CONTROL DE LA ESPECIFICIDAD DEL INMUNOSUERO

La especificidad de un inamosuero frente a un virus purificado puede verse afectada si existen proteínas de la planta huésped en el purificado, falseando como consecuencia los resultados (Van Regenmortel, 1966). Para establecer la ausencia de contaminantes en la solución antigénica inicial, el Is fué ensayado

frente a extracto crudo de planta sana y enferma. En el pocillo central del gel se colocaron 15 ul del Is diluido v/v en PBS pH 7.2; en los periféricos, se colocaron 45ul de extracto crudo de planta sana, de plantas infectadas con los diferentes aislados de SqMV. y como control, 45 ug del antígeno en 15 ul de H₂O bidestilada estéril. El extracto crudo de planta se preparó triturando en mortero 1 gr. de hoja/1ml de tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.0 seguido de filtración por gasa y centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos, recogiendo el sobrenadante. El gel se incubó en iguales condiciones a las descritas anteriormente.

C) CARACTERIZACION SEROLOGICA DE LOS AISLADOS DE SqMV
MEDIANTE DOBLE INMUNODIFUSION EN GELES DE AGAR:

Para establecer las relaciones serológicas entre los diferentes aislados de SqMV, se siguió la técnica descrita por Ouchterlony (1949). Como antígenos se utilizaron virus purificados de los aislados SqMV-Netherlands (serotipo I), SqMV-Arkansas (serotipo I), SqMV-Arizona (serotipo II), SqMV-C1 y SqMV-C3, cuya procedencia se describe en el aptdo III.6. Como anticuerpos, el inmuosuero frente a SqMV-Netherlands, con título 1:1024 proporcionado por el Dr. Maat (Holanda) y el inmuosuero frente a SqMV-C1, con título 1:2048, obtenido por nosotros (aptdo II.7.1).

En los pocillos periféricos se colocaron 45 ug de antígeno disueltos en 15 ul de agua, en diferentes disposiciones (de modo que todos los aislados quedasen enfrentados entre sí). En el pocillo central se colocaron 15 ul del Is entero o diluido v/v en PBS pH 7.2. El gel se incubó y fotografió en las condiciones ya descritas.

II.7.3.- ABSORCION INTRAGEL

En un sistema equilibrado, cuando un Is se hace reaccionar en el interior de un pocillo con antígenos homólogos y heterólogos en exceso, la reacción Ag-Ac da lugar a la formación de una línea de precipitado en torno al pocillo, al tiempo que los Ac excedentes reaccionan con los epitopos homólogos -si los hay- del resto de los

Ag formando una línea de precipitación como la descrita para la doble inmunodifusión (Van Regenmortel, 1967).

A) CARACTERIZACION SEROLOGICA DE LOS AISLADOS DE SqMV
MEDIANTE ABSORCION INTRAGEL

Para conseguir un sistema Ag-Ac equilibrado con Ag en exceso, se absorbieron y enfrentaron diferentes concentraciones de los Ag e Is. La caracterización de los aislados de SqMV se llevó a cabo absorbiendo 90 ug de virus purificado con Is anti-SqMV C1 diluido a la mitad en PBS pH 7,2 enfrentándolo con 45 ug de cada aislado purificado. La absorción con el Is anti-SqMV Netherland se realizó utilizando el Is sin diluir.

Los 90 ug del Ag disueltos en 15 ul de H2O se colocaron en el pocillo central, dejándolo difundir durante 3hr a 18°C. A continuación se colocaron 15 ul del Is en el mismo pocillo, incubando a 37°C durante 1 hr. Los Ag homólogos y heterólogos (45 ug/15 ul H2O) se dispusieron en los pocillos periféricos y el conjunto se incubó a temperatura ambiente durante 24 hr. La reacción se observó al cabo de este tiempo y durante dos o tres días más. Los resultados se visualizaron y fotografiaron como se ha descrito anteriormente.

II.7.4.- INMUNODETECCION DE LAS PROTEINAS SEPARADAS DE LA CUBIERTA VIRAL DE LOS AISLADOS DE SqMV.

La técnica descrita por Towbin et al., (1979) y modificada por Erickson et al., (1982), permite identificar serológicamente muy pequeñas cantidades de proteínas separadas electroforéticamente (SDS-PAGE). El fundamento estriba en la capacidad de la nitrocelulosa de inmovilizar las proteínas -previamente separadas en geles de poliacrilamida (aptdo II.6)-por interacción electrostática con ellas a pH 8.3 (al que la nitrocelulosa es electronegativa). Previamente a la reacción Ag-Ac, se bloquearon el resto de cargas libres para evitar reacciones inespecíficas.

A) ELECTROTRANSFERENCIA ("WESTERN BLOTTING").

Se disociaron 100 ng de viriones purificados calentando a 100°C durante 3 min. en solución disociadora para proteínas (aptdo II.1). Las proteínas fueron resueltas electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5% (aptdo II.6). Las hojas de nitrocelulosa (Schleicher and Schvell, BA 85), se cortaron al tamaño del gel y se humedecieron en H₂O sumergiéndolas en tampón de transferencia pH 8.3 (aptdo II.1) durante 30 min. junto con 4 piezas de papel Whatman 3 MM. Terminada la electroforesis, el gel (al que se había seccionado el carril con los marcadores de Pm), se sumergió en el tampón de transferencia durante 30 min., al igual que las esponjas Scotch-Brite del aparato de transferencia (E-C apparatus Corporation). Sobre la placa catódica, y por este orden, se colocaron las esponjas, 2 capas de papel Whatman, y el gel, sobre el que se adhirió la nitrocelulosa cuidando que no quedasen burbujas. El emparedado se completó con dos capas de papel Whatman, las esponjas, y la placa anódica, fijando el conjunto con tres bandas elásticas. Es importante tener presente que la nitrocelulosa tiene que estar colocada hacia el ánodo para que la transferencia tenga lugar. El soporte se introdujo en la cubeta que se rellenó con el tampón de transferencia, la cual se llevó a cabo a 250 mA (17 V y 2 W), utilizando una fuente de alimentación LKB 2197, durante 4 hr a 4°C. Se comprobó que la transferencia había sido efectiva sumergiendo la nitrocelulosa (molde del carril de marcadores de Pm) durante unos minutos, en una solución reveladora conteniendo negro amido (Naftol B) al 0,001% en tampón acetato sódico 45 mM, pH 3,5 y ácido acético 450 mM, destiñendo con agua. Como confirmación complementaria, el gel se tñó con azul de Coomassie (aptdo II.1).

B) INMUNODETECCION

La detección serológica de proteínas unidas al soporte sólido nitrocelulosa se hizo siguiendo el método de Hawkes et al., (1982), basado en la conjugación primaria de las proteínas con su Ac específico, y secundaria, con un Ac específico frente al primero conjugado con peroxidasa.

La reacción positiva se visualizó revelando con

4-Cloro-1-Naftol al que se añadió H₂O₂, apareciendo manchas azuladas. Para evitar posibles uniones inespecíficas de las proteínas séricas, la nitrocelulosa conteniendo los polipéptidos transferidos se incubó en tampón de bloqueo (solución al 5% de leche descremada "Mollico Nestlé" en PBS pH 7.2), durante 1 hr a 18°C y agitación (100 rpm sobre un agitador New Brunswick Sc.). Las soluciones conteniendo los respectivos Ac se prepararon asimismo en tampón de bloqueo y la incubación se realizó en agitación, en el interior de bolsas de polietileno selladas por calor (pinzas Rovebloc) cuidando que no quedasen burbujas que pudieran interferir la reacción Ag-Ac.

El Ac específico frente al aislado C1 de SqMV se preparó a una dilución 1:100 en tampón de bloqueo, realizándose la incubación primaria durante toda la noche en agitación, a 18°C. El exceso de Ac fué retirado lavando durante 1hr con PBS, con 4 cambios sucesivos. La incubación secundaria se llevó a cabo en una solución 1:1000 de suero de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa (Gar-PO) durante 3 hr en agitación a 18°C. Se retiró el exceso del segundo anticuerpo (Ac-2), lavando con PBS durante 1hr en agitación, con 4 cambios sucesivos. Finalmente, la reacción se reveló con 4-cloro-1-naftol (Merck Inc.) y peróxido de hidrógeno, preparando la solución inmediatamente antes de usarla en las proporciones siguientes:

-Solución stock de 4-cloro-1-naftol	
3mg/ml. en metanol	3,3 ml.
-Solución acuosa 30% H ₂ O ₂	10 ul.
-PBS hasta	50 ml.

La reacción positiva del primer Ac apareció entre 2 y 5 min. después, como manchas azuladas oscuras. El revelado se detuvo con H₂O dejando secar la nitrocelulosa al aire.

RESULTADOS
Y
DISCUSION

III.- RESULTADOS Y DISCUSION

III.1.- POTYVIRUS INFECTANDO CRUCIFERAS (LUNARIA ANNUA L.) Y CUCURBITACEAS (CUCURBITA PEPO L.)

El extenso grupo de los Potyvirus con 175 miembros descritos, equivalente al 30% de los virus de plantas conocidos (Shukla y Ward, 1989a), es fácilmente identificable por microscopía electrónica pues los virus inducen, en las células infectadas, la formación de inclusiones citoplásmicas características.

Patógenos eficaces, generalmente transmitidos de manera no persistente por áfidos y también mecánicamente, sus partículas largas y flexuosas (entre 680 y 900 nm de longitud y 11 nm de diámetro) se localizan en el citoplasma de las células infectadas (Shukla y Ward, 1989a). Además, las proteínas no estructurales -codificadas por su genoma- forman agregados estables que son serológicamente diferentes de la proteína de la cápsida y de las proteínas de la célula huésped (Dougherty y Hiebert, 1980a). Estos agregados se forman en el citoplasma de todas las células infectadas y aparecen como inclusiones citoplásmicas cilíndricas (ICC) de carácter diagnóstico y taxonómico para el grupo (Edwardson, 1974; Edwardson y Christie, 1978; Dougherty y Hiebert, 1980a; Dougherty y Carrington, 1988).

La naturaleza protéica de las inclusiones cilíndricas fué establecida por primera vez por Rubio-Huertos, M. (1950) y confirmada posteriormente por Shepard (1968).

Las inclusiones citoplásmicas cilíndricas aparecen en tinción negativa como agregados laminares, con una fina estriación con 5nm de separación (Edwardson *et al.*, 1968). En cortes ultrafinos, las secciones longitudinales de los agregados laminares muestran haces densos a los electrones más o menos rectos o a modo de cilindros cortados, en tanto que en secciones transversales se muestran como

molinetes o "pinwheels", si las láminas están en relación con un eje central; rollos o "scrolls", y túbulos, si no lo están.

La estructura tridimensional de los "pinwheels" fué establecida casi simultáneamente por Rubio-Huertos y López-Abella (1966) y por Edwardson (1966). En la figura 3, se presenta una interpretación gráfica de los diferentes tipos de inclusiones cilíndricas según descripción de Rubio-Huertos (1978).

Los agregados laminares pueden presentarse también en formas planas: rectas y largas, o curvas y cortas (Martelli y Russo, 1984). Esta diferente morfología de las inclusiones cilíndricas tiene carácter diagnóstico y taxonómico dentro del grupo (Edwardson, 1974).

Adicionalmente, algunos Potyvirus inducen la formación de otros tipos de inclusiones protéicas. Algunos, forman inclusiones amorfas en el citoplasma y unos pocos, inclusiones fibrosas o cristalinas en el núcleo (Hollings y Brunt, 1981a). Las proteínas que forman ambas inclusiones también están codificadas por el genoma viral, no estando relacionadas serológicamente entre sí, ni con las inclusiones cilíndricas, la cápsida, o proteínas de la planta (Dougherty y Carrington, 1988).

En este capítulo presentamos una muestra de diferentes tipos de inclusiones cilíndricas, algunas de ellas poco frecuentes, producidas por distintos Potyvirus infectando Crucíferas y Cucurbitáceas.

III.1.1.- ORIGEN Y SINTOMATOLOGIA DE LAS MUESTRAS

A: POTYVIRUS INFECTANDO LUNARIA ANNUA L.

En los jardines del C.S.I.C. de Madrid, se localizaron plantas de Lunaria annua L. (Fam. Cruciferae) utilizadas como ornamentales, mostrando moteado clorótico en hojas. A la muestra se denominó muestra P1.

B: POTYVIRUS INFECTANDO CUCURBITA PEPO L. var. "Calabacín americana".

Se estudiaron muestras de Cucurbita pepo L. var. "Calabacín

americana" procedentes de una explotación comercial en la región de Murcia (La Roda-San Javier). Las plantas presentaban fuerte mosaico y notable filiformismo (fig. 2A). La muestra se denominó muestra P2.

C: POTYVIRUS INFECTANDO CUCURBITA PEPO L.

Muestras de calabacines de variedad desconocida, presentando síntomas de mosaico y deformaciones foliares a modo de "abolladuras" (fig. 2B), procedentes de cultivos bajo plástico en El Ejido (Almería), fueron estudiadas como en los casos anteriores. La muestra se denominó muestra P3.

En todos los casos, se prepararon tinciones negativas de extracto crudo e inclusiones para ultramicrotoma (aptdo II.3), así como desecados en CaCl₂ para su conservación (aptdo II.2).

III.1.2.- GAMA DE HUESPEDES

A: Para el virus infectando Lunaria annua L. (muestra P1)

Ejemplares de Brassica sinensis L. (Cruciferae) fueron inoculadas mecánicamente (aptdo II.2) con extracto crudo de hoja infectada de Lunaria annua L.

B: Para el virus infectando Cucurbita pepo L. var. "Calabacín americana" (muestra P2)

Extracto crudo de hoja infectada fué utilizado para inocular mecánicamente las siguientes especies y variedades:

Fam. Cucurbitáceae: Cucumis melo L. var. "Amarillo temprano", "Tendral"; Cucurbita pepo L. var. "Belleza negra". Fam. Leguminosae: Vigna sinensis (Turner) Savi. var. "Blackeye". Fam. Solanaceae: Nicotiana sylvestris Sp. and Gomez; N. tabacum L. var. "Samsun" y "Xanthi-nc".

C: Para el virus infectando Cucurbita pepo L. (muestra P3)

Se utilizó igual gama de huéspedes que con la muestra P2 para las inoculaciones con extracto crudo de la muestra de campo.

En los tres casos, las muestras crecieron y se mantuvieron en cámara de cultivo en las condiciones habituales (aptdo II.2).

D: Resultados de las inoculaciones:

-muestra P1: las plantas de Brassica sinensis L. inoculadas, mostraron moteado clorótico y mosaico 15 días después de la inoculación.

-muestras P2 y P3: en ambos casos, las inoculaciones produjeron mosaicos en las Cucurbitáceas inoculadas (fig.2C) y ausencia de síntomas en el resto de las especies. El síntoma de filiformismo no se reprodujo en las plantas inoculadas, al menos de forma tan notable como en la muestra original P2.

Los resultados se resumen en el cuadro a continuación:

PLANTAS DE ENSAYO	SINTOMAS:	P2	P3
<u>C.melo L.</u> "Amarillo temprano"		M	M
<u>C.melo L.</u> "Tendral"		M	M
<u>C.papo L.</u> "Belleza negra"		M	M
<u>V.sinensis Savi.</u> "Blackeye"		Neg	Neg
<u>N.sylvestris Speg.</u>		Neg	Neg
<u>N.tabacum L.</u> "Samsun"		Neg	Neg
<u>N.tabacum L.</u> "Xanthi-nc"		Neg	Neg

Abreviaturas: M =Mosaico; Neg. =Ausencia de síntomas.

Las plantas de ensayo fueron reinoculadas con plantas infectadas, obteniendo iguales resultados a los descritos.

III.1.3.- MICROSCOPIA ELECTRONICA

POTYVIRUS INFECTANDO LUNARIA ANNUA L. (Muestra P1).

TINCION NEGATIVA

Las preparaciones con ácido fosfotúngstico (PTA)(apdo II.3) de extracto crudo de Lunaria annua L. y Brassica sinensis L. con moteado clorótico en hojas, mostraron la presencia de partículas largas y flexuosas, así como inclusiones laminares planas o enrolladas análogas a las del grupo de los Potyvirus. Las inclusiones presentaron una fina estriación longitudinal, como puede observarse en la figura 4A.

CORTES ULTRAFINOS

En las células infectadas tanto de L. annua como de B. sinensis, se detectaron partículas virales distribuidas al azar en el citoplasma y también asociadas a inclusiones citoplásmicas cilíndricas características de Potyvirus.

En las células de Lunaria lo más notable fué la presencia en el citoplasma de largas inclusiones laminares rectas asociadas a estructuras fibrosas (figs.4 y 5). En ocasiones, las partículas se presentaron dispuestas perpendicularmente a la inclusión laminar y en dirección al tonoplasto, como puede verse en la figura 5A (flecha). Esta compleja estructura denominada "inclusión en peine" (IP) ha sido descrita por Rubio-Huertos y Vela-Cornejo (1966) para el virus infectando Amaranthus lividus.

En la figura 6 se presenta una interpretación de las "inclusiones en peine" tomada de Rubio-Huertos (1978).

Las plantas de Brassica sinensis infectadas con el virus de Lunaria mostraron una ultraestructura celular ligeramente diferente que la descrita para la muestra de campo, como puede verse en la figura 7. En el citoplasma de las células del mesófilo aparecieron, al igual que en las de Lunaria, gran abundancia de inclusiones

laminares largas y rectas, acompañadas aquí por numerosas inclusiones citoplásmicas cilíndricas formando "pinwheels", túbulos, y "scrolls" (fig.7). Sin embargo, un hecho a destacar de la infección de Brassica, fué la ausencia de las típicas "inclusiones en peine" presentes en la muestra de Lunaria.

POTYVIRUS INFECTANDO CUCURBITA PEPO L. var. "CALABACIN AMERICANA"
(Muestra P2)

TINCION NEGATIVA

Las preparaciones de extracto crudo de la muestra de campo teñidas con PTA (aptdo II.3), mostraron la presencia de largas partículas flexuosas junto a inclusiones laminares enrolladas, en las que una fina estriación longitudinal fué claramente visible, como se muestra en la figura 8.

CORTES ULTRAFINOS

Las células del mesófilo de la muestra P2 (Cucurbita pepo L. var. "Calabacín americana"), presentaron las características inclusiones citoplásmicas cilíndricas (ICC) de las infecciones producidas por Potyvirus (fig.9). Además se observaron filamentos semejantes a partículas virales distribuidas al azar en el citoplasma de longitud variable como consecuencia de los diferentes niveles de las secciones (fig. 9B).

En zonas de acumulación de las ICC pudieron verse gran número de "scrolls", túbulos, y algunos "pinwheels", entremezclados con el retículo endoplásmico rugoso y con vacuolas (fig.10A). En ningún caso aparecieron agregados laminares similares a los descritos en la muestra P1. Sin embargo, en el citoplasma de las células infectadas se observaron cuerpos o inclusiones amorfas, de tamaño y forma variable, con una textura interna finamente granular, como puede observarse en la figura 10B. Estas inclusiones amorfas resultaron ser semejantes a las "inclusiones citoplásmicas amorfas" descritas como características diferenciales del virus del

mosaico de la sandía, estirpe 1 (WMV-1) por Martelli y Russo, (1977a;1984).

POTYVIRUS INFECTANDO CUCURBITA PEPO L. (Muestra P3)

TINCIÓN NEGATIVA

En las preparaciones de extracto crudo de la muestra P3 (Cucurbita pepo L.) teñidas con PTA (aptdo II.3), se observaron la presencia de largos filamentos flexuosos, de características similares a las partículas de Potyvirus, como se muestra en la figura 11 A. En una ocasión observamos una inclusión cristalina presentando una clara estriación a modo de retícula, de características poco frecuentes y asociada a alguna partícula viral, como puede verse en la figura 11 B.

CORTES ULTRAFINOS

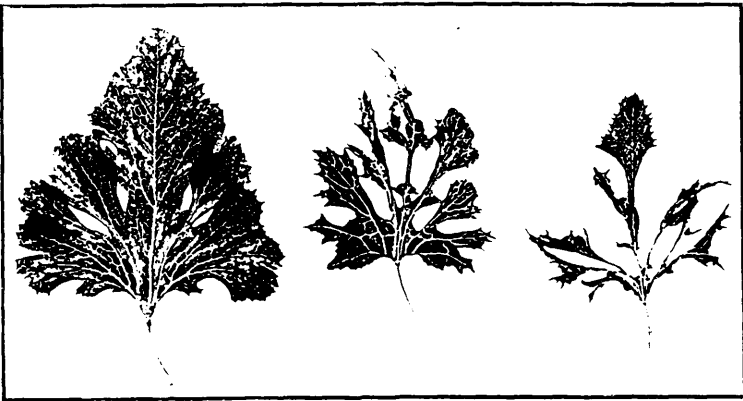
Las células de mesófilo de la muestra P3 mostraron, como en la muestra P2, las inclusiones citoplásmicas cilíndricas (ICC) características de las infecciones producidas por Potyvirus, de las que en la figura 12 se muestran diferentes secciones de las ICC formando "pinwheels", túbulos y "scrolls", entremezcladas con los finos filamentos de las partículas virales distribuidas al azar en el citoplasma. Con frecuencia se observaron agregados de partículas virales formando haces (fig. 12 C).

Hay que hacer notar que entre las abundantes ICC presentes en la muestra, en ningún caso se observaron inclusiones laminares rectas o curvas, ni tampoco ninguna inclusión de tipo cristalino como la que se observó en tinción negativa.

Figura 2 A.- Síntomas de filiformismo y mosaico en planta de campo de la muestra P2 (Cucurbita pepo L. var. "Calabacín americana"), infectada por Potyvirus.

Figura 2 B.- Mosaico y "abolladuras" en planta de campo de la muestra P3 (C. pepo L.), infectada por Potyvirus.

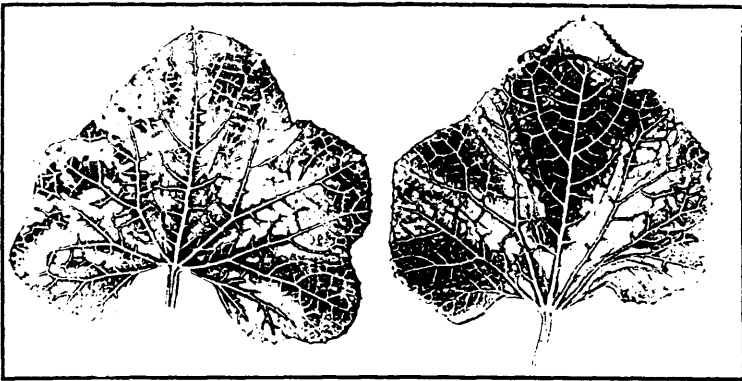
Figura 2 C.- Mosaico en planta de ensayo (Cucumis melo L. var. "Amarillo temprano") inoculada con la muestra P2.



A



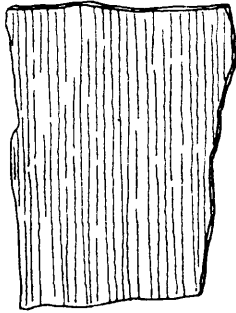
B



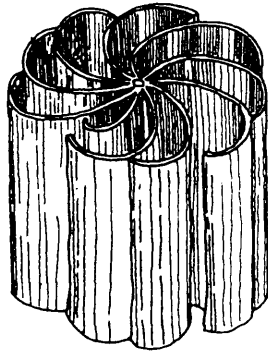
C

Figura 3.- Interpretación gráfica de las diferentes inclusiones citoplásmicas cilíndricas inducidas por Potyvirus (Rubio-Huertos,1978; Hollings y Brunt,1981b).

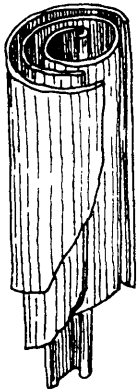
INCLUSIONES CILINDRICAS DE POTYVIRUS



AGREGADO LAMINAR



PINWHEEL (seccion)



SCROLL

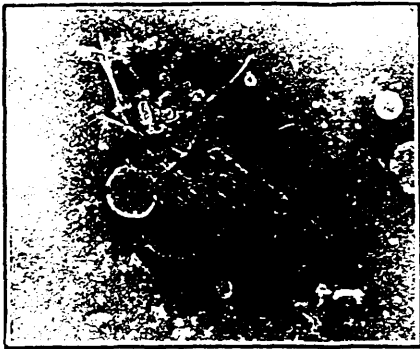


TUBULO

Figura 4 A.- X 38.400 Tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2% pH 7. de extracto crudo de Lunaria annua L. En la micrografía puede observarse una característica inclusión de Potyvirus con partículas virales asociadas. En la inclusión puede verse la fina estriación longitudinal.

Figura 4 B.- X 25.100 Células de L.annua infectadas, mostrando inclusiones laminares rectas con masas fibrosas asociadas.

Figura 4 C.- X 41.000.- Células de L.annua mostrando las masas fibrosas asociadas a las inclusiones laminares rectas así como algunas secciones de inclusiones en "scroll" (flecha) y partículas virales en diferentes secciones (V).



A



B



C

Figura 5 A.- X 31.900 Célula de Lunaria mostrando una típica "inclusión en peine" (IP). Nótese la relación de las partículas (flecha) con la inclusión laminar recta y el tonoplasto.

Figura 5 B.- X 31.900 Célula de Lunaria mostrando diferentes secciones de "pinwheels", "túbulos" y "scrolls".

Figura 5 C.- X 50.200 Diferentes secciones de inclusiones laminares rectas con partículas virales (V) asociadas, en el citoplasma de una célula de Lunaria.



A



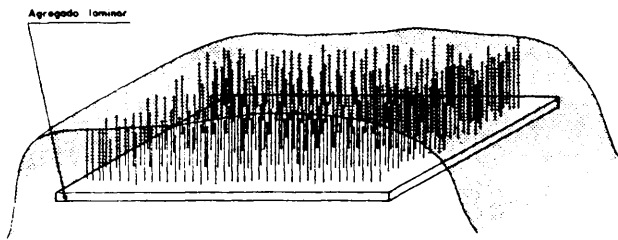
B



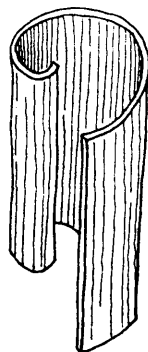
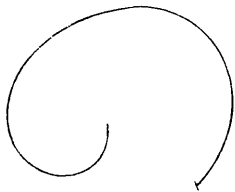
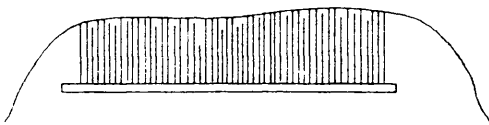
C

Figura 6.- Interpretación gráfica de las "inclusiones en peine"
tomada de Rubio-Huertos (1978).

INCLUSION EN PEINE



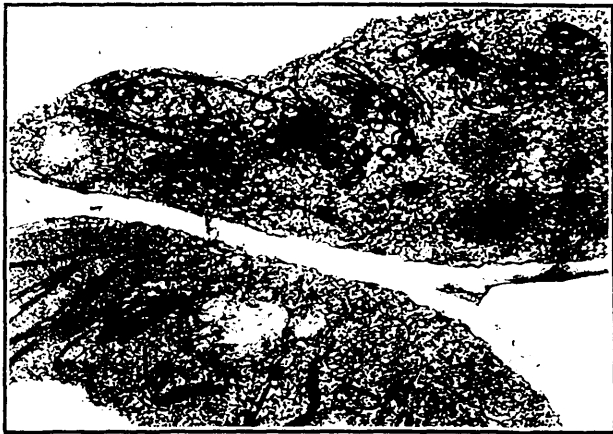
INCLUSION EN PEINE



AGREGADO LAMINAR CURVO

Figura 7 A.- X 31.900 Visión de dos células del mesófilo de Brassica sinensis L. infectada, mostrando inclusiones citoplásmicas cilíndricas en "pinwheels", "túbulos" y "scrolls", así como alguna inclusión laminar recta.

Figura 7 B.- X 20.500 Diferentes secciones de las inclusiones cilíndricas en una célula parenquimática del mesófilo de B. sinensis.



A



B

Figura 8 A.- X 42.300 Tinción negativa con ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% pH 7. de extracto crudo de la muestra P2 (Cucurbita pepo L. var. "Calabacín americana"). En la micrografía se muestra una inclusión cilíndrica característica de Potyvirus.

Figura 8 B.- X 50.000 Tinción negativa con PTA de extracto crudo de la muestra anterior en la que al lado de la inclusión cilíndrica puede observarse una larga partícula de Potyvirus.

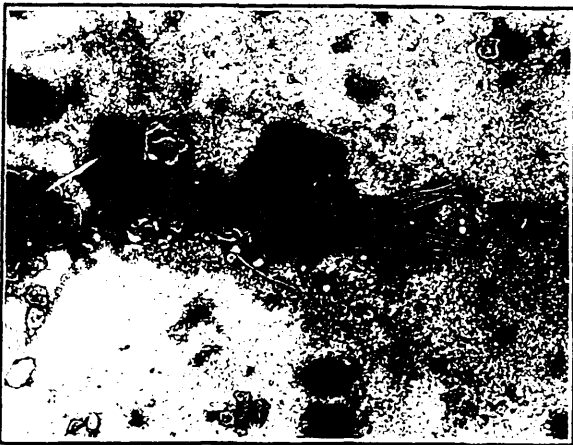
Figura 8 C.- X 25.100 Tinción negativa con PTA de un grupo de partículas virales infectando la muestra P2.



A



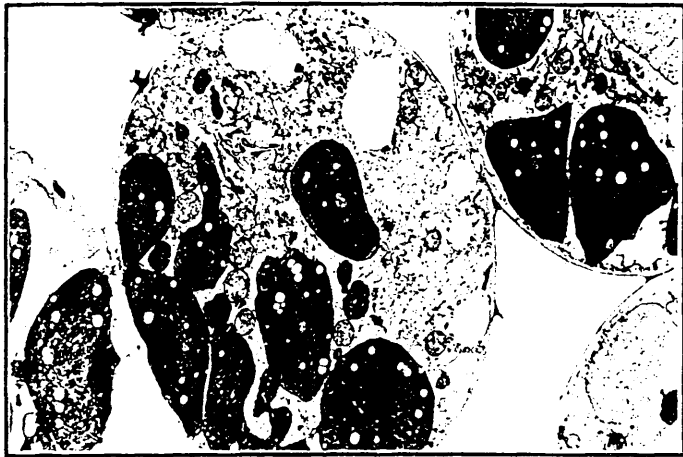
B



C

Figura 9 A.- X 9.100 Visión panorámica a bajos aumentos de células del mesófilo de la muestra P2 infectadas por Potyvirus. Pueden observarse diferentes secciones de inclusiones citoplásmicas cilíndricas (ICC).

Figura 9 B.- X 25.100 Zona aumentada de la figura 13 A, en la que pueden observarse partículas virales dispersas en el citoplasma así como secciones de las ICC.



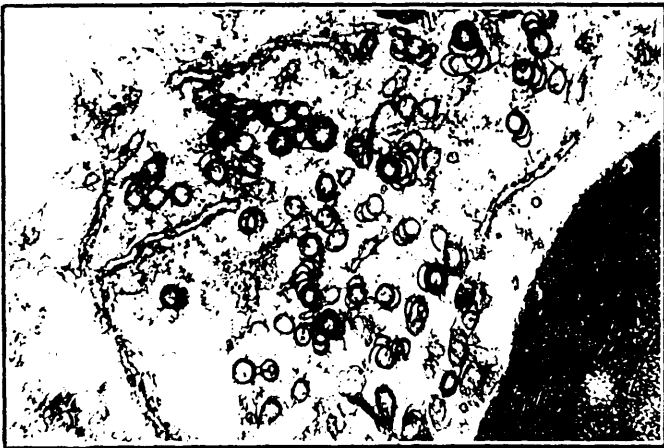
A



B

Figura 10 A.- X 50.200 Diferentes secciones de las inclusiones citoplásmicas cilíndricas (ICC) en una célula de la muestra P2. Nótese la ausencia de inclusiones laminares rectas.

Figura 10 B.- X 41.000 Inclusión amorfa de gran tamaño (flechas) junto a inclusiones citoplásmicas cilíndricas en una célula de la muestra P2.



A



B

Figura 11 A.- X 37.000 Tinción negativa con ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% pH 7. de la muestra P3 (Cucurbita pepo L.) Las partículas virales aparecen formando un haz.

Figura 11 B.- X 50.000 Inclusión cristalina mostrando notable estriación reticular (tinción negativa con PTA de extracto crudo de la muestra P3).



A



B

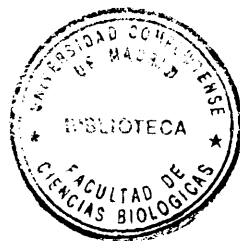


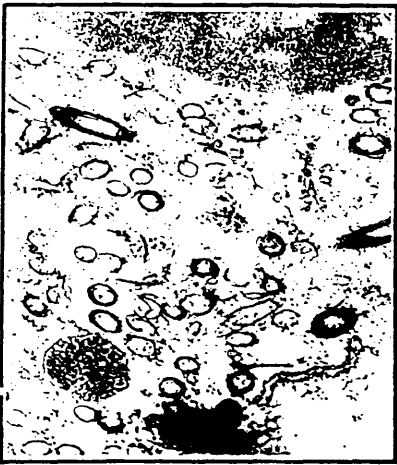
Figura 12 A.- X 36.000 Célula del mesófilo de la muestra P3 mostrando diferentes secciones de inclusiones citoplásmicas cilíndricas (ICC) en "pinwheels", "túbulos" y "scrolls". Nótese la ausencia de inclusiones laminares rectas.

Figura 12 B.- X 36.000 Citoplasma con diferentes secciones de ICC (muestra P3).

Figura 12 C.- X 36.000 Muestra P3. Masa de partículas virales (V) formando haces, en las proximidades del núcleo (Nu).



A



B



C

III.1.4.- DISCUSION

La primera cuestión que se desprende del estudio de las plantas infectadas pertenecientes a las familias botánicas Cruciferae (muestra P1) y Cucurbitaceae (muestras P2 y P3), es que en los tres casos se detectaron en el citoplasma las características inclusiones citoplásmicas cilíndricas de las infecciones producidas por virus del grupo Potyvirus.

La correcta interpretación de la estructura tridimensional de estas inclusiones cilíndricas a partir de cortes seriados cuya representación se muestra en la figura 3, se debe a Rubio-Huertos y López-Abella (1966) a pesar de que la comunidad científica lo atribuyera inicialmente a Edwardson (1966) según citan Andrews y Shalla (1974). La morfología de estas inclusiones cilíndricas tiene un importante valor diagnóstico y taxonómico (Edwardson, 1974; 1981; Edwardson et al., 1984).

Las proteínas constitutivas de las ICC se asocian formando agregados en forma de lámina, que en tinción negativa presentan una fina estriación de unos 5nm (Edwardson y Purcifull, 1970). En secciones transversales de cortes ultrafinos, las inclusiones aparecen como molinetes o "pinwheels", si están asociadas a un eje central; rollos o "scrolls" y túbulos, si enrolladas y, agregados laminares rectos o curvos, si planas.

La asociación de los "pinwheels" con túbulos, "scrolls" o agregados laminares, ha sido el criterio utilizado por Edwardson (1974; 1981); Edwardson et al., (1984); Edwardson y Christie (1986), para el establecimiento de IV Subdivisiones de carácter taxonómico dentro del grupo de los Potyvirus:

Subdivisión I, con "pinwheels" y "scrolls"

Subdivisión II, con "pinwheels" y "agregados laminares"

Subdivisión III, presentando "pinwheels", "scrolls" y "agregados laminares" largos y rectos.

Subdivisión IV, "pinwheels", "scrolls" y "agregados laminares" cortos y curvos.

A este criterio habría que añadir la presencia de inclusiones citoplásmicas amorfas e inclusiones nucleares, peculiares de unos pocos virus del grupo (Martelli y Russo, 1984). Aplicando pues los criterios morfológicos establecidos por Edwardson (1974; 1981), el virus encontrado infectando Lunaria annua L. (muestra P1) pertenecería a la Subdivisión III, caracterizada por la presencia de "pinwheels", "scrolls" y "agregados laminares" largos y rectos, mientras que los virus infectando Cucurbita pepo L. (muestras P2 y P3), pertenecerían a la Subdivisión I, en la que los "pinwheels" se asocian con "scrolls" y no con "agregados laminares".

Hay que hacer notar que en la literatura no se ha encontrado ninguna referencia a Potyvirus infectando Lunaria, por lo que cabría suponer que es ésta la primera vez que se describe.

La morfología de las inclusiones del virus de Lunaria annua L., ha resultado similar a la descrita para otros Potyvirus que infectan Crucíferas, particularmente el Virus del Mosaico del Nabo (TuMV), (Kamei et al., 1969). En las células infectadas de Lunaria y no así en las de Brassica, se pudieron observar gran cantidad de las características "inclusiones en peine" descritas previamente por Rubio-Huertos y Vela-Cornejo (1966) en Amaranthus lividus (Amarantaceae) y también por Kamei et al., (1969) en Brassica perviridis Bailey infectada por TuMV. Sin embargo, Edwardson y Purcifull (1970) no describen estas "inclusiones en peine" en TuMV infectando B. perviridis, si bien sugieren que puede tratarse de una cepa diferente de TuMV a la descrita por Kamei et al., (1969).

En base a nuestros resultados y de acuerdo con los criterios taxonómicos establecidos por Edwardson (1974; 1981), el virus encontrado infectando Lunaria sería una cepa del Virus del mosaico del nabo (TuMV). El hecho de que las "inclusiones en peine" no se hayan observado en las células infectadas de B. sinensis, lo que estaría de acuerdo con los resultados de Edwardson y Purcifull (1970) y en contradicción con los de Kamei et al., (1969), sugiere que este tipo de inclusiones no sólo son inducidas por determinadas

cepas del virus, sino que también podrían ser huésped-dependientes.

En las muestras P2 y P3 de Cucurbita pepo L. infectadas, se observaron largos y flexuosos filamentos en el citoplasma, entremezclados y asociados con inclusiones cilíndricas en forma de "pinwheels", "scrolls" y túbulos, estando ausentes en ambos casos agregados laminares. Este tipo de inclusiones cilíndricas caracterizan la Subdivisión I de Edwardson (1974).

La sintomatología que presentan las plantas de campo de fuerte mosaico y deformación foliar, así como la gama de huéspedes aparentemente restringida a Cucurbitáceas, indujo a pensar que la infección podría estar producida por algún Potyvirus de los que actualmente son responsables de grandes pérdidas en cultivos de Cucurbitáceas, como el virus del mosaico de la sandía estirpes 1 y 2 (WMV 1,2); Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) y, Zucchini yellow fleck virus (ZYFV) (Nameth et al., 1986; Martelli et al., 1988).

La morfología de las inclusiones cilíndricas, con "scrolls" y sin "agregados laminares" es común a todos ellos, salvo para algunas cepas de WMV-2. La diferenciación entre los virus citados ha resultado ser dificultosa: WMV 1 y 2 fueron descritos inicialmente por Webb y Scott (1965) como dos virus separados, en base a tener o no la gama de huéspedes restringida a Cucurbitáceas; posteriormente fueron considerados como dos cepas de WMV serológicamente relacionadas (Milne et al., 1969), y más tarde como dos virus serológicamente diferentes (Purcifull y Hiebert, 1979). Finalmente, la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas (ELISA) han permitido establecer que WMV-1, WMV-2 y ZYMV, son tres virus diferentes (Nameth et al., 1986).

El virus que infectaba la muestra P2 de C. pepo, presentó además de las inclusiones citoplásmicas cilíndricas, otras inclusiones amorfas descritas como características diferenciales de WMV-1 y que lo distingue claramente de WMV-2 (Martelli y Russo, 1984). Estas inclusiones amorfas son claramente distintas de

las inclusiones "fimbriadas" (citoplásmicas y nucleares), asociadas típicamente a las infecciones de ZYFV (Martelli y Russo, 1984). Por lo tanto, podemos afirmar que el virus encontrado infectando la muestra P2 es el virus del mosaico de la sandía, estirpe 1 (WMV-1) el cual por otra parte, está actualmente propuesto como una cepa del virus de las manchas anulares de la papaya (PRSV) en base a la homología de secuencia de los aminoácidos de la cubierta viral (Shukla y Ward, 1989a).

III.2.- RHABDOVIRUS INFECTANDO EVONYMUS JAPONICA THUMB.

La familia Rhabdoviridae incluye actualmente tanto virus de plantas como de animales, con partículas de forma bacilar o de bala, grandes - de entre 135 y 380 nm de longitud-, provistas de una envuelta membranosa adquirida del huésped, lo que significa una singularidad entre los virus de plantas si exceptuamos el virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV) (Martelli y Russo, 1977b).

La compleja estructura de la partícula, constituida por una envuelta lipoprotéica, su gran tamaño en comparación con el resto de los virus vegetales, los complicados procesos de adquisición de la envuelta no bien dilucidados hasta el presente y en los que se encuentran implicadas las membranas nucleares o del retículo endoplásmico, así como la similitud con los virus animales hacen particularmente interesante a estos virus vegetales y permite que se les reconozca fácilmente en las células infectadas (Rubio-Huertos, 1978).

La sintomatología de las enfermedades que éstos virus producen es altamente variable, siendo frecuente la ausencia de síntomas. Al ser muy inestables y difícilmente transmisibles, sólo la microscopía electrónica permite la segura identificación de los virus pertenecientes a este grupo (Franckí et al., 1981).

Aquí presentamos un estudio ultraestructural de diferentes variedades de Evonymus japonica Thumb. mostrando muy distinta sintomatología y su relación con la presencia de partículas de Rhabdovirus.

III.2.1.- ORIGEN Y SINTOMATOLOGIA DE LAS MUESTRAS

En la primavera de 1985 se recogieron diferentes muestras de la planta ornamental Evonygus japonica Thumb., presentando síntomas de virosis:

Muestra E-1:

De los jardines de la Plaza del Descubrimiento de Madrid, se recogieron muestras de E. japonica Thumb. var. microphylla Jaeger cv. "argentea" con notable enanismo en relación con las otras plantas del seto, y exhibiendo manchas amarillo blanquecinas en hojas (figs. 13B y 15B)

Muestra E-2:

De los mismos jardines se recogieron muestras de E. japonica Thumb. var. microphylla Jaeger., cultivar desconocido de hoja verde, exhibiendo mosaico y enanismo (fig. 15A).

Muestra E-3:

Del mismo lugar también se recogieron muestras de E. japonica Thumb. var. macrophylla Jaeger., cultivar desconocido, con mosaico en hojas (figs. 13C y 15C).

Las tres muestras estaban infectadas por cóccidos de los géneros Lepidosaphes y Pinnaspis.

Muestra E-4:

De las proximidades de Madrid (La Berzosa, Hoyo de Manzanares) se recogieron muestras de E. japonica Thumb. var. macrophylla Jaeger., que mostraban el síntoma "fascié" (Codaccioni, 1972) consistente en aplanamiento en abanico de tallos y anomalías filotáxicas en hojas y meristemas terminales, como se muestra en las figuras 13A y 14. Las plantas estaban fuertemente infectadas por cóccidos del género Lepidosaphes.

Muestra E-5:

De invernaderos comerciales se obtuvieron ejemplares de

E. japonica Thumb. var. aurea-variegata. con hojas variegadas de color verde-amarillo.

Plantas completas de las muestras E-1, E-2, E-3 y E-5 se trasplantaron y mantuvieron en el laboratorio durante cuatro años. La planta con el síntoma "fascié" (muestra E-4) se conservó y controló en el campo.

De todas ellas se prepararon tinciones negativas de extracto crudo e inclusiones para ultramicrotomía (aptdo II.3).

III.2.2.- GAMA DE HUESPEDES

Para determinar la gama de huéspedes de los posibles virus que infectaban Evonymus, se inocularon mecánicamente con tampón de inoculación (aptdo II.1) y tampón de inoculación conteniendo 2-mercaptoetanol al 0,1%, y por injerto e incisión (aptdo II.2), las siguientes especies y variedades:

Fam. Celastraceae, E. japonica Thumb. var. "microphylla". var. "macrophylla" y var. "aurea-variegata".

Fam. Chenopodiaceae: Chenopodium amaranticolor Coste et Rein; Ch. quinoa Willd.

Fam. Solanaceae: Datura stramonium L.; Nicotiana clevelandii Gray; N. glutinosa L.; N. glutinosa L.; N. rustica L.; N. tabacum L. var. "Samsam", var. "Xanthynoc" y var. "White-Burley".

Los resultados fueron negativos en todos los casos, no pudiendo reproducir ninguno de los síntomas en las plantas inoculadas, ni observar partículas mediante microscopía electrónica (aptdo II.3).

Las plantas trasplantadas y mantenidas en laboratorio, presentaron durante todo el tiempo el síntoma. La planta de campo con el síntoma "fascié" (muestra E-4), mantuvo el síntoma siempre en el mismo grupo de ramas, y no en otras del mismo pie.

III.2.3.- MICROSCOPIA ELECTRONICA

TINCION NEGATIVA

En las preparaciones de tinción negativa de extracto crudo (aptdo. II.3) de las muestras E-1, E-2, y E-3 con enanismo y mosaico, se observaron partículas virales baciliformes y en forma de bala (fig. 16) características del grupo de los Rhabdovirus (Martelli y Russo, 1984). No se observaron partículas virales en la muestra E-4 con el síntoma "fascié" ni en la muestra E-5, variegada de aspecto sano. Las partículas virales de las muestras E-1, E-2 y E-3 fueron más estables frente a la tinción con molibdato amónico (AM) al 2%, pH 5,5 (aptdo II.3) que frente a otras tinciones, si bien las imágenes resultaron con menor contraste y resolución.

La forma bacilar típica de los Rhabdovirus de plantas, se muestra en las micrografías de la figura 16. Las partículas aparecieron sueltas o en el interior de sacos posiblemente del retículo endoplasmático (fig. 16A). En algunas partículas se pudo observar la envuelta que rodea a la nucleocápsida y en las partículas rotas -adoptando entonces forma de bala-, el canal central penetrado por la tinción (fig. 16C).

CORTES ULTRAFINOS

En el estudio de cortes ultrafinos (aptdo II.3) de las muestras E-1, E-2 y E-3, se observaron partículas de Rhabdovirus infectando tanto células parenquimáticas del mesófilo como elementos vasculares inmaduros y células acompañantes (fig. 17, 18 y 22).

No se observaron partículas virales en la muestra E-4 con el síntoma "fascié", ni en la muestra E-5 de hoja amarillo variegada como tampoco se encontraron diferencias ultraestructurales significativas entre las muestras infectadas.

Las alteraciones morfológicas celulares más notables en las plantas infectadas, consistieron en la presencia de grandes bolsas en el espacio perinuclear conteniendo paquetes y apilamientos de partículas ordenadas en disposición paracristalina (fig. 17). Las masas de partículas acumuladas en este espacio, con frecuencia dieron la impresión de encontrarse en el interior del núcleo, si bien siempre limitadas por una membrana (fig. 17C). Las imágenes podrían ser resultado de la invaginación de las bolsas del espacio perinuclear o bien haber sido afectadas por cortes tangenciales.

No se observaron nucleocápsidas desnudas en el interior del núcleo ni tampoco viriones no incluidos en sacos o vesículas. También se observaron partículas en el citoplasma, formando pequeños grupos o partículas aisladas, en el interior de sacos o vesículas del retículo endoplásmico (fig. 18). Además de los pequeños grupos de partículas en el interior de bolsas, las células infectadas presentaron numerosas vesículas de pequeño tamaño así como alguna vesícula conteniendo envueltas virales vacías (fig. 18C y 21A).

En general, la forma predominante de las partículas fue bacilar, con un tamaño medio obtenido a partir de 50 mediciones sobre fotografía, de unos 230 nm de largo y 58 de diámetro. Con frecuencia pudo verse la disposición helicoidal de la nucleocápsida, de unos 5 nm de separación entre vueltas (fig. 16, 18A y 19). En las nucleocápsidas, el canal central fue patente tanto en cortes longitudinales como en los transversales (figs. 17, 18A y 19), pudiendo diferenciarse dos envueltas en torno a la nucleocápsida con posibles espículas o peplómeros saliendo hacia el exterior (fig. 19). Excepcionalmente se observaron partículas dobles, que midieron unos 450 nm de longitud, presentando un septo o estrechamiento central (figs. 18A y 19).

La morfología de las partículas fue semejante al modelo propuesto por Francki y Randles (1979) que se presenta en la figura 20, observándose -a grandes aumentos-, la disposición helicoidal de la nucleocápsida, el canal interior y, la envuelta lipoprotéica (fig. 19).

En las zonas vasculares, gran número de partículas se localizaron en las proximidades de las paredes celulares (fig. 22), algunas de las cuales incluso apareció emergiendo de la pared celular como se muestra en la figura 21A, y posiblemente en el interior de los plasmodesmos, ya que en secciones transversales de éstos se observaron estructuras formadas por dos envueltas diferenciadas y que por su tamaño -entre 57 y 60 nm de diámetro-, pudieran corresponder a partículas virales completas (fig 21B).

Figura 13 A.- E. japonica Thumb. var. macrophylla (muestra E-4) fuertemente infectada por coccidos mostrando el sintoma "fascié" en una de las ramas. Obsérvese el aplanamiento del tallo y brotes foliares en abanico.

Figura 13 B.- E. japonica var. microphylla cv. "argentea" (muestra E-1) con suave mosaico en hojas.

Figura 13 C.- E. japonica var. macrophylla (muestra E-3) exhibiendo mosaico en hojas.

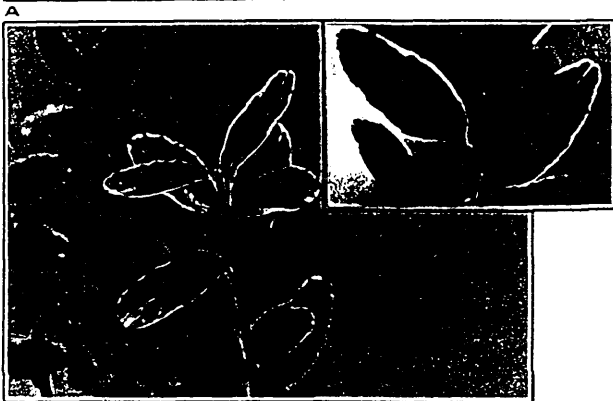


Figura 14.- E. japonica var. macrophylla (muestra E-4) con sintoma "fascié". Nótese el aplanamiento del tallo (A), anomalías filotáxicas con nerviación en abanico (B) y brotes foliares en roseta (C)



A



B



C

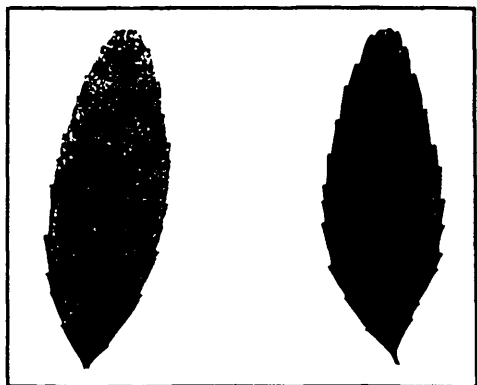
Figura 15. - Síntoma de mosaico en hojas de E. japónica variedades "microphylla" muestra E-2 (A), "microphylla cv. argentea" muestra E-1 (B) y "macrophylla" muestra E-3 (C), en comparación con hojas sanas de las mismas variedades.



A



B



C

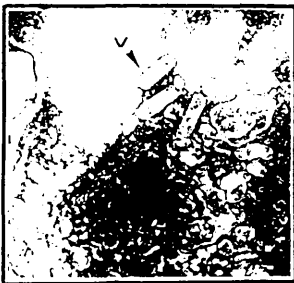
Figura 16 A. - X 79.800 Tinción negativa con molibdato amónico (AM) al 2% pH 5.5 de extracto crudo de E. japonica (muestra E-1). Las particular virales aparecen dentro de una bolsa (flecha).

Figura 16 B. - X 50.200 Tinción negativa con AM de la muestra E-2 mostrando partículas baciliformes (flecha)

Figura 16 C. - X 79.800 Tinción negativa de la muestra E-3, mostrando partículas virales rotas en las que el canal central es claramente visible.



A



B



C

Figura 17 A.- X 16.200 Núcleo de célula infectada de Evonymus mostrando numerosos acúmulos de partículas virales en el espacio perinuclear en disposición paracristalina. Las flechas señalan partículas aisladas o en pequeños grupos, localizadas en el citoplasma.

Figura 17 B.- X 31.900 Núcleo con partículas en disposición paracristalina como en la figura anterior. Nótese el gran desarrollo del nucleolo.

Figura 17 C.- X 25.100 La membrana interna nuclear de las bolsas conteniendo partículas es claramente visible (flechas). Las secciones transversales de las partículas permiten observar el interior de las nucleocápsidas. Una de las flechas indica la presencia de una partícula de localización citoplásmica.

Figura 17 D.- X 41.000 Núcleo mostrando las partículas localizadas en el espacio perinuclear. Nótese el gran desarrollo del nucleolo y algunas secciones de los poros nucleares.



A

B

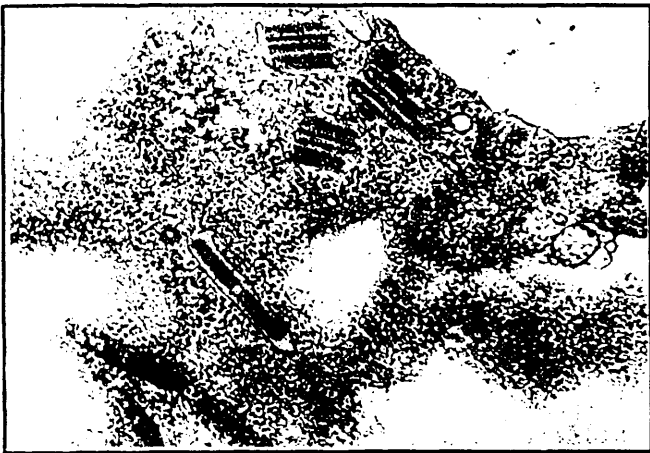
C

D

Figura 18 A.- X 63.800 Células de Evonymus mostrando partículas virales localizadas en el citoplasma en las que el aspecto estriado de las nucleocápsidas es claramente visible. En la micrografía se muestra una "partícula doble" localizada en el interior del retículo, en la que se observa un septo transversal así como la presencia de dos envueltas.

Figura 18 B.- X 41.000 Partículas virales con localización citoplásmica, en el interior de bolsas del retículo.

Figura 18 C.- X 50.200 Aspecto del citoplasma de una célula infectada con numerosas vesículas próximas a los grupos de partículas.



A



B



C

Figura 19. - X 255.000 Partículas de la figura 18A a gran aumento en cortes transversales y longitudinales, en las que puede observarse la disposición helicoidal de la nucleocápsida, el canal central y, la envuelta lipoprotéica (flechas).



-107-

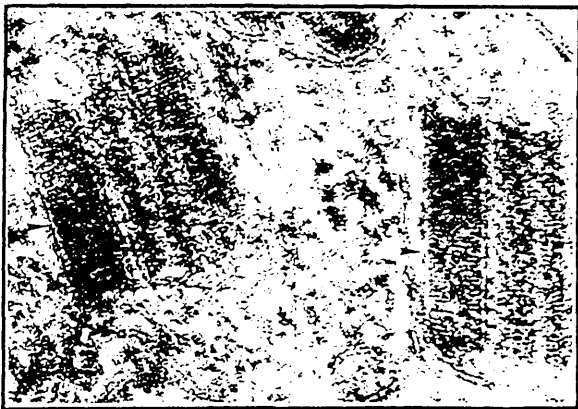


Figura 20.- Representación de la estructura de una partícula de Rhabdovirus, según el modelo propuesto por Francki y Randles (1979).

ESTRUCTURA DE UNA PARTICULA DE RHABDOVIRUS

(MODELO DE FRANCK Y RANDES, 1979)

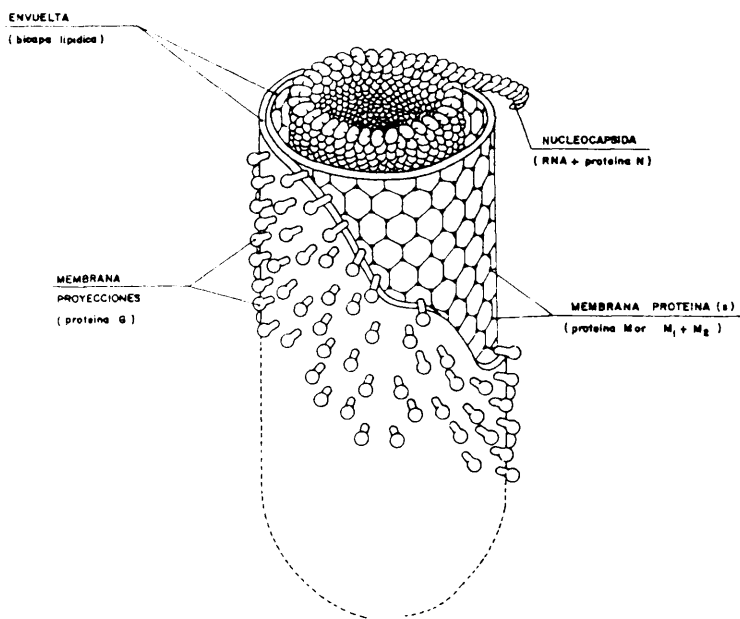


Figura 21 A. - X 50.200 Masas de partículas localizadas en el citoplasma. Nótese la presencia de una de las partículas (V) haciendo protusión de la pared celular. En el interior de vesículas (flechas) aparecen envueltas virales sin nucleocápsida.

Figura 21 B. - X 63.800 Pared celular con un grupo de plasmodesmos de mayor tamaño que lo normal, en los que pueden observarse la presencia en su interior de posibles partículas virales (flecha).



A



B

Figura 22 A. - X 13.700 Visión general de una zona vascular de Erythraeus mostrando partículas virales en el citoplasma como posiblemente emergiendo del interior de plasmodesmos (flechas).

Figura 22 B. - X 9.100 Zona vascular mostrando la localización de partículas virales en el espacio perinuclear de las células acompañantes (flecha).

Figura 22 C. - X 20.500 Localización citoplásmica y nuclear de los viriones en un área vascular de Erythraeus (flechas). Algunas partículas parecen estar en relación con las paredes celulares (una ampliación de una de las zonas se mostró en la figura 18C).



III.2.4.- DISCUSION

La detección mediante microscopía electrónica de partículas con envuelta, bacilares o con forma de bala, tanto en tinción negativa como en cortes ultrafinos, constituye un método rápido y seguro de identificación de los virus pertenecientes a la familia Rhabdoviridae (Francki et al., 1981).

Muchos virus del grupo han sido observados en células de plantas que mostraban síntomas de enfermedad, pero dado que son difícilmente transmisibles, se hace necesario disponer de más datos para establecer la etiología de las enfermedades a ellos atribuidas (Francki et al., 1981), como es el caso que nos ocupa en el presente estudio.

En España, esta es la primera vez que se describe un Rhabdovirus infectando el género Evonymus. Únicamente otro Rhabdovirus llamado virus del variegado del Evonymus o Evonymus fasciation (Matthews, 1984) ha sido descrito previamente infectando Evonymus japonica Thumb. (Codaccioni, 1972) como causante del síntoma "fascié" consistente en anomalías del funcionamiento meristemático apical, con tallos aplanados en abanico, y alteraciones filotáxicas en hojas con aspecto sano (Jonsson, 1974).

Las partículas han sido descritas como de 80 nm de diámetro y 260 nm de longitud, con localización citoplásmica y nuclear (Codaccioni, 1972; Jonsson, 1974).

Codaccioni y Cossar (1975), transmitieron la infección a partir de Evonymus con síntoma "fascié", mediante inoculación por injerto únicamente cuando ésta se realizó en el mes de noviembre. Sin embargo, aunque localizaron las partículas en la planta inoculada, no pudieron reproducir el síntoma.

En nuestro estudio, no hemos encontrado partículas virales en plantas de E. japonica Thumb. var. macrophylla que sin embargo presentaba el síntoma "fascié". La planta permaneció en el campo desde 1985, repitiendo las anomalías filotáxicas en tallos y hojas cada primavera, siempre en el mismo grupo de ramas y no en otras. El no haber encontrado partículas virales en plantas con el síntoma

"fascié", así como el hecho de que Codaccioni y Cossard (1975) hubiesen transmitido el virus sin conseguir reproducir el síntoma, nos permite suponer que no existe relación entre la presencia de Rhabdovirus y las anomalías morfológicas denominadas "fascié".

En nuestros estudios, tampoco en las variedades denominadas "variegata" se encontraron partículas virales. Por el contrario, se localizaron partículas de Rhabdovirus, similares a las descritas por Codaccioni (1972), en diferentes variedades de Evoynvus presentando síntomas de mosaico y enanismo (muestras E-1, E-2 y E-3), si bien no pudieron ser transmitidos por los procedimientos descritos en el apartado II.2, a plantas de Evoynvus o a otras plantas.

De nuestro estudio parece deducirse que el paso de partículas de célula a célula presumiblemente se realiza por las partículas maduras a través de los plasmodesmos (seguramente modificados por el virus), y no como nucleocápsidas desnudas (Kitajima y Costa, 1966). El mayor diámetro de los plasmodesmos (entre 55 y 60 nm), así como las dos capas observadas en las partículas en el interior de ellos al igual que las imágenes de partículas con envuelta brotando del plasmodesmo, parecen corroborarlo.

La localización celular de las partículas maduras de Rhabdovirus se sitúa en el citoplasma, espacio perinuclear o en viroplasma citoplásmicos (Martelli y Russo, 1984). Excepcionalmente se citan virus con localización simultánea en citoplasma y espacio perinuclear (Vela y Rubio-Huertos, 1974; Peters, 1981; Francki et al., 1981). Esta localización seguramente tiene que ver con el proceso de maduración de las partículas.

En este proceso, las nucleocápsidas en los estadios tempranos de la infección, adquieren una envuelta externa lipoprotéica con proyecciones o peplómeros formados por la glicoproteína mayoritaria G; en la cara interna de la envuelta están presentes entre otras, las también mayoritarias proteínas M, que además sirven para clasificar los Rhabdovirus: el subgrupo A, contiene proteína M y la localización del virus es citoplásmica; el subgrupo B, contiene

proteínas M1 y M2 acumulándose las partículas en el espacio perinuclear (Peters, 1981; Matthews, 1979; Rodriguez et al., 1988).

Según la teoría propuesta por Francki (1973), las nucleoproteínas y "cores" libremente formados en el nucleoplasma, realizarían el ensamblaje a expensas de la membrana interna nuclear previamente modificada por una o dos proteínas codificadas por el virus. Las partículas maduras así formadas se acumularían, en los estadios tardíos de la infección, en el espacio perinuclear o pasarían al enquilema del retículo a través de las conexiones existentes entre ambos sistemas (Rubio-Huertos y Rubio-Saez, 1986).

Este tipo de Rhabdovirus caracterizado por formar grandes acumulaciones de partículas en disposición paracristalina en el espacio perinuclear, induce también la formación de nucleolos de gran tamaño (Kitajima y Costa, 1966).

La acumulación de partículas en disposición paracristalina en el espacio perinuclear y en cisternas del retículo observadas en el presente estudio, sugieren para el virus de Evonymus descrito, una localización citoplásmica y nuclear simultánea, lo que también se corresponde con las primeras descripciones de Evonymus fasciation (Codaccioni, 1972; Jonsson, 1974).

Dadas las características de las muestras estudiadas, nosotros no hemos podido observar las nucleocápsidas desnudas, presentes en los estadios tempranos de la infección, por lo que resulta difícil afirmar cual es el modo de maduración del Rhabdovirus encontrado en Evonymus.

En todo caso, como hemos señalado anteriormente, ni el sintoma "fasciá", ni el "variegado", parecen ser debidos a la infección por Rhabdovirus, por lo que la denominación de "virus del variegado de Evonymus" o "Evonymus fasciation" dados oficialmente para el Rhabdovirus encontrado en Evonymus (Mathews, 1984) parecen inadecuadas.

III.3.- VIROSIS MULTIPLE INFECTANDO CUCURBITA PEPO L.

Frecuentemente las plantas de campo suelen estar infectadas por más de un virus, por lo que para realizar estudios de cada uno de ellos se hace necesario separarlos, recurriendo a inoculaciones en huéspedes específicos.

Una muestra de la eficacia de la microscopía electrónica en el estudio de las enfermedades producidas por virus de plantas, es que nos permite detectar estas infecciones mixtas en poco tiempo y, aunque la identificación de los virus en muchos casos sea sólo a nivel de grupo, resulta de gran ayuda para la selección de los huéspedes más adecuados. Por otro lado, la técnica permite determinar la extensión geográfica de una virosis o la localización de una nueva infección en una zona determinada (Martelli et al., 1988). En todo caso, detectar mediante microscopía electrónica infecciones virales mixtas evita realizar otro tipo de experiencias que, por partir de mezclas de virus conducirían a resultados confusos o equívocos.

Infecciones mixtas producidas por dos virus son relativamente frecuentes, no así la presencia conjunta de tres virus. García-Luque et al., (1983) encontraron en cultivos de interés económico en España, al virus del mosaico del pepino (CMV) asociado con Potyvirus (PVY) o con el virus del mosaico del tabaco (TMV), en una proporción de 17/112 casos estudiados y únicamente en 2/112 casos, la asociación fué de CMV+PVY+TMV.

Un caso típico de infección producida por tres virus, que hasta donde sabemos no ha sido descrita previamente, es el que se presenta a continuación.

III.3.1.- ORIGEN Y SINTOMATOLOGIA DE LAS MUESTRAS

Se estudiaron muestras de Cucurbita pepo L. variedad desconocida, mostrando síntomas de mosaico y deformación foliar, procedentes de cultivos en Ventas de Zafarraya (Málaga). Las plantas tenían gran abundancia de pulgones.

Con la muestra de campo se prepararon tinciones negativas e inclusiones para ultramicrotoma (aptdo II.3), así como desecados en CaCl₂ para su conservación (aptdo II.2).

III.3.2.- GAMA DE HUESPEDES

Con la muestra de campo se inocularon mecánicamente (aptdo II.2), las siguientes especies y variedades:

Fam. Cucurbitaceae: Cucumis melo L. var. "Amarillo"; "Tendral".
Fam. Leguminosaceae: Vigna sinensis (Torner) Savi var. "Blackeye".
Fam. Solanaceae: Nicotiana sylvestris Speg. and Gomez; N. tabacum L. var. "Xanthi-nc", obteniendo los siguientes resultados:

<u>PLANTAS DE ENSAYO</u>	<u>SINTOMAS</u>
Melón "Amarillo"	M,DF
Melón "Tendral"	M
<u>Vigna sinensis</u> "Blackeye"	LLN
<u>N. sylvestris</u>	M
<u>N. tabacum</u> "xanthi-nc"	M

Abreviaturas:DF=Deformación foliar;LLN=Lesiones locales necróticas;M= Mosaico.

Las lesiones locales producidas a los dos o tres días en V. sinensis se clonaron tres veces y se utilizaron para inocular N. tabacum, var "Xanthi-nc", con el resultado de mosaico.

Las plantas crecieron y se mantuvieron en cámara de cultivo en las condiciones habituales (aptdo II.2).

III.3.3- MICROSCOPIA ELECTRONICA

TINCION NEGATIVA

En las preparaciones de tinción negativa del extracto crudo (aptdo II.3) de la muestra de campo, se observaron partículas filamentosas y flexuosas junto a inclusiones características del grupo de los Potyvirus (fig. 23A y 23B).

En las tinciones negativas de N. tabacum L. "xanthi-nc" inoculadas con lesiones locales necróticas clonadas, no se observaron más que pequeñas partículas esféricas, cuando las preparaciones fueron fijadas previamente con formaldehído al 2% (aptdo II.3).

CORTES ULTRAFINOS

El estudio de cortes ultrafinos de la muestra de campo (Cucurbita pepo L.) mostró la presencia, en las mismas células, de partículas virales de diferentes formas y tamaños, así como inclusiones citoplásmicas cilíndricas (ICC) descritas por Edwardson (1974) como características del grupo de los Potyvirus (figs. 23A, 23B, 24A, 24B y 25). Las ICC presentaron principalmente forma de "túbulos" y de gruesos rollos o "scrolls" (fig. 24B y 25A). Igualmente se observaron agregados laminares cortos y curvos, sensiblemente más gruesos que los "brazos" de los "pinwheels" (fig. 25A). No se observaron entre las ICC, agregados laminares rectos.

En las mismas células y mezclados con los ribosomas se observaron partículas virales más densas que éstos, de los que eran

Figura 23 A.- X 38.400 Tinción negativa con ácido fosfotúngstico(PTA) al 2% pH 7 de una inclusión cilíndrica característica de Potyvirus, al lado de una partícula viral. Nótese la fina estriación longitudinal de la inclusión.

Figura 23 B.-X 38.400 Tinción con PTA de una inclusión cilíndrica de Potyvirus.

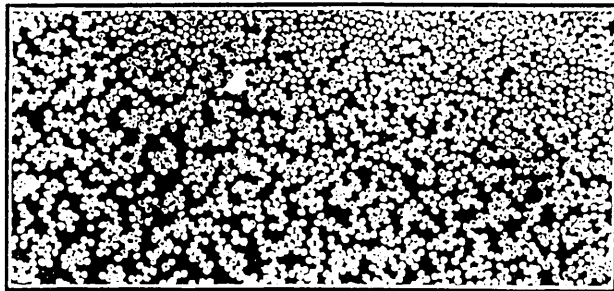
Figura 23 C.-X 63.800 Tinción con PTA de partículas purificadas del virus del mosaico del pepino (CMV) previamente fijadas con formaldehído al 2%



A



B



C

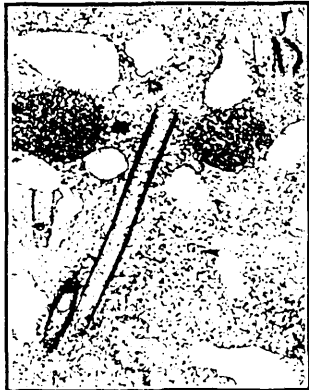
Figura 24 A.- X 16.100 Visión general de una célula de Cucurbita pepo L. infectada por tres virus. En la micrografía se observan partículas filamentosas (flecha) e inclusiones citoplásmicas cilíndricas características de los Potyvirus (ICC) (flecha), así como acúmulos de pequeñas partículas esféricas entremezcladas con ribosomas.

Figura 24 B.- X 46.000 Secciones longitudinales y tangenciales de ICC en forma de "túbulos" y "scrolls". Las flechas señalan partículas de Rhabdovirus y posibles partículas de virus esféricos.

Figura 24 C.- X 41.000 Agregado de partículas esféricas (flecha). Al lado de una mitocondria pueden observarse dos partículas en sección transversal de Rhabdovirus(V).



A



B

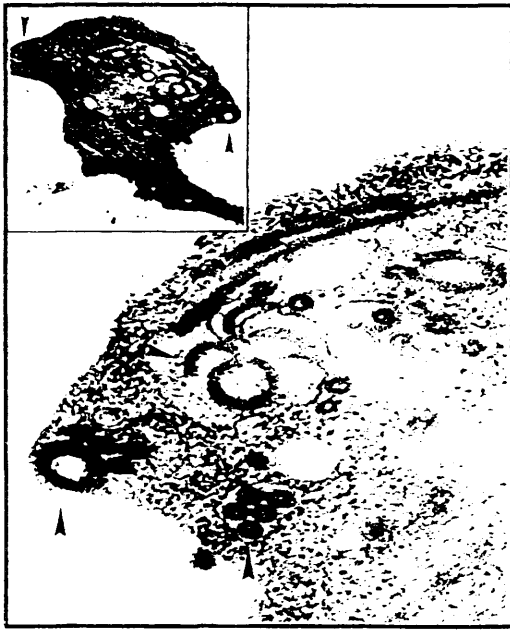


C

Figura 25 A.- Visión a diferentes aumentos (X 12.500 y X 100.300) de una porción de citoplasma mostrando las gruesas inclusiones con forma de rollo o "scroll" y los agregados laminares gruesos y curvos característicos de la Subdivisión IV de Potyvirus (Edwardson et al., 1984) junto a partículas de Rhabdovirus en secciones transversales y posibles partículas de CMV dispersas en el citoplasma.

Figura 25 B.- X 100.300 Sección transversal de partículas de Rhabdovirus de localización citoplásmica en las que pueden observarse las nucleocápsidas rodeadas por una envuelta externa (flecha).

Figura 25 C.- X 12.500 Aspecto de la misma célula mostrando gran cantidad de ICC. La flecha señala el grupo de partículas de Rhabdovirus ampliado en la fig. 25B.



A



B



C

difícilmente diferenciables. Únicamente pudieron distinguirse cuando las pequeñas partículas esféricas formaron agregados, como el que se muestra en la figura 24C.

Finalmente, junto a las inclusiones cilíndricas de Potyvirus se observaron partículas grandes, provistas de envuelta y forma bacilar características del grupo de los Rhabdovirus. Estas partículas -aisladas o formando grupos-, se localizaron en el interior de vesículas en el citoplasma (fig. 25). Las secciones transversales de las partículas baciliformes permitieron observar un espacio interior rodeado por dos envueltas (fig. 25). No se localizaron partículas semejantes a Rhabdovirus ni en el espacio perinuclear, ni en el núcleo.

III.3.4.- PURIFICACION Y ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS ARNs DE CMV.

Las plantas de N. tabacum L. "xanthi-nc" inoculadas a partir de las lesiones locales necróticas clonadas en V. sinensis, se utilizaron como material para la purificación de un posible virus perteneciente al grupo de los Cucumovirus mediante el método de Lot et al., (1972) (aptdo II.4).

La concentración del virus purificado se calculó a partir de su espectro de absorción (aptdo II.4) obteniendo rendimientos de 597,785 mg de nucleoproteína por Kg de tejido.

Las tinciones negativas del virus purificado fijadas previamente con formaldehído al 2% (aptdo II.3), mostraron la presencia de partículas de 30 nm de diámetro, perfil angular y penetradas por la tinción en la parte central, con un característico aspecto de "rosquilla" (fig. 23C).

Para la identificación del virus esférico, se extrajeron sus ácidos nucleicos (aptdo II.5) analizándolos electroforéticamente (aptdo II.6). Los análisis evidenciaron la presencia de cuatro bandas (fig. 26) que por su movilidad se corresponden con los ARNs 1, 2 y 3 y el subgenómico ARN-4 de los virus pertenecientes al grupo Cucumovirus (Kaper y West, 1972).

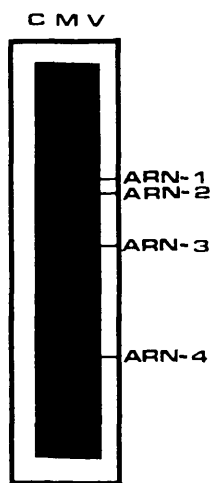


Figura 26.- Análisis electroforético de los ARNs de CMV. Se observan los tres ARNs genómicos mayores (ARN 1,2 y 3) y el ARN-4 subgenómico.

III.3.5.- DISCUSION

De acuerdo con los estudios realizados por microscopía electrónica y gama de huépedes, se puede afirmar que las plantas de Cucurbita pepo L con fuerte mosaico presentaban una multiinfección producida por tres virus diferentes.

La presencia de inclusiones citoplásmicas cilíndricas, son criterio taxonómico suficiente para identificar al grupo de los Potyvirus (Edwardson, 1974; 1981; Edwardson et al., 1984; Edwardson y Christie, 1986). Las inclusiones cilíndricas y, particularmente los agregados laminares cortos y curvos detectados en el presente estudio, resultaron ser de características similares a las descritas por Edwardson et al., (1984) para las cepas del virus del mosaico de la sandía, estirpe 2 (WMV-2), pertenecientes a la Subdivisión IV (apdo III.1.4).

Las partículas baciliformes grandes, con un canal central rodeado por varias capas, e incluidas en el interior de vesículas del retículo son características del grupo de los Rhabdovirus (Francki et al., 1981) el que, por la particular morfología de sus partículas, es fácilmente diferenciable de otros grupos de virus de plantas mediante microscopía electrónica. La presencia de partículas localizadas sólo en el citoplasma, y no en el núcleo o espacio perinuclear, permite suponer que se trate de partículas de ensamblaje citoplásmico (Francki et al., 1981), si bien sería necesario localizar viroplasmos formados por partículas inmaduras para afirmarlo (Rubio-Huertos y Rubio-Saez, 1986), lo que no suele ser frecuente en los estudios en plantas de campo por tratarse de estadios avanzados de la infección. En general, las características morfológicas de las partículas del Rhabdovirus encontradas en la multiinfección de C. pepo L., fueron similares a las descritas para el virus del variegado del melón (Melon variegation) por Rubio-Huertos y Peña-Iglesias (1973) y como éste, podría tratarse de un virus de ensamblaje citoplásmico.

La observación en el citoplasma de partículas de 30 nm densas a los electrones, similares a ribosomas y ocasionalmente formando agregados, no es por sí mismo criterio válido para la identificación de un determinado grupo de virus. De entre los virus isométricos del tamaño y características del descrito, el virus del mosaico del pepino (CMV) es de los patógenos más frecuentes en Cucurbitáceas. (Milne et al., 1969; Nameth et al., 1986; Martelli et al., 1988), para el que Vigna sinensis es huésped diferencial produciendo lesiones locales necróticas, que lo diferencian de otros Cucumovirus y de otros virus esféricos que infectan Cucurbitáceas (Kaper y Waterworth, 1981; García-Luque et al., 1983). La presencia de CMV se confirmó mediante su aislamiento en plantas de tabaco, purificación y posterior análisis electroforético de sus ácidos nucleicos, resultando un patrón de bandas característico de este virus.

Los resultados de este trabajo demuestran que, como en otros muchos casos, son bastante comunes en las plantas de campo las infecciones virales producidas por más de un virus. Hemos podido detectar en este caso, la presencia del virus del mosaico del pepino (CMV), una posible cepa del virus del mosaico de la sandía estirpe 2 (WMV-2) y un Rhabdovirus, probablemente el virus del variegado del melón, Melón variegation.

La doble infección por CMV y Potyvirus es relativamente frecuente en las muestras de campo (Milne et al., 1969; García-Luque et al., 1983; Martelli y Lal, 1985; Nameth et al., 1986; Martelli et al., 1988), incluyendo Cucurbitáceas (García-Luque et al., 1983). La asociación de Rhabdovirus con Potyvirus ha sido descrita por Henriques y Henriques (1986) infectando Malva sp.

Hasta lo que nosotros conocemos, la presencia simultánea de un Cucumovirus, un Potyvirus y un Rhabdovirus, en una misma planta de la familia Cucurbitáceas no había sido descrita previamente. Puesto que los tres virus son transmitidos por áfidos, particularmente por especies del género Myzus, podríamos aventurar que éste ha sido el vector responsable de la triple infección.

III.4.- EL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DEL PIMIENTO (PMMV) INFECTANDO
CAPSICUM ANNUUM L. var. "GEDEON"

El agente causal de las mayores pérdidas en cultivos protegidos de pimientos con resistencia incorporada al virus del mosaico del tabaco (TMV) en el sureste de España, ha sido identificado como el virus del moteado suave del pimiento (PMMV) por Alonso et al. (1989) y García-Luque et al. (1990).

El virus, perteneciente al grupo de los Tobamovirus, produce síntomas suaves en hojas jóvenes, afectando sin embargo gravemente a los frutos. Sin vector conocido, es sin embargo fácilmente transmisible por contacto, lo que apunta hacia el importante papel del hombre durante las operaciones de cultivo en la rápida expansión de la enfermedad (Garrett et al. 1985).

Las partículas virales rectas, de unos 300 nm de longitud, son por el contrario rápida y fácilmente detectadas mediante microscopía electrónica, por lo que éste método puede jugar un importante papel en cuanto a diagnóstico (Martelli y Russo, 1984; Edwardson y Christie, 1986b).

La escasa información sobre la ultraestructura de las células de hoja y fruto de pimiento respectivamente, infectadas por PMMV así como la importancia económica de los cultivos de pimiento bajo plástico, en nuestro país, han sido el motivo de la realización del presente estudio.

III.4.1.- ORIGEN Y SINTOMATOLOGIA DE LAS MUESTRAS

Se han estudiado ejemplares de Capsicum annuum L. var. "Gedeón" resistentes a TMV, procedentes de cultivos comerciales bajo plástico en Motril (Granada). Las plantas presentaban mosaico en hojas y frutos de pequeño tamaño, con deformaciones y necrosis.

III.4.2.- GAMA DE HUESPEDES

Para establecer la gama de huéspedes del posible virus del moteado suave del pimiento (PMMV) infectando las muestras de pimiento "Gedeón", se inocularon mecánicamente (aptdo II.2) las siguientes especies y variedades: Capsicum annuum L. var. "Yolo Wonder"; Datura stramonium L.; Lycopersicon esculentum Mill. var. "Rutgers"; Nicotiana clevelandii Gray; N. glutinosa L.; N. sylvestris Spex and Gomes; N. tabacum L. "xanthi-nc". Las plantas crecieron y se mantuvieron en cámara de cultivo en las condiciones descritas en el apartado II.2.

No se produjeron síntomas en las plantas de tomate inoculadas, apareciendo mosaico suave en pimiento y N. clevelandii. En el resto de las plantas, el síntoma fué de pequeñas lesiones locales necróticas.

Las especies arriba citadas fueron inoculadas igualmente con purificados del virus causante de la infección en pimiento "Gedeón" (PMMV), del virus del mosaico del tabaco (TMV) y, del virus del mosaico del tomate (ToMV) proporcionados amablemente por la Dra. Elena Alonso. Las inoculaciones se realizaron mecánicamente (aptdo II.2) en cada media hoja, con tampón de inoculación (aptdo. II.1) conteniendo 0,5 mg/ml de virus purificado.

El virus del moteado suave del pimiento no infectó los tomates inoculados y produjo mosaico suave en pimientos y Nicotiana

N. clevelandii. En el resto de las plantas de ensayo produjo lesiones locales necróticas pequeñas a los cuatro días de la inoculación. Las plantas inoculadas con TMV y ToMV presentaron lesiones locales necróticas grandes dos días después de la infección y, mosaico en tomate.

Los resultados obtenidos se recogen en tabla que se presenta en la continuación y en la figura 27.

SINTOMAS PRODUCIDOS POR DIFERENTES TOBAMOVIRUS			
Plantas de ensayo	PMMV	TMV	ToMV
<u>C. annuum</u> L. "Yolo Wonder"	M	LLN	LLN
<u>D. stramonium</u> L.	LLNp	LLN	LLN
<u>L. esculentum</u> Mill. "Rutgers"	Neg	M	M
<u>N. clevelandii</u> Gray.	M	M	M
<u>N. glutinosa</u> L.	LLNp	LLN	LLN
<u>N. sylvestris</u> Speg.	LLNp	M	LLN
<u>N. tabacum</u> L. "Xanthi-nc"	LLNp	LLN	LLN

Abeviaturas: LLN = Lesiones locales necróticas, grandes; LLNp = Lesiones locales necróticas pequeñas; M = mosaico; Neg = Ausencia de síntomas.

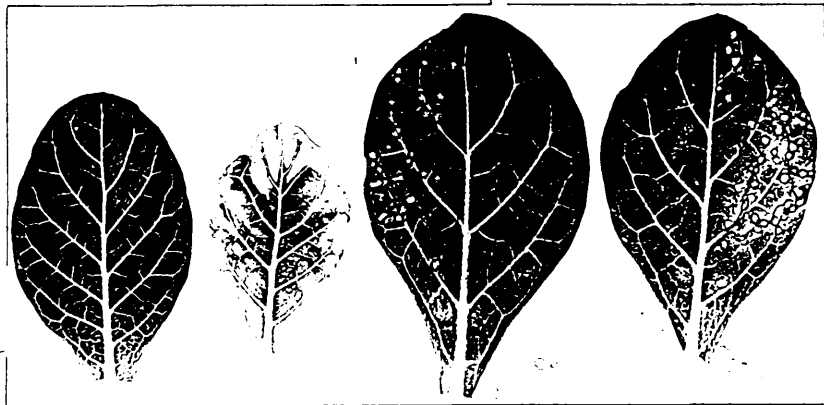
Figura 27 A.- Plantas de Nicotiana sylvestris inoculadas con TMV, ToMV y PMMV respectivamente mostrando síntomas de mosaico (izquierda), lesiones locales necróticas grandes (centro) y lesiones locales necróticas pequeñas (derecha)

Figura 27 B.- De izquierda a derecha, hojas de Nicotiana sylvestris: control sano e inoculada con TMV; Inoculada con ToMV (mitad izquierda) y con TMV (mitad derecha); con PMMV (mitad izquierda) y con ToMV (mitad derecha). Notese la diferencia entre el síntoma generalizado de mosaico producido por TMV, las lesiones locales necróticas pequeñas de PMMV y las lesiones locales necróticas grandes de ToMV.

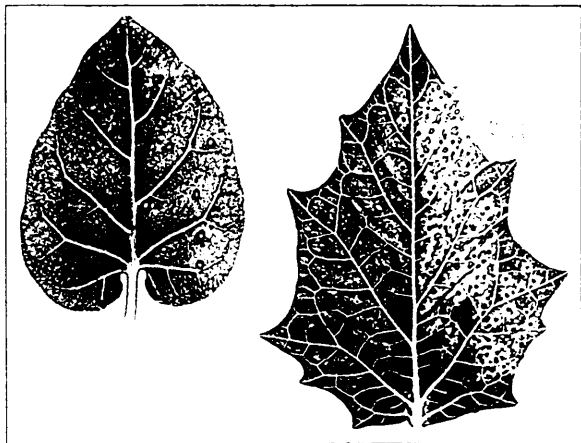
Figura 27 C.- De izquierda a derecha, hoja de Nicotiana glutinosa inoculada con PMMV (mitad izquierda) y con ToMV (mitad derecha); hoja de Datura stramonium inoculada con PMMV (mitad izquierda) y con TMV (mitad derecha).



A



B



C

III.4.3.- MICROSCOPIA ELECTRONICA

TINCION NEGATIVA

En tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2%, pH 7.0 (apdo II.3) del extracto crudo de las plantas infectadas, se observaron las características partículas cilíndricas y rígidas, de unos 300 nm de longitud y 18 nm de diámetro, del grupo de los Tobamovirus (Martelli y Russo, 1984) (Fig. 28A). Se encontraron partículas tanto en extracto crudo de hoja como de fruto, sueltas o asociadas "lado a lado".

CORTES ULTRAFINOS

En el estudio de cortes ultrafinos se pudieron observar en el citoplasma y vacuolas de las células infectadas, partículas virales rectas de tamaño similar a las observadas en tinción negativa (fig. 28, 29 y 30). En las células parenquimáticas del mesófilo de las plantas de campo infectadas, las partículas se presentaron sueltas o formando agregados cristalinos. En la figura 28B se muestra una visión general del mesófilo mostrando la distribución de las partículas en las células.

Los agregados cristalinos se presentaron en el interior de bolsas limitadas por una membrana. En secciones a mayores aumentos de éstos agregados se pudo observar la disposición de las partículas en "empalizada" por asociación "lado a lado" y "punta a punta", de ellas (fig. 29A y 29D). Ocasionalmente los agregados presentaron una disposición de las partículas en "molinete", asociadas en diferentes ángulos, produciendo imágenes como las que se muestran en las figuras 29B y 29C.

En las vacuolas, las partículas virales aparecieron siempre sueltas y distribuidas al azar (fig. 29). Asimismo en las vacuolas se encontraron frecuentes formaciones osmiofílicas (fig. 29), características de pimiento pues también se observaron en planta sana.

En las células parenquimáticas de los frutos se observaron igualmente abundantes partículas virales distribuidas al azar en el citoplasma y en las vacuolas, en las que los cuerpos osmiofílicos fueron más abundantes que en las células de hoja (fig. 30A y 30B). Los agregados cristalinos que también se observaron en el fruto, presentaron morfología semejante a los de hoja aunque de menor tamaño (fig. 30C).

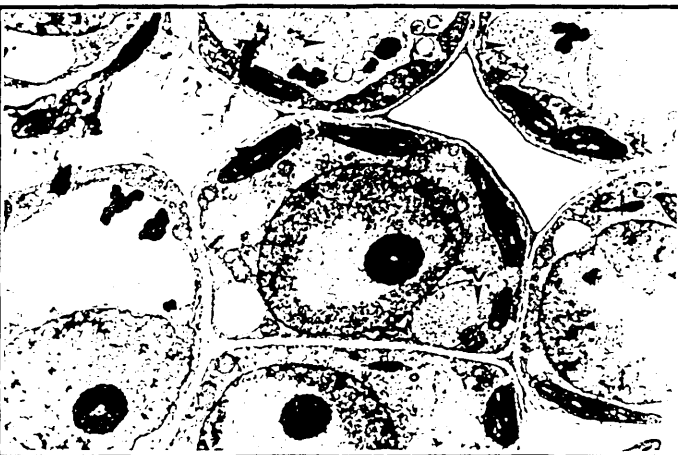
No se observaron partículas en cloroplastos, núcleo u otros orgánulos celulares, ni inclusiones o alteraciones celulares inducidas por la infección.

Figura 28 A. - X 32.000 Tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2% pH 7.0 de extracto crudo de Capsicum annuum L. var. "Gedeon" infectado por el virus del moteado suave del pimiento (PMMV).

Figura 28 B. - X 6.400 Aspecto general de células del mesófilo de pimiento, infectadas por PMMV.



A



B

Figura 29 A.- X 20.500 Célula parenquimática de hoja de pimiento (muestra de campo) con partículas virales (V) sueltas en el interior de la vacuola y, una sección de un agregado cristalino localizado en el citoplasma, con las partículas dispuestas "en empalizada" dentro de una bolsa (flecha).

Figura 29 B.- X 25.000 Agregados cristalinos en diferentes secciones localizados en el citoplasma y en los que las partículas aparecen dispuestas según ángulos diferentes o "en molinete" al lado de partículas sueltas (flecha).

Figura 29 C.- X 13.700 Agregado de partículas con diferente orientación en el que puede observarse los restos del citoplasma entre las partículas y partículas sueltas en la vacuola (flecha).

Figura 29 D.- X 16.200 Agregado "en empalizada" de gran tamaño, conservando restos celulares entre las partículas virales.



A

B

C

D

Figura 30 A.- X 6.400 Célula parenquimática del fruto de la muestra de campo infectada, mostrando partículas virales en el interior de la vacuola.

Figura 30 B.- X 25.100 Detalle de las partículas de PMMV en la vacuola acompañadas de cuerpos osmiofilicos.

Figura 30 C.- X 25.100 Agregado cristalino en el citoplasma de una célula del fruto.



A



B



C

III.1.4.- DISCUSION

En la última década se han publicado gran número de investigaciones sobre ciertos Tobamovirus capaces de infectar cultivares de pimiento resistentes a otros miembros del grupo. Dichas "estirpes de pimiento" de TMV, han sido propuestas por Wetter et al. (1984), como un nuevo miembro del grupo de los Tobamovirus, denominándose virus del moteado suave del pimiento (PMMV), ya que produce síntomas muy suaves en la planta, afectando sin embargo gravemente al fruto (Alonso et al., 1989).

La ausencia de infectividad en plantas de tomate y la capacidad para infectar cultivares de pimiento resistentes a Tobamovirus, junto a las lesiones locales necróticas de pequeño tamaño en algunas plantas de ensayo, son propiedades biológicas que permiten diferenciar al virus del moteado suave del pimiento (PMMV) de los otros Tobamovirus (Alonso et al., 1989).

A pesar del gran número de publicaciones sobre estas "estirpes de pimiento", las referencias sobre la ultraestructura de las células infectadas por PMMV se limitan al estudio de Wetter et al. (1987) realizado únicamente en hojas infectadas pero no en frutos.

En nuestro estudio, las formaciones cristalinas, resultaron ser similares en hoja y fruto, estando formadas por partículas agregadas "lado a lado y "punta a punta"; bien en forma de empalizada recta, como láminas entrecruzadas o, con una cierta inclinación dando lugar a los agregados que hemos llamado en "molinete". Estas formaciones cristalinas son similares a las de otros Tobamovirus (Martelli y Russo, 1984; Edwardson y Christie, 1986b) incluyendo las descritas por Wetter et al., (1984) para PMMV en células de hoja de pimiento. Sin embargo, que nosotros sepamos, éste es el primer trabajo sobre la ultraestructura de células de fruto infectadas por PMMV.

No se observaron las formaciones amorfas constituidas por retículo, ribosomas y membranas, denominadas "cuerpos X" y que son características de muchas estirpes de TMV "vulgare" (Martelli y Russo, 1977a; 1984).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de la sintomatología y gama de huéspedes del virus infectando un cultivar resistente a TMV, nos permite suponer que se trata del virus del moteado suave del pimiento (PMMV), aislado en España y caracterizado por García-Luque et al. (1990), a pesar de que, como es evidente en el presente caso, la microscopía electrónica no ha permitido caracterizar taxonómicamente al virus infectando pimiento más que a nivel de Grupo. De todos modos, los estudios por microscopía electrónica tienen la no despreciable ventaja de la rapidez en la detección de la infección, con lo que es posible adoptar medidas conducentes a evitar, tanto la propagación de la enfermedad como grandes pérdidas inmediatas (Garrett et al., 1985).

III.5.- EL VIRUS DE LAS MANCHAS BRONCEADAS DEL TOMATE (TSWV).
INFECTANDO PIMIENTOS (CAPSICUM ANNUUM L. var. GEDEON).

El virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV) es un patógeno cosmopolita que produce grandes pérdidas en cosechas, especialmente en regiones templadas y subtropicales. Aunque forma parte de los primeros virus de plantas descritos, por ahora sigue siendo el único representante de su grupo (Francki y Hatta, 1981).

La peculiar morfología de sus partículas: esféricas, de alrededor de 85 nm de diámetro y con envuelta externa lipoprotéica densa a los electrones, así como su localización en el interior de vesículas del retículo endoplásmico formando grupos, permiten su identificación directa sin confusión posible, mediante microscopía electrónica (Martelli y Russo, 1984).

TSWV se transmite persistentemente por larvas de "Thrips" (Q. Thysanoptera, Fam. Thripidae) del género Thrips tabaci Lindeman, en Europa y Frankliniella occidentalis Pergande, en el continente americano. Recientemente F. occidentalis ha sido introducido y descrito en Europa como vector más eficaz que T. tabaci (Gebre-Selassie et al., 1989).

TSWV no había sido descrito en España y como consecuencia de la presente tesis doctoral, se detectó por primera vez infectando pimientos en cultivos protegidos en las islas Canarias (Díaz Múgica et al., 1989; de Avila et al., 1989). Posteriormente en nuevas comunicaciones de nuestro laboratorio (Trad et al., 1990) y de otros laboratorios (Cuadrado et al., 1989; Jorda y Osca, 1989), ha sido detectada la presencia del virus en diferentes zonas de nuestro país, lo que puede representar un serio problema económico.

III.5.1.- ORIGEN Y SINTOMATOLOGIA DE LAS MUESTRAS.

En 1988 se recibieron en la Unidad de Fitopatología del CIB de Madrid, ejemplares de Capsicum annuum L. var. "Gedeón" procedentes de cultivos bajo invernadero situados en la C.A. Canaria. Las plantas mostraban fuerte mosaico en hojas así como necrosis caulinar y foliar, siendo la característica más notable del conjunto de la sintomatología la necrosis que afectaba al extremo apical del tallo y conjunto de hojas jóvenes. Los invernaderos estaban afectados por "thrips".

De la muestra se prepararon tinciones negativas de extracto crudo e inclusiones para ultramicrotoma (aptdo II.3), así como desecados en CaCl₂ para su conservación (aptdo II.2).

III.5.2.- GAMA DE HUESPEDES

Para determinar la gama de huéspedes, se inocularon mecánicamente con la muestra de campo (aptdo II.2) las siguientes especies y variedades:

Fam. Cucurbitáceae: Cucumis sativus L. var. "C. beit alpha CMR/MMR"; Cucurbita pepo L. var. "Belleza negra". Fam. Chenopodiaceae: Chenopodium quinoa Willd. Fam. Leguminosaceae: Phaseolus vulgaris L. cv. Fam. Solanaceae: Capsicum annuum L.: 17 variedades comerciales; Lycopersicon esculentum Mill. var. "Rutger"; Nicotiana benthamiana, Domin.; N. clevelandii, Gray.; N. tabacum, L. var. "Samsun", "Xanthi-nc"; Petunia hybrida, Vilm.

Las plantas crecieron y se mantuvieron en cámara de cultivo en las condiciones habituales (aptdo II.2).

Los síntomas en plantas de ensayo aparecieron entre los 10 y 16 días posteriores a la inoculación, siendo los más reiterativos las lesiones necróticas de gran extensión, de color bronceado oscuro, extendiéndose del ápice de la hoja al peciolo como necrosis generalizadas; lesiones necróticas de menor extensión y de color

bronceado brillante; bandeados de venas con aclaramiento del parénquima foliar; mosaicos; distorsiones foliares, y enanismo (fig. 31).

Los resultados se recogen en las tablas a continuación:

SINTOMAS PRODUCIDOS POR TSWV	
Planta de Ensayo	Síntomas
<u>C. sativus</u> L. "C beit alpha"	Neg.
<u>C. pepo</u> L. "Belleza negra"	Neg.
<u>Ch. quinoa</u> Willd.	Neg.
<u>Ph. vulgaris</u> L. cv.	Neg.
<u>C. annuum</u> L. *	LLN, M, BV, DF, N, E.
<u>L. esculentum</u> Mill. "Rutger"	Neg.
<u>N. benthamiana</u> , <u>Domin.</u>	LLN.
<u>N. clevelandii</u> , <u>Gray.</u>	LLN, M, N.
<u>N. tabacum</u> , L. "Samsun"	LLN, N.
<u>N. tabacum</u> , L. "Xanthi-nc"	LLN, M, N.
<u>P. hybrida</u> , <u>Vilm.</u>	LLN.

Abreviaturas: BV =bandeado de venas; DF =deformación foliar; E =enanismo; LLN =lesiones locales necróticas; M =mosaico; N =necrosis; Neg =ausencia de síntomas; * =variedades de pimiento que se presentan en cuadro aparte

La variedad "pimiento dulce italiano", inoculada con la muestra original y que exhibía mosaico en las hojas (fig. 31B), fué utilizada como inóculo vivo para infectar otras 16 variedades comerciales de pimientos y comprobar la susceptibilidad de éstos a TSWV. Todas las variedades ensayadas resultaron infectadas y mostraron síntomas en general severos (fig. 31A). Los resultados se resúmen en la tabla a continuación:

SINTOMAS EN VARIEDADES COMERCIALES DE PIMIENTOS INOCULADAS EXPERIMENTALMENTE CON TSWV.			
VARIEDAD	SINTOMAS	VARIEDAD	SINTOMAS
1. Lamuyo	LLN,M,N,E	10. Novi	LLN,N.
2. Gedeón	M,DF,N.	11. Ursus P-728	LLN,DF,N
3. Amador amarillo	M,DF.	12. Sunboy amarillo	M,BV,N,E
4. Shamrok	LLN,DF,N	13. Andalus P-753	DF,N.
5. Mélody	N,E.	14. Córdoba P-720	M,DF,N.
6. Rino	LLN,M,DF,N	15. Bruyo	N.
7. Yolo wonder	M.	16. Latino	N,E.
8. Blue star	M,N,E.	17. Dulce italiano	LLN,M,N.
9. Skipper	BV,DF,N.		

Abreviaturas: BV =bandedado de venas; DF =deformación foliar;
E =enanismo; LLN =lesiones locales necróticas;
M=Mosaico; N =necrosis.

Figura 31.- Diferentes síntomas producidos en plantas de ensayo inoculadas con el virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV). A: Deformación foliar en pimiento "Gedeón". B: Mosaico en pimiento "Dulce italiano". C: Lesiones necróticas características de TSWV en pimiento "Lamuyo". D y E: Lesiones necróticas en N. tabacum L. "Sansum".



A



B



C



D



E

III.5.3.- MICROSCOPIA ELECTRONICA

TINCION NEGATIVA

La detección e identificación de las partículas de TSWV mediante tinción negativa de extracto crudo no resultó convincente en todos los casos, puesto que al no poseer los viriones tamaño y forma uniforme, con frecuencia fueron difícilmente distinguibles de otros materiales celulares presentes, teniendo que recurrir para su confirmación a cortes ultrafinos. No obstante y de acuerdo con las diferentes tinciones ensayadas, el molibdato amónico (AM) (aptdo II.3) resultó ser la tinción más adecuada. En las figuras 32A y 32B se muestran tinciones con AM de extracto crudo, en la que se observan partículas virales esféricas, unas con envuelta y otras, sin ella. También aparecen envueltas vacías y rotas, sugiriendo la pérdida de la nucleocápsida interior.

CORTES ULTRAFINOS

Las células infectadas, tanto del huésped original como de los inoculados, mostraron las características partículas casi esféricas, grandes y densas a los electrones, agrupadas en el interior de sacos o vesículas ensanchadas, probablemente del retículo endoplásmico (fig. 32C y 32D). Las partículas, de unos 85 nm de diámetro, mostraron con frecuencia una parte central menos densa y una capa externa correspondiente a la envuelta lipoprotéica (fig. 32C). Las partículas virales se detectaron en todos los casos en el citoplasma, tanto en células parenquimáticas del mesófilo como en células acompañantes de los vasos. No se observaron partículas virales en el núcleo u otros orgánulos celulares. Las células infectadas mostraron abundantes lisosomas con inclusiones cristalinas en su interior así como mitocondrias conteniendo cuerpos osmiofílicos (fig. 34A y 34B) no encontrados en plantas sanas. Ocasionalmente, se observaron posibles partículas virales atravesando plasmodesmos (fig. 35A).

En el citoplasma de algunas células infectadas, correspondientes a estadios tempranos de la infección, aparecieron inclusiones amorfas viroplásmicas (Vp) formadas por un material denso de aspecto estriado, rodeados por un material difuso y entremezclados con vesículas, membranas, y abundantes ribosomas, como se muestra en la figura 33.

En las células con viroplasmos (fig.33), se observaron muy pocas partículas maduras. En los estadios avanzados de la infección, las células presentaron gran cantidad de partículas virales en el interior de sacos o vesículas (fig. 32C y 32D) y ausencia de viroplasmos.

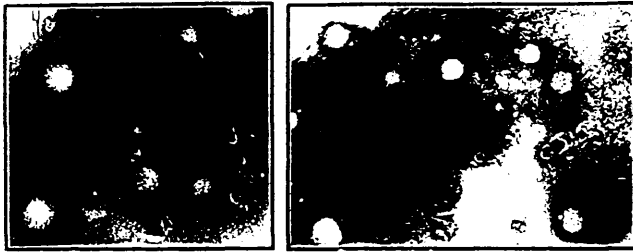
La infección en las zonas próximas a las necrosadas o en estadios destructivos, produjo desorganización celular afectando a los orgánulos celulares e incluso al nucleoplasma, conservándose sin embargo algunas partículas en el interior de las vesículas (fig. 35B).

Figura 32 A. - X 24.000. Tinción negativa de extracto crudo con 2% molibdato amónico, en la que se observan partículas de TSWV.

Figura 32 B. - X 40.000. Tinción negativa como la anterior. En la micrografía se observa un conjunto de posibles envueltas vacías de TSWV (flecha).

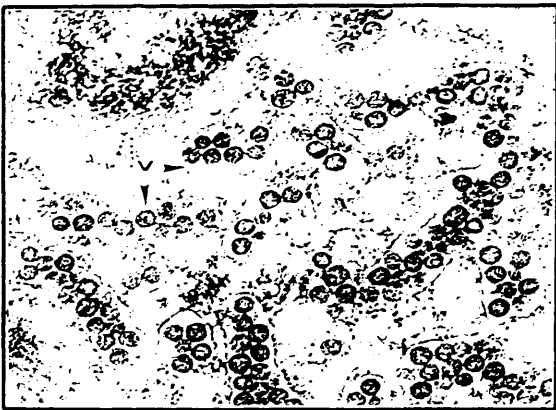
Figura 32 C. - X 74.000. Característicos grupos de partículas de TSWV en el interior de vesículas del retículo endoplásmico. La zona interna de la nucleocápsida de las partículas aparece como menos densa a los electrones.

Figura 32 D. - X 87.800. Fase tardía de la infección en la que se observan abundantes grupos de partículas maduras de TSWV en el interior de vesículas. La flecha señala una formación cristalina en el interior de un lisosoma.

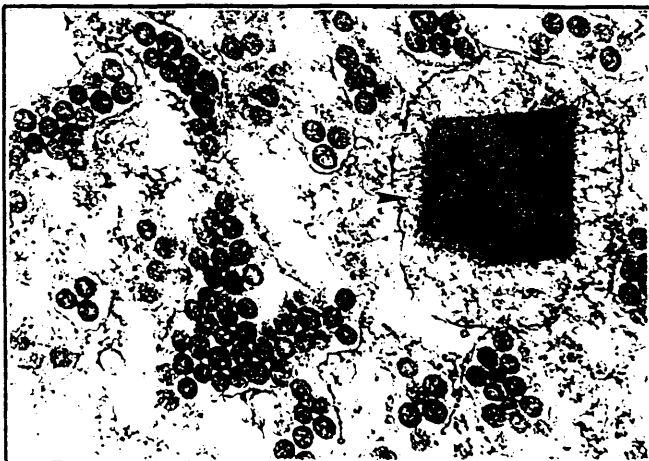


A

B



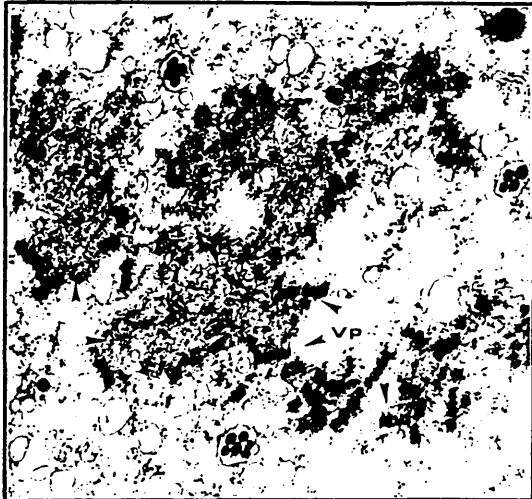
C



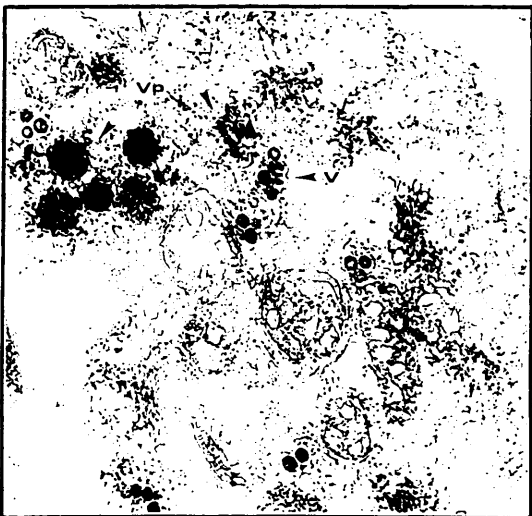
D

Figura 33 A. - X 31.900. Inclusión amorfa o Viroplasma perteneciente a un estadio temprano de la infección por TSWV, en el que es claramente visible el aspecto estriado de la formación densa (Vp, flecha). En las proximidades de la inclusión se observan unas pocas partículas maduras en el interior de vesículas.

Figura 33 B. - X 51.300. Partículas en diferente estado de maduración (V, flecha) de TSWV junto a formaciones amorfas (Vp, flecha).



A



B

Figura 34 A.- X 50.200. Partículas de TSWV en el interior de vesículas junto a lisosomas con formaciones cristalinas en su interior (flechas).

Figura 34 B.- X 29.900. Inclusiones osmiofilicas en el interior de mitocondrias (flechas) e inclusiones cristalinas en lisosomas, junto a partículas de TSWV.

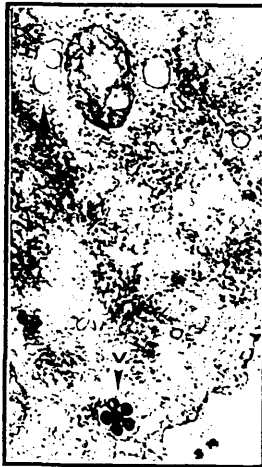
Figura 34 C.- X 48.000. Partículas maduras (V) y posibles envueltas vacías de TSWV sin nucleocápsida (flecha).



A



B



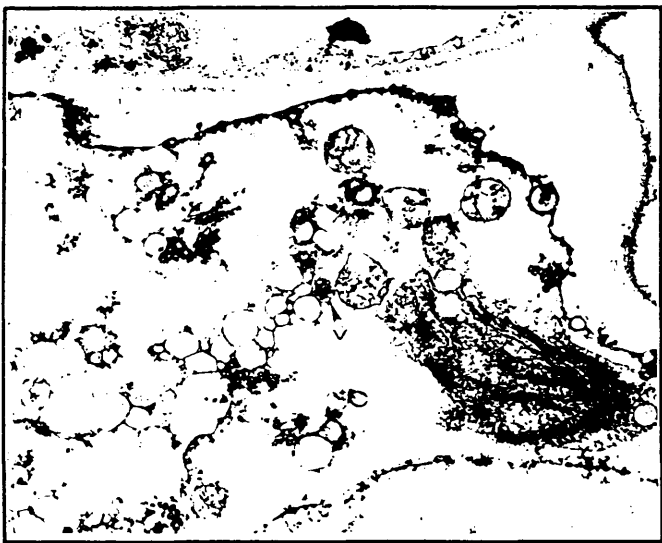
C

Figura 35 A. - X 22.500. Dos células contiguas infectadas por ISWV (V). En la pared celular se observan plasmodesmos de gran tamaño con posibles partículas en su interior (flecha).

Figura 35 B. - X 20.100. Sección de una célula próxima a una zona necrosada. En el citoplasma desorganizado, se conservan partículas de ISWV en el interior de vesículas (V). En la parte inferior derecha de la micrografía puede verse la membrana nuclear y el nucleoplasma desorganizado.



A



B

III.5.4.- DISCUSION

Uno de los aspectos más notables de TSWV es la amplia gama de huéspedes que es capaz de infectar, que alcanza 350 especies diferentes pertenecientes a 50 familias (Huguenot et al., 1990) y la versatilidad de los síntomas, dependientes tanto de las condiciones fisiológicas de la planta como sobre todo, de las diferentes cepas descritas (Ie, 1970). Esta situación hace que sea necesario recurrir a las técnicas de microscopía electrónica para una rápida e inconfundible identificación del virus. Las grandes partículas esféricas características de TSWV, de unos 85 nm de diámetro, provistas de una envuelta lipoprotéica externa y su localización citoplásmica formando grupos en el interior de vesículas o del retículo endoplásmico, son criterio suficiente para la identificación del virus (Martelli y Russo, 1984).

En tinción negativa, las partículas son inestables en la mayor parte de los casos. Nuestros resultados confirman que la solución acuosa de molibdato amónico al 2% pH 5,5 mantiene las estructuras, si bien la tinción no proporciona imágenes de calidad (Francki y Hatta, 1981; Milne, 1984). Cuando las partículas se separan de la célula y extienden en la rejilla, tienden a deformarse y aplastarse, produciendo imágenes con partículas de diferentes tamaños y formas, lo que hace necesario recurrir a cortes ultrafinos de tejido para su confirmación (Milne, 1970; Mohamed et al., 1973; Francki y Hatta, 1981).

Nuestros resultados sobre la ultraestructura de células infectadas de pimiento relacionan la presencia de inclusiones amorfas viroplásmicas formadas por masas de un material de aspecto estriado, entremezclado con vesículas, membranas y ribosomas, con los estadios tempranos de la infección, como ha sido también descrito por Francki y Grivell, (1970) e Ie, (1971) en otros huéspedes. La presencia de sólo partículas maduras aisladas en vesículas en los estadios tardíos, sugieren nuevamente la implicación de las inclusiones amorfas en los procesos de la

multiplicación viral.

La naturaleza nucleoprotéica detectada en el material condensado de las formaciones viroplásmicas (Verkleij y Peters,1983) y la abundancia de membranas del retículo en ellas (Milne,1970), permite suponer que las nucleocápsidas virales formadas en los viroplasmias tomarían la envuelta lipoprotéica de las membranas celulares convirtiéndose en viriones maduros. Esta hipótesis permitiría explicar también la presencia de envueltas virales vacías, sin "core" o nucleocápsida interior asociadas a los viroplasmias. En un estadio posterior, las partículas maduras se agruparían en el interior de vesículas o dentro del retículo.

El material condensado, asociado o no con las inclusiones amorfas, ha sido interpretado también como agregados de formas defectivas virales (Ie,1982), caracterizadas por delecciones a nivel del ARN-2 incapaces de sintetizar la envuelta lipoprotéica (Verkleij y Peters,1983; Trad et al.,1990). La exacta naturaleza y función de las características formaciones viroplásmicas, no parece bien dilucidada hasta el presente, aunque son compatibles su función de síntesis de partículas virales maduras con la presencia de formas defectivas virales.

Asociadas a la infección por TSWV en pimiento, hemos encontrado importantes alteraciones celulares como cristales de gran tamaño en el interior de lisosomas, cuerpos osmiofílicos en mitocondrias y degeneración celular en zonas necrosadas.No suele ser frecuente la presencia de cuerpos osmiofílicos en mitocondrias (Martelli y Russo,1977a) y por lo que sabemos, no han sido descritas previamente este tipo de alteraciones citológicas en las infecciones de TSWV.

Igualmente hemos observado posibles partículas virales completas en el interior de los plasmodesmos, lo que significaría que, al igual que en el caso de los Rhabdovirus, éstos serían modificados por el virus para permitir su movimiento "célula a célula".

El Virus de las Manchas Bronceadas del Tomate (TSWV) ha sido citado en todo el mundo causando graves pérdidas económicas en cultivos hortícolas y ornamentales (Cho et al., 1989). En los últimos años ha pasado a constituir un grave problema en los cultivos bajo invernadero en el continente europeo, detectándose recientemente en España infectando pimientos (Díaz Múgica et al., 1989; Cuadrado et al., 1989; Trad et al., 1990), y tomates (Jorda y Osca, 1989).

La rápida expansión del virus en Europa parece ser debida a la reciente introducción del vector Frankliniella occidentalis Pergande, que es difícilmente controlable además de ser un vector más eficaz que el europeo Thrips tabaci Lindeman, (Gebre-Selassie et al., 1989).

Nuestro estudio pone de manifiesto cómo la utilización de la microscopía electrónica podría ser un instrumento de gran ayuda en la detección de las enfermedades producidas por este virus.

III.6.- EL VIRUS DEL MOSAICO DE LA CALABAZA (SqMV) INFECTANDO CUCURBITACEAS.

Los cultivos de Cucurbitáceas tienen gran importancia económica en nuestro país y en todo el área mediterránea estando sujetos a infecciones naturales por varios grupos de virus (Freitag, 1956). El virus del mosaico de la calabaza (SqMV), es un patógeno ampliamente extendido en el Hemisferio occidental donde produce graves pérdidas en Cucurbitáceas (Nameth et al., 1986), siendo el primer virus descrito que es transmitido por un Coccinelido: Epilachna chrysomelina F. (Cohen y Nitzany, 1963). Además, algunas estirpes del virus se transmiten por semillas en un porcentaje relativamente alto (Nelson y Knuhtsen, 1973a).

Su presencia en el Hemisferio oriental fué detectada en Israel infectando Cucurbitáceas silvestres (Cohen y Nitzany, 1963) teniendo el virus una rápida expansión en los últimos años en cultivos protegidos de Cucurbitáceas en el área mediterránea (Lockhart et al., 1982; Diaz-Múgica y Diaz-Ruiz, 1987; Hussein y Sharaf, 1988; Avgelis y Katis, 1989) que no puede justificarse por la presencia de los vectores, fácilmente controlables con plaguicidas, sino que hay que pensar en que la enfermedad ha sido introducida a través de la importación de semillas infectadas (Diaz Múgica y Diaz Ruiz, 1987; Avgelis y Katis, 1989). En España, el virus fué detectado por primera vez por nosotros (Diaz-Múgica y Diaz-Ruiz, 1987) y por lo que sabemos, también es la primera vez que el virus es caracterizado en Europa, puesto que una descripción anterior fué hecha en base a la sintomatología en el contexto de una infección mixta (Ragozzino, 1973).

SqMV pertenece al grupo de los Comovirus, virus multiparticulados que presentan partículas isodiamétricas, de 30 nm de diámetro, estables, que sedimentan como tres componentes (Top, Middle y Bottom) y que poseen dos polipéptidos de cubierta de 22Kd

y 42Kd (Van Kammen,1967) en proporciones equimoleculares (Geelen et al., 1972; Goldbach y Van Kammen,1985) formando una estructura de tipo icosaédrico constituida por 60 copias de cada proteína (Crowther et al., 1974). Su genoma está formado por dos moléculas de ARN monocatenario lineal y de sentido positivo con un peso molecular en millones de daltons de 2,4 el ARN-B y de 1,4 el ARN-M (Matthews,1979), que se encapsidan separadamente en las dos partículas más densas, estando el componente Top formado por sólo proteína de cubierta (Goldbach y Van Kammen,1985).

En base a las relaciones serológicas (Nelson et al.,1973b) se han diferenciado dos grupos serológicos para SqMV: las cepas pertenecientes al serotipo I, parecen estar mejor adaptadas epidemiológicamente a Cucurbitáceas, son más agresivas y se transmiten en todos los casos por semillas. Las pertenecientes al serotipo II, en general no infectan sandías, no se transmiten por semillas y producen síntomas leves en melones y calabacines. Esta característica, de gran interés epidemiológico, junto al hecho de ser un virus nuevo en España, ha sido la razón para abordar la caracterización de diferentes aislados españoles y su comparación con otros aislados extranjeros, como se presenta a continuación.

III.6.1.- ORIGEN Y SINTOMATOLOGIA DE LAS MUESTRAS

A) AISLADOS ESPAÑOLES DE SqMV

En 1983 se recogieron en zonas de cultivos protegidos de la provincia de Almería, ejemplares de Cucumis melo L. var. "Goloso" con síntomas de mosaico (fig. 36). A la muestra se le llamó muestra C1 (C =procedente de Cucurbitáceas).

En 1986 se recibieron muestras de campo de Cucumis melo L. var. "Cantaloupe", remitidas por una casa comercial con cultivos protegidos en la provincia de Málaga, con síntomas de mosaico y bandeado de venas. A la muestra se denominó C3.

En ambos casos, se prepararon tinciones negativas de extracto crudo e inclusiones para ultramicrotomía (aptdo II.3) así como desecados en CaCl₂ (aptdo II.2).

B) OTROS AISLADOS DE SqMV

Con el fin de poder realizar pruebas comparativas en cuanto a la caracterización de los aislados españoles C1 y C3, el Dr. MAAT, D.Z. Wagenigen (Holanda) nos proporcionó amablemente desecados de los siguientes aislados de SqMV:

-aislado SqMV-Netherland (Serotipo I) cedido por el Dr. MAAT, D.Z. (Holanda).

-aislado SqMV-Arkansas (Serotipo I) cedido por el Dr. SCOTT, H.A. (USA).

-aislado SqMV-Arizona (Serotipo II) cedido por el Dr. NELSON, M.N. (USA).

III.6.2.- GAMA DE HUESPEDES

Para determinar la gama de huéspedes de los virus que infectaban melón "Goloso" (muestra C1), y melón "Cantaloupe" (muestra C3) se inocularon mecánicamente (apto II.2) las siguientes especies y variedades:

Fam. Compositae: Zinnia elegans Jacq. Fam. Cucurbitaceae: Citrullus vulgaris Schröd. var. "Large green", "Sugar baby"; Cucumis melo L. var. "Bola de oro", "Futura", "Goloso", Japonés", "Melón amarillo", "Piñonet", "Tendral"; Cucumis sativus L. var. "C. beit alpha F1 CMR/MMR", "Klondyke"; Cucurbita maxima Duch. var. "Buen gusto", "Cabello de angel", "De horno"; Cucurbita pepo L. var. "Black beauty", "Caserta bush", "Very early algerian", "White half long". Fam. Chenopodiaceae: Chenopodium amaranticolor Coste et Rein.; Chenopodium quinoa Willd. Fam. Leguminosae: Pisum sativum L.; Vigna sinensis (Torner) Savi. var. "Blackeye". Fam. Solanaceae: Capsicum annuum L. var. "Bellamy", "Gedeón", "Yolowonder"; Lycopersicon esculentum Mill. var. "Rutger"; Nicotiana benthamiana Domin.; N. clevelandii Gray.; N. glutinosa L.; N. sylvestris Speng.; N. tabacum L. var. "Samsun", "White burley", "Xanthyn-c".

Las plantas presentaron los síntomas que exponemos a continuación:

PLANTAS DE ENSAYO	S I N T O M A S	
	Aislados: C1	C3
Fam. COMPOSITAE		
<u>Zinnia elegans Jacq.</u>	Neg.	Neg.
Fam. CUCURBITACEAE		
<u>Citrullus vulgaris Schrad.</u>		
var. "Large green"	Neg.	Neg.
var. "Sugar baby"	Neg.	Neg.
<u>Cucumis melo L.</u>		
var. "Bola de oro"	M	M
var. "Futura"	M	M
var. "Goloso"	RS	M
var. "Japonés"	Neg.	Neg.
var. "Melón amarillo"	RS, BV	M, BV
var. "Piñonet"	M	M
var. "Tendral"	M, BV	M, BV
<u>Cucumis sativus L.</u>		
var. "C.beit alpha F1 CMR/MMR"	Neg.	Neg.
var. "Klondyke"	Neg.	Neg.
<u>Cucurbita máxima Duch.</u>		
var. "Buen gusto"	M	M
var. "De horno"	M	BV
<u>Cucúrbita pepo L.</u>		
var. "Black beauty"	RS, M	BV
var. "Caserta bush"	RS	M
var. "Very early algerian"	M	M
var. "White half long"	M	M

PLANTAS DE ENSAYO	S I N T O M A S	
	Aislados: C1	C3
Fam. CHENOPODIACEAE		
<u>Ch. amaranticolor</u> Coste et Revn.	Neg.	Neg.
<u>Ch. quinoa</u> Willd.	M	M
Fam. LEGUMINOSAE		
<u>Pisum sativum</u> L.	Neg.	Neg.
<u>Vigna sinensis</u> Torner "Blackeye"	Neg.	Neg.
Fam. SOLANACEAE		
<u>Capsicum annuum</u> L.		
var. "Bellamy"	Neg.	Neg.
var. "Gedeón"	Neg.	Neg.
var. "Yelowonder"	Neg.	Neg.
<u>Lycopersicon esculentum</u> Mill.		
var. "Rutger"	Neg.	Neg.
<u>Nicotiana benthamiana</u> Domin.	Neg.	Neg.
<u>Nicotiana clevelandii</u> Gray.	Neg.	Neg.
<u>Nicotiana glutinosa</u> L.	Neg.	Neg.
<u>Nicotiana sylvestris</u> Speg.	Neg.	Neg.
<u>Nicotiana tabacum</u> L.		
var. "Samsun"	Neg.	Neg.
var. "White burley"	Neg.	Neg.
var. "Xanthv-nc"	Neg.	Neg.

Abreviaturas: BV =Bandeado de venas (Vein banding; M =Mosaico;
RS =Manchas en anillos (Ring spot); Neg = sin síntomas.

Del análisis de la tabla anterior se deduce que:

-de las especies inoculadas sólo presentaron síntomas de infección las variedades ensayadas de Cucumis melo L., Cucurbita pepo L., Cucurbita máxima Duch., y Chenopodium quinoa Willd.

-los síntomas más frecuentes fueron mosaicos y bandeados de venas con aclaramiento del parénquima foliar (fig.36 y 37B) que aparecieron en la mayor parte de los casos entre 12 y 15 días después de la inoculación, seguidos de deformación foliar y en ocasiones muerte de la planta. Ninguna planta infectada llegó a producir flores.

Los melones y calabacines inoculados con la muestra C1, presentaron ocasionalmente y sólo en las primeras hojas con infección, el síntoma de manchas en anillos (fig. 37A). Las hojas presentando el síntoma en anillos fueron utilizadas como inóculo vivo con el fin de reproducir el síntoma, resultando que las plantas inoculadas mostraron indistintamente síntomas en mosaico, bandeado de venas o anillos.

-no presentaron síntomas de infección el resto de especies y variedades ensayadas. Esta gama de huéspedes y sintomatología permitió tentativamente pensar en el virus del mosaico de la calabaza (SqMV) como causante de la infección en las muestras C1 y C3.

Para comparar la sintomatología y seleccionar las plantas de ensayo más adecuadas para la propagación y posterior purificación de los aislados C1, C3, SqMV-Netherland (N), SqMV-Arkansas (AK), y SqMV-Arizona (AZ), se inocularon las siguientes variedades de plantas cuyos resultados se recogen en la tabla a continuación:

PLANTAS de ENSAYO	A I S L A D O S DE SqMV:				
	C1	C3	Nether	Ak	Az
Calabacín					
"Belleza negra"	RS,M,BV	M,BV	Neg	M,BV	M,BV
Melón					
"Amarillo"	RS,BV	M,BV	Neg	M	M,BV
Melón					
"Tendral"	M,BV	M,BV	Neg	M	M,BV
<u>Ch. quinoa</u>	M	M	M	M	M

Abreviaturas: BV =Bandeado de venas; M =Mosaico; Neg. =ausencia de síntomas; RS = Manchas en anillos (Ring Spot).

El aislado SqMV-Netherland no fue infectivo cuando se inoculó en Cucurbitáceas a partir del desecado, necesitando Ch. quinoa como huésped intermedio. Cuando las plantas de Ch. quinoa infectadas se utilizaron como inóculo vivo, se produjeron síntomas de mosaico suave en melones y calabacines.

Las plantas seleccionadas para la propagación y purificación del virus fueron melón "Amarillo" y calabacín "Belleza negra" por su mejor adaptación a las condiciones de la cámara de cultivo.

En todos los casos las plantas germinaron y crecieron en cámaras de cultivo en las condiciones habituales (aptdo II.2).

Figura 36.- Muestra de campo de Cucumis melo L. var. "Goloso", con síntoma de mosaico en hojas.

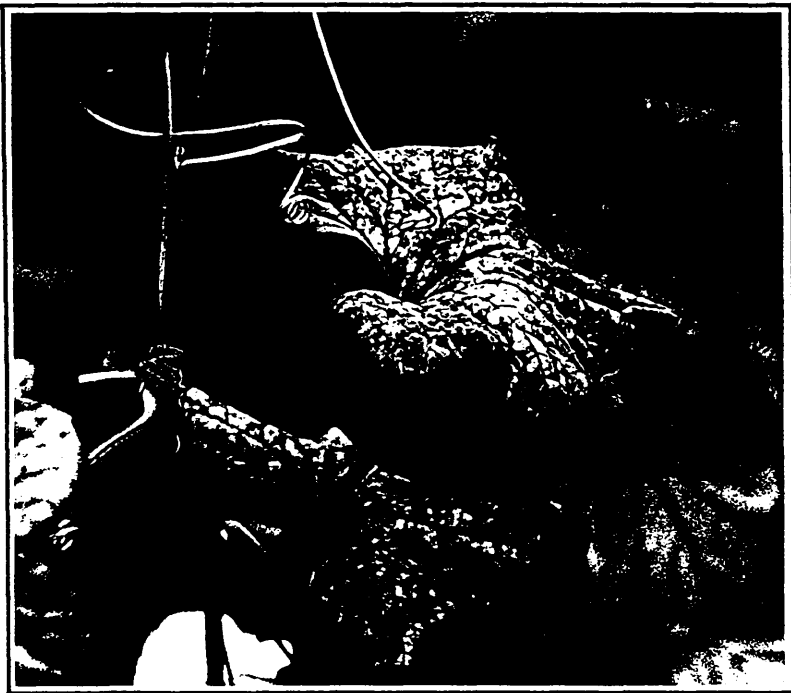


Figura 37 A.- Cucurbita pepo L. var. "Caserta bush" inoculada con el aislado C1, mostrando el característico síntoma en anillos.

Figura 37 B.- Cucurbita pepo L. var. "Belleza negra" inoculada con el aislado C3. La planta muestra bandeo de venas con aclaramiento del parénquima.



A



B

III.6.3.- MICROSCOPIA ELECTRONICA.

TINCION NEGATIVA

El exámen de las tinciones negativas (aptdo II.3) de las muestras C1 y C3 reveló la presencia de partículas isodiamétricas de unos 30 nm de diámetro, sin que se observasen otras partículas virales en las muestras de campo. En las plantas infectadas experimentalmente y que presentaron síntomas, se detectaron en todos los casos las partículas arriba descritas que resultaron ser estables frente a la tinción con el ácido fosfotúngstico a pH 7 (PTA) y a otros colorantes electrónicos (aptdo II.3).

En las preparaciones de los virus purificados teñidos con PTA, se detectaron dos tipos de partículas: unas llenas y otras, menos abundantes, penetradas por la tinción y con aspecto de partículas vacías. No se observaron diferencias morfológicas entre los diferentes aislados de SqMV y las muestras C1 y C3. En ambos casos, las partículas presentaron un claro perfil hexagonal, más acentuado en las penetradas por la tinción (fig.45). Estas características, perfil hexagonal y presencia de partículas vacías, son típicas de los virus pertenecientes al grupo de los Comovirus. La proporción de partículas vacías aumentó notablemente en estados avanzados de la infección.

En tinción con formiato de uranilo (UF), todas las partículas fueron penetradas por la tinción (fig.45D), lo que hace desaconsejable esta tinción para estudios de identificación, por inducir a confusión con otros tipos de virus isodiamétricos de plantas.

Cuando la concentración de virus fué elevada, las partículas formaron agregados bidimensionales (monocapas) y tridimensionales (cristales), que se analizan en el apartado III.6.6.

CORTES ULTRAFINOS

Los estudios ultraestructurales de las células infectadas por las muestras de campo C1 (melón "Goloso"), C3 (melón "Cantaloupe"), de plantas inoculadas experimentalmente con los aislados españoles C1 y C3 y con los otros aislados de SqMV evidenciaron:

-la localización citoplásmica del virus, cuyas partículas fueron difícilmente distinguibles de los ribosomas.

-el acúmulo de partículas en las vacuolas donde, debido a su agregación, fueron fácilmente identificables (fig. 42) especialmente cuando ocasionalmente dieron lugar a agregados cristalinos.

-la presencia de estructuras citopáticas membranosas (ECM) formadas por un conjunto de vesículas (figs. 38B y 39C1) junto a numerosas partículas virales y ribosomas.

-la presencia de formaciones viroplásmicas (FV) conteniendo estructuras tubulares de organización helicoidal (Díaz-Múgica y Díaz-Ruiz, 1988) (fig. 38A). Estas formaciones viroplásmicas no han sido descritas previamente para ningún Comovirus, y son muy diferentes de los viroplasmas asociados con otros virus de plantas.

No se observaron alteraciones ultraestructurales en mitocondrias, cloroplastos o núcleo (fig. 38).

Las estructuras citopáticas membranosas y las formaciones viroplásmicas asociadas con estructuras tubulares, se observaron tanto con los aislados pertenecientes al Serotipo I como al Serotipo II. Igualmente se observaron en plantas con síntoma en anillos, mosaicos o bandeado de venas. Generalmente se presentaron asociadas entre sí y en las proximidades del núcleo (fig. 38). Como se ha citado antes, en el interior de la vacuola se observaron acúmulos de partículas (fig. 42), llegando a formar con frecuencia

agregados cristalinos de gran tamaño (fig. 42B y 42C). Los agregados cristalinos fueron más abundantes en los estados avanzados de la infección.

El interés de las formaciones viroplásmicas nos decidió a hacer un estudio más detallado al microscopio electrónico de sus características ultraestructurales en plantas inoculadas experimentalmente para tratar de dilucidar su significación funcional. En todos los casos, las formaciones viroplásmicas parecieron estar constituidas por un material denso a los electrones con ribosomas y partículas virales difícilmente diferenciables entre sí. Dispersas en la formación viroplásmica siempre se observaron las estructuras tubulares de organización helicoidal (fig.40B).

En secciones transversales, las estructuras tubulares mostraron un perfil poligonal como formado por subunidades bien diferenciadas (fig.41). El diámetro externo de estas formaciones tubulares estuvo comprendido entre 37 y 40 nm y el interno, entre 20 y 24 nm. En sección longitudinal, las estructuras tubulares presentaron una evidente organización helicoidal (fig. 41) claramente diferente en tamaño y estructura de los microtúbulos celulares.

III.6.4.- PURIFICACION DE LOS AISLADOS DE SqMV.

Para la completa identificación de los virus que infectaban las muestras C1 y C3, y posterior comparación serológica con los aislados de SqMV Netherland (serotipo I), Arkansas (serotipo I) y Arizona (serotipo II), se procedió a la purificación de todos ellos.

Los virus se propagaron en "melón amarillo" y "calabacín belleza negra" y el método de purificación consistió en una pequeña modificación del descrito por Klootwijk et al. (1977)(aptdo II.4). Durante el proceso, el tratamiento con polietilén glicol/ cloruro sódico y posterior resuspensión del precipitado resultaron críticos para obtener buenos rendimientos. Las concentraciones en solución de los virus purificados se calcularon a partir de su espectro de absorción (aptdo II.4). Un espectro de absorción típico para los purificados de SqMV, entre 200 y 300nm se muestra en la figura 43.

Las relaciones de absorbancias A260/A280 estuvieron entre 1,6 y 1,8. Los rendimientos promedio en mg de virus por Kg de hoja, obtenidos utilizando "melón amarillo" como huésped fueron:

SqMV-Netherland (Ser.I).....	44,2 mg/Kg
SqMV-Arizona(Ser.II).....	139,5 mg/Kg
Aislado-C1	238,7 mg/Kg
Aislado-C3	283,2 mg/Kg
SqMV-Arkansas (Ser.I).....	452,9 mg/Kg

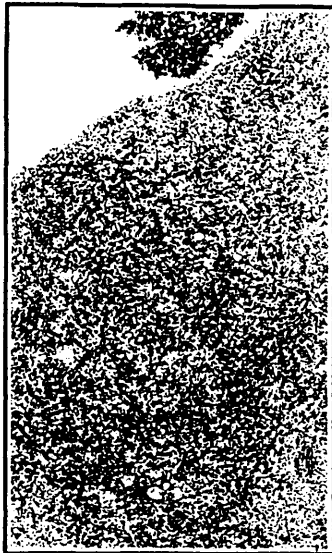
Los mejores rendimientos se obtuvieron a los 16 días después de la inoculación, descendiendo notablemente cuando se purificó a los 25 o más días. El rendimiento promedio en las purificaciones del aislado SqMV-Netherland a partir de Ch. quinoa Willd. como huésped, fué de 28 mg/Kg. Los virus mantuvieron su capacidad infectiva varios meses después de la purificación y fueron estables mantenidos a pH 7.0 y 4°C. Las observaciones por microscopía electrónica de tinciones negativas con ácido fosfotúngstico (PTA) al 2%, pH 7.0 de los purificados (aptdo II.3), (fig. 45), mostraron la ausencia de contaminantes.

Figura 38.- X 7.300 Visión general de dos células del mesófilo de Cucumis melo L. infectadas por el virus del mosaico de la calabaza (SqMV). Los recuadros A, B y C, con las formaciones citopáticas características de la infección, se muestran ampliados en las siguientes micrografías.

Figura 38 A.- X 25.000 Detalle de la figura 38 mostrando una formación viroplásmica con estructuras tubulares. En la vacuola pueden observarse agregados de partículas virales.

Figura 38 B.- X 31.000 Detalle de la figura 38 mostrando una estructura citopática membranosa característica de Comovirus, al lado del núcleo celular y asociada a la formación viroplásmica con estructuras tubulares.

Figura 38 C.- X 25.000 Detalle de la figura 38 mostrando la asociación entre las estructuras citopáticas membranosas y las formaciones viroplásmicas con túbulos. En la vacuola se observan acúmulos de partículas virales.



A



B



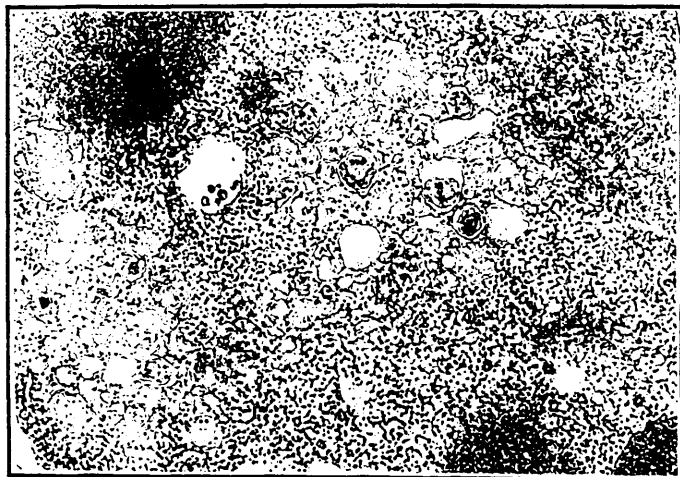
C

Figura 39 B1.- X 24.600 Detalle ampliado de la figura 38B mostrando las estructuras citopáticas membranosas y los viroplasmias característicos, en el que puede observarse secciones transversales y longitudinales de las estructuras tubulares.

Figura 39 C1.- X 50.100 Detalle ampliado de la figura 38C mostrando la estructura citopática membranosas. Obsérvese la abundancia de partículas virales y ribosomas junto a las formaciones membranosas.



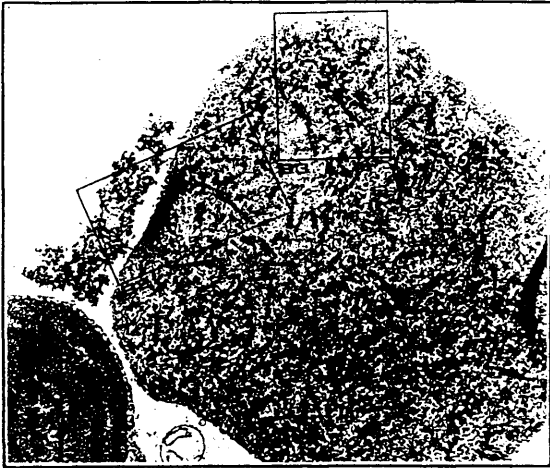
B-1



C-1

Figura 40 B1.- X 20.500 Aspecto general de una formación vioplásmica. Nótese la abundancia de formaciones tubulares y la presencia de agregados virales en la vacuola.

Figura 40 B2 y 40 B3.- X 41.000 y X 34.800 Detalle ampliado de la figura anterior mostrando diferentes secciones de las estructuras tubulares.



B1



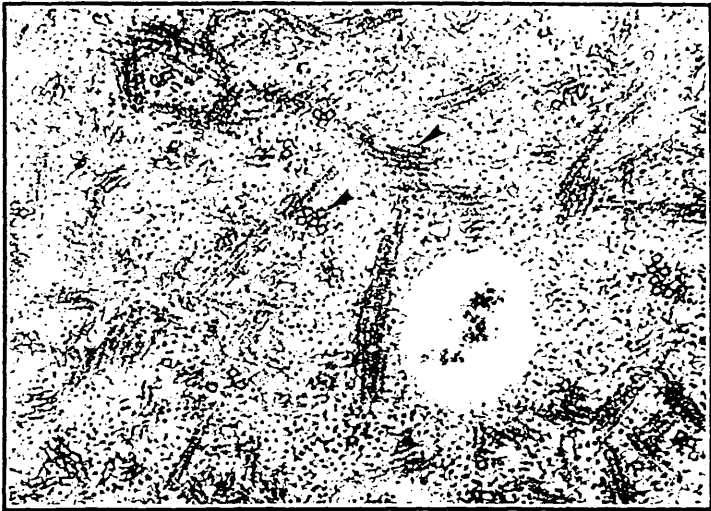
B2



B3

Figura 41.- X 62.700 Detalle a mayor aumento de las formaciones viroplásmicas. Las secciones transversales de las estructuras tubulares muestran la disposición poligonal de las subunidades que las constituyen. En las secciones longitudinales, se aprecia la organización helicoidal de los túbulos.

Obsérvese la gran abundancia de partículas virales y ribosomas asociados a la formación viroplásmica.



A

Figura 42 A. - X 41.000 Aspecto general de una célula infectada por SqMV presentando un agregado cristalino de partículas virales, en la vacuola.

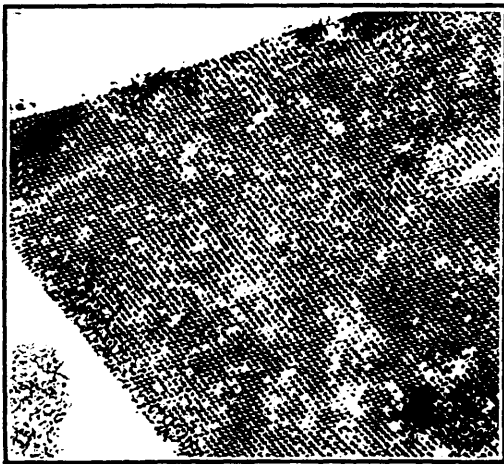
Figura 42 B. y 42C. - X 79.800 y X 63.800. Detalle a mayor aumento de dos agregados cristalinos.



A



B



C

C₁ -190-

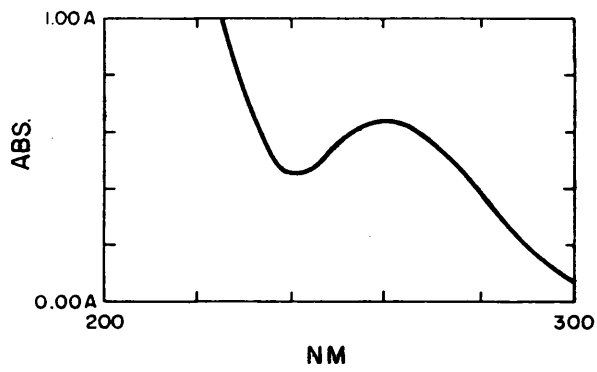


Fig.43 Espectro de absorción típico, entre 200 y 300 nm de una solución de SqMV purificado

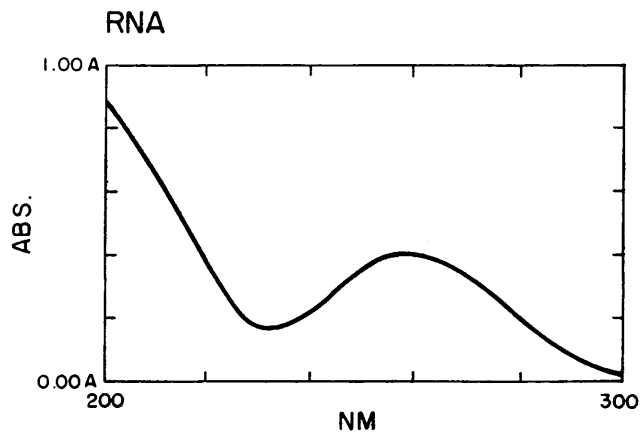


Fig.43 Espectro de absorción, entre 200 y 300 nm de una solución de RNAs de SqMV purificado

III.6.5.- ANALISIS ELECTROFORETICO DE PROTEINAS Y ACIDOS
NUCLEICOS DE LOS AISLADOS DE SqMV.

El análisis electroforético de las proteínas de la cubierta viral obtenidas directamente por disociación de partículas recién purificadas y realizado en geles de poliacrilamida al 12,5% y al 15%, conteniendo SDS (aptdo II.6), mostró en los aislados C1 y C3, la presencia de dos polipéptidos cuyos pesos moleculares, determinados por comparación con proteínas de peso molecular conocido (aptdo II.6), fueron de 42 y 24 Kd (fig. 44A). La movilidad electroforética de las proteínas de la cubierta viral, fué la misma para todos los aislados de SqMV, así como la proporción relativa de ambos polipéptidos (fig. 44B). No se observaron diferencias en relación con la concentración de poliacrilamida de los geles (fig. 44C). Ambas proteínas parecieron presentarse en cantidades equimoleculares, no observando ninguna diferencia significativa en el patrón de bandas de los aislados pertenecientes a los serotipos I y II.

Para el análisis de los ácidos nucleicos, éstos se extrajeron según el método de Van Kammen (1967), (aptdo II.5). Las concentraciones se determinaron espectrofotométricamente (aptdo II.5) y dieron rendimientos del 15 al 20% de mg de ARN por mg de virus. En la figura 43 se muestra un espectro de absorción típico para los ARNs de SqMV. El análisis electroforético de los ARNs nativos en geles de poliacrilamida al 2% - agarosa al 1% (aptdo II.6.2) y de ARNs previamente desnaturalizados (aptdo. II.6.3) en geles de agarosa al 1%, mostraron la presencia de dos bandas de pesos moleculares aproximados, en millones de daltons de 2,4 para el ARN-B y 1,6 para el ARN-M, obtenidos por comparación con los ARNs del virus del mosaico del pepino (CMV) y del virus de la sharka (PPV) (aptdo II.6), (fig. 44D).

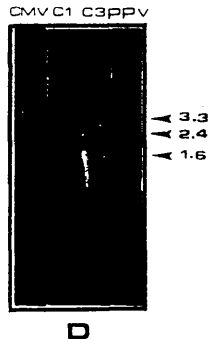
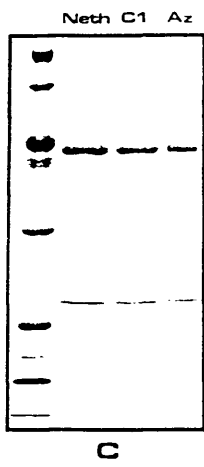
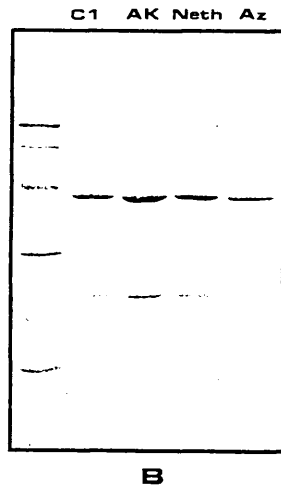
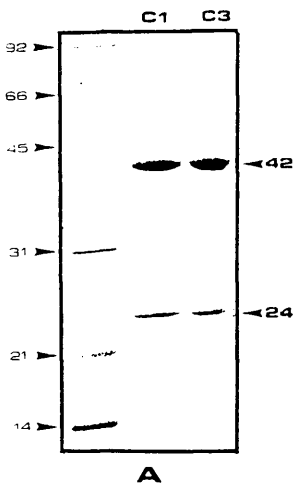
Estas características, tamaño y número de proteínas de cubierta y de ARNs, derivadas de los análisis electroforéticos, junto a la determinación de la sintomatología y gama de huéspedes, permitieron confirmar que las muestras C1 y C3 estaban infectadas por SqMV.

Figura 44 A.- Análisis electroforético de las proteínas de cubierta de los aislados C1 y C3, en geles de poliacrilamida al 12,5% conteniendo SDS.

Figura 44 B.- Estudio comparativo de la movilidad electroforética de las proteínas de cubierta de los aislados C1; SqMV-Arkansas, serotipo I (AK); SqMV-Netherland, serotipo I (Nether); y SqMV-Arizona, serotipo II (AZ).

Figura 44 C.- Estudio electroforético comparativo de las proteínas de la cubierta de los aislados C1, con Nethe.(serotipo I) y AZ (serotipo II), en geles de poliacrilamida al 15%, conteniendo SDS.

Figura 44 D.- Análisis electroforético en geles de agarosa al 1% de los ARNs de los aislados C1 y C3, previamente desnaturalizados con glioxal.



III.6.6.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS VIRIONES PURIFICADOS DE SqMV.

Al ser SqMV un virus que se agrega formando estructuras cristalinas en las vacuolas de las células infectadas (aptdo III.6.3), y cuyas partículas no han sido estudiadas ultraestructuralmente a diferencia del virus tipo del grupo, nos interesó también analizar la estructura de las partículas virales y su comparación con la descrita para CpMV (Crowther et al., 1974), así como su capacidad de agregación "in vitro" a partir del virus purificado.

El examen al microscopio electrónico de los virus purificados de los diferentes aislados de SqMV, reveló que entre las diferentes tinciones ensayadas (aptdo. II.3), el ácido fosfotúngstico proporcionaba los mejores contrastes y resolución de imágenes. Resultaron de interés las tinciones con formiato de uranilo (fig. 45 D) en las que las partículas mostraron una superficie de perfil irregular, apareciendo todas ellas penetradas por la tinción. Los virus purificados se tñieron con PTA al 1% y se estudiaron comparativamente en campo oscuro y campo claro y a grandes aumentos. La técnica evidenció el perfil hexagonal de las partículas tanto de las llenas como de las vacías (fig. 45 A y 45B).

Utilizando concentraciones de virus adecuadas, fué posible conseguir que las partículas virales aparecieran dispuestas ordenadamente formando agregados bidimensionales y tridimensionales (fig. 46 a 49), lo cual revela una estructura regular de las cápsidas. Las monocapas bidimensionales presentaron una ordenación de partículas prácticamente reticular. En los agregados aparecieron en ocasiones partículas vacías intercaladas sin que alterasen la pauta de ordenación (fig. 46), indicando una estructura igual para ambos tipos de partículas. En muchas preparaciones, se observaron transiciones desde partículas aisladas, a monocapas y a agregados tridimensionales (fig. 47 A y 47 B).

La capacidad de interacción entre las subunidades protéicas de la cubierta viral se puso de manifiesto en los agregados tridimensionales. En éstos se encontraron tres pautas principales

de agregación: partículas colocadas sobre el centro de otras tres, dando imágenes como las de las figuras 47 B y 48 A; partículas colocadas sobre el centro de otras cuatro, cuya imagen se muestra en las figuras 47 B y 48 B; y partículas colocadas exactamente sobre otra, formando estructuras de tipo cúbico como las que se muestran en la figura 47 C. Los diferentes tipos de agregados sugieren una estructura poliédrica de la partícula, seguramente formada por diferentes tipos de caras en las que estarían colocadas regularmente las dos diferentes subunidades protéicas. Las partículas interaccionarían entre ellas para dar lugar a los diferentes tipos de ordenamientos tridimensionales.

Otro intento de análisis de la estructura de las partículas se realizó haciendo series giradas, con un goniómetro U céntrico, de las monocapas bidimensionales (sobre un eje de 45° XY), realizando tomas sin inclinar (0°) y con ángulos de inclinación de $+10^\circ$, $+20^\circ$, $+25^\circ$, -10° , -20° , -25° (fig. 49). Aunque el ángulo de giro no pudo ser ampliado, estas series giradas parecieron confirmar la estructura poliédrica de las partículas al difuminarse o acentuarse el perfil hexagonal de ellas en función del ángulo de inclinación de la toma fotográfica.

De los presentes resultados, y por similitud con lo que ha sido descrito para el virus tipo de grupo (CpMV) por Crowther *et al.*, (1974), podría aventurarse que las partículas de SqMV estarían formadas por cápsidas poliédricas con simetría de tipo "icosaédrico" formadas por más de un tipo de caras.

El icosidodecaedro formado por 12 caras pentágonos regulares y 20 caras triangulares, permitiría la asociación de 60 subunidades protéicas de cada clase, proporcionando al tiempo imágenes de perfil hexagonal. Las subunidades de 42 Kd estarían agrupadas en 12 conjuntos piramidales de base pentagonal, mientras que las subunidades de 24 Kd formarían 20 grupos tetraédricos.

La representación gráfica de una estructura como ésta, se presenta en la figura 50; éste tipo de estructura estructura coincide básicamente con la propuesta por Crowther *et al.*, (1974) para el virus tipo del grupo mediante reconstrucción por procesamiento de imágenes.

Figura 45 A. -X 210.000 Micrografía en campo oscuro de un purificado de SqMV teñido con ácido fosfotúngstico (PTA) al 1% pH 7.

Figura 45 B. -X 210.000 Micrografía en campo claro de la preparación anterior. Obsérvese el perfil hexagonal de las partículas.

Figura 45 C. -X 63.800 Tinción con PTA al 2% pH 7, de un purificado de SqMV.

Figura 45 D. -X 63.000 Tinción con formiato de uranilo del purificado anterior. Todas las partículas aparecen penetradas por la tinción y presentan un perfil más irregular de la superficie de las cápsidas.

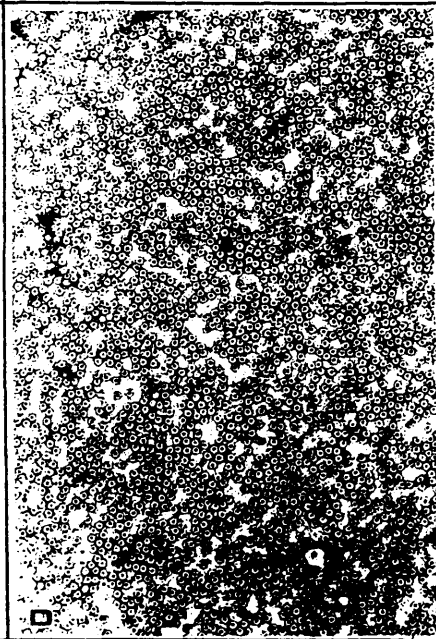
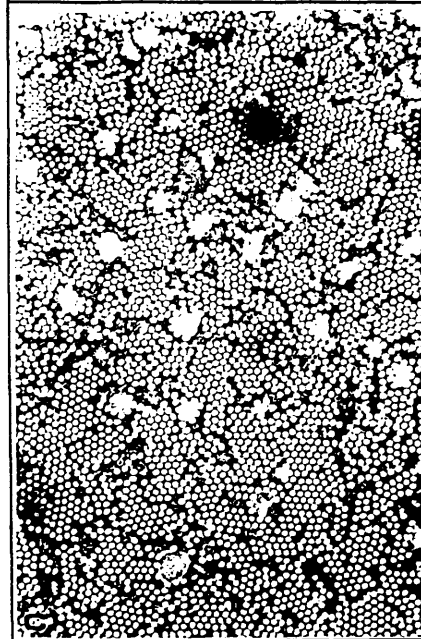
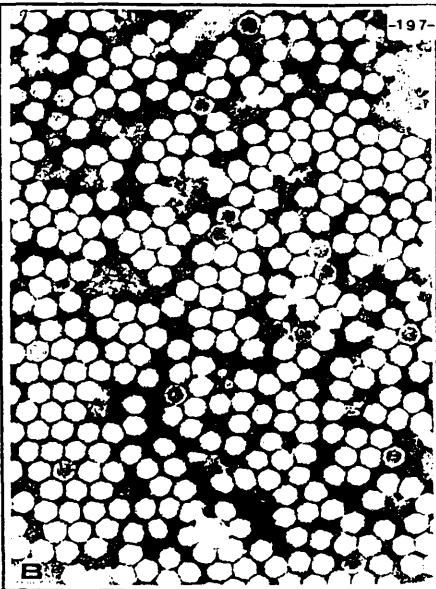
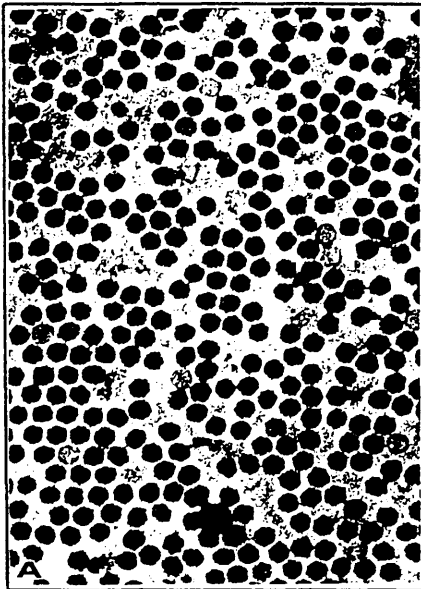


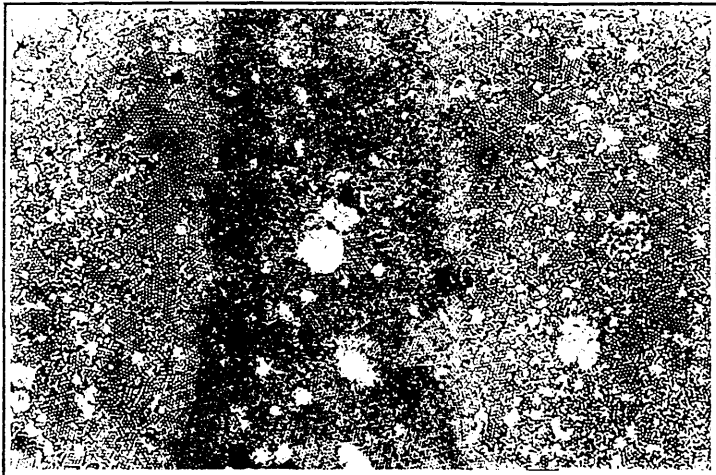
Figura 46.- X 120.800 Diferentes agregados bidimensionales formados por partículas de SqMV. Obsérvese la tendencia a la disposición reticular de los agregados en torno a núcleos hexagonales. Las partículas vacías intercaladas no distorsionan la ordenación de los agregados.



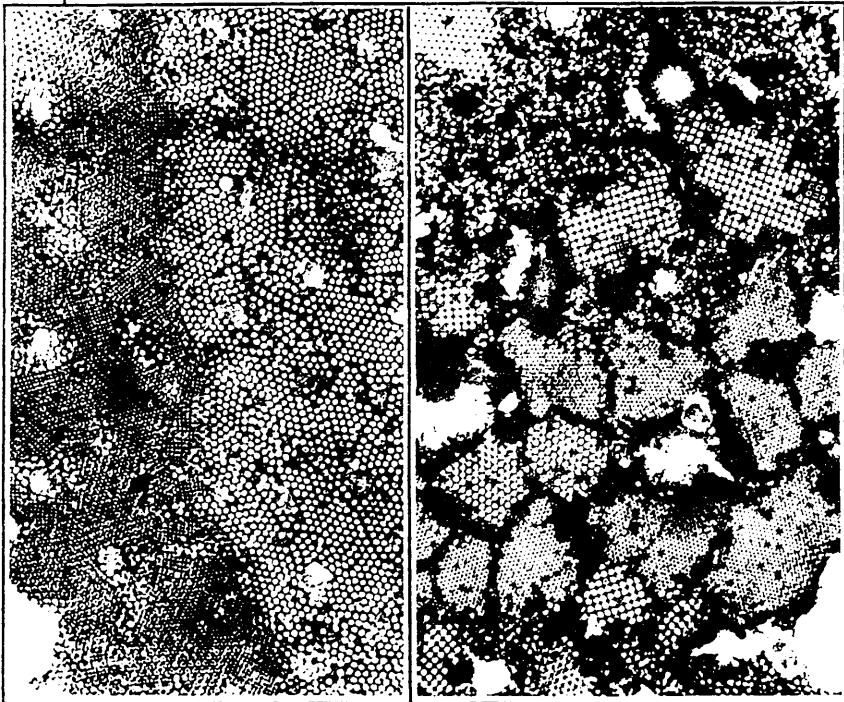
Figura 47 A.- X 31.900 Micrografía de SqMV en la que se observa la capacidad de las partículas para formar agregados bi y tridimensionales.

Figura 47 B.- X 63.800 Transición entre agregados bi y tridimensionales. En la micrografía puede observarse diferentes pautas de ordenación en los agregados tridimensionales.

Figura 47 C.- X 63.800 Detalle de agregados tridimensionales en los que la pauta de agregación dá lugar a algunas estructuras tridimensionales de tipo cúbico en la parte superior derecha.



A



B

C

Figura 48 A. - X 102.600 Detalle de un agregado tridimensional formado por agregación de partículas sobre el espacio entre cada tres.

Figura 48 B. - X 176.500 Detalle a gran aumento de la transición entre agregados bi y tridimensionales.

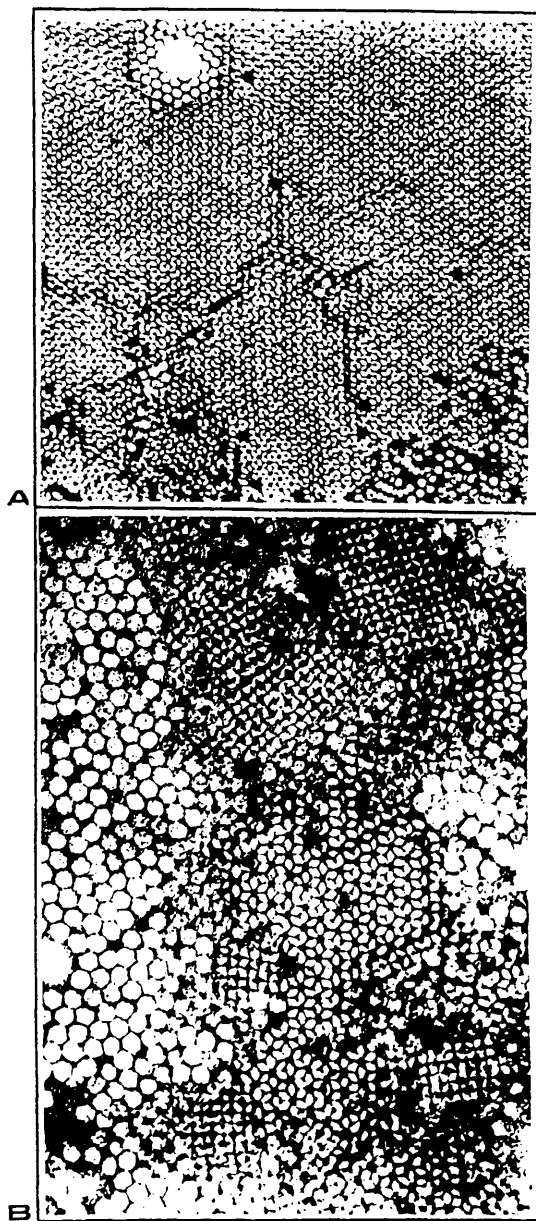


Figura 49.- X 210.000 Serie de micrografías tomadas sobre un goniómetro U céntrico a diferentes ángulos de inclinación. El perfil hexagonal de algunas partículas se difumina o se hace más nítido en relación con el ángulo de inclinación.

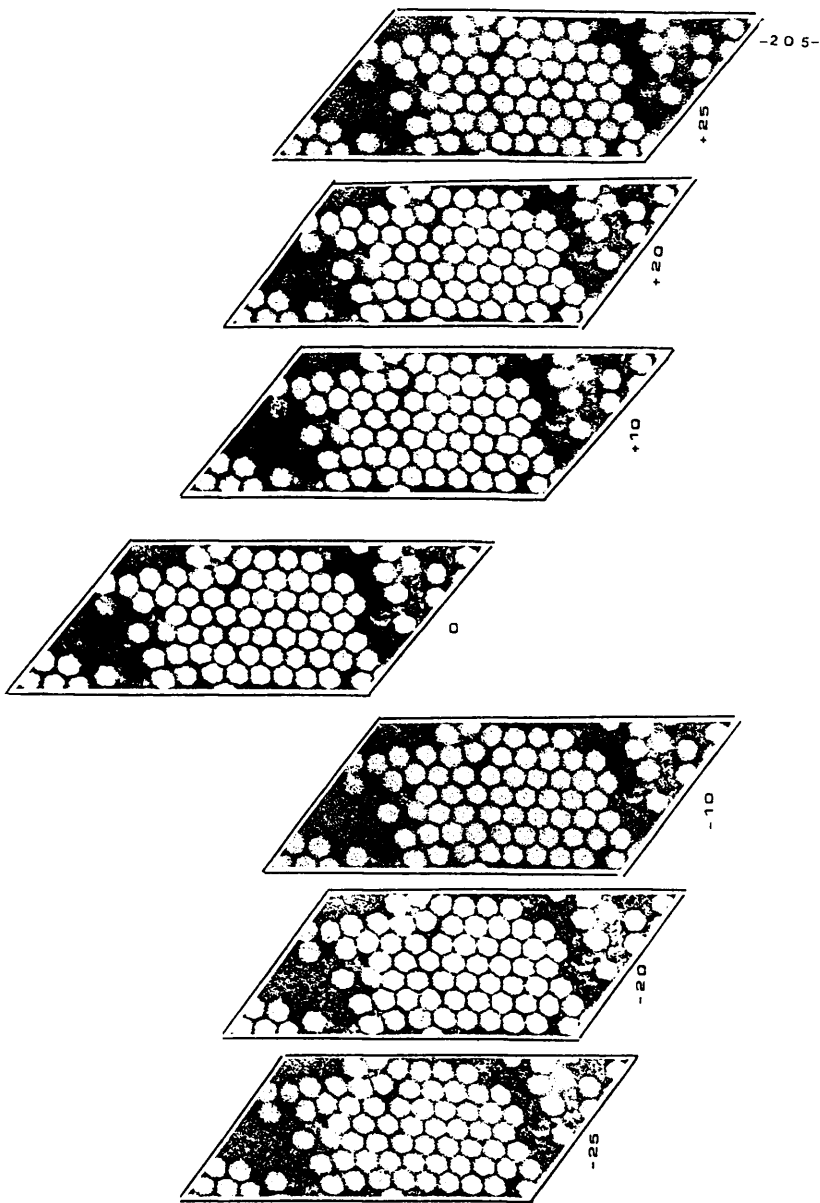
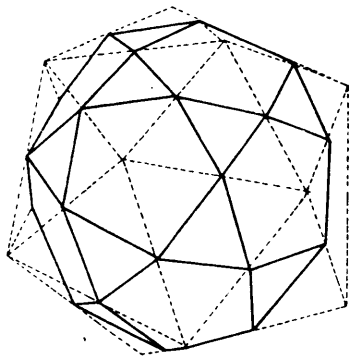


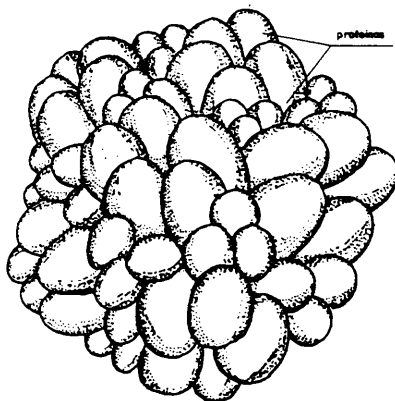
Figura 50.- Propuesta de estructura tridimensional para el virus del mosaico de la calabaza (SqMV). Las caras pentagonales del icosidodecaedro serian la sección de las pirámides formadas por la asociación de cinco proteínas de 42 Kd, en tanto que las caras triangulares, lo serian de las pirámides tetraédricas formadas por la asociación de las proteínas de 24 KD.

El conjunto estaria formado por 60 subunidades protéicas de 42 Kd y, 60 subunidades de 24 Kd.

MODELO TRIDIMENSIONAL PARA LA PARTICULA DE SqMV



ICOSIDODECAEDRO



MODELO DE SqMV

III.6.7.- OBTENCION Y TITULACION DE LOS INMUNOSUEROS

Para la completa determinación del grupo serológico de los aislados C1 y C3, se prepararon inmunosueros (Is) frente al aislado SqMV-C1 (aptdo II.8). Previo a la titulación de los Is se hicieron experimentos con el suero preinmune haciéndolo reaccionar en geles de doble inmunodifusión (aptdo II.7) con extractos de savia procedentes de plantas sana e inoculadas con los aislados SqMV, y con suspensiones de virus purificados. En ninguno de los ensayos se produjo reacción alguna de inmunoprecipitación (fig. 51 A).

En la titulación de los Is anti-C1 se obtuvieron valores de 1:512 a los 23 días de la inmunización primaria y de 1:2048 a los 48 días (aptdo II.7). El título 1:2048 se mantuvo en los Is procedentes de la extracción final (fig. 51 B y C).

La especificidad de los Is anti-C1 se comprobó haciéndolo reaccionar en geles de doble inmunodifusión con extracto crudo de planta sana sin que se formase banda alguna de precipitación (fig. 51 D, 51E). Cuando el Is anti-C1 se hizo reaccionar con 15 ul (1gr tejido/ml) de savias de plantas sanas e infectadas por antígenos (Ag) homólogos y heterólogos, se formaron bandas de precipitación en el caso de los aislados C1 y C3, no reconociendo a esa concentración en savia a los aislados SqMV-Arkansas (serotipo I) y SqMV-Arizona (serotipo II), (fig. 51 E).

La cantidad mínima de virus purificado del Ag homólogo a la que se produjo reacción visible con el Is diluido v/v en solución salina tamponada 10 mM pH 7.2 (PBS) fué de 0,250 ug de virus. En extracto de planta infectada por el Ag homólogo, la dilución máxima detectada fué de 1:10 gr/ml (fig 51 D).

III.6.8.- CARACTERIZACION SEROLOGICA DE LOS AISLADOS SqMV-C1 Y SqMV-C3.

Para determinar el serotipo de los aislados de SqMV-C1 y SqMV-C3, así como su parentesco serológico con los otros aislados de SqMV, de acuerdo con la clasificación establecida por Nelson y

Knuhtsen (1973 b), se llevaron a cabo experimentos de doble inmunodifusión y absorción intragel, con los aislados e inmunosueros que se resúmen a continuación:

ANTIGENO	SEROTIPO	INMUNOSUERO	TITULO
Aislado C1	-	anti-C1	1:2048
Aislado C3	-	-	-
SqMV-Netherland(N)	I	anti-Nether	1:1024
SqMV-Arkansas(AK)	I	-	-
SqMV-Arizona(AZ)	II	-	-

A) CARACTERIZACION MEDIANTE TECNICAS DE DOBLE INMUNODIFUSION EN GELES DE AGAR AL 0,8%

Para las reacciones antígeno/anticuerpo (Ag-Ac), el sistema equilibrado se estableció, después de experimentos previos, en 45 ug de virus purificado usado como Ag y disueltos en 15ul de agua, con 15 ul de Ac diluido v/v en PBS para el Is anti-C1 con título 1:2048 .El Is anti-Netherland (Ser I) con título 1:1024 se utilizó sin diluir. En los experimentos se pudo comprobar que cuando los geles se prepararon fundiendo la agarosa en PBS, se produjeron halos de precipitación en torno a los pocillos conteniendo los antígenos, lo que no sucedió cuando estos se prepararon en agua (fig 51 F y 51 G), por lo que se decidió aplicar esta modificación a la técnica de Oüchterlony (1949).

La reacción Ag-Ac con el Is anti-C1 produjo una banda continua de precipitación coalescente entre los aislados del serotipo I (AK y N) y los aislados C1 y C3 (fig. 51H); en cambio la banda de precipitación presentó interacción parcial con formación de espolones o "spur" entre estos aislados y el aislado perteneciente al serotipo II (AZ), (fig 51 H). La reacción con el Is anti SqMV-Netherland (ser I), produjo en todos los casos una banda coalescente de precipitación con todos los aislados (fig 51I). Estos resultados claramente identifican al virus infectando las muestras C1 y C3 como SqMV, e indican que el Is anti-C1 diferencia al serotipo I del II, mientras que el Is anti-Netherland, no.

B) CARACTERIZACION MEDIANTE TECNICAS DE ABSORCION INTRAGEL

En estos ensayos, el sistema equilibrado Ag-Ac se estableció absorbiendo en los pocillos centrales 90 ug de virus purificado (Ag) con 15 ul de Is anti-C1 diluido v/v en PBS (aptdo II.7). El Is anti-Netherland, se utilizó sin diluir. Después de tres horas de incubación, se colocaron 45 ug de los diferentes virus purificados utilizados como Ag, en los pocillos periféricos.

Los Is anti-C1 y anti-Netherland se absorbieron con los antígenos SqMV-C1, SqMV-C3, SqMV-Netherland (ser.I), SqMV-Arkansas (ser.I) y SqMV-Arizona (ser.II) y se enfrentaron a todos ellos para obtención de posibles reacciones cruzadas.

La absorción del Is anti-C1 con su Ag homólogo fue completa, con formación de una banda de precipitación en torno al pocillo central y ninguna reacción frente a los Ag situados en los pocillos periféricos (fig 51J). Idénticos resultados se obtuvieron en la absorción del Is anti-C1 con los antígenos SqMV-C3, SqMV-Netherland (ser.I) y SqMV-Arkansas (ser.I) enfrentados con los antígenos homólogos y heterólogos. La absorción del Is anti-C1 con el Ag SqMV-Arizona (ser.II) fué parcial, formándose una banda de precipitación en torno al pocillo central y reacción cruzada coalescente con los antígenos pertenecientes al serotipo I (N y AK) así como con los antígenos C1 y C3. No hubo reacción cruzada con el Ag homólogo (SqMV-Arizona), (fig. 51K).

Los resultados de las absorciones intragel de los diferentes antígenos con el Is anti-C1, los esquematizamos a continuación:

ABSORCION INTRAGEL CON Is ANTI SqMV-C1					
Is absorbido con SqMV	A n t i g e n o				
	C1	C3	Nether(I)	Ark(I)	Az(II)
Ais.C1	-	-	-	-	-
Ais.C3	-	-	-	-	-
Nether(I)	-	-	-	-	-
Ark(I)	-	-	-	-	-
Az(II)	+	+	+	+	-

(-) ausencia de reacción cruzada; (+) reacción cruzada.

La absorción del Is anti Netherland (ser.I) con su Ag homólogo fué completa, con formación de una banda de precipitación en torno al pocillo central y ausencia de reacción cruzada con los antígenos homólogos y heterólogos situados en los pocillos periféricos (fig.51L). Iguales resultados se obtuvieron en la absorción de éste Is con los antígenos AK(serotipo I), C1 y C3. En la absorción del Is anti-Nether. (ser.I) con el Ag heterólogo SqMV-AZ (ser.II), se produjo una débil reacción cruzada coalescente entre los aislados C1 y C3 y, aún más débil con su Ag homólogo (fig. 51 M). No hubo reacción cruzada con el aislado SqMV-AK (ser.I), ni con el Ag heterólogo absorbido (AZ,ser.II),(fig.51M). Los resultados los esquematizamos a continuación:

ABSORCION INTRAGEL CON Is ANTI SqMV-NETHERLAND(Ser.I)					
Is absorbido con SqMV	A n t i g e n o				
	C1	C3	Nether(I)	Ark(I)	Az(II)
Ais.C1	-	-	-	-	-
Ais.C3	-	-	-	-	-
Nether(I)	-	-	-	-	-
Ark(I)	-	-	-	-	-
Az(II)	+	+	+	-	-

(-) ausencia de reacción cruzada; (+) reacción cruzada.

Los ensayos mediante doble inmunodifusión y absorción intragel, indican claramente que los aislados españoles SqMV-C1 y SqMV-C3, pertenecen al serotipo I.

III.6.9.- INMUNODETECCION DE LAS PROTEINAS DE LA CUBIERTA VIRAL DE SqMV.

Para determinar la antigenicidad de cada una de las proteínas de la cubierta viral de SqMV y establecer posibles diferencias entre los diferentes aislados, particularmente entre los Serotipos I y II, se procedió a su separación electroforética e inmunodetección por el método descrito por Hawkes et al., (1982) (aptdo II.7.4). La transferencia electroforética a soporte sólido de nitrocelulosa, de las proteínas de la cubierta viral resueltas en SDS-PAGE se realizó según la técnica descrita por Erickson et al. (1982) y resultó una réplica de los geles de procedencia (fig. 52).

En las condiciones descritas en el apartado II.7.4, aparentemente toda la proteína fué transferida a la nitrocelulosa, no detectando resto alguno cuando el gel transferido se tiñó con azul de Coomassie.

Los resultados obtenidos demuestran que las dos bandas correspondientes a las proteínas de 42Kd y 24Kd de los aislados C1 y C3 reaccionaron positivamente con el anticuerpo anti-C1, siendo la reacción más intensa en color con la proteína de 42Kd (fig. 52A). El Ac anti-C1 detectó igualmente las dos proteínas de cubierta de los aislados pertenecientes al serotipo I SqMV-Nether. y SqMV-AK, sin diferencias en la intensidad de color de las bandas que no fuesen imputables más que a variaciones en las concentraciones de los Ag. Dicho anticuerpo no identificó la proteína de 24 Kd perteneciente al aislado del serotipo II, SqMV-AZ o lo hizo más débilmente (fig. 52 B), indicando que es en esta proteína dónde se localizan los lugares antigénicos diferenciales entre los dos serotipos.

Similares resultados se obtuvieron cuando se utilizó el Is anti- Netherland (ser. I).

Abreviaturas: SB= suero preinmune; Sv-S; Sv-C1, Sv-C3; Sv-AZ; Sv-AK= extracto crudo de plantas infectadas con planta sana y los aislados C1, C3, AZ y AK respectivamente.

N, AK, C1, AZ, C3 = virus purificados de los aislados de SqMV Netherland(I), Arkansas(I), C1, Arizona(II) y C3, respectivamente.

Figura 51 A.- Doble inmunodifusión con suero preinmune frente a savia de plantas sanas e infectadas por los diferentes aislados de SqMV.

Figura 51 B y 51 C.- Titulación del inmosuero anti-SqMVC1.

Figura 51 D.- Reacción del Is anti-C1 frente a extracto de planta sana y frente a diluciones de extracto de planta infectada con SqMV-C1.

Figura 51 E.- El mismo Is frente a extractos de plantas infectadas con diferentes aislados de SqMV y frente a 0,250ug del Ag homólogo.

Figura 51 F y 51 G.- Doble inmunodifusión en geles de agar al 0,8% preparados con agua(F) y con solución salina tamponada (PBS)(G).

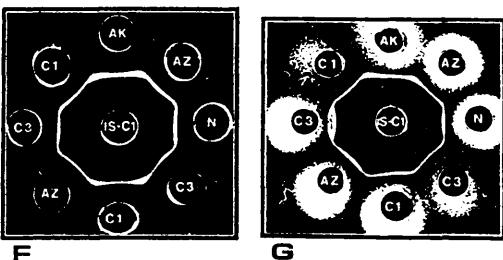
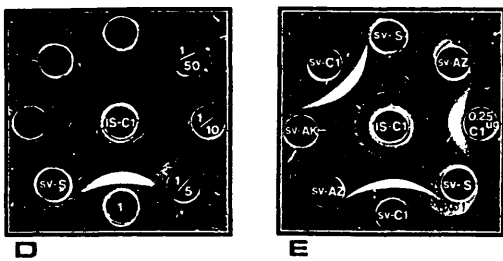
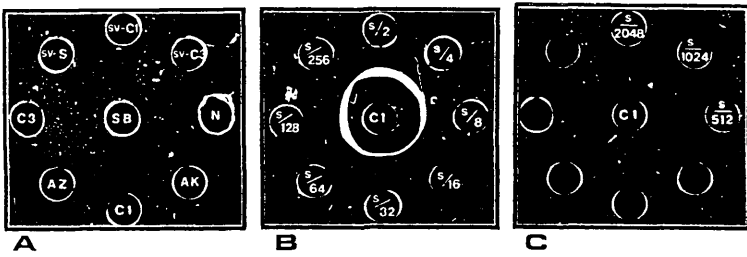


Figura 51 H.- Reacción del Is anti-C1 frente a antígenos diferentes de SqMV. Obsérvese el "spur" con el antígeno del serotipo II (SqMV-AZ).

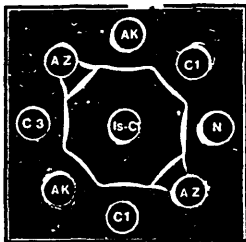
Figura 51 I.- como en 51H pero con el Is anti-Netherland. Obsérvese que el inmunosuero no diferencia entre el serotipo I y II.

Figura 51 J.- Absorción intragel del Is anti-C1 con su Ag homólogo y enfrentado a los Ag homólogos y heterólogos de SqMV.

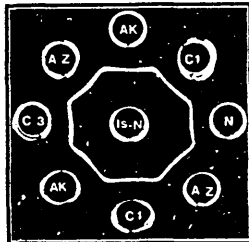
Figura 51 K.-Absorción del Is anti-C1 con el Ag heterólogo, Arizona. Se observa reacción cruzada con los antígenos pertenecientes al serotipo I y no con el heterólogo absorbido.

Figura 51 L.- Absorción intragel del Is anti-Netherland con su Ag homólogo y enfrentado con Ag homólogos y heterólogos de SqMV

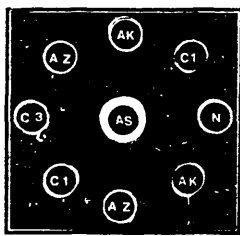
Figura 51 M.-Absorción del Is anti-Netherland con el Ag heterólogo Arizona. Se produce leve reacción cruzada con los aislados C1, C3 y Netherland.



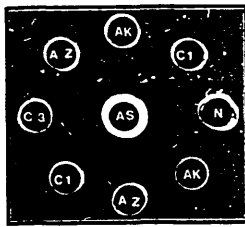
H



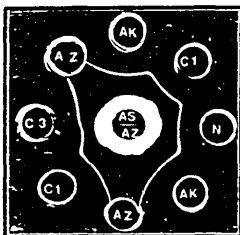
I



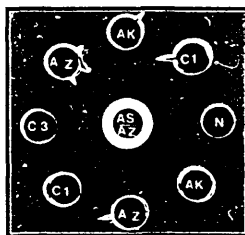
J



L



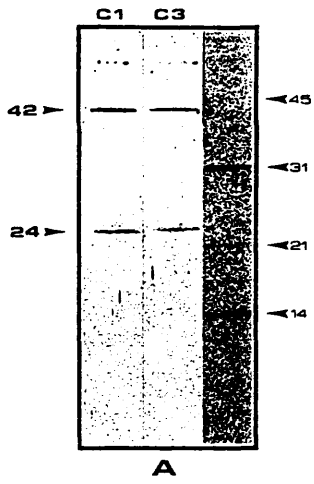
K



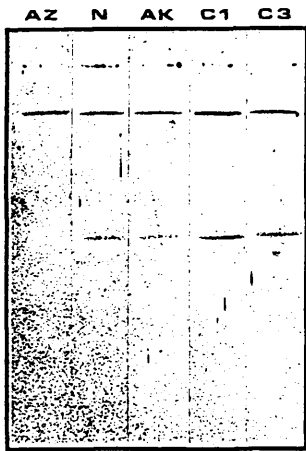
M

Figura 52 A.- Inmunodetección con el Is anti-C1 de las proteínas de cubierta de los aislados C1 y C3 separadas electroforéticamente y transferidos a filtros de nitrocelulosa. En el carril de la izquierda figuran los patrones de pesos moleculares.

Figura 52 B.- Inmunodetección de las proteínas de cubierta de los diferentes aislados de SqMV. Nótese la ausencia de la banda correspondiente a la proteína de 24 Kd del aislado Arizona perteneciente al serotipo II.



A



B

III.6.10.- DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio identifican al virus del mosaico de la calabaza (SqMV), perteneciente al grupo de los Comovirus, como el agente causal de la enfermedad con síntomas de mosaico y bandeado de venas de los melones procedentes de cultivos en las provincias de Almería y Málaga (Díaz-Múgica y Díaz-Ruiz, 1987).

SqMV ha sido ampliamente descrito como causante de grandes pérdidas en cosechas de Cucurbitáceas en el continente americano (Nelson y Knuhtsen, 1973a; Nameth et al., 1986; Rosemeyer et al., 1986; McLeod et al., 1988).

El virus, que tiene una gama de huéspedes prácticamente restringida a Cucurbitáceas, fué detectado por primera vez en Israel infectando únicamente Cucurbitáceas silvestres (Cohen y Nitzany, 1963). Lochart et al., (1982) aislaron en Marruecos la cepa SqMV-Moroccan (serotipo I) que como en nuestro caso, infecta también Chenopodiáceas, consideradas anteriormente no susceptibles a la infección por SqMV. El virus ha sido detectado también en Irán (Izadpanah, 1987), Egipto (Husseini y Sharaf, 1988) y Creta (Avgelis y Katis, 1989). Esta rápida expansión de la enfermedad en el área mediterránea, no puede atribuirse al vector Epilachna chrysomelina F. que es fácilmente controlable, sino más bien a la introducción de semillas infectadas (Díaz-Múgica y Díaz-Ruiz, 1987; Avgelis y Katis, 1989), puesto que siendo un virus que se transmite por semillas en más de un 10% de los casos, además es de los pocos virus de plantas que infectan el embrión y las envueltas seminales (Alvarez y Campbell, 1978).

El análisis electroforético de los ARNs de los aislados C1 y C3 mostró la presencia de dos bandas de pesos moleculares, en millones de daltons, de 2,4 para el ARN-B y 1,6 para el ARN-M, coincidiendo con los resultados obtenidos para SqMV por Mazzone et al., (1962).

Presentar el genoma dividido en dos piezas es una

característica común a Comovirus, Dianthovirus, Nepovirus y miembros del grupo del virus de las excrecencias del guisante, aunque sólo Comovirus y Nepovirus presentan tamaños similares.

Unicamente la presencia de dos proteínas de cubierta de alrededor de 20K y 40K en cantidades equimoleculares (Geelen et al., 1972), permite definitivamente diferenciar los Comovirus de los Nepovirus, los que sólo poseen una proteína de cubierta de 55K (Stace-Smith, 1981).

Los resultados de los análisis electroforéticos de las proteínas de la cubierta de los aislados C1 y C3 evidenciaron la presencia de dos bandas de pesos moleculares de 24K y 42K, obtenidos por comparación con otras de peso molecular conocido. Estos tamaños son similares a los obtenidos por Hiebert y Purcifil (1981) para otro aislado de SqMV (22K y 42K).

En las plantas infectadas, los miembros de los Comovirus producen tres tipos de partículas, conteniendo las B y M cada uno de los ARNs del genoma, mientras que las partículas T están vacías (Savithri et al., 1989). La composición de los tres tipos de cápsidas es idéntica y está formada por 60 subunidades de cada una de las proteínas de cubierta (Crowther et al., 1974).

En nuestro estudio hemos observado que las cápsidas de SqMV son estables, poseen un claro perfil hexagonal y fuerte tendencia a formar agregados bi y tridimensionales incluyendo partículas vacías, lo que explica la presencia de agregados cristalinos de partículas en las células infectadas. El que la estructura de las cápsidas vacías sea idéntica a la de las cápsidas conteniendo ARN, indica que la estabilidad de las partículas y la formación de agregados cristalinos están principalmente basadas en la interacción proteína-proteína de las subunidades de la cubierta.

La tendencia a formar agregados ha sido observada, también en SqMV, por Lastra y Munz (1969).

En el pasado, las cepas de SqMV se habían diferenciado en base a la sintomatología, a que infectasen o no sandías, y a que se

transmitiesen o nó por semillas. Nelson y Knuhtsen (1973b), introduciendo criterios serológicos, distinguen dos serotipos entre las cepas de SqMV, de los que los miembros del serotipo I están mejor adaptados epidemiológicamente a Cucurbitáceas, se transmiten por semillas y causan síntomas severos en calabacines y suaves en calabazas. Las cepas del serotipo II no infectan sandías, ni se transmiten por semillas y producen síntomas suaves en calabacines y severos en calabazas, si bién Lima y Amaral (1985) han encontrado en Brasil una cepa de SqMV perteneciente al serotipo II infectando naturalmente Citrullus lanatus Thumb.

De nuestros ensayos inmunológicos se puede concluir que los aislados españoles C1 y C3 de SqMV, son serológicamente idénticos entre sí y pertenecen al serotipo I (Díaz-Múgica et al., 1989b). Su sintomatología y gama de huéspedes coincide también con la descrita por Nelson y Knuhtsen (1973b).

El aislado C1 resultó ser fuértemente inmunogénico y el inmunosuero (Is) anti-C1 diferenció claramente los antígenos del serotipo I y II, que no diferenció el Is anti-Netherland. El Is anti-C1 nos permitió también establecer ciertas diferencias antigénicas entre los aislados del serotipo I que hacen suponer la existencia de variabilidad serológica entre los miembros del grupo I, en la que los aislados Arkansas y Netherland estarían más próximos al serotipo II que los aislados C1 y C3.

En los ensayos de inmunodetección sobre soporte sólido, ambas proteínas de cubierta resultaron inmunogénicas, no observando diferencias significativas entre las cepas pertenecientes al serotipo I, pero sí con la proteína de 24K del aislado Arizona perteneciente al serotipo II, por lo que posiblemente los epitopos diferenciales de este serotipo se localicen en esta proteína.

Las alteraciones ultraestructurales producidas por la infección de SqMV apenas han sido estudiadas, a diferencia de las producidas por el virus tipo del grupo CpMV. De nuestros estudios se puede concluir que como resultado de la infección, se produce

la formación de viroplasmos constituidos por estructuras citopáticas membranosas asociadas con formaciones tubulares de organización helicoidal.

Las estructuras citopáticas membranosas observadas en las formaciones viroplásmicas, son similares a las producidas en diferentes plantas infectadas por CpmV (De Zoeten *et al.*, 1974) y en protoplastos inoculados con sólo el componente B o el ARN-B (Rezelman *et al.*, 1982). Sin embargo, las estructuras tubulares de dichas formaciones viroplásmicas, no han sido descritas previamente para ningún miembro de los Comovirus.

Nosotros hemos encontrado las estructuras tubulares en todas las Cucurbitáceas estudiadas y en todas las infecciones producidas por los distintos aislados de SqMV. Puesto que SqMV es el único miembro del grupo que infecta Cucurbitáceas (Stace-Smith, 1981), el que estas estructuras no hayan sido observadas en otros virus del grupo parece indicar que no se producen en todos los huéspedes. De nuestro estudio se deduce que las formaciones viroplásmicas con túbulos tienen valor diagnóstico para las infecciones por SqMV, al menos en Cucurbitáceas.

Se ha descrito que ambos componentes B y M (o sus ARNs) son necesarios para la multiplicación de CpmV. El ARN-B codifica las proteínas no estructurales necesarias para la replicación, actividad proteasa, encapsidación e inducción de las estructuras citopáticas membranosas relacionadas con la replicación viral (Dorssers *et al.*, 1984; Goldbach y Van Kammen, 1985). Puesto que las formaciones viroplásmicas conteniendo estructuras tubulares observadas por nosotros en Cucurbitáceas infectadas por SqMV están siempre asociadas con las estructuras citopáticas membranosas, parece lógico pensar que estas estructuras tubulares estén también relacionadas con los procesos de replicación o encapsidación del virus en estos huéspedes.

~~-225-~~

RESUMEN
Y
CONCLUSIONES

IV.-RESUMEN Y CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio y caracterización mediante microscopía electrónica de nuevos virus en España, la mayoría de ellos produciendo enfermedades en cultivos de importancia económica, como son los cultivos bajo plástico de la zona Suroriental de la Península.

La elección de los virus estudiados ha sido realizada fundamentalmente en base a que no se tenía conocimiento previo sobre la ultraestructura de las células infectadas por ellos, o porque no habían sido descritos infectando las muestras analizadas, o por la importancia de la enfermedad que producen.

Este estudio nos ha permitido identificar directamente algunos virus no descritos anteriormente en España y que, por la peculiar morfología de sus partículas, son claramente diferentes del resto de los virus vegetales. En otros casos, el estudio al microscopio electrónico de las alteraciones citopáticas presentes en las células infectadas, nos ha permitido llegar a la identificación del o de los virus causantes de la enfermedad. Además, en un caso hemos encontrado características alteraciones celulares no descritas previamente, que han resultado tener valor diagnóstico.

En todos los casos, y como apoyo previo a los estudios por microscopía electrónica, hemos determinado la gama de huéspedes de estos virus y la sintomatología que producen en las plantas infectadas. Cuando ha sido necesario para caracterizar los virus causantes de determinadas enfermedades, o porque el interés del virus así lo requería, hemos recurrido también a técnicas bioquímicas e inmunológicas.

De los resultados expuestos en el presente trabajo, podemos deducir las siguientes conclusiones:

1.- Hemos identificado el virus infectando plantas ornamentales del género Lunaria como una cepa del virus del mosaico del nabo (TuMV), perteneciente al grupo de los Potyvirus. La identificación se ha realizado por la presencia en las células infectadas de inclusiones citoplásmicas cilíndricas acompañadas de características "inclusiones en peine". Presentamos evidencias que indican que estas "inclusiones en peine", poco frecuentes entre los Potyvirus, son también huésped-dependientes.

Ni el virus identificado ni ningún otro Potyvirus, había sido descrito con anterioridad infectando el género Lunaria.

2.- El estudio de muestras de Cucurbitáceas infectadas nos ha permitido detectar, en base a la morfología de las inclusiones citoplásmicas cilíndricas presentes en las células infectadas, dos diferentes Potyvirus. Hemos identificado uno de ellos como la estirpe 1 del virus del mosaico de la sandía (WMV-1) por la presencia de inclusiones citoplásmicas amorfas diferenciales para este virus.

3.- Hemos caracterizado un Rhabdovirus infectando plantas ornamentales de Evonymus, cuyas partículas se localizan simultáneamente en el espacio perinuclear y en el citoplasma celular, lo que es excepcional entre los Rhabdovirus de plantas.

En España, esta es la primera vez que se describe un Rhabdovirus infectando plantas del género Evonymus.

El Rhabdovirus estudiado tiene características similares de tamaño y localización a las descritas para otro Rhabdovirus como causante del síntoma llamado "fascié" o "variegation" en Evonymus. Sin embargo, de nuestros resultados se deduce que ni el síntoma "fascié" ni tampoco otros síntomas de tipo variegado en Evonymus, tienen relación con la infección por Rhabdovirus, por lo que la denominación dada al virus, de Evonymus fasciation o "virus del variegado de Evonymus", recogida actualmente por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, parece inadecuada.

En el estudio hemos detectado la presencia de posibles partículas en el interior de los plasmodios, o relacionados con

ellos, lo que sugiere que el movimiento célula a célula de estos virus de gran tamaño provistos de membrana, podría realizarse en forma de partículas completas a través de los plasmodesmos.

4.- Hemos estudiado una enfermedad en Cucurbitáceas producida por una triple infección debida a un Rhabdovirus, un Potyvirus y un Cucumovirus, comprobando que los tres virus coexisten en la misma célula. Que nosotros sepamos, esta es la primera vez que se describe una infección que implique simultáneamente a estos tres grupos de virus en Cucurbitáceas.

El Rhabdovirus de la infección múltiple antes citada, posiblemente sea el virus del variegado del melón (Melon variegation), pues como él presenta localización citoplásmica e infecta Cucurbitáceas. El Potyvirus probablemente es una cepa del virus del mosaico de la sandía, estirpe 2 (WMV-2), por las inclusiones laminares cortas y curvas que induce. El tercer virus se identificó como el virus del mosaico del pepino (CMV) en base a la gama de huéspedes y al análisis electroforético de sus ARNs.

5.- Hemos estudiado la citopatología en hojas y frutos de plantas de pimiento infectadas por el virus del moteado suave del pimiento (PMMV), miembro del grupo de los Tobamovirus, y que recientemente ha sido detectado como causante de una grave enfermedad en frutos de pimiento en cultivos protegidos bajo plástico en el Sureste peninsular.

La ultraestructura de las células infectadas por este virus, no había sido estudiada en profundidad. Los resultados obtenidos, indican que la localización intracelular de este virus y las alteraciones que produce, son similares en hojas y frutos, y no son diferentes a las de otros miembros de los Tobamovirus.

6.- Hemos identificado el virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV) infectando pimientos en cultivos bajo plástico en la C.A. Canaria, por la inconfundible morfología de sus partículas y hemos estudiado las alteraciones citopatológicas que el virus produce en las plantas de pimiento infectadas.

En este estudio hemos encontrado en el citoplasma de las células infectadas unas formaciones viroplásmicas, probablemente relacionadas con la replicación y/o ensamblaje del virus al estar asociadas sólo con los estadios tempranos de la infección, y hemos observado alteraciones celulares no descritas con anterioridad. Además, hemos detectado presumibles partículas de virus en el interior de los plasmodesmos, lo que sugiere que el movimiento célula a célula de este virus con membrana podría realizarse a través de estas conexiones intracelulares en forma de partícula completa.

Este virus no había sido detectado anteriormente en España y por ser un virus capaz de infectar gran número de diferentes especies vegetales, incluyendo plantas hortícolas y ornamentales, su presencia puede originar graves pérdidas económicas.

7.- Hemos caracterizado el virus del mosaico de la calabaza (SqMV) perteneciente al grupo de los Comovirus, encontrado infectando cultivos protegidos de melón en el Sureste de la Península. El virus infecta diferentes variedades de las especies Cucumis melo L., Cucurbita máxima Duch. y Cucurbita pepo L.

Aunque este virus parece estar actualmente produciendo problemas en los cultivos de Cucurbitáceas de la cuenca Mediterránea, su presencia en España era desconocida. SqMV es un virus poco estudiado y prácticamente desconocido a nivel ultraestructural. En los estudios de caracterización hemos determinado que el virus presenta, como el virus tipo del grupo, partículas muy estables llenas y vacías, de 30 nm de diámetro, con simetría de "tipo icosaédrico", cuyas cápsidas están formadas por dos proteínas de cubierta de 24K y 42K. Las partículas llenas encapsidan dos moléculas de ARN de 2,4 y 1,6 millones de daltons respectivamente.

Las partículas purificadas han sido estables frente a todas las tinciones ensayadas y tienen tendencia a formar agregados bi y tridimensionales, en los que también participan las cápsidas vacías.

En los estudios ultraestructurales hemos determinado que en las células infectadas, las partículas virales se localizan en el citoplasma y en las vacuolas, donde con frecuencia forman agregados cristalinos.

Hemos comprobado que las diferentes cepas de SqMV inducen en todas las Cucurbitáceas la formación de característicos viroplasmas constituidos por formaciones citopáticas membranosas asociadas a estructuras tubulares de organización helicoidal. Estas estructuras tubulares no han sido descritas para ningún otro Comovirus, y es probable que estén relacionadas con los procesos de replicación o encapsidación del virus en las plantas de Cucurbitáceas. En todo caso, de nuestro estudio se deduce que tienen claro valor diagnóstico para SqMV, al menos en Cucurbitáceas.

Hemos determinado la pertenencia al serotipo I de los aislados españoles de SqMV, comprobando que los dos aislados estudiados son serológicamente idénticos. Asimismo hemos detectado que existe cierta variabilidad serológica dentro de los diferentes aislados de SqMV utilizados pertenecientes al serotipo I, y que posiblemente, los epítomos diferenciales del serotipo II se localizan en la proteína de 24K de la cubierta viral.

8.- En nuestros estudios hemos podido comprobar la importancia de la aplicación de las técnicas de microscopía electrónica para la rapidez en el diagnóstico de muchas enfermedades virales, lo cual puede permitir en muchos casos tomar medidas oportunas para evitar pérdidas económicas importantes.

B I B L I O G R A F I A

B I B L I O G R A F I A

- AGAR, A.W., ALDERSON, R.H., and CHESCOE, D. (1974) Principles and Practice of Electron Microscope Operation en Practical Methods in Electron Microscopy, ed. por Glauert, A.M. North Holland American Elsevier. New York. vol. 2.
- ALONSO, E., GARCIA LUQUE, I., AVILA-RINCON, M.J., WICKE, B., SERRA, M.T and DIAZ-RUIZ, J.R. (1989) A Tobamovirus Causing Losses in Protected Pepper Crops in Spain. J. Phytopathology **125**, 67-76
- ALVAREZ, M. and CAMPBELL, R.N. (1978) Transmission and Distribution of Squash Mosaic Virus in Seeds of Cantaloupe. Phytopathology. **68**, 257-263.
- ANDREWS, J.H., and SHALLA, T.A. (1974) The Origin, Development, and Conformation of Amorphous Inclusion Body Components in Tobacco Etch Virus-Infected Cells. Phytopathology **64** 1234-1243.
- ATABEKOV, J.G., and DOROKHOV, Y.L. (1984) Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses. Adv. Virus Res. **29**, 313-363.
- AVGELIS, A.D., and KATIS, N. (1989) Occurrence of squash mosaic virus in melons in Greece. Plant Pathol. **38**, 111-113
- AVILA, A.C. de, PEÑA, L., KITAJIMA, R., RESENDE, R. de O., DIAZ-MUGICA, M.V., DIAZ-RUIZ, J.R. and PETERS, D. (1990). Characterization of a Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV), isolated from *Capsicum annuum* L. in the Canary Islands. Phytopath. medit. (en prensa).
- BLOOMER, A.C. and BUTLER, P.J.G. (1986) Tobacco Mosaic Virus, Structure and Self-Assembly. en The Plant Viruses Vol 2 ed. por M.H.V. Van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat. Plenum press 19-57
- BOATMAN, S. and KAPER, J.M. (1976) Molecular organization and stabilizing forces of simple RNA viruses. IV Selective interference with protein-RNA interaction by use of sodium dodecyl sulfate. Virology **70**, 1-16.
- BRANDES, J. (1957) Eine Elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis fadenförmiger stabchenförmiger Viren,

- Insbesondere in Kartoffeldunkelkeirnen. Nachrichtenbl. Dr. Pflanzenschutzdienst. Braunschweig. 9, 151.
- BRANDES, J., and WETTER, C. (1959) Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. Virology 8, 99-115.
- BRÄKKE, M. K. (1967) Miscellaneous problems in virus purification. Methods in Virology, ed. por Maramorosch, K. and Koprowski, H., Academic Press, New York, vol. 2, 119-136.
- BRENNER, S. and HORNE, R. W. (1959) A Negative Staining Method for High Resolution Electron Microscopy of Viruses. Biochim. Biophys. Acta, 34, 103.
- BROWN, F., BISHOP, D. H. L., CRICK, J. y col. (1979) Rhabdoviridae. Intervirology 12, 1-7.
- BRUENING, G. (1978) Comovirus Group. CMI/AAB Descriptions, 199, 5pp.
- BUTLER, P. J. G. and KLUG, A. (1971) Assembly of the particle of tobacco mosaic virus from RNA and disks of protein. Nature New Biol., 229, 47-50.
- CAMPBELL, R. N. (1971) Squash Mosaic Virus. CMI/AAB Descriptions 43, 4pp.
- CASPAR, D. L. D. and KLUG, A. (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 1-24.
- CHO, J. J., MAU, R. F. L., GERMAN, T. L., HARTMANN, R. W. y YUDIN, L. S. (1989) A Multidisciplinary Approach to Management of Tomato Spotted Wilt Virus in Hawaii. Plant Dis. 73 375-383.
- CHRISTIE, R. G. and EDWARDS, J. R., (1977) Light and Electron Microscopy of Plant Virus Inclusions. Fla. Agr. Exp. Sta. Monogr. Series, 9, 115pp
- CHRISTIE, S. R., PURCIFULL, D. E., CRAWFORD, W. E. and AHMED, N. A. (1987) Electron Microscopy of Negatively Stained Clarified Viral Concentrates Obtained from Small Tissue Samples with Appendices on Negative Staining Techniques. Agric. Exp. St. Inst. Food Agric. Sci. Bull. 872, 45 pp
- CITOVSKY, V., KNORR, D., SCHUSTER, G. and ZAMBRYSKI, P. (1990) The P30 Movement Protein of Tobacco Mosaic Virus Is a Single-Strand Nucleic Acid Binding Protein. Cell, 60, 637-647.

- CLARK, M.F., and ADAMS, A.N., (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34, 475-483.
- CODACCIONI, M. (1972) Description de particules intracytoplasmiques dans de jeunes tiges fasciées de l'*Evonymus japonica* Th. Bull. Soc. bot. Fr. 119, 51-60
- CODACCIONI, M. et COSSARD, CH. (1975) Etude de la transmission expérimentale de diverses inclusions intracellulaires observées dans les tiges fasciées du *Forsythia* sp. et d'une variété de Fusain du Japon. C.R. Acad. Sci. Paris. 280, 1497-1500.
- COHEN, S. and NITZANY, F.E., (1963) Identity of Viruses Affecting Cucurbits in Israel. Phytopathology 53, 193-196
- COLLMER, C.W., VOGT, V.M., and ZAITLIN, M. (1983) H. Protein, a minor protein of TMV virions, contain sequences of viral coat proteins. Virology 126, 429-448.
- CRICK, F.H.C. and WATSON, J.D. (1956) Structure of small viruses. Nature 177, 473-475.
- CROWTHER, R.A., GEELEN, J.L.M.C., and MELLEMA, J.E. (1974) A Three-Dimensional Image Reconstruction of Cowpea Mosaic Virus. Virology 57, 20-27.
- CUADRADO, I.M., DE JUAN, E., MORENO, P. y SAEZ, E. (1989) Detención del virus del bronceado del tomate (TSWV) en cultivos de pimientos y tomate bajo invernadero en el poniente almeriense. Proc. V Cong. Nal. Fitopatol. pp 29 (Oct. 1989) Badajoz
- DE ZOETEN, G.A., ASSINK, A.M. and VAN KAMMEN, A. (1974) Association of Cowpea Mosaic Virus-Induced Double-Stranded RNA with a Cytopathological Structure in Infected Cells. Virology 59, 341-355.
- DIAZ MUGICA, M.V., and DIAZ-RUIZ, J.R. (1987) "Squash Mosaic Virus isolated from melons in Spain". Proc. 7th Cong. Medit. Phytopathol. Union. Granada (Spain) pp 142.
- DIAZ MUGICA, M.V., y DIAZ-RUIZ, J.R. (1988) "Nuevas estructuras intracelulares de valor diagnóstico asociadas con la infección del virus del Mosaico de la Calabaza (SqMV) Proc. I.

Cong. Nal. Virolog. Madrid.

- DIAZ, M.V., PEÑA, L. y DIAZ-RUIZ, J.R. (1989) Detección mediante Microscopía Electrónica del virus de las manchas bronceadas del tomate infectando pimientos, en España, Proc. XII Cong. Nal. As. Españ. Microbiol. (Sept. 1989) Pamplona.
- DIAZ, M.V., SERRA, M.T. y DIAZ RUIZ, J.R. (1989) Determinación del Serotipo de Dos Aislados Españoles del Virus del Mosaico de la Calabaza (SqMV). Proc. V Cong. Nal. Fitopatol. (Oct. 1989) Badajoz
- DIAZ-RUIZ, J.R. and KAPER, J.M. (1977) Cucumber mosaic virus associated RNA 5. III. Little nucleotide sequence homology between CARNA 5 and helper RNA. Virology 80, 204-213.
- DORSSERS, L., VAN DER KROL, S., VAN DER MEER, J., VAN KAMMEN, A. and ZABEL, P. (1984) Purification of cowpea mosaic virus RNA replication complex: Identification of a virus-encoded 110,000-dalton polypeptide responsible for RNA chain elongation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1951-1955.
- DOUGHERTY, W.G. and HIEBERT, E. (1980 a) Translation of Potyvirus RNA in a Rabbit Reticulocyte Lysate: Identification of nuclear Inclusion Proteins as Products of Tobacco Etch Virus RNA Translation and Cylindrical Inclusion Protein as a Product of the Potyvirus Genome. Virology 104, 174-182.
- DOUGHERTY, W.G. and HIEBERT, E. (1980 b) Translation of Potyvirus RNA in a Rabbit Reticulocyte Lysate: Cell-Free Translation Strategy and Genetic Map of the Potyviral Genome. Virology 104, 183-194.
- DOUGHERTY, W.G. and CARRINGTON, C. (1988) Expression and Function of Potyviral Gene Products. Ann. Rev. Phytopathol. 26, 123-143.
- DRESER, D.W. (1986) en Immunochemistry Handbook of Experimental Immunology, ed. por Weir, D.M. Blackwells Scientific Publications. Oxford. 4 ed. I, 8, 1-21
- EDWARDSON, J.R. (1966) Electron Microscopy of Cytoplasmic Inclusions in Cells Infected with Rod-Shaped Viruses. Amer. J. Bot. 53(4), 359-364.
- EDWARDSON, J.R., PURCIFULL, D.E. and CHRISTIE, R.G. (1968)

- Structure of Cytoplasmic Inclusions In Plants Infected with Rod-Shaped Viruses. Virology 34, 250-263.
- EDWARDSON, J.R. and PURCIFULL, D.E. (1970) Turnip Mosaic Virus-Induced Inclusions. Phytopathology 60, 85-88.
- EDWARDSON, J.R. (1974) Some properties of the potato virus Y-group. Fla. Agr. Exp. Sta. Monogr. Ser. 4. 398pp.
- EDWARDSON, J.R., AND CHRISTIE, R.G. (1978) Use of Virus-Induced Inclusions in Classification and Diagnosis. Annu. Rev. Phytopath. 16, 31-55.
- EDWARDSON, J.R. (1981) Attempts to Characterize and Separate Potyviruses. 5 th. Int. Cong. Virology Abs. 23/03
- EDWARDSON, J.R., CHRISTIE, R.G. and KO, N.J. (1984) Potyvirus Cylindrical Inclusions-Subdivision-IV Phytopathology 74 1111-1114.
- EDWARDSON, J.R. and CHRISTIE, R.G. (1986a) Virus Infecting Forage Legumes II. Fla. Agr. Exp. Sta. Monogr. Series 14, 247-464.
- EDWARDSON, J.R. and CHRISTIE, R.G. (1986b) Tobacco Mosaic Virus: Cytopathological Effects en The Plant Viruses, vol. 2 ed. por Van Regenmortel, M.H.V. and Fraenkel-Conrat. Plenum Press. New York 153-166.
- ERICKSON, P.F., MINIER, L.N., and LASHER, R.S. (1982) Quantitative Electrophoretic Transfer of Polypeptides from DSD Polyacrylamide gels to Nitrocellulose Sheets: a Method for their Re-Use in Immunoradiographic Detection of Antigens. J. Immunol. Methods. 51, 241-249.
- ESAU, K. (1967) Anatomy of Plant Virus Infections. Annu. Rev. Phytopathol., 5, 45-76.
- FINCH, J.T., KLUG, A., and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1967) The structure of cucumber mosaic virus J. Mol. Biol., 24, 303-305.
- FINCH, J.T. (1972) The hand of the helix of tobacco mosaic virus. J. Mol. Biol., 66, 291-294.
- FRANCKI, R.I.B., and GRIVELL, C.J. (1970) An Electron Microscope Study of the Distribution of Tomato Spotted Wilt Virus in Systemically Infected *Datura stramonium* leaves. Virology 42, 969-978.
- FRANCKI, R.I.B. (1972) Purification of viruses. Principles

- and Techniques in Plant Virology, ed. por Kado, C.I. and Agrawal, H.O. Van Nostrand Rein. N.Y. 295-335.
- FRANCKI, R.I.B. (1973) Plant Rhabdoviruses en Adv. Virus Res. ed. por Lauffer, M.A., y otros. Ac. Press. N.Y. 18, 257-345.
- FRANCKI, R.I.B. and RANGLES, J.W. (1979) en Rhabdoviruses. ed por Bishop, D.H.L. C.R.C. Press.
- FRANCKI, R.I.B., (1981) Plant Virus Taxonomy en Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. ed. por Kurstak. Elsevier/North-Holland Biomed. Press. 1, 3-16.
- FRANCKI, R.I.B. and HATTA, T. (1981) Tomato Spotted wilt virus en Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis ed. por Kurstak Elsevier/North-Holland Biomed. Press. 17, 492-512.
- FRANCKI, R.I.B., KITAJIMA, E.W. and PETERS, D. (1981) Rhabdoviruses en Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, ed. por Kurstak Elsevier/North-Holland Biomed. Press. 16, 455-489.
- FRANCKI, R.I.B., MILNE, R.G., and HATTA, T. (1984) Atlas of Plant Viruses. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- FREITAG, J.H., (1956). Beetle transmission, host range, and properties of Squash Mosaic Virus. Phytopathology 46, 73-81.
- FREUND, J., 1947. Some aspects of active immunization. Ann. Rev. Microbiol. 1, 291.
- GARCIA-LUQUE, I., DIAZ-RUIZ, J.R., RUBIO-HUERTOS, M. and KAPER, J.M. (1983) Cucumovirus survey in Spanish economically important crops. Phytopath. medit. 22, 127-132.
- GARCIA-LUQUE, I., SERRA, M.T., ALONSO, E., WICKE, B., FERRERO, M. y DIAZ-RUIZ, J.R. (1990) Characterization of a Spanish Strain of Pepper Mild Mottle Virus (PMMV-S) and its Relationship to Other Tobamoviruses. J. Phytopathology (en prensa).
- GARRET, R.G., COOPER, J.A., and SMITH, P.R. (1985) Virus Epidemiology and Control en The Plant Viruses. vol. 1 ed. por Francki, R.I.B. Plenum Press. New York 269-297.
- GEBRE-SELASSIE, K., CHABRIERE, C. y MARCHOUX, G. (1989) El despertar de un virus. Tomato Spotted Wilt sobre cultivos hortícolas y florales. Phytoma, 14, 25-31.
- GEELAN, J.L.M.C., VAN KAMMEN, A., and VERDUIN, B.J.M. (1972)

- Structure of the capsid of Cowpea Mosaic Virus. The chemical subunit: molecular weight and number of subunits per particle. Virology, 49, 205-213.
- GETTNER, M.E. and HILLIER, J., (1950). Improved Ultrathin Sectioning of Tissue for Electron Microscopy. J. Appl. Phys. 21, 889.
- GIBBS, A.J. and HARRISON, B.D., (1976) Plant Virology. The Principles. ed. por Edward Arnold. London
- GLAUERT, A.M., and GLAUERT, R.H. (1958) Araldite as an Embedding Medium for Electron Microscopy. J. Biophys. Biochim. Cytol. 4, 191.
- GOELET, P., LOMONOSSOFF, G.P., BUTLER, P.J.G., AKAM, M.E., GAIT, M.J., and KARN, J. (1982) Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5818-5822.
- GOLDBACH, R.W. (1986) Molecular evolution of plant RNA viruses. Ann. Rev. Phytopathol. 24, 289-310.
- GOLDBACH, R. and VAN KAMMEN, A. (1985) Structure, Replication, and Expression of the Bipartite Genome of Cowpea Mosaic Virus en Molecular Plant Virology, vol II ed. por Davis, J.W. CRC Press, Boca Raton, Florida pp. 83-120.
- GORDON, L.K. (1981) A Reliable Method for Repetitively Bleeding Rabbits from the Central Artery of the Ear. J. Immunol. Meth., 44, 241-245.
- HALL, C. E. (1955) Electron Densitometry of Stained Virus Particles. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 1
- HALL, C.E. (1970) Microscopia Electrónica. URMO. Bilbao.
- HAMILTON, R. I. EDWARDSON, J. R., FRANCKI, R. I. B., HSU, H. T., HULL, R. KOENIG, R. and MILNE, R. G. (1981) Review Article. Guidelines for the Identification and Characterization of Plant Viruses. J. Gen. Virol., 54, 223-241.
- HAWKES, R., NIDAY, E. and GORDON, J. (1982) A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and Other Antibodies. Anal. Biochem. 119, 142-147.
- HENRIQUES, M. I. C. and HENRIQUES, F. S. (1986) Association of malva vein-clearing virus and rhabdoviruslike particles with mottle and vein clearing of malva plants. Can. J. Bot. 64,

85-89.

- HIEBERT, E. and PURCIFULL, D.E. (1981) Mapping of the two coat protein genes on the middle RNA component of Squash Mosaic Virus (Comovirus group). Virology, 113, 630-636.
- HOLLINGS, M. and BRUNT, A.A. (1981a) Potyvirus Group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 245.
- HOLLINGS and BRUNT, A.A. (1981 b) Potyviruses. Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Ed. por Kurstak, Elsevier/North Holland Biomed. Press., 23, 730-807.
- HORNE, R. W., and RONCHETTI, I.P. (1974) A Negative Staining-Carbon Film Technique for Studying Viruses in the Electron Microscope I. Preparative Procedures for Examining Icosahedral and Filamentous Viruses. J. Ultrastruct. Res. 47, 361-383.
- HUGUENOT, C., van den DOBBELSTEEN, G., de HAAN, P., WAGEMAKERS, C.A.M., DROST, G.A., OSTERHAUS, A.D.M.E., and PETERS, D. (1990) Deteccion of tomato spotted wilt virus using monoclonal antibodies and riboprobes. Arch. Virol. 110, 47-62
- HULL, R. (1978) The stabilization of the particles of turnip rosette virus. III. Divalent cations. Virology 89, 418-422.
- HULL, R., (1989) The Movement of Viruses in Plants. Annu. Rev. Phytopathol. 27, 213-240.
- HUSSEIN, M.E. and SHARAF, A., (1988) Viruses infecting Squash plants in Egypt: II- Identification of a Squash Mosaic Virus Strain (GIZA-I). 5th Internat. Cong. Plant. Pathol. Abst. Japan. pp 53
- HUXLEY, H.E. (1957) Program of the 15th. Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America, Cambridge. Mass, p.5 J. Appl. Phys. 28, 1369.
- IE, T.S. (1970) Tomato Spotted Wilt Virus. Descriptions of plant viruses C.M.I./A.A.B. 39, 4pp.
- IE, T.S. (1971) Electron Microscopy of Developmental Stages of Tomato Spotted Wilt Virus in Plant Cells. Virology 43, 468-479.
- IE, T.S. (1982) A Sap-transmissible, Defective Form of Tomato Spotted Wilt Virus. J. gen. Virol. 59, 387-391.

- ISRAEL, H.W. and WILSON, H.J. (1977) Pinwheel Inclusions and Plant Viruses en The Atlas of Insect and Plant Viruses ed. Maramorosch, K. 405-417.
- IZADPANAH, K. (1987) Squash Mosaic Virus as the Cause of Melon Veinbanding Mosaic in Iran. Journal of Phytopath. 120, 276-282.
- JACROT, B., (1975) Studies on the assembly of a spherical plant virus. J. Mol. Biol., 95, 433-446
- JONSSON, G. (1974) Localisation nucléaire et cytoplasmique de particules d'allure virale chez des sujets fasciés de Fusain (*Evonymus japonica* Thunb. et *Evonymus japonica* Thunb. var. *microphylla* Jaeger) Rev. gen. Bot. 81, 135-150.
- JORDA, C. y OSCA, J.M. (1989) Un nuevo virus en España: el TSWV Proc. V Cong. Nal. Fitopatol. pp 7 (Oct. 1989) Badajoz
- KAMEI, T., HONDA, Y. and MATSUI, C. (1969) Intracellular Appearance of Turnip Mosaic and Bean Yellow Mosaic Virus Particles. Phytopathology 59, 139-144.
- KAPER, J.M., DIENER, T.O. and SCOTT, H.A. (1965) Some physical and chemical properties of cucumber mosaic virus (Strain Y) and of its isolated ribonucleic acid. Virology 27, 54-72.
- KAPER, J.M. and GEELLEN, J.L.M.C. (1971) Studies on the stabilizing forces of simple RNA viruses. II Stability diassociation, and reassembly of Cucumber mosaic virus. J. Mol. Biol. 56, 277-294.
- KAPER, J.M. and WEST, C.K. (1972) Polyacrilamide gel separation and molecular weight determination of the components of cucumber mosaic virus RNA. Prep. Biochem. 2, 251-263.
- KAPER, J.M. and WATERWORTH, H.E. (1981) Cucumoviruses en Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. ed. por Kurstak, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 8, 257-332.
- KIM, K.S., and FULTON, J.P. (1971) Tubules with Viruslike Particles in Leaf Cells Infected with Bean Pod Mottle Virus. Virology 43, 329-337.
- KIM, K.S., and FULTON, J.P. (1972) Fine Structure of Plant Cells Infected with Bean Pod Mottle Virus. Virology 49

112-121.,

- KITAJIMA, E.W. and COSTA, A.S. (1966) Morphology and Developmental Stages of Gomphrena Virus. Virology 29, 523-539.
- KITAJIMA, E.W. and LAURITIS, J.A. (1967) Plant virions in plasmodesmata. Virology, 37, 681-685.
- KLOOTWIJK, J., KLEIN, I., ZABEL, P. and VAN KAMMEN, A., (1977) Cowpea Mosaic Virus RNAs Have neither m7GpppN... nor Mono-, Di- or Triphosphates at their 5' Ends. Cell, 11, 73-82.
- LAEMMLI, V.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assemptor of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- LASTRA, R. and MUNZ, K., (1969). Purification and Electron Microscopy of Squash Mosaic Virus. Phytopathology 59, 1429-1435.
- LESEMANN, D. and DORAISWAMY, S. (1975) Bullet-shaped Virus-like Particles in Chlorotic and Necrotic Leaf Lesions of Orchids. Phytopath. Z. 83, 27-39.
- LIMA, J.A.A., and AMARAL, M.R.G. (1985) Purificação e Sorologia de "Squash Mosaic Virus" Isolado de Melancia. Fitopatol. Bras. 10, 605-611.
- LOCKHART, B.E.L., FERJI, Z., and HAFIDI, B. (1982) Squash Mosaic Virus in Morocco. Plant Dis. 66, 1191-1193.
- LOCKHART, B.E.L., KHALESS, N., EL MAATAOUI, M. and LASTRA, R. (1985) Cynodon chlorotic streak virus, a previously undescribed plant Rhabdovirus infecting bermuda grass and maize in the mediterranean area. Phytopathology 75, 1094-1098.
- LOT, H., MARROU, J., QUIOT, J.B., et ESVAN, C. (1972) Contribution à l'étude du virus de la mosaïque du cocombre (CMV). II. Méthode de purification rapide du virus. Ann. Phytopathol. 4 25-38.
- LOT, H. and KAPER, J.M. (1976) Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus. Virology, 74, 209-222.
- LUFT, J.H. (1961) Improvements in Epoxi Resin Embedding Methods. J. Biophys. Biochim. Cytol., 9, 409.
- MAGYAROSY, A.C., BUCHANAN, B.B., and SCHURMANN, P. (1973) Effect of a

- Systemic Virus Infection on Chloroplast Function and Structure. Virology **55**, 426-438.
- MANIATIS, T., FRITSH, E.F., and SAMBROOK, J., (1982) Molecular cloning, a laboratory manual. C.S.H.L. New York.
- MARTELLI, G.P. and RUSSO, M., (1976) Unusual Cytoplasmic Inclusions Induced by Watermelon Mosaic Virus. Virology **72**, 352-362.
- MARTELLI, G.P., and RUSSO, M. (1977a) Plant Virus Inclusion Bodies. Adv. Virus Res. **21**, 175-266.
- MARTELLI, G.P., and RUSSO, M. (1977b) Rhabdoviruses of Plants. en The Atlas of Insect and Plant Viruses. ed. por Maramorosh. Academic Press, N.Y. 181-213
- MARTELLI, G. P., and RUSSO, M. (1984) Use of Thin Sectioning for Visualization and Identification of Plant Viruses. en Methods in Virology. ed. por Maramorosh, K. and Koprowski, H. Academic Press, Inc. VIII. 143-224.
- MARTELLI, G.P. and LAL, S.B. (1985) Ultrastructural observations on virus-diseased plants of the Kabul area. Phytopath. medit. **24**, 228-233.
- MARTELLI, G.P. and RUSSO, M. (1985) Virus-host Relationships: Symptomatological and Ultrastructural Aspects. En The Plant Viruses. Vol I Polyhedral Virions with Tripartite Genomes, ed. por R.I.B. Francki, pp 163-205. New York: Plenum
- MARTELLI, G.P., LI, Z. and PROTA, U. (1988) Ultrastructural observations on virus diseased plants from Henan and Shantung, People's Republic of China. Phytopath. medit. 148-156.
- MATTEONI, J.A., ALLEN, W.R. and BROADBEN, A.B. (1988) Tomato Spotted Wilt Virus in Greenhouse Crops in Ontario. Plant Dis. **72**, 801.
- MATTHEWS, R.E.F. (1957) Plant Virus Serology. Cambridge University Press, London. 127 pp.
- MATTHEWS, R.E.F. (1967) Serological Techniques for Plant Viruses. en Methods in Virology. ed. por Maramorosch, K. and Koprowski, H. Academic Press, Inc. III. 199-241.
- MATTHEWS, R.E.F. (1979) The classification and nomenclature of

- viruses:Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Intervirolgy 12, 2-12
- MATTHEWS,R.E.F. (1981) Plant Virology Second Edition. Academic Press, New York, 897pp
- MATTHEWS,R.E.F. (1982) Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses:Classification and nomenclature of viruses. Intervirolgy 17,4-199
- MATTHEWS,R.E.F. (1984) Clasificación y nomenclatura de los virus. Cuarto informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus. Soc. Espñ. Microbiol. 230 pp.
- MATTHEWS,R.E.F. (1987) The changing scene in plant virology. Ann.Rev.Phytopathol., 25, 10-23
- MAZZONE, H.M., INCARDONA, N.L. and KAESBERG, P. (1962) Biochemical and Biophysical Properties of Squash Mosaic Virus and Related Macromolecules. Biochem. Biophys. Acta 55, 164-175.
- McLEOD,P.J., SCOTT,H.A.and KLINE,A.S.(1988) Squash Mosaic Virus (Serotype I) Isolated from Cucurbita foetidissima in Northwest Arkansas. Plant Dis. 72, 362.
- McMASTER,G.K. and CARMICHAEL,G.G. (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Biochemistry 74, 4835-4838.
- McWHORTER,F.P. (1965) Plant Virus Inclusions. Ann. Rev. Phytopath. 3, 287-312.
- MILNE,R. G. (1966) Multiplication of Tobacco Mosaic Virus in Tobacco Leaf Palisade Cells. Virology, 28,520.
- MILNE,K.S.,GROGAN,R.G. and KIMBLE,K.A. (1969) Identification of Viruses Infecting Cucurbits in California. Phytopathology, 59, 819-828.
- MILNE,R.G. (1970) An Electron Microscope Study of Tomato Spotted Wilt Virus in Sections of Infected Cells and in Negative Stain Preparations. J.gen. Virol. 6, 267-276.
- MILNE, R. G. (1984) Electron Microscopy for the Identification of Plant Viruses in in vitro Preparations. Methods in Virology. ed. por Maramorosch, K. and

- Koprowski, H., Academic Press, N.Y. . . . III, 87-120.
- MOGHAL, S.M. and FRANCKI, R.I.B. (1981) Towards a System for the identification and classification of Potyviruses. II. Virus Particle Length, Symptomatology, and Cytopathology of Six Distinct Viruses. Virology **112**, 210-216.
- MOHAMED, N.A., RANGLES, J.W. and FRANCKI, R.I.B. (1973) Protein Composition of Tomato Spotted Wilt Virus. Virology **56**, 12-21
- MONIS, J., SCOTT, H.A. and GERGERICH, R.C. (1986) Effect of Beetle Regurgitant on Plant Virus Transmission Using the Gross Wounding Technique. Phytopathology, **76**, 808-811.
- MORGAN, C. and ROSE, H.M. (1967) The Application of Thin Sectioning. in Methods in Virology. ed. por Maramorosch, K., and Koprowski, H., Academic Press. New York. vol III.
- NAMETH, S.T., DODDS, J.A., PAULUS, A.O. and LAEMMLEN, F.F. (1986) Cucurbit Viruses of California. Plant Dis. **70**, 8-11.
- NELSON, M.R., and KNUHTSEN, H.K. (1973a) Squash Mosaic Virus Variability: Epidemiological Consequences of Differences in Seed Transmission Frequency Between Strains. Phytopathology **63**, 98-920.1
- NELSON, M.R., and KNUHTSEN, H.K. (1973b) Squash Mosaic Virus Variability: Review and Serological Comparisons of six Biotypes. Phytopathology **63**, 920-926.
- NISHIGUCHI, M., MOTOYOSHI, F., and OSHIMA, M (1978) Behavior of a temperature sensitive strain of tobacco mosaic virus in tomato leaves and protoplasts. J. Gen. Virol. **39**, 53-61.
- OUCHTERLONY, Ø. (1948) In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. Acta path. microbiol. scand. **25**, 186.
- OUCHTERLONY, Ø. (1949) Antigen-antibody reactions in gels. Acta Pathol. Microbiol. Scand. **26**, 507.
- OUCHTERLONY, Ø. and NILSSON, L.A. (1986) Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. en Immunochemistry Handbook of Experimental Immunology. ed. por Weir, D.M. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 4 ed. **I**, 32 1-50.
- PALADE, G.E. (1952) A Study of Fixation for Electron Microscopy. J. Exp. Med. **95**, 285.

- PALUKAITIS, P. and ZAITLIN, M. (1986) Tobacco Mosaic Virus: Infectivity and Replication en The Plant Viruses, vol. 2 ed. por Van Regenmortel, M.H.V. and Fraenkel-Conrat. Plenum Press. New York 105-131.
- PETERS, D. (1981) Plant Rhabdovirus Group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 244.
- PURCIFULL, D.E., and HIEBERT, E. (1979) serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. Phytopathology 69, 112-116.
- RAGOZZINO, A. (1973) Infezione del Virus del Mosaico della Zucca e del Mosaico del Cocomero in Campania. Inform. Fitopat. 4, 15-16.
- REDDICK, B.B., HADDEN, C.H., BOST, S.C. and NEWMAN, M.A. (1988) First Report of Tomato Spotted Wilt Virus in Tennessee. Plant Dis. 71, 376.
- REYNOLDS, E.S. (1963) The use of Lead Citrate at High pH and Electron-Opaque, Stain in Electron Microscopy. J. Cell. Biol. 17, 208.
- REZELMAN, G., FRANSSSEN, H.J., GOLDBACH, R.W., IE, T.S., and VAN KAMMEN, A. (1982) Limits to the Independence of Bottom Component RNA of Cowpea Mosaic Virus. J. gen. Virol. 60, 335-342
- ROBERTS I.M. and HARRISON, B.D. (1970) Inclusion Bodies and Tubular Structures in *Chenopodium amaranticolor* Plants Infected with Strawberry Latent Ringspot Virus J. Gen. Virol. 7, 47-54.
- ROSEMEYER, M.E., BROWN, J.K., and NELSON, M.R. (1986) Five Viruses Isolated from Field-Grown Buffalo Gourd (*Cucurbita foetidissima*), a Potential Crop for Semiarid Lands. Plant Dis. 70, 405-409.
- RODRIGUEZ, J.L., DIAZ-RUIZ, J.R. and FLORES, R. (1988) Isolation and Characterization in *Gynura aurantiaca* of a Possible Citrus Rhabdovirus. J. Phytopathology 123, 69-78.
- RUBIO-HUERTOS, M. (1950) Estudio sobre las Inclusiones Intracelulares producidas por Virus en las Plantas. Microbiol. Española 3, 207-231.
- RUBIO-HUERTOS, M. (1956) Los virus de las plantas. Monograf.

- Cien.Moderna., 56, ed. por Inst. Edafol. Fisiol. Veg.CSIC. 161pp
RUBIO-HUERTOS,M. (1964) Estudio al microscopio óptico y electrónico de un virus aislado de *Pisum sativum*. Microbiol. Españ. 17, 1-13.
- RUBIO-HUERTOS,M. and GARCIA HIDALGO,F. (1964) Ultrathin Sections of Intranuclear and Intracytoplasmic Inclusions Induced by Severe Etch Virus. Virology 24,84-90.
- RUBIO-HUERTOS,M. y LOPEZ-ABELLA,D. (1966) Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. Microbiol. Españ. 19,1-10.
- RUBIO-HUERTOS,M. and VELA-CORNEJO,A. (1966) Light and Electron Microscopy of Virus Inclusions in *Amaranthus lividus* Cells. Protoplasma, Bd.LXII/2-3, 184-193.
- RUBIO-HUERTOS, M. and BOS,L. (1969) Morphology and intracellular localization of bacilliform virus particles associated with the clover enation disease. Neth. J. Pl. Path. 75, 329-337.
- RUBIO-HUERTOS,M. (1972) Inclusions Bodies en Principles and Techniques in Plant Virology. ed. por Kado,C.I. and Agrawal,H.O. Van Nostrand Rein. Co. N.Y. 62-75.
- RUBIO-HUERTOS,M. and PEÑA-IGLESIAS,A. (1973) Bacilliform particles in cortex cells of *Cucumis melo* fruits. Plant.Dis.Rep. 57, 649-652.
- RUBIO-HUERTOS, M. (1978) Atlas on Ultrastructure of Plant Tissues Infected with Viruses. C.S.I.C. Madrid.
- RUBIO-HUERTOS,M. and GARCIA-HIDALGO,F. (1982) A Rhabdovirus Resembling Lettuce Necrotic Yellows from Lettuce in Spain. Phytopath. Z. 103, 232-238.
- RUBIO-HUERTOS,M., DIAZ-RUIZ,J.R., LOPEZ ABELLA,D., MORENO,R. y SANTAOLALLA,M. (1985) Microscopía Fotónica y Electrónica en el Diagnóstico de Virosis de Plantas. An. Inst. Nal. Inv.Agrarias. 28, 311-321.
- RUBIO-HUERTOS,M. y RUBIO-SAEZ,M. (1986) Algunos datos aclaratorios para las hipótesis de ensamblaje de Rhabdovirus de plantas. Microbiol. Españ. 39, 29-39.
- RUSSO,M., MARTELLI,G.P. and RANA,G.L. (1975) A Rhabdovirus of

- Cynara in Italy. Phytopath. **73**, 223-231.
- BRUSSO, M., and MARTELLI, G.P. (1976) Unusual cytoplasmic inclusions induced by watermelon mosaic virus. Virology **72**, 352-362.
- RYBICKI, E.P. and von WECHMAR, M.B. (1985) Serology and Immunochemistry en The Plant Viruses I ed. por Franki, R.I.B. Plenum press. N.Y. 207-244.
- RYTER, A., and KELLENBERGER, E. (1958) L'Inclusion au Polyester pour l'Ultramicrotomie. J. Ultras. Res. **2** 200.
- SHAPIRO, S.Z. and YOUNG, J.R. (1981) An Immunochemical Method form RNA Purification. J. Biol. Chem. **25**, 1495-1498.
- SAVITHRI, H.S., SURYANARAYANA, S. and MURTHY, M.R.N. (1989) Structure-function relationships of icosahedral plant viruses. Arch. Virol. **109**, 153-172.
- SHEPARD, J.F. (1968) Electron microscopy of subtilisin treated tobacco etch virus nuclear and cytoplasmic inclusions. Virology **36**, 20-29.
- SHERWOOD, J.L., SANBORN, M.R., KEYSER, G.C. and MYERS, L.D. (1989) Use of Monoclonal Antibodies in Detection of Tomato Spotted Wilt Virus. Phytopathology **79**, 61-64.
- SHIKATA, E. Tobamovirus (Tobacco Mosaic Virus) Group. (1977) en The Atlas of Insect and Plant Viruses. Ultrastructure in Biological Systems. Ed. por Maramorosch, K., Academic Press, New York. 237-255.
- SHUKLA, D.D., and WARD, C.W. (1989a) Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Arch. Virol. **106**, 171-200.
- SHUKLA, D.D. and WARD, C.W. (1989b) Structure of Potyvirus Coat Proteins and its Application in the Taxonomy of the Potyvirus Group. Adv. Virus Res. **36**, 273-314.
- SPIESS, E., ZIMMERMANN, H.P., and LUNSDORF, H. (1987) Negative Staining of Protein Molecules and Filaments. in Electron Microscopy in Molecular Biology a Practical Approach. Sommerville, ed. IR Press.
- STACE-SMITH, R. (1981) Comovirus. Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Kurstak, E., ed. Elsevier/North

- Holland. Biomedical Press. 171-195.
- STEFANAC,Z and LJUBESIC,N. (1971) Inclusion Bodies in Cells Infected with Radish Mosaic Virus J.Gen.Virol. 13,51-57.
- STONER, W.N. (1963) A mosaic virus transmitted by beetles and grasshopper. Phytopathology 53, 890
- STRAUSS,J.H. and STRAUSS,E.G., (1988) Evolution of RNA Viruses. Ann.Rev.Microbiol., 42, 657-683
- TEAKLE,D.S. and PARES,R.D. (1977) Potyvirus (Potato Virus Y) Group en The Atlas of Insect and Plant Viruses.ed. por Maramorosch Academic Press. N.Y. 311-315.
- TOLIN,S.A. (1977) Cucumovirus en The Atlas of Insect and Plant Viruses, including Mycoplasma Viruses and Viroids ed. por Maramorosch,K. Academic Press, New York. 303-306
- TOLLIN,P. and WILSON,H.R. (1988) Particle Structure en The Plant Viruses, vol.4 The Filamentous Plant Viruses. ed. por Milne,r.g. Plenum Press.51-83
- TOMENIUS,K., CLAPHAM,D., and MESHI,T. (1987) Localization by immunogold cytochemistry of the virus coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. Virology, 160, 363-371
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., and GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76,4350-4354
- TRAD,J.,PEÑA,L.,DIAZ,M.V. y DIAZ-RUIZ,J.R.,(1990) El Virus de las manchas bronceadas del tomate (TSWV): un nuevo peligro para los cultivos hortícolas y ornamentales españoles. II Cong. Nal. Virol. Valladolid. Lib. Res. pp 177.
- VAN DER SCHEER,C and GROENEWEGEN,J. (1971) Structure in cells of Vigna unguiculata infected with Cowpea Mosaic Virus Virology, 46 493-497.,
- VAN KAMMEN,A. (1967) Purification and properties of the components of Cowpea Mosaic Virus. Virology 31, 633-642.
- VAN KAMMEN,A. and MELLEMA,J.E. (1977) Comoviruses en The Atlas of Insect and Plant Viruses. Ultrastructure in Biological Systems. Ed. por Maramorosch,K., Academic Press, New York. 8, 167-197

- VAN KAMMEN, A. and JAGER, C.P. (1978) Cowpea Mosaic Virus. CMI/AAB Descriptions. 197, 6pp.
- VAN LENT, J., WELLINK, J. and GOLBACH, R. (1990) Evidence for the involvement of the 58K and 48k proteins in the intercellular movement of cowpea mosaic virus. J. gen. Virol. 71, 219-223.
- VAN LOON, L.C. (1987) Disease induction by plant viruses. Adv. Virus Res. 33, 205-255.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1966) Plant Virus Serology. en Advances in Virus Research, ed. por Smith, K.M. and Lauffer, M.A. Academic Press, N.Y. 12, 207-271.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1967) Serological Studies on Naturally Occurring Strains and Chemically Induced Mutants of Tobacco Mosaic Virus. Virology 31, 467-480.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1971) Watermelon Mosaic Virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. 63, 4pp.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1977) Watermelon Mosaic Virus Group. en The Atlas of Insect and Plant Viruses ed. por Maramorosch, K. Academic Press N.Y. 323-329.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1981) Tobamoviruses en Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis ed. por Kurstak, E., Elsevier/NorthHolland. Biomedical Press. 541-564.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1982) Serology and Immunochemistry of Plant Viruses. Academic Press. New York. 302pp.
- VELA, A. y RUBIO-HUERTOS, M. (1972) Ultraestructura de hojas de Digitalis Thapsi infectadas espontáneamente con dos virus. Microbiol. Españ. 25. 1-18.
- VERKLEIJ, F.N. and PETERS, D. (1983) Characteriation of a Defective Form of Tomato Spotted Wilt Virus. J. gen. Virol. 64 677-686.
- WEBB, R.E., and SCOTT, H.A. (1965) Isolation and identification of watermelon mosaic viruses 1 and 2. Phytopathology 55, 895-900.
- WEBER, K. and OSBORN, M. (1969) The reliability of macromolecular weight determinations by sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.
- WEEINTRAUB, M., AGRAWAL, H.O., and RAGETLI, H.W.J. (1973)

- Cytoplasmic and nuclear inclusions in leaf cells infected with Datura shoestring virus (DSV) Can. J. Botany 51, 855-861
- WELINK, J., and VAN KAMMEN, A. (1989) Cell-to cell transport of cowpea mosaic virus requires both 58k/48k proteins and the capsid proteins. J. Gen. Virol., 70, 2279-2286.
- WETTER, C., CONTI, M., ALTSCHUH, R., TABILLION, R., and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1983) Pepper Mild Mottle Virus, a Tobamovirus Infecting Pepper Cultivars in Sicily. Phytopathology 74, 405-410.
- WETTER, C., DORE, I., and BERNARD, M., (1987) Bell pepper mottle virus, a distinct Tobamovirus infecting pepper. J. Phytopathology 119, 333-344.
- WOLF, S., DEOM, C.M., BEACHY, R.N. and LUCAS, W.J. (1989) Movement Protein of Tobacco Mosaic Virus Modifies Plasmodesmal Size Exclusion Limit. Science, 246, 377-379.
- ZAITLIN, M., and HULL, R. (1987) Plant Virus-Host Interactions. Ann. Rev. Plant Physiol., 38, 291-315.