

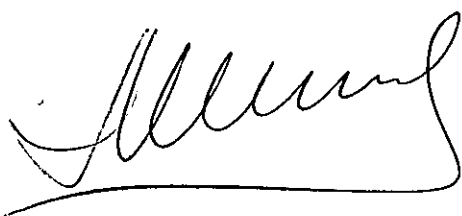


T 581.2  
BLA  
est

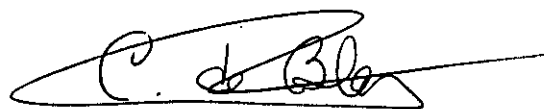
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**"Estudios sobre técnicas de detección de virus y patógenos  
subvirales vegetales y búsqueda de resistencia al virus del  
mosaico del pepino (CMV) en germoplasma de pimiento".**

Memoria presentada por  
CARMEN DE BLAS BEORLEGUI  
para optar al grado de  
DOCTOR en CIENCIAS BIOLÓGICAS



Director: Dr. JAVIER ROMERO CANO  
Investigador principal del CIT-INIA



Madrid, 1992

R. 21. 752

*A mis viejos compañeros del laboratorio de Virología Vegetal,  
cuando éramos CRIDA-06.*

*A mi padre, que ya no está, y a mi madre.*

*A Gerardo y a nuestros hijos.*

*¡Oh, Dios, dame una visión sin nubes y  
líbrame de la prisa!*

*Dame el valor de oponerme a toda vanidad y  
de proseguir, lo mejor que pueda y hasta el  
final, cada una de mis tareas.*

*Dame la voluntad de no aceptar nunca  
reposo ni homenaje antes de haber podido  
comprobar que mis resultados corresponden  
a mis cálculos o de haber podido descubrir y  
enmendar mis errores.*

*Sinclair Lewis, El doctor Arrowsmith.*

# AGRADECIMIENTOS

*Muchísimas personas han contribuido a la realización de esta tesis. Algunas de forma indirecta, como los millones de contribuyentes españoles, con cuyos impuestos han mantenido mi sustento a lo largo de estos años. O el personal del INIA, que me concedió un puesto de trabajo hace ya años, y en cuyos laboratorios del Departamento de Protección Vegetal he efectuado todos los experimentos que aquí describo. O los descubridores de la Coca-Cola y de la aspirina, sin cuya aportación a la humanidad me habría sido mucho más difícil la escritura de todas estas páginas.*

*Pero muchos también han intervenido de una forma muy directa, como:*

*- Los integrantes del laboratorio de Virología Vegetal, que tanto me han ayudado y enseñado, por su saber trabajar en equipo, y cuyo entusiasmo me ha hecho más llevadera esta ardua tarea de realizar la tesis. Por las reuniones de los miércoles, en las que se discutían los trabajos de todos, aprendiendo tanto sin darnos cuenta. Gracias a todos he disfrutado muchísimo a lo largo de estos cinco años de trabajo. Quiero expresar especialmente mi agradecimiento a Javier Romero, Fina Castro, y Gerardo Carazo, que en un viaje a Francia me convencieron de lanzarme a la aventura y luego me apoyaron en todo momento incondicionalmente. A Fernando Ponz por su amplia visión, y sus certeros consejos. A Flora Sánchez por su experimentada guía en algunos experimentos, por sus maravillosos protocolos y por el virus GFLV purificado. A María José Soto, con la que compartí y sufrí el intenso trabajo de la búsqueda de resistencia a virosis en germoplasma de pimiento y además me permitió analizar la presencia de CMV en sus muestras de pimiento de campo. A David Martínez, por su paciente ayuda innumerables veces en el ordenador, por sus explicaciones de cuestiones a veces difíciles para mí y por purificar el plásmido pT105 portador de un inserto del satélite de CMV. A Jesús Fresno, por ayudarme con las fotos. A Gerardo Carazo, Brígida García, Adela Redondo, y Margarita Calvo, que tantas veces me ayudaron a procesar las muestras de los ELISAS. A Paco Sánchez por su colaboración en el cuidado del invernadero. A Carmen Marcilla, por su infinita paciencia. A Fernando,*

flora, fina, Vicente, Jesús y Marga por las correcciones al manuscrito de la tesis, aparte naturalmente de a Javier, mi director. A nuestros convecinos del Area de Biología Molecular y Virología Vegetal, con los que compartimos casi todo, y especialmente por los seminarios de los jueves, tan enriquecedores. Al Dr. Jose M. Malpica y Vicente Torres, que ayudaron a la unión de los dos equipos.

- Gustavo Nolasco (U. C. T. A., Universidad del Algarve, Faro, Portugal), que pasó tres meses intensísimos con nosotros diciendo que venía a aprender, pero me enseñó muchísimo más a mí; por una colaboración fecunda y por haber podido disfrutar tanto trabajando.

- Nicolás Gonzales, del Centro de Conservación de Recursos fitogenéticos del CIT-INIA, que nos suministró las semillas de pimiento y realizó las autofecundaciones y los cruces en campo. El Dr. Luis Silvela, con sus pacientes explicaciones para enseñarme a abordar el tratamiento estadístico de las muestras analizadas por ELISA. El Dr. A. Schram (Zaadunie Biotechnology, Holanda), que nos cedió el plásmido pZU123A portador de la proteína de la cápsida de CMV. El Dr. B. D. Harrison, por el plásmido pT 105 portador de un inserto del satélite de CMV.

También quiero agradecer su ayuda en los muestreos de campo a Carlos Fabregás y Mario Serdá, del Servicio de Protección de los Vegetales de Amposta (Tarragona); Miguel García Morató, del Servicio de Transferencia y Tecnología de Moncada (Valencia), y Vicente Félix, del Servicio de Extensión Agraria de foios (Valencia); Elisa Sáez, del Servicio de Protección de Vegetales de Almería; fernando Pérez, del Servicio de Extensión Agraria de San Martín de Valdeiglesias (Madrid); y Rafael Ortiz y Jose Manuel Barreiro, de Hispareco (Badajoz).

Por enviarme diferentes patógenos al Dr. F. García Arenal (E.T.S.I.A., Madrid), por el aislado fny de CMV; a Ana Cano (C.R.I.A. Murcia) por las hojas de naranja infectadas con CTV; a la Dra. Maite Serra (C.I.B., C.S.I.C., Madrid) por las hojas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con PMMV; a Cristina Pérez de San Román (C.I.M.A., Vitoria) por los tubérculos de patata infectados con PLRV; al Dr. A. Schram (Zaadunie Biotechnology, Holanda) por las plantas de pimiento infectadas con TSWV; al Dr. Owens (U.S.D.A. Beltsville, MD, EEUU), por el PSTVd; al Dr. Barnett (U. de Carolina del Sur, Clemson, EEUU) por el TAV desecado.

*Por cederme fotos: al Dr. Ventura Padilla, de síntomas del CTV; a Cristina Pérez de San Román, de síntomas del PLRV; al Dr. Jesús Fresno, por la micrografía del CMV purificado; a Ramón Fisac, por el CMV en platanera.*

*A mi cuñado Toño, por sus maravillosos mapas.*

*Al Dr. Julián Perera, Profesor Titular de Biología Molecular y tutor de esta tesis, que siempre me recibió con toda amabilidad.*

*Y muy especialmente, quiero expresar mi agradecimiento a Gerardo, porque esta tesis nos cambió la vida, y sin embargo, se supo adaptar y rellenar los huecos que tantas veces dejé en casa. Y a Gerardo II y Carmen II, porque su sola presencia ayuda a poner las cosas en su sitio.*

# INDICE

O. ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCION	4
1. LOS VIRUS VEGETALES	5
2. PATOGENOS SUBVIRALES	10
2.1. Satélites	10
2.2. Viroides	11
3. EL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV).	11
3.1. Características biológicas.	13
3.2. La partícula viral.	15
3.3. Clasificación de cepas.	18
3.4. Propiedades del genoma.	19
3.5. Satélites de CMV.	20
3.6. CMV en España.	22
4. DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR LOS VIRUS Y PATOGENOS SUBVIRALES QUE AFECTAN A LAS PLANTAS.	23
4.1. Técnicas serológicas	24
4.2. Análisis de RNAs bicatenarios	26
4.3. Hibridaciones sobre membrana.	27
4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	28
5. CONTROL DE LOS VIRUS	29
5.1. Plantas libres de virus.	30
5.2. Plantas resistentes a virus.	30
5.2.1. Protección por RNAs satélites.	31
5.2.2. Protección cruzada.	31
5.2.3. Plantas transgénicas.	31
5.2.4. Genes de resistencia naturales	32
5.2.5. Resistencia a CMV en pimiento	33

II. OBJETIVOS	36
III. MATERIALES Y METODOS	39
1. MATERIALES	
1.1. Patógenos	40
1.2. Anticuerpos.	40
1.3. Soluciones y tampones	41
1.4. Medios de cultivo	42
1.5. Estirpes bacterianas.	42
1.6. Productos.	42
1.7. Equipo.	42
2. INOCULACION MECANICA DE LOS VIRUS.	43
3. TECNICAS INMUNOENZIMATICAS.	43
3.1. La técnica ELISA.	43
3.2. Estandarización de la técnica ELISA.	44
4. PURIFICACION DE CMV Y DE LOS RNAs VIRALES.	44
4.1. Purificación del virus	44
4.2. Extracción del RNA viral.	45
5. ANALISIS DE RNAs BICATENARIOS	45
6. DETECCION DE CMV POR HIBRIDACIONES SOBRE MEMBRANA	46
6.1. Clones de cDNA.	46
6.2. Transferencia tipo "Southern" de DNA a membranas.	49
6.3. "Dot blot" de macerados vegetales sobre membranas.	49
6.4. Marcaje de las sondas.	49
6.5. Hibridación con sondas radiactivas.	50
6.6. Hibridación con sondas no radiactivas (digoxigenina).	50
7. DETECCION DE VIRUS Y PATOGENOS SUBVIRALES POR AMPLIFICACION ENZIMATICA	
7.1. Oligonucleotidos cebadores.	51

7.2. RT-PCR a partir de un macerado vegetal.	51
7.3. RT-PCR basada en captura del virus con anticuerpos específicos en placas de microtitulación.	53
7.4. RT-PCR realizada sobre placas ensayadas previamente con la técnica ELISA.	54
7.5. RT-PCR basada en captura del virus por adsorción directa al poliestireno.	54
7.6. RT-PCR basada en captura de RNA bicatenario.	55
7.7. Cuantificación del DNA amplificado por fluorimetría.	55
8. DETECCION DE CMV EN MUESTRAS DE CAMPO.	55
9. BUSQUEDA DE RESISTENCIA A CMV EN GERMOPLASMA DE PIMIENTO.	56
IV. RESULTADOS.	58
1. PUESTA A PUNTO Y EVALUACION DE LAS TECNICAS DE DETECCION RUTINARIA DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO.	59
1.1. Detección de CMV por ELISA	59
1.1.1. Estandarización de la técnica.	59
1.1.1.1. Tiempo idóneo de lectura	59
1.1.1.2. Positivo o negativo	61
1.1.1.3. Determinación de subgrupo	61
1.1.1.4. Tampón de extracción	62
1.1.2. Límite de detección con un macerado vegetal	62
1.1.3. Límite de detección con virus purificado	66
1.2. Detección de CMV por análisis de los RNAs bicatenarios.	66
1.3. Detección de CMV por hibridaciones sobre membrana ("dot blot")	68
1.4. Detección de CMV por RT-PCR en un macerado vegetal.	68
2. DETECCION DE VIRUS Y PARTICULAS SUBVIRALES POR RT-PCR PREVIA CAPTURA EN PLACAS DE MICROTITULACION	71
2.1. Captura del virus con anticuerpos específicos.	71
2.2. Captura inespecífica del virus.	82
2.3. Análisis de resultados por fluorimetría.	82

3. DETECCION DE CMV EN MUESTRAS DE CAMPO	84
4. BUSQUEDA DE RESISTENCIA A CMV EN GERMOPLASMA DE PIMIENTO.	87
V. DISCUSION.	93
1. TECNICAS DE DETECCION DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV)	94
ELISA	94
Análisis de RNAs bicatenarios	96
Hibridaciones sobre membrana ("dot blot")	97
RT-PCR	98
Límite de detección	99
2. DETECCION DE VIRUS Y PATOGENOS SUBVIRALES POR RT-PCR PREVIA CAPTURA EN UNA PLACA DE MICROTITULACION.	101
3. DETECCION DE CMV EN CAMPO.	105
4. BUSQUEDA DE RESISTENCIA EN GERMOPLASMA DE PIMIENTO	107
VI. CONCLUSIONES	110
VII. BIBLIOGRAFIA	114
ANEXO I	137
ANEXO II	151

## **O. ABREVIATURAS**

**AL:** Almería

**AMV:** alfalfa mosaic virus: virus del mosaico de la alfalfa

**ArMV:** Arabis mosaic virus: virus del mosaico del Arabis

**ASBVd:** viroide de las manchas solares del aguacate

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BA:** Badajoz

**BBWV:** broad bean wilt virus: virus del marchitamiento del haba

**bc:** bicatenario

**BCMV:** bean common mosaic virus: virus del mosaico común de la judía

**BPYV:** beet pseudo-yellows virus: virus del pseudo-amarilleamiento de la remolacha

**BYMV:** bean yellow mosaic virus: virus del mosaico amarillo de la judía

**BWYV:** beet western yellows virus: virus del amarilleo occidental de la remolacha

**CARNA5:** RNA 5 asociado a CMV

**cebador 3':** cebador complementario al extremo 3' del fragmento que se quiere amplificar

**cebador 5':** cebador homólogo al extremo 5' del fragmento que se quiere amplificar

**CCCVd:** viroide del cadang cadang del cocotero

**CCRF:** Centro de Conservación de Recursos Fitogenéticos

**cDNA:** ácido desoxirribonucleico complementario

**CIB:** Centro de Investigaciones Biológicas

**CIT-INIA:** Centro de Investigación y Tecnología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

**CLRV:** Cherry leaf roll virus: virus del enrollado del cerezo

**CMV:** Cucumber mosaic virus : virus del mosaico del pepino

**CPMV:** cowpea mosaic virus: virus del mosaico de la carilla

**CRIA:** Centro Regional de Investigaciones Agrarias

**cRNA:** ácido ribonucleico complementario

**CSIC:** Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**CTV:** citrus tristeza virus: virus de la tristeza de los cítricos

**dATP:** 5'-trifosfato de desoxiadenosina

**dCTP:** 5'-trifosfato de desoxicitidina

**DEPC:** pirocarbonato dietílico

**dGTP:** 5'-trifosfato de desoxiguanosina

dig-dUTP: 5'-trifosfato de desoxiuracilo-11-digoxigenina  
dNTP: 5'-trifosfato de desoxinucleósido  
dTTP: 5'-trifosfato de desoxitimidina  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; N-(2-(N'-N' biscoximetil) aminoetil) -N-carboximetilglicina  
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay  
ELISA-DAS: ELISA directo doble sandwich  
ELISA-TAS: ELISA indirecto triple sandwich  
GFLV: grapevine fanleaf virus: virus del entrenudo corto de la vid  
HLVd: hop latent viroid: viroide latente del lúpulo  
HpMV: hop mosaic virus: virus del mosaico del lúpulo  
HPRI: human placental ribonuclease inhibitor: inhibidor de ribonucleasas de placenta humana  
LE: León  
LMV: lettuce mosaic virus: virus del mosaico de la lechuga  
LO: Logroño  
M: Madrid  
mc: monocatenario  
M-MLV-RT: Transcriptasa inversa del virus Moloney de la leucemia murina.  
MU: Murcia  
NA: Navarra  
nt: nucleótido  
O/N: overnight: 12-16 h (toda la noche)  
ORF: fase de lectura abierta  
PA: Palencia  
pb: pares de bases  
PCR: polymerase chain reaction: reacción en cadena de la polimerasa  
PLRV: potato leaf roll virus: virus del enrollado de la patata  
PMMV: pepper mild mottle virus: virus del moteado suave del pimiento  
PO: Pontevedra  
PPV: plum pox virus: virus de la Sharka  
PSTVd: potato spindle tuber viroid: viroide del tubérculo ahusado de la patata  
PSV: peanut stunt virus: virus del enanismo del cacahuete  
p/v: peso/volumen  
PVY: potato virus Y: virus Y de la patata  
RF: forma replicativa

**RNA:** ácido ribonucleico  
**RRSV:** raspberry ringspot virus: virus de las manchas en anillo del frambueso  
**RT:** reverse transcriptase: transcripción inversa  
**RT-PCR:** reacción de transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa  
**SBMV:** southern bean mosaic virus: virus del mosaico de la judía del sur  
**SCSV:** virus del enanismo del trébol subterráneo  
**SDS:** dodecilsulfato sódico  
**SIA:** Servicio de Investigación Agraria  
**SO:** Soria  
**SPV:** Servicio de Protección de los Vegetales.  
**STNV:** satélite del virus de la necrosis del tabaco  
**STRSV:** satélite del virus de las manchas en anillo del tabaco  
**T:** Tarragona  
**TAV:** tomato aspermy virus: virus de la aspermia del tomate  
**TBRV:** virus de los anillos negros del tomate  
**TBSV:** tomato bushy stunt virus: virus del achaparrado peludo del tomate  
**TEV:** tobacco etch virus: virus del grabado del tabaco  
**TMV:** tobacco mosaic virus: virus del mosaico del tabaco  
**TNV:** tobacco necrosis virus: virus de la necrosis del tabaco  
**ToMV:** tomato mosaic virus: virus del mosaico del tomate.  
**ToRSV:** tomato ringspot virus: virus de las manchas en anillo del tomate.  
**Tris:** trihidroximetilaminoetano; 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol.  
**tRNA:** ácido ribonucleico de transferencia  
**TRSV:** tobacco ringspot virus: virus de las manchas en anillo del tabaco  
**TSWV:** tomato spotted wilt virus: virus del bronceado del tomate  
**U:** Universidad  
**V:** Valencia  
**Z:** Zaragoza  
**ZMV:** zucchini mosaic virus: virus del mosaico del calabacín

# INTRODUCCION

# I. INTRODUCCION

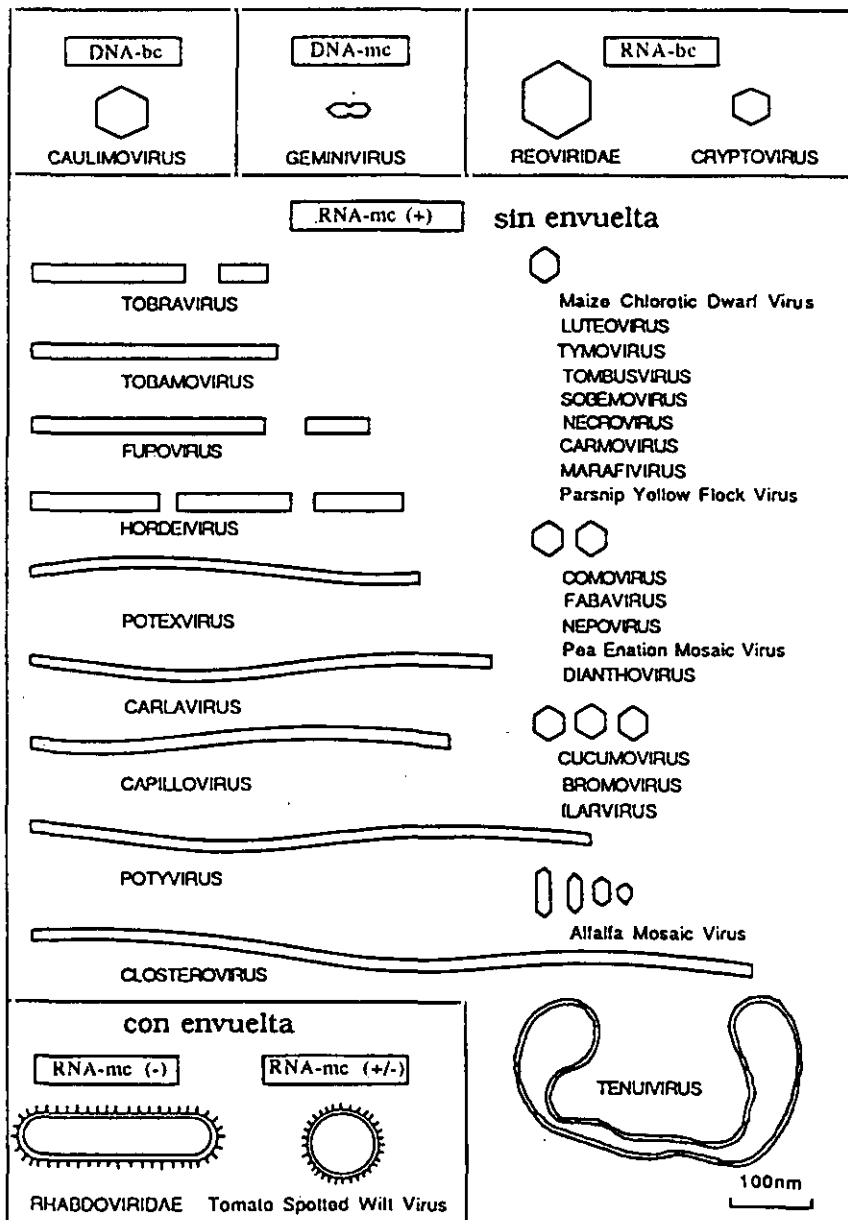
## 1. LOS VIRUS VEGETALES.

Los virus son partículas nucleoproteicas no visualizables al microscopio óptico, se multiplican sólo en las células vivas, y pueden causar multitud de enfermedades. En general, entre los patógenos de plantas, los virus son, después de los hongos, los que producen mayores pérdidas en los cultivos agrícolas. Se conocen alrededor de setecientos virus vegetales, cuyo ácido nucleico es bien RNA (monocatenario en la mayoría de los casos, o bicatenario), o bien DNA (monocatenario o bicatenario). El genoma se presenta rodeado de una cubierta proteica constituida por moléculas de proteína que en la mayoría de los virus son de un solo tipo. Algunos de los virus más complejos llevan una envuelta externa de lipoproteína. La Figura 1 muestra la variabilidad en tamaños y formas encontrados en los virus vegetales (Matthews, 1991).

Los genomas virales pueden codificar para varias proteínas, tanto estructurales como la proteína de cubierta, como no estructurales como proteasas, proteínas implicadas en la replicación (las replicasas son RNAs polimerasas RNA-dependientes que realizan copias de genomas enteros; las helicasas (Gorbalenya et al, 1989) desenrollan el ácido nucleico y están implicadas en replicación, recombinación, reparación y expresión del genoma RNA o DNA), o proteínas de movimiento.

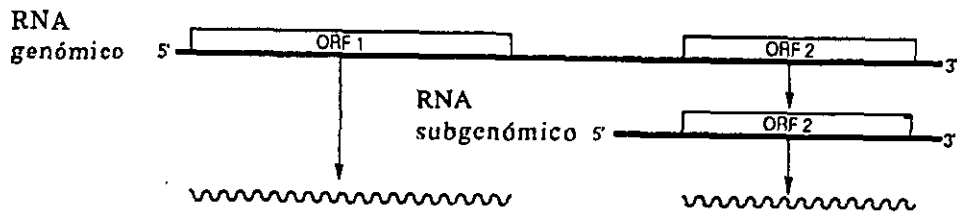
En los sistemas eucariotas de síntesis de proteínas los RNA mensajeros contienen una sola fase de lectura abierta (ORF), y los ribosomas traducen solamente las ORFs situadas en el extremo 5'. Los virus vegetales han desarrollado básicamente cinco estrategias, ilustradas en la Figura 2, para sintetizar proteínas a partir de un genoma RNA que contenga más de un gen, y cada grupo de virus adopta una o más de estas estrategias (Matthews, 1991):

- a) RNAs subgenómicos (cucumovirus, closterovirus). La síntesis de uno o más RNAs subgenómicos permite la traducción de la ORF situada en su extremo 5'.
- b) Genomas divididos en varios segmentos (cucumovirus, nepovirus). Se traduce el gen situado en el extremo 5' de cada RNA.
- c) Poliproteínas. Una sola ORF se traduce para dar una (en el caso de los potyvirus) o dos (en el caso de los comovirus) poliproteínas, que posteriormente se escinden mediante proteasas codificadas por el propio virus liberando las proteínas funcionales.

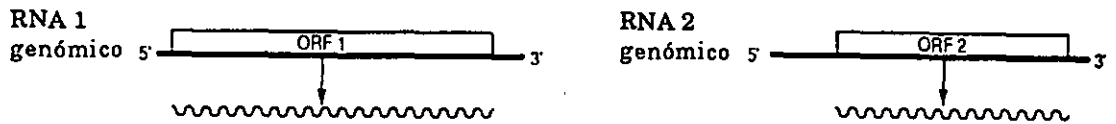


**Fig 1.** Familias y grupos de virus que infectan a las plantas (Matthews, 1991). Un grupo adicional, el del virus del moteado amarillo de la commelina, formado por partículas baciliformes con DNA bicatenario, fue aprobado por la I. C. T. V. en 1990.

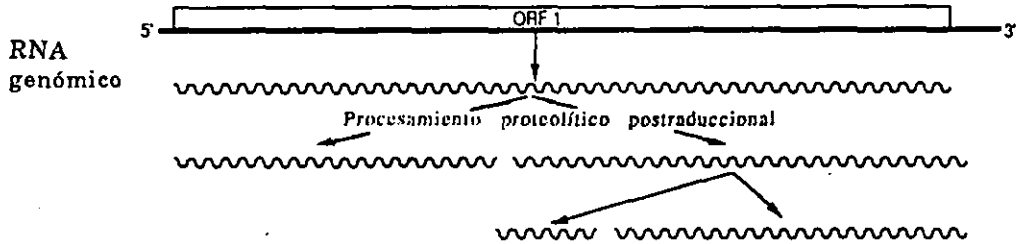
1. RNAs subgenómicos



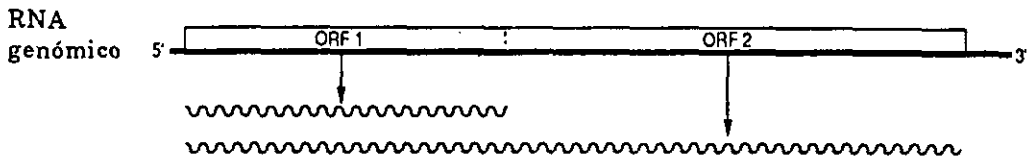
2. Genoma dividido en varios segmentos



3. Poliproteína



4. Presencia de un codón de terminación interior en ORF<sub>1</sub> que puede ser leído o no



5. Genes solapados en fases de lectura distintas.

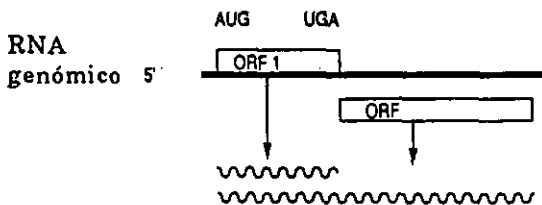


Fig 2. Estrategias utilizadas por los virus vegetales para permitir la síntesis de proteínas en un sistema eucariótico a partir de un genoma RNA conteniendo más de un gen.

d) Los tobamovirus y tospovirus contienen ORFs con un codon de terminación interior que, según se lea o no, da lugar a la formación de dos proteínas distintas.

e) Genes solapados en fases de lectura distintas que por un cambio en la fase de lectura cerca del codon de terminación dan lugar a una segunda proteína más larga (luteovirus).

A fin de que los virus puedan acceder al interior de las células vegetales deben penetrar a través de la cutícula y pared de celulosa de éstas, por lo cual la mayoría de los virus se asocian para su transmisión con insectos, nemátodos, u otros organismos que produzcan las heridas necesarias. En la mayoría de los casos estas asociaciones son altamente específicas, con relaciones bien definidas entre el virus y el vector. Algunos virus son también transmitidos a través del polen y transferidos a las semillas. La propagación vegetativa comercial es una forma de diseminación importante en plantas leñosas cultivadas.

No todas las plantas reaccionan de igual forma al ser inoculadas con un virus. En los fenómenos de inmunidad total, el virus no se replica, mientras que en las llamadas infecciones subliminales los virus se replican solamente en las células inicialmente infectadas. En las reacciones de hipersensibilidad, el virus queda restringido a unas pocas células que rodean al punto de entrada, dando lugar a lesiones localizadas. Por último, en los casos de susceptibilidad, los virus infectan al huésped sistémicamente, es decir, se esparcen desde el lugar de la infección hacia otras partes de la planta.

Los virus son económicamente importantes sólo cuando producen reducciones significativas en la producción o en la calidad de los productos de las plantas. Algunos de los síntomas que pueden producir los virus en el huésped, revisados por Bos (1970), Zaitlin (1979) y Goodman et al (1986), son reducción en el crecimiento, cambios en el color tales como mosaicos, amarilleamientos (clorosis) o aparición de anillos concéntricos, muerte del tejido (necrosis), y alteraciones en la forma de crecimiento como enaciones, filimorfismo o enrollamiento de las hojas. La mayoría de los nombres de los virus incluyen términos que describen síntomas en el huésped donde se describió por primera vez la enfermedad. La Figura 3 muestra los síntomas inducidos por algunos de los virus utilizados en la presente tesis doctoral.



**Fig 3.** Síntomas producidos por varios virus vegetales en diferentes huéspedes: a) Muerte de un naranjo infectado con CTV. b) Síntomas de GFLV en madera y fruto de vid (corrimiento de uvas, tallo aplanado, dobles y triples nudos, entrenudo corto). c) Síntoma típico de línea negra en un nogal injertado infectado por CLRV. d) Enrollamiento de las hojas basales de una planta de patata infectada con PLRV. e) Mosaico amarillo en hojas de haba infectadas con BYMV. f) anillos concéntricos en hojas de pimiento infectadas con TSWV.

## 2. PATOGENOS SUBVIRALES (SATELITES Y VIROIDES).

### 2.1. Satélites

Algunos virus de plantas presentan RNAs asociados llamados satélites, revisados por Murrant y Mayo (1982), y por Francki (1985), que se caracterizan por ser moléculas de RNA monocatenario de pequeño tamaño, no presentar apenas homología de secuencia nucleotídica con el genoma viral ni con la planta huésped, y por ser dependientes para su replicación del virus auxiliar ("helper") al que están asociados, generalmente modificando la expresión de los síntomas de la enfermedad producida en la planta huésped. Cucumovirus, nepovirus y tobusvirus son grupos de virus que presentan a menudo RNAs satélites asociados.

Los mayoría de los RNAs satélites se replican de dos maneras diferentes (Piazzola et al, 1989): a) los que presentan estructuras en los extremos 3' y 5' similares a las del virus auxiliar, replicándose de forma semejante a éste a través de un molde de sentido negativo, y utilizando sus replicasas, como en el caso de los satélites del virus del mosaico del pepino (CMV) y del virus de los anillos negros del tomate (TBRV), y b) los que se replican mediante un mecanismo de círculo rodante con RNAs satélites circulares y multiméricos como intermedios de la replicación, que se autoprocenan mediante una actividad de "ribozima" (ej. el virus del satélite de las manchas en anillo del tabaco, STRSV). Esta actividad autocatalítica de los RNA satélites circulares (Bruening et al, 1988) está confinada a una parte conservada y relativamente corta de la secuencia, con un modelo estructural propuesto por Forster y Symons (1987 a y b) de cabeza de martillo para los nucleótidos que contienen el sitio de la ruptura.

Los RNAs de algunos satélites llevan información genética para la síntesis de su propia proteína de cubierta, en cuyo caso sus partículas difieren de las de los virus auxiliares y se denominan virus satélites, como el caso del satélite del virus de la necrosis del tabaco (STNV) (Kassanis, 1981). En cambio, los RNAs satélites, que utilizan la proteína de cubierta del virus auxiliar, dan lugar a partículas morfológica y antigénicamente indistinguibles de las de éste, aunque pueden presentar un coeficiente de sedimentación diferente.

## 2.2. Viroides

Los viroides, de los que existen revisiones recientes de Diener (1987, 1991), Riesner (1991), y Symons (1991), son un fenómeno biológico extraordinario (que afecta exclusivamente a las plantas) en el sentido de que un pequeño RNA es capaz de producir enfermedades como un virus completo. Los viroides son moléculas circulares covalentemente cerradas de RNA monocatenario de bajo peso molecular (246-375 nucleótidos), en los que el apareamiento intramolecular de secuencias complementarias determina una estructura secundaria característica formada por pequeñas regiones bicatenarias interrumpidas por bucles internos y protuberantes (Figura 4 I). Al contrario que los virus, no se encapsidan, y a pesar de su pequeño tamaño, los viroides se replican autónomamente mediante un mecanismo de círculo rodante (semejante al del STRSV) (Figura 4 II) a través de intermedios RNA oligoméricos, y utilizando las enzimas del huésped. Esta replicación, en el caso del viroide del tubérculo ahusado de la patata (PSTVd), se lleva a cabo en el núcleo, acumulándose posteriormente en él (Semancik et al, 1976; Takahashi et al, 1982) o, en el caso del viroide de las manchas solares del aguacate (ASBVd), o el viroide del cadang-cadang del cocotero (CCCVd) en el citoplasma (Randles et al, 1976; Marcos y Flores, 1990). Hasta ahora no se han encontrado proteínas codificadas por los viroides.

Se conocen más de 15 viroides, de los cuales el más estudiado es el PSTVd. Los síntomas de las enfermedades producidas por los viroides no se distinguen de los producidos por los virus e incluyen enanismo, moteado, distorsionamiento en las hojas y necrosis. Pueden producir desde enfermedades letales como la del CCCVd (Haseloff et al, 1982) hasta infecciones asintomáticas como la del viroide latente del lúpulo (HLVd), distribuido por todo el mundo (Puchta et al, 1988). Los viroides se transmiten en los cultivos principalmente por propagación vegetativa o contaminación mecánica, y a través del polen y la semilla, existiendo también alguna evidencia de transmisión por artrópodos (Matthews, 1991).

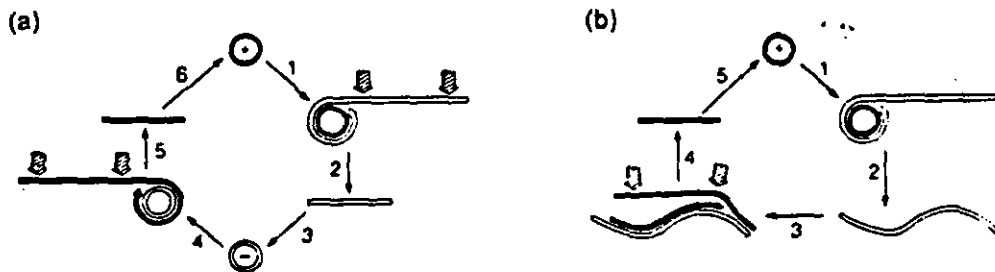
## 3. EL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV).

El virus del mosaico del pepino (cucumber mosaic virus o CMV) es el miembro tipo del grupo de los cucumovirus. Dentro de este grupo, CMV es el más distribuido en el mundo y el mejor estudiado; sus propiedades han sido revisadas

(I)



(II)



**Fig 4.** (I) Secuencia y estructura secundaria propuesta para el viroide PSTVd (Gross et al, 1978). (II) Modelo de replicación en círculo rodante propuesto para los pequeños RNAs circulares patogénicos (Branch y Robertson, 1984; Hutchins et al, 1985). A la forma infectiva se le asigna arbitrariamente la polaridad positiva, mientras que la polaridad negativa representa a la copia complementaria de la forma infectiva. (a) Variante simétrica en la cual los RNAs oligoméricos de ambas polaridades son procesados a formas circulares monoméricas. (b) Variante asimétrica en la cual sólo los RNAs oligoméricos de polaridad positiva son procesados a monómeros circulares. Las flechas indican los sitios de corte de los oligómeros producidos a monómeros.

por Francki et al (1979), Kaper y Waterworth (1981), Edwardson y Christie (1991) y Palukaitis et al (1992) entre otros. Fue descrito por primera vez como el causante de una enfermedad tipo mosaico en el pepino (Doolittle, 1916; Jagger, 1916).

El grupo de los cucumovirus contiene tres miembros distintos: el virus del mosaico del pepino (CMV) mencionado, el virus del enanismo del cacahuete (PSV) y el virus de la aspermia del tomate (TAV). Todos estos virus muestran similitudes en la morfología de la partícula, transmisión por vectores, y organización del genoma, aunque pueden ser diferenciados serológicamente, por su gama de huéspedes, y por los tamaños moleculares y secuencias nucleotídicas de sus RNAs virales (Kaper y Waterworth, 1981).

### 3.1. Características biológicas.

CMV es probablemente el virus con la gama de huéspedes naturales más amplia: afecta a más de 775 especies de 365 géneros pertenecientes a 85 familias de mono y dicotiledóneas (Douine et al, 1979 b), sobre todo de regiones templadas, principalmente a Crucíferas, Solanáceas, Compuestas, Papilionáceas y Cucurbitáceas, siendo a nivel mundial el primer causante de pérdidas económicas en hortícolas y ornamentales cultivadas al aire libre (Tomlinson, 1987).

Los diversos síntomas producidos por CMV en diferentes huéspedes han sido revisados por Kaper y Waterworth, (1981) y Martelli y Russo (1985). El síntoma más común inducido por CMV es el mosaico. Sin embargo, la gravedad de la enfermedad puede variar desde no mostrar síntomas en algunos cultivos (como por ejemplo en las malas hierbas *Portulaca oleracea* L. y *Stellaria media* L., que juegan un importante papel epidemiológico como reservorios naturales del virus), hasta la muerte de la planta huésped. Algunos de los síntomas intermedios incluyen moteado suave, enanismo, cambios cromáticos en hojas y frutos, filimorfismo, manchas anulares o lignificación en frutos. Algunas cepas producen amarilleamientos en las hojas y otras necrosis localizadas o generalizadas. La Figura 5 muestra algunos de los síntomas observados con los aislados utilizados en la presente tesis.

CMV se transmite de forma natural por numerosas especies de áfidos. Fritzsche et al (1972) señalan 75 especies que transmiten CMV, siendo los más comunes *Aphis gossypii* y *Myzus persicae*. Los cucumovirus se transmiten en general de forma no persistente (Matthews, 1991): los áfidos, al hacer breves pruebas en las hojas (normalmente en menos de 30 segundos), introducen el estilete en las células epidérmicas adquiriendo el virus de una forma no conocida,



**Fig 5.** Síntomas producidos por CMV en diferentes huéspedes: (a) mosaico en platanera, (b) lesiones locales necróticas en la planta indicadora *Vigna unguiculata*, (c) mosaico en pepino, (d) mosaico en pimiento.

5306075699

donde deben producirse interacciones entre la proteína de cubierta viral y el estilete del áfido (Palukaitis et al, 1992). En sucesivas pruebas, el áfido inyecta el virus en plantas sanas, siendo este tiempo de transmisión muy corto. Los áfidos retienen el virus menos de 4 horas, y no se transmite a la progenie. Hay un bajo nivel de especificidad, ya que varias especies de áfidos pueden transmitir varias cepas de cucumovirus.

La facultad del CMV de transmitirse a través de la semilla se ha demostrado en unas 20 especies (Kaper y Waterworth, 1981), lo cual es un factor muy importante en la epidemiología del virus (Tomlinson y Carter, 1970). Los porcentajes de transmisión varían desde unas trazas en pepino, a 0,2% en tomate, 7% en calabaza, 3-8% en altramuz (Jones, 1988), 8% en trebol subterráneo (Jones y McKirdy, 1990), 4 a 28% en carilla (*Vigna unguiculata*), ó 10-28% en melón (Sharma et al, 1984). La transmisión por semilla de CMV en judía (*Phaseolus vulgaris*) se describió por primera vez en un aislado español (Bos y Maat, 1974) en un 7%, pero posteriormente se han encontrado casos con hasta un 50% (Davis y Hampton, 1986). CMV también se transmite a través de la semilla de varias malas hierbas comunes, como en el caso de algunas especies de *Cerastium* (2%), *Spergula* (2%), *Stellaria* (21 a 40%) (Tomlinson y Carter, 1970) y *Echinocystis* (9 a 95%) (Neergaard, 1977). El mecanismo de transmisión por semilla apenas se conoce, solamente ha podido ser localizado en el embrión en el caso de *Stellaria media*, y en el endospermo en el caso de *Echinocystis lobata* (Palukaitis et al, 1992).

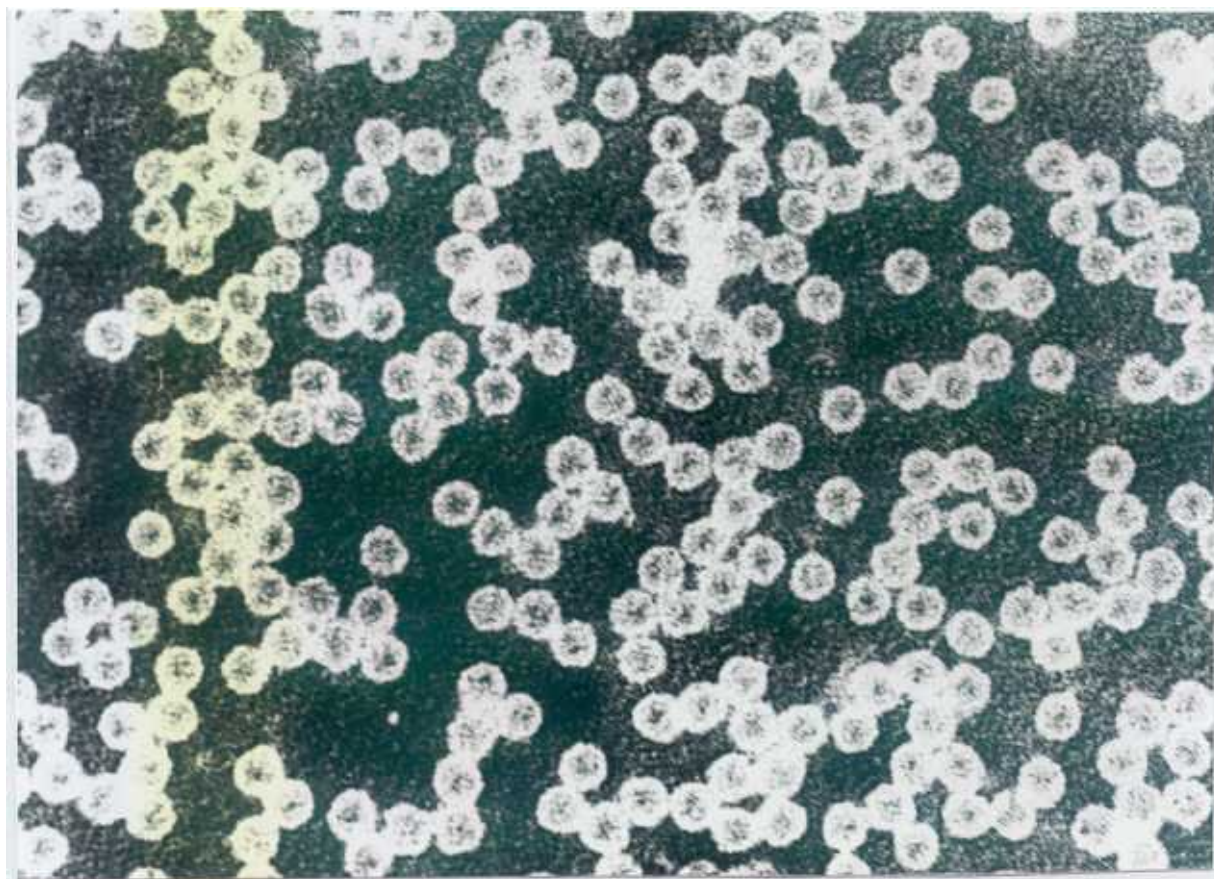
CMV no parece que se transmita por contacto de planta a planta ni por hongos, nemátodos, u otros insectos aparte de los áfidos, aunque sí por algunas especies de *Cuscuta*, en las que el virus se multiplica (Francki et al, 1979).

### 3.2. La partícula viral.

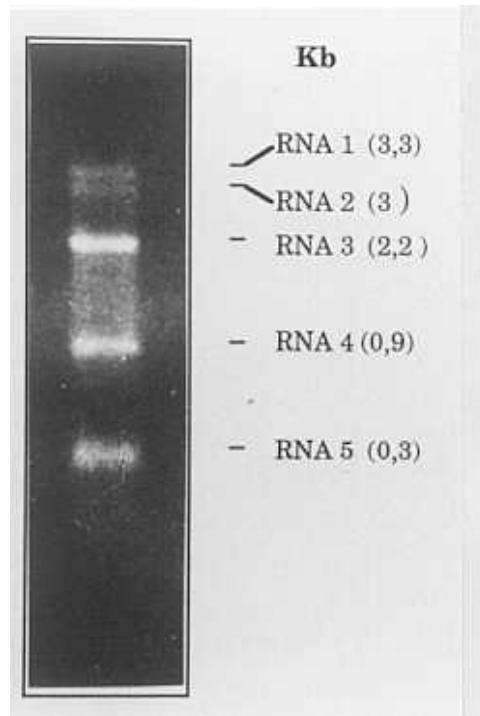
Las partículas de CMV son isométricas con un diámetro de unos 30 nm. (Figura 6). La cubierta está formada por 180 subunidades proteicas idénticas con un peso molecular de aproximadamente 24.500 daltons (Francki et al, 1979). Las partículas contienen un 18% de RNA genómico (Kaper y Re, 1974), que es monocatenario y de sentido mensajero (+), compuesto por tres segmentos denominados RNA 1, 2, y 3 según tamaños decrecientes, que varían ligeramente de unas cepas a otras (Figura 7). Presentan otro RNA 4, que es un subgenómico mensajero para la proteína de cubierta (Peden y Symons, 1973). Solamente se requieren los 3 RNAs genómicos para que el virus sea infeccioso. Los RNAs 1 y 2 se encapsidan separadamente, mientras que los RNAs 3 y 4 se encapsidan en la

Grupos		Propiedades	Referencia
C	B	gama de huéspedes	Marrou et al, 1975
DTL	ToRS	serología	Devergne y Cardin, 1973
U	N	serología	Richter et al, 1972
Termorresistente	Termosensible	sensibilidad térmica	Marchoux et al, 1976
B	L2	mapeado de péptidos	Edwards y Gonsalves, 1983
W T	S	hibridación ácidos nucleicos	Piazzolla et al, 1979
Sugrupo I	Subgrupo II	hibridación ácidos nucleicos	Owen y Palukaitis, 1988

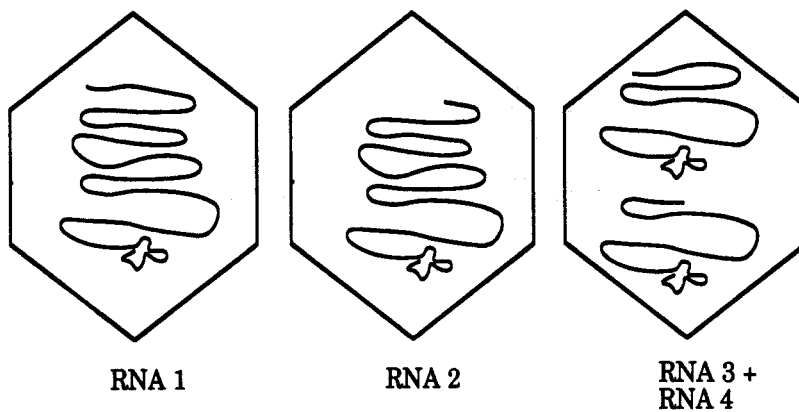
Tabla 1. Sinónimos de los subgrupos de CMV.



**Fig 6.** Micrografía electrónica de tinción negativa de partículas virales de CMV purificadas y teñidas con ácido fosfotúngstico. Las partículas son icosaédricas, con un diámetro de unos 29 nm, y presentan un orificio central de 12 nm de diámetro (Francki et al, 1966). Barra: 100 nm



**Fig 7.** Electroforesis en un gel de poliacrilamida de los RNAs de CMV. Los tamaños de los RNAs son según Palukaitis et al (1992).



**Fig 8.** Distribución de los RNAs de CMV en tres partículas con dimensiones y propiedades de sedimentación similares (Lot y Kaper, 1976; Dougherty y Hiebert, 1985)

misma partícula (Lot y Kaper, 1976; Dougherty y Hiebert, 1985), de forma que hay tres clases de partículas de CMV con dimensiones y propiedades de sedimentación similares (Figura 8).

### 3.3. Clasificación de cepas.

La variabilidad genética y fenotípica de CMV es tal que casi todos los aislados descritos pueden considerarse cepas diferentes, hasta el punto de que Lovisolo y Conti (1969), basándose en la gama de huéspedes y en los síntomas, no encontraron dos aislados idénticos entre 60 de diferentes localidades. Siendo CMV capaz de soportar la replicación de un quinto RNA llamado satélite, cuya presencia influye en los síntomas que el virus induce en el huésped (Kaper y Waterworth, 1977; Waterworth et al, 1979), no es de extrañar esta enorme variabilidad.

Devergne y Cardin (1973) dividieron las cepas de CMV en dos grandes subgrupos, DTL y ToRS, según su comportamiento en tests de inmunodifusión (Tabla 1). A veces se considera un tercer grupo, Co, más cercano a ToRS que a DTL (Devergne et al, 1981). Esta clasificación serológica se correlaciona con los grupos C y B definidos por sus reacciones sobre plantas huésped (Marrou et al, 1975).

Aunque ambos subgrupos pueden convivir en el campo e incluso en el mismo individuo (Douine et al, 1979 a; Quiot, 1980), se ha descrito que el serogrupo ToRS es aparentemente más prevalente en las regiones templadas pues se multiplica mal a elevadas temperaturas, mientras que el serogrupo DTL, más termorresistente (Marchoux et al, 1976), predomina en las zonas tropicales y subtropicales (Haase et al, 1989), y que los aislados del serogrupo DTL normalmente producen síntomas más graves que los de ToRS (Haack y Richter, 1987). Durante los meses de verano se puede observar un cambio de predominio de cepas ToRS a DTL (Quiot, 1980), debido a una selección de las cepas DTL. Este cambio más parece debido a posteriores infecciones que a mutaciones o a selecciones de variantes (Quiot et al, 1979; Devergne y Cardin, 1979). Mientras que en Alemania predomina ToRS (Haase et al, 1989), en Francia se han descrito ambos (Devergne y Cardin, 1978; Quiot et al, 1979), en EEUU Kearney et al (1990) encuentran principalmente ToRS en pimientos, y DTL en el resto de las especies en el estado de Nueva York e islas Bermudas, en Guadalupe predomina DTL (Migliori et al, 1978), y en España se ha encontrado mayoría de DTL (Luis-Arteaga et al, 1988, Luis-Arteaga, 1989; Jordá et al, 1992).

Las cepas de CMV se pueden dividir también en subgrupos distintos comparando sus RNAs genómicos. Los serogrupos DTL y ToRS están

correlacionados con los grupos de hibridación WT y S respectivamente (Piazzolla et al, 1979), y con los subgrupos I y II definidos por Owen y Palukaitis (1988). Los RNAs de los miembros de un subgrupo no hibridan con cDNAs del otro grupo en análisis tipo "dot-blot " en condiciones restrictivas de hibridación (Owen y Palukaitis, 1988).

### 3.4. Propiedades del genoma.

Se conocen las secuencias completas de tres cepas de CMV, y las secuencias parciales de varias otras cepas (Palukaitis et al, 1992). La secuencia de cepas del mismo grupo tienen alrededor de un 95% de homología, mientras que las de distintos grupos tienen aproximadamente un 75% (Quemada et al, 1989; Rizzo y Palukaitis, 1989).

Los 4 RNAs de CMV tienen varias características comunes: son de polaridad positiva (+), es decir actúan como RNAs mensajeros, y llevan el extremo 5' bloqueado con 7-metil-guanosina. Los extremos 3' contienen una región no traducida conservada tanto en secuencia como en estructura secundaria (en forma de tRNA) de unos 200 nt (Gould y Symons, 1977) que puede aminoacilarse por tirosina en presencia de aminoacil-tRNA-sintetasas (Kaper y Waterworth, 1981). La conservación de estas estructuras secundarias indica una importancia funcional, probablemente en la replicación viral.

El RNA 1 (3357-3389 nt según las cepas) contiene una única ORF que codifica para una proteína de 111 kDa, denominada proteína 1a, que contiene seis motivos conservados encontrados en helicasas (Hodgman, 1988), sugiriendo este papel funcional para esta proteína. También hay una región con una considerable homología con un fragmento del virus Sindbis (virus con una envuelta lipoproteica que infecta animales vertebrados) que codifica para la proteína nsP1, necesaria para iniciar la síntesis del RNA (-) (Hahn et al, 1989) y que presenta una actividad metiltransferasa (Mi et al, 1989).

El RNA 2 (3035-3050 nt) contiene una ORF que codifica para una proteína de 94-97 kDa, denominada proteína 2a. Esta contiene la secuencia conservada Gly-Asp-Asp asociada con las replicasas virales (Palukaitis et al, 1992).

Tanto los RNAs 1 y 2 de CMV como las proteínas 1a y 1b están implicados en la formación del complejo de replicación viral (Palukaitis et al, 1992).

El RNA 3 contiene dos ORFs, de las que la situada en el extremo 5' codifica para una proteína denominada 3a de 30 kDa, mientras que la situada en el extremo 3' codifica para la proteína de cubierta de 24 kDa que no se traduce a partir del RNA

3, sino a partir del RNA 4 subgenómico, que es colinear con el extremo 3' del RNA 3 (Gould y Symons, 1978). La función de la proteína 3a permanece desconocida, aunque por analogía con otros virus podría estar implicada en el movimiento célula a célula del virus (Davies y Symons, 1988). La proteína de cubierta está implicada tanto en la encapsidación de los distintos RNAs virales como en el reconocimiento por el áfido vector para la transmisión del CMV (Chèn y Francki, 1990).

### 3.5. Satélites de CMV.

Las partículas de CMV a menudo contienen un quinto RNA de pequeño tamaño (330-390 nt) que ha demostrado ser un verdadero satélite (Díaz-Ruiz y Kaper, 1977; Lot et al, 1977; Gould et al, 1978).

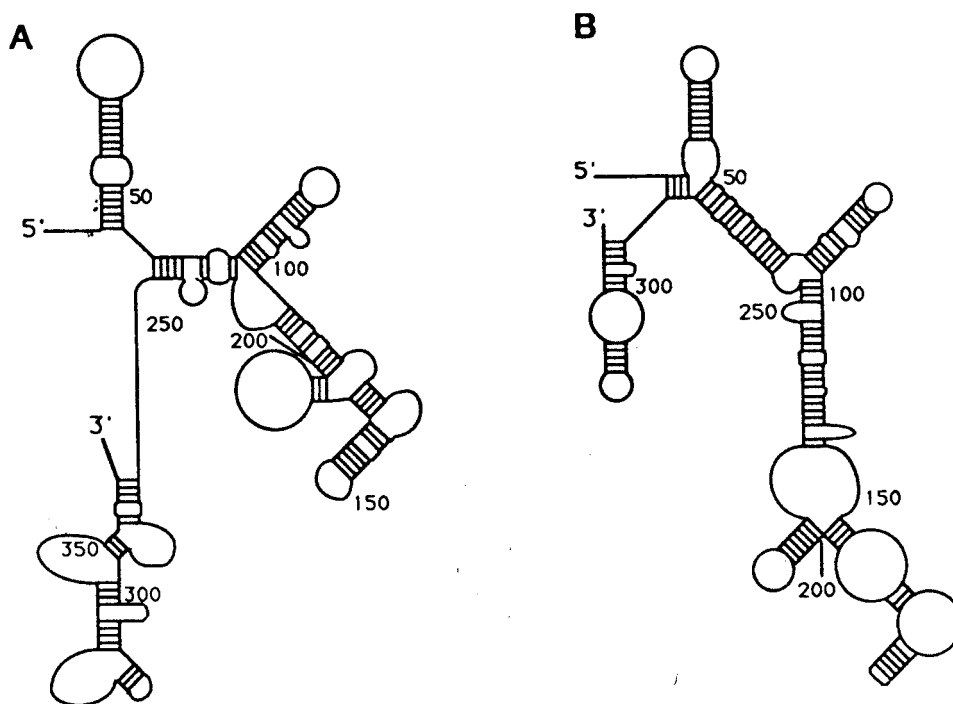
Los RNAs satélites asociados a CMV están distribuidos por todo el mundo. El de mayor importancia económica, el denominado CARNA 5 (RNA 5 asociado a CMV), fue descrito por primera vez en 1972 en Alsacia (Francia) (Kaper y Waterworth, 1977) produciendo una epidemia devastadora de necrosis en campos de tomate. Posteriormente se ha encontrado en otros países como Japón (Yoshida et al, 1984), Italia (Kaper et al, 1990) y España (Jordá et al, 1992) (Figura 9).

Los RNAs satélites se acumulan a altos niveles cuando están presentes en las plantas infectadas, a menudo reduciendo la síntesis del genoma viral (Kaper y Tousignant, 1977; Mossop y Francki, 1979; Takanami, 1981; Jacquemond y Leroux, 1982). En la mayoría de los huéspedes, esta reducción de la replicación viral se correlaciona con una atenuación de la gravedad de los síntomas inducidos por el virus. Sin embargo, hay algunos RNAs satélites que mientras que atenúan los síntomas en unos huéspedes acentúan la gravedad de los síntomas en ciertas Solanáceas, pudiendo producir una fuerte clorosis sistémica en tabaco y pimiento, mientras que inducen necrosis sistémica en tomate. Se sabe que los determinantes para clorosis y necrosis en tomate están localizados en diferentes dominios funcionales de los RNAs satélites (Kurath y Palukaitis, 1989), y que un simple cambio en un nucleótido distingue RNAs satélites necrogénicos de los no necrogénicos (Palukaitis, 1988; Sleat y Palukaitis, 1990), pero en definitiva la modificación de los síntomas es el resultado de interacciones complejas entre el RNA satélite, la cepa del virus auxiliar y la especie huésped implicada.

Se han secuenciado más de 25 aislados de RNA satélite de CMV, que presentan una homología de secuencia del 70-99% (Palukaitis et al, 1992), y mientras las variantes necrogénicas están fuertemente conservadas, entre las variantes no necrogénicas hay una mayor variabilidad. Los RNAs satélites



**Fig 9.** Necrosis en un tomate de Valencia (muestra V-1 del anexo 1) infectado con CMV portador de un RNA satélite.



**Fig 10.** Estructura secundaria de los RNAs satélites. A) Estructura propuesta para el RNA Y-sat (Hidaka et al, 1988). B) Estructura propuesta para el RNA Q-sat (Gordon y Symons, 1983).

presentan unos extremos 5' y 3' muy similares a los de los RNAs genómicos (el extremo 5' bloqueado con una guanosina metilada y el extremo 3' con una estructura tipo tRNA, aunque no ha podido ser aminoacilado). Contienen de una a tres ORFs, que pueden ser traducidas *in vitro*, aunque los polipéptidos que codifican no parecen tener un papel en la patogénesis. El alto grado de estructura secundaria (Gordon y Symons, 1983; García-Arenal et al, 1987) (Figura 10), fuertemente conservada (Fraile y García-Arenal, 1991), puede explicar su estabilidad y sugerir que estos RNAs satélites son RNAs funcionales cuya biología estaría determinada por su interacción directa con los componentes del huésped y/o el virus auxiliar.

Los RNAs satélites probablemente se encapsidan con las partículas que contienen el RNA 2 o el RNA 3 y también, en partículas que no contienen ningún RNA de CMV en un número variable de copias (Lot y Kaper, 1976). La cubierta del CMV permite al RNA satélite ser transmitido por los áfidos que transmiten al virus (Mossop y Francki, 1977).

### 3.6. CMV en España.

El CMV se ha encontrado ampliamente distribuido en España sobre muy diferentes cultivos hortícolas:

- Bos y Maat (1974) identifican un aislado de CMV transmisible por semilla en judías (*Phaseolus vulgaris*) procedentes de Valencia.
- Peña-Iglesias et al (1979) describen CMV en plataneras procedentes de Tenerife, perteneciente al subgrupo ToRS y portador de un RNA satélite.
- García-Luque et al (1983) encuentran aproximadamente un 30% de cultivos con CMV en una prospección realizada en diferentes regiones españolas durante tres años (1979-1982), todas ellas pertenecientes al subgrupo DTL. Solamente en dos muestras de melón con síntomas de mosaico y enanismo procedentes de Valencia encuentran un satélite tras pases seriados en diferentes plantas huésped (García-Luque et al, 1984).
- Luis-Arteaga et al (1988) describen una epidemia de CMV en borraja en Huesca y Zaragoza, con síntomas de enanismo, reducción de la hoja y mosaico. Estas cepas pertenecían al subgrupo DTL, y no contenían satélite. Luis-Arteaga (1989), estudiando las virosis que afectan a los pimientos en España, encuentra que CMV es el virus más frecuente en Badajoz, Logroño y Zaragoza, y el segundo después de PVY en Murcia y Valencia. Además consigue clasificar una cepa de Murcia como ToRS, y dos de Valencia y Badajoz como DTL.

- Murrant et al (1990) realizan una prospección en cultivos hortícolas de la región valenciana y Badajoz, encontrando aproximadamente un 50% de plantas infectadas por CMV, de las que el 85% son ToRS, y el 33% portadoras de RNA satélite, aunque éste no se detectó en ninguna muestra de Badajoz. Este no se encuentra en plantas de pimiento, calabaza, o malas hierbas, y sí en pepino, melón, sandía, tabaco, tomate y lechuga. Algunas plantas asintomáticas estaban infectadas con CMV y RNA satélite.

- CMV se ha encontrado ampliamente distribuido en diferentes cultivos hortícolas de Almería (Sáez, 1991).

- Todos los aislados del virus presentes en las muestras de tomate del área del Mediterráneo analizadas por Jordá et al (1992) pertenecían al subgrupo I de hibridación (equivalente al serogrupo DTL).

La necrosis de tomate fue observada por primera vez en España en la maresma catalana (Peña-Iglesias et al, 1978), en 1986, en el norte de Valencia, y en 1990 afectando a la mayoría de las zonas de cultivo de tomate del área del Mediterráneo (Jordá et al, 1992). Se ha encontrado también en las islas canarias, pero no en Extremadura o La Rioja, zonas importantes de cultivo de tomate para industria (Murrant et al, 1990; Jordá et al, 1992). A diferencia de los casos de necrosis en tomate encontrados en Francia (Putz et al, 1974) o Italia (Gallitelli, 1988), en la epidemia española se han encontrado tres tipos principales de RNA satélite: unos que inducen necrosis, otros que inducen otro síndrome de enanismo y abarquillado de las hojas (muy frecuente en Valencia desde 1989), y otros que no modifican los síntomas inducidos por el virus auxiliar. Jordá et al (1992), al contrario que Murrant et al (1990), no encuentran RNAs satélites atenuantes.

#### 4. DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR LOS VIRUS Y PATOGENOS SUBVIRALES QUE AFECTAN A LAS PLANTAS.

Las técnicas de detección en plantas de virus y patógenos subvirales son muy importantes en la patología vegetal por muchos motivos (Chu et al, 1989 b; Hull y Al-Hakim, 1988): en estudios epidemiológicos, para la evaluación de resistencia en plantas en programas de mejora, para comprobar el estado sanitario de las semillas y material vegetal en estaciones de cuarentena y certificación, para la identificación y diagnóstico de nuevos patógenos, etc.

Tradicionalmente, el diagnóstico de las enfermedades de plantas se ha llevado a cabo por el reconocimiento de síntomas característicos presentados por las plantas enfermas y sobre determinadas plantas huésped tras inoculación mecánica, injerto o a través de vectores del patógeno. Aunque no son métodos muy precisos, hoy en día se siguen utilizando por dar una información importante (sobre todo en frutales) e incluso crucial en algunos casos, como en el estudio de patotipos (Hamilton et al, 1981; Matthews, 1991).

La visualización al microscopio electrónico de partículas virales y/o estructuras ligadas a la patogénesis (Horne, 1967), aunque no se utiliza de forma rutinaria, es indispensable para los estudios estructurales, especialmente con la ayuda de la inmunoelectromicroscopía (Milne, 1984).

Entre los métodos más utilizados están los que detectan las proteínas virales (técnicas serológicas) y los que detectan los ácidos nucleicos virales (análisis de RNAs bicatenarios, hibridación con sondas de cDNA o cRNA, y recientemente la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR)

#### 4.1. Técnicas serológicas.

Los primeros tests serológicos se basaron en la observación del precipitado formado cuando los anticuerpos (preparados en animales a los que se inyectaba el virus purificado) se unían en condiciones favorables a los antígenos virales, bien en medio líquido, bien en geles de agar, formando un agregado que al hacerse suficientemente grande, precipita. El ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) es actualmente el método más utilizado para la detección e identificación rutinaria de virus vegetales en diferentes huéspedes, por ser fiable, rápido, sensible, y fácilmente aplicable a gran número de muestras (Clark y Bar-Joseph, 1984; Torrance y Jones, 1981).

Hay muchos tipos de ELISA, pero los tres más utilizados son: ELISA-DAS (double antibody sandwich) (Clark y Adams, 1977), ELISA indirecto (Rybicki y von Wechmar, 1981; Koenig, 1981) y ELISA indirecto TAS (triple antibody sandwich) (Bar Joseph y Malkinson, 1980; van Regenmortel y Burckard, 1980; Barbara y Clark, 1982).

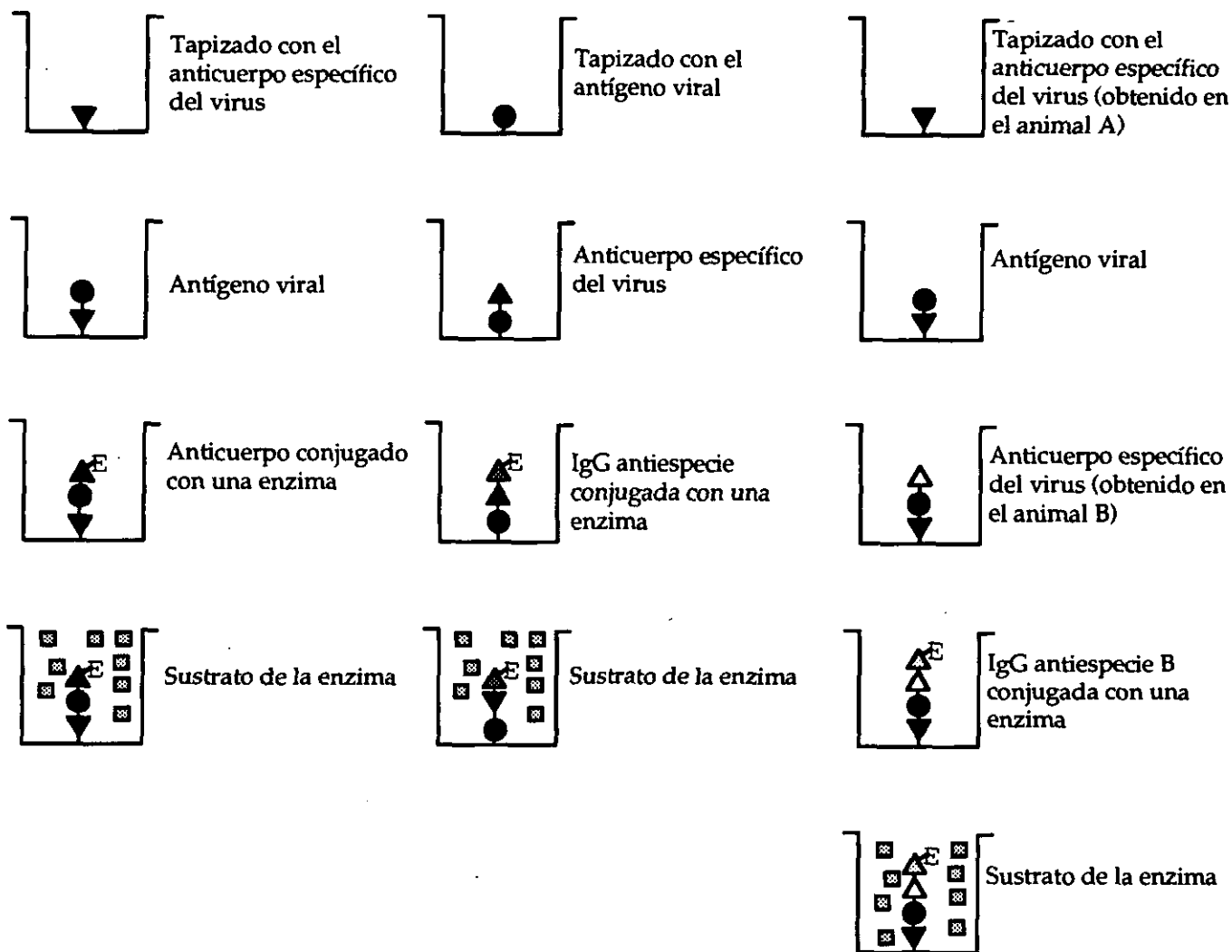
Las diferencias entre las tres técnicas están resumidas en la Figura 11.

EL ELISA-DAS es muy sensible, pero necesita la preparación de un conjugado para cada virus a testar. Los ELISAs indirectos, en cambio, no utilizan conjugados específicos del virus, sino anticuerpos obtenidos contra las inmunoglobulinas del animal utilizado para la obtención de los anticuerpos

## ELISA DAS

## ELISA INDIRECTO

## ELISA SANDWICH INDIRECTO (TRIPLE SANDWICH)



- ▼ Anticuerpo específico del virus (obtenido en una especie animal A)
- Antígeno viral
- ▲<sup>E</sup> Anticuerpo específico del virus conjugado con un enzima
- △ Anticuerpo específico del virus (obtenido en una especie animal B)
- ▲<sup>E</sup> IgG antiespecie A conjugada con un enzima
- ▲<sup>E</sup> IgG antiespecie B conjugada con una enzima
- Sustrato

Fig 11. Las tres técnicas ELISA mas utilizadas en Virología Vegetal.

específicos del virus, o bien la proteína A de *Staphylococcus aureus*, que posee gran afinidad por la porción Fc de las IgGs de muchas especies animales. Además, al no estar conjugado con una molécula de enzima, el anticuerpo encuentra facilitada su unión al antígeno. El ELISA-TAS presenta la desventaja de que necesita de dos anticuerpos antivirales obtenidos en animales diferentes, y de que el método requiere un paso adicional.

Aunque los anticuerpos policlonales todavía se utilizan frecuentemente, la utilización de los anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975; Halk y De Boer, 1985) ha supuesto un gran avance en la fiabilidad, especificidad y facilidad de interpretación de los resultados de las técnicas serológicas.

En la interpretación de resultados con el ensayo ELISA es muy importante determinar qué se considera como respuesta positiva y qué como respuesta negativa, lo que se puede abordar de varias maneras. Unas veces se considera un resultado positivo cuando se obtiene una absorbancia dos o tres veces la media de las absorbancias obtenidas con las muestras negativas, otras cuando se obtiene la media más 2 o 3 veces la desviación estándar si hay disponible un número elevado de referencias, o incluso otras arbitrariamente cuando presenta una absorbancia determinada (Tijssen, 1985). La selección de este criterio es importante para minimizar las respuestas falsas. Este valor puede moverse hacia arriba o hacia abajo para incurrir más en el error tipo I (falsos positivos) o tipo II (falsos negativos), dependiendo en qué ajuste tiene consecuencias menos graves.

#### 4.2. Análisis de RNAs bicatenarios.

La presencia de RNAs bicatenarios (RNAs-bc) de alto peso molecular, superior a  $10^5$  daltons, en las células vegetales, en general puede atribuirse a la infección de virus RNA, bien a aquellos cuyo genoma está formado por RNA-bc (reovirus y criptovirus), o bien a la forma replicativa (RF) de los virus cuyo genoma es RNA monocatenario (RNA-mc) (Dodds et al, 1984). Estos RNAs-bc se han utilizado para diagnóstico bien por análisis en electroforesis (Dodds et al, 1984; Dodds, 1986), bien por su detección mediante anticuerpos que reaccionan con los RNA-bc (Stollar, 1975; Schwartz y Stollar, 1969).

En principio, cada virus RNA debe presentar unos RNAs bicatenarios con unos tamaños característicos, pero a veces complica el diagnóstico la presencia de RNAs-bc en determinadas plantas sanas o sin inocular, como es el caso de una variedad de *Phaseolus vulgaris* (Wakarchuk y Hamilton, 1985) o del pimiento

(Valverde et al, 1990). A pesar de estas limitaciones, esta técnica se ha utilizado con éxito para ciertos virus (Matthews, 1991). Coffin y Coutts (1992) obtienen un clon de cDNA de un virus difícil de purificar, el virus del pseudo-amarilleamiento de la remolacha (BPYV), un posible closterovirus transmitido por mosca blanca, a partir de una extracción de RNAs bicatenarios. La secuenciación de este clon ha hecho posible el poder diseñar unos cebadores que permiten la detección del virus, hasta ahora muy difícil, por RT-PCR. Además, el estudio de los RNAs-bc puede ayudar en la clasificación de virus desconocidos.

En el caso de CMV, diferentes autores han detectado RNAs bicatenarios a partir de diferentes plantas infectadas con este virus, detectándose también formas replicativas de los RNAs satélites (Kaper y Díaz-Ruiz, 1977; Bar-Joseph et al, 1983; Gabriel, 1986; Steger et al, 1987; Romero et al, 1988). García-Luque et al (1986) obtuvieron anticuerpos monoclonales con especificidad para una variante necrogénica de los RNAs satélites de CMV, pero no se utiliza normalmente ELISA para la detección de estos patógenos subvirales.

#### 4.3. Hibridaciones sobre membrana.

La técnica (revisada por Thomas, 1983; Anderson y Young, 1985; Kingsbury, 1987; Hull y Al-Hakim, 1988; Chu et al, 1989 b; Sambrook et al, 1989) se basa en la unión del ácido nucleico genómico del patógeno, previamente fijado a un soporte sólido (normalmente nitrocelulosa o nylon), con moléculas complementarias que reciben el nombre de sonda (ya sea cDNA clonado o no, oligonucleótidos sintéticos, o cRNA obtenido por transcripción *in vitro*). La unión de las dos moléculas complementarias (esto es, la hibridación) se detecta marcando la sonda, que normalmente se sintetiza *in vitro* utilizando dNTPs marcados radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ , o no radiactivamente con biotina o digoxigenina (Donovan et al, 1987; Habili et al, 1987; Saldanha et al, 1987).

Esta técnica de detección e identificación fue puesta a punto por primera vez para la detección del viroide del tubérculo ahusado de la patata (PSTVd) (Owens y Diener, 1981) y posteriormente se ha aplicado a otros virus y viroides (Bar-Joseph y Rosner, 1984; Varveri et al, 1987; Robinson y Romero, 1991), incluyendo los RNA satélites (Jordá et al, 1992), aunque su uso no se ha extendido mucho, debido principalmente a ser más laboriosa que el test ELISA.

Los límites de detección de virus purificados por hibridación con sondas radiactivas están en el rango de 1-100 pg, superior a ELISA, mientras que con tejido infectado ELISA parece tener un límite de detección mayor (Chu et al, 1989 b). Sin

embargo, la utilización de sondas marcadas radiactivamente implica un riesgo y necesita de instalaciones especiales. La hibridación con sondas no radiactivas está descrita como un método menos sensible (Zwadyk y Cooksey, 1987), aunque Kanematsu et al (1991), y Hopp et al (1991) llegan a unos niveles de detectabilidad muy considerables para virus y viroides de patata utilizando sondas marcadas con biotina.

El tiempo de preparación de las muestras en el caso de ELISA es menor que en el de las hibridaciones; con la técnica ELISA, y sobre todo cuando se utilizan anticuerpos monoclonales, existen menos interferencias con los componentes de la planta, pero en cambio mientras ELISA requiere 100  $\mu$ l de extracto las hibridaciones requieren solamente 1-10  $\mu$ l. Otra ventaja de las hibridaciones es que una sonda permite detectar cualquier parte del genoma del virus, mientras que el ELISA detecta normalmente la proteína de cubierta, que representa sólo una pequeña parte del genoma. Además, las hibridaciones pueden detectar satélites y viroides, que carecen de proteínas estructurales, y por tanto en general no pueden ser identificados por técnicas serológicas.

#### 4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos, mediante el cual se puede replicar específicamente un segmento determinado de DNA a través de dos oligonucleotidos cebadores que flanquean este fragmento, y ciclos sucesivos de desnaturalización térmica del DNA, anillado de los cebadores a las secuencias complementarias y extensión de los cebadores anillados mediante una DNA polimerasa termoestable. Dado que los productos de extensión son a su vez complementarios a los cebadores, en cada ciclo se duplica la cantidad de DNA sintetizada en el ciclo anterior, de forma que hay una amplificación exponencial del fragmento (Innis et al, 1990).

El primer gen amplificado por PCR fue el de la  $\beta$ -globina humana (Saiki et al, 1985), y desde entonces esta técnica se ha utilizado ampliamente en Biología Molecular. La tecnología de la PCR ya ha sido aplicada al estudio y la detección de virus DNA de plantas (Rybicki y Hughes, 1990; Pasamontes et al, 1991; Soler et al, 1991). Sin embargo, la mayoría de los virus y patógenos subvirales tienen un genoma RNA (Matthews, 1991), y para su detección se han aplicado varios métodos que combinan la transcripción inversa y la PCR (RT-PCR) (Vunsh et al, 1990; Jones et al, 1991; Korschineck et al, 1991; Langeveld et al, 1991; Nicolas y Laliberté, 1991; Robertson et al, 1991). En la mayoría de estos casos se han encontrado serios

problemas para la aplicación de la RT-PCR a un diagnóstico rutinario de gran número de muestras por un lado, en la extracción de los ácidos nucleicos a partir de la planta enferma, algo más laboriosa que en el caso de ELISA y que requiere la utilización del fenol, compuesto que puede ser tóxico y producir quemaduras, y por otro lado en la detección e identificación de los productos amplificados, que se realiza normalmente a través de una electroforesis.

Para evitar las extracciones de los ácidos nucleicos, Wetzal et al (1991), y Borja y Ponz (1992) llevaron a cabo la RT-PCR directamente a partir de macerado vegetal de plantas. En el caso del virus de la hepatitis A, Jansen et al (1990) purificaron los ácidos nucleicos mediante la adsorción del virus a tubos de polipropileno tapizados con anticuerpos específicos (de forma semejante al ELISA), seguido de una ruptura térmica del virión. Un ensayo semejante se ha descrito recientemente para la detección de un virus de plantas, el virus de la Sharka (PPV) (Wetzal et al, 1992). En ambos casos se lleva a cabo un tratamiento térmico para desensamblar el virión, previo a la transcripción inversa.

La alta sensibilidad (normalmente varios órdenes de magnitud mayores que la técnica ELISA) de esta técnica le da un gran potencial sobre todo en el diagnóstico de patógenos que se presentan en bajas concentraciones, como puede ser en la certificación de semillas, detección de virus y viroides en plantas leñosas, virus limitados al floema que se encuentran en bajo título en las plantas, etc. (Chu et al, 1989 b).

## 5. CONTROL DE LOS VIRUS.

Dado que todavía no se dispone de métodos directos de control tales como "viricidas", los esfuerzos suelen ir encaminados a reducir las fuentes de infección dentro o fuera del cultivo, limitar la dispersión de los vectores y minimizar el efecto de la infección en la producción. En general, estas medidas no ofrecen una solución permanente al problema producido por un virus en una area determinada, salvo en el caso de encontrar una fuente de resistencia a un virus en particular en cultivares agronómicamente importantes, y aun así, la protección puede no ser permanente si aparecen nuevas cepas del virus capaces de infectar el cultivar antes resistente (Matthews, 1991).

### 5.1. Plantas libres de virus.

Los intentos de eliminar los reservorios naturales de un virus en un área determinada tendrán éxito si la gama de huéspedes es restringida, pero para virus como CMV o el bronceado del tomate (TSWV) con una amplia gama de huéspedes puede ser prácticamente imposible. Reservorios naturales de los virus pueden ser: las malas hierbas perennes, o aquellas anuales en las que el virus se transmite por semilla; plantas ornamentales perennes que a menudo son portadoras de infecciones suaves; las semillas portadoras de virus; infecciones crónicas en plantas propagadas vegetativamente, etc. (Matthews, 1991).

Es de gran importancia la certificación de semillas para garantizar la ausencia de virus o un porcentaje de infección muy bajo. Kimble et al (1975) indican que incluso con un 0,1% de transmisión por semilla del potyvirus mosaico de la lechuga (LMV) no se obtiene un buen control de la enfermedad, recomendando un porcentaje <0,003%. Jones y Proudlove (1991) en el caso de CMV transmisible por semilla en el altramuz (*Lupinus angustifolius*), de gran importancia en Australia como planta forrajera, recomiendan no sembrar semilla con más de 0,5% de infección, y observan que cuando la semilla se siembra a 8 y 11 cm de profundidad, en vez de los 5 cm normales, disminuye la incidencia de plantas infectadas en un 15% y 50%, respectivamente.

Se pueden obtener plantas libres de virus mediante termoterapia. CMV ha sido eliminado de varias plantas por este procedimiento (Nylan y Goheen, 1969; Walkey y Freeman, 1977).

### 5.2. Plantas resistentes a virus.

Una de las mejores formas de luchar contra los virus es la introducción de genes de resistencia en cultivares de importancia agronómica. Ponz y Bruening (1986), Everett y Harnett (1987), Fraser (1986, 1987, 1990), Fraser y Gerwitz (1991) han realizado revisiones sobre la resistencia de las plantas a las virosis.

A pesar de estar muy extendida la utilización de cultivares resistentes, no se conoce bien aún la base molecular de la resistencia. El caso más revelador hasta ahora fue el estudiado por Ponz et al (1988), que encontraron que un gen de resistencia presente en *Vigna unguiculata* cv. Arlington frente al virus del mosaico de la carilla (CPMV) codifica para un inhibidor de la proteasa viral encargada del procesamiento de la poliproteína del virus en proteínas individuales.

### 5.2.1. Protección por RNAs satélites.

Como se ha explicado anteriormente, en el caso del CMV la reducción o ausencia de síntomas virales puede estar asociada con la presencia de un pequeño RNA extragenómico (RNA satélite) en el inóculo viral (Mossop y Francki, 1979). Por ej, en China, plantas de pimiento inoculadas con una cepa de CMV que contenía RNA satélite produjeron unos rendimientos significativamente mayores que los de plantas adyacentes no inoculadas, que sufrieron infección natural por CMV (Baulcombe, 1989). También se han llevado a cabo con éxito ensayos de campo con plantas de tomate en Italia (Gallitelli et al, 1991). Francki (1985 a y b) y Tien et al (1987) realizaron una revisión del control de las enfermedades producidas por CMV utilizando el RNA satélite asociado a este virus.

### 5.2.2. Protección cruzada.

En este procedimiento las plantas se inoculan con una cepa suave del virus, lo cual protege a la planta huésped contra la infección por cepas más virulentas. En todos los casos en que se ha demostrado, parece que la presencia de la proteína de la cubierta de la cepa suave del virus en la planta inmunizada impide la expresión del gen de la proteína de cubierta de la cepa más virulenta, evitándose así la acumulación de virus y expresión de los síntomas (Palukaitis y Zaitlin, 1984; Fulton, 1986; Bryant, 1988).

Dodds (1982), mediante protección cruzada con dos cepas de CMV en tomate, observa que hay una inhibición de la acumulación sistémica de virus, además de ausencia de síntomas, aunque el virus se acumula en las hojas inoculadas. En este caso la protección cruzada no es dependiente del huésped, no se produce contra un virus no relacionado como el del mosaico del tabaco (TMV) y se detecta protección tanto en las hojas inoculadas con la segunda cepa como en las hojas formadas posteriormente (Dodds et al, 1985).

### 5.2.3. Plantas transgénicas.

A fin de imitar el fenómeno de la protección cruzada se ha intentado transformar plantas con secuencias virales. El gen de la proteína de cubierta de TMV fue el primero en ser expresado en tabaco transgénico por Bevan et al (1985). Powell Abel et al (1986) también transformaron tabaco con el gen de la proteína de cubierta de TMV y encontraron que las plantas desarrollaban menos síntomas

frente a la infección por TMV. Posteriormente se han realizado experimentos semejantes con el virus del mosaico de la alfalfa (AMV) (Tumer et al, 1987; Loesch-Fries et al, 1987; Van Dun et al, 1987) y otros muchos virus. La resistencia a virus en plantas transgénicas ha sido revisada por Baulcombe (1989) y Beachy et al (1990).

En el caso de CMV, se ha observado que hay tres tipos diferentes de genes que confieren tolerancia a los virus en plantas: unos que codifican para la proteína de la cubierta viral, que son los que hasta ahora han desarrollado una mayor resistencia a virus (Cuozzo et al, 1988; Slightom et al, 1990; Quemada et al, 1991), otros que codifican para RNA contrasentido (gen de la proteína de cubierta de sentido negativo), en cuyo caso las plantas se protegen sólo a concentraciones de inóculo bajas (Cuozzo et al, 1988), y otros que corresponden a diferentes formas del RNA satélite (Baulcombe et al, 1986; Harrison et al, 1987; Jacquemond et al, 1988).

#### 5.2.4. Genes de resistencia naturales

Las plantas poseen un sistema de defensa muy eficiente contra la mayoría de los agresores, la denominada resistencia no huésped (Heath, 1981). Sólo unos pocos agentes bióticos son capaces de inhibir las defensas de una especie en particular. Sin embargo, CMV es un patógeno muy común y efectivo, capaz de infectar muchas especies silvestres y cultivadas y son muy escasas o inexistentes las resistencias mayores en especies cultivadas de gran importancia económica como melón, calabacín, tomate o pimiento (Pochard y Daubèze, 1989).

Se ha encontrado una resistencia parcial a CMV en el pepino cv. China (Kyoto), cuyos protoplastos aislados también son resistentes. Esta resistencia está bajo el control de tres genes que son de naturaleza recesiva y afectan a la replicación viral (Maule et al, 1980). Otra de las resistencias a CMV mejor estudiadas fue la descubierta por Walkey y Pink (1984) en calabacín cv Cinderella, donde el virus es capaz de replicarse en las hojas inoculadas, pero no da lugar a una infección sistémica. Esta resistencia es heredable bajo un control genético relativamente complejo, y resulta más efectiva a altas intensidades de luz y a altas temperaturas (Pink y Walkey, 1985; Pink, 1987). También se ha descrito una resistencia a CMV en melón "P1-161-375" (Risser et al, 1977), que consiste en una resistencia al vector *Aphis gossypii* (Lecoq et al, 1979). Asimismo, se han observado resistencias a CMV, de las que se sabe poco en general, en *Vigna unguiculata*, que presenta una reacción de hipersensibilidad al virus (deZeeuw y Crum, 1963), en lechuga (Provvidenti et al, 1980), y espinaca, todas ellas controladas por genes únicos (Pound y Cheo, 1952; Sinclair y Walker, 1955; Provvidenti et al, 1980). Otras

resistencias en *Phaseolus aureus* y *Phaseolus limensis* se sabe que están determinadas por un gen único dominante y por dos genes dominantes complementarios, respectivamente (Edwardson y Christie, 1991).

#### 5.2.5. Resistencia a CMV en pimiento.

El pimiento (*Capsicum* spp.) es una planta semileñosa dioica ( $2n=24$ ), parcialmente autoalógama y cuyo fruto constituye un alimento frecuente en nuestra dieta. Perteneciente a la familia de las Solanáceas, proviene de sudamérica, de la región del sur de Perú y Bolivia y todavía puede encontrarse *C. annum* creciendo silvestre desde el sur de Estados Unidos hasta el centro de Argentina. Este género fue introducido en Europa a través de los españoles en 1493 (Villalón, 1981).

Se conocen alrededor de 18 diferentes especies de pimiento, de las cuales 5 se han domesticado, y dentro de éstas hay una enorme variedad en tamaño, forma, color, aroma y sabor del fruto (Villalón, 1981). La especie de pimiento cultivada más importante en el hemisferio norte es *C. annum*. Otra especie cultivada en EEUU, Méjico y centroamérica es *C. frutescens*, a la que pertenece el tabasco.

El pimiento, como la mayoría de las plantas hortícolas, es susceptible al ataque de numerosas enfermedades, entre las que destacan los hongos (principalmente *Fusarium* y *Verticillium*) y los virus. A nivel mundial se conocen alrededor de 30 virus que afectan al pimiento, a los que hay que añadir otras enfermedades de supuesta o probada etiología viral en las que el virus implicado no está completamente caracterizado e identificado (Villalón, 1981; Conti y Marte, 1983). Por otro lado, los mayores daños son producidos por un número de virus relativamente bajo: CMV, el virus Y de la patata (PVY), el virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus del grabado del tabaco (TEV), el virus de las manchas en anillo del tabaco (TRSV), y últimamente el virus del bronceado del tomate (TSWV).

El pimiento es uno de los cultivos hortícolas más importantes en España, donde su importancia queda reflejada por las 23.900 Ha. de superficie dedicada al mismo durante el año 1990, de las que un 25% corresponden a cultivo protegido (de Miguel, 1991). En general, CMV y PVY, que se transmiten ambos por áfidos de forma no persistente, son los más prevalentes y los que producen daños económicos más importantes (Luis-Arteaga, 1989), a los que se añade desde 1988 el TSWV, que constituye actualmente el principal problema del cultivo del pimiento al aire libre. En invernadero destacan el virus del moteado suave del pimiento (PMMV), el virus del mosaico del tomate (ToMV) y PVY (Soto y Ponz, 1991; García-Arenal, 1992; Gil-

Ortega y Luis-Arteaga, 1992). Entre los diversos síntomas que produce CMV en pimiento destacan la reducción en el crecimiento, mosaico, filimorfismo y aspecto mate en las hojas, manchas necróticas o en forma de anillo en los frutos, y reducción del cuajado y del tamaño de los frutos (Luis-Arteaga, 1989)

Hasta ahora no se han conseguido plantas de pimiento transgénicas, ya que *Capsicum annuum* es una especie muy difícil de regenerar *in vitro*. Sólo se ha conseguido regenerar a partir de diferentes explantos como hipocótilo y cotiledón (Fari y Czako, 1981; Phillips y Hubstenberger, 1985; Arroyo y Revilla, 1991), y a partir de callo solamente en el caso de utilizar protoplastos (Saxena et al, 1981; Díaz et al, 1988). También se ha observado que *C. annuum* puede ser susceptible a cepas silvestres de *Agrobacterium* (Liu et al, 1990), lo que hace pensar que será posible una transformación genética del pimiento en el futuro.

La Mejora Genética para Resistencia (introducir genes de resistencia o inmunidad a patógenos en cultivares de importancia económica) es la solución más factible actualmente para controlar las enfermedades de virus en pimiento. Sin embargo, hasta ahora no se conoce ningún mecanismo de resistencia eficiente a CMV en las especies de *Capsicum* y especialmente en *C. annuum*. Hay descritas algunas resistencias parciales, por ej. Pochard y Daubèze (1989) describen al menos cinco componentes de resistencia parcial a CMV en varias especies del género *Capsicum*:

- Resistencia a instalación del virus. Lecoq et al (1982) encontraron tres fuentes de esta resistencia: en uno de los casos, en *C. annuum* var. minimum "Rama", existe un gen dominante mayor (Pochard, 1982), pero en los otros dos la herencia es poligénica y recesiva.

- Resistencia a la migración del virus en la planta. Fue descubierta en *C. baccatum* ("Pendulum 3-4") y *C. annuum* "Milord" y "Vania", en las que el virus queda restringido a las hojas inoculadas (Pochard y Chambonnet, 1971; Pochard, 1977; Nono-Womdim et al, 1992). Parece que la resistencia resulta de una inhibición en la translocación del virus hacia o desde el sistema vascular, impidiendo el transporte del virus a largas distancias (Dufour et al, 1989). Esta resistencia poligénica se ha mejorado a través de una selección recurrente, se ha introducido en nuevas variedades de pimiento (Pochard y Daubèze, 1989) y ha sido efectiva en campo, aun en caso de fuertes infestaciones (Marchoux et al, 1986; Nono-Womdim et al, 1992).

- Resistencia a multiplicación viral. Presente en la línea "Perennial" (Singh y Thakur, 1977), su herencia es poligénica (Pochard, 1985).

- Algunos cultivares brasileños presentan una resistencia parcial a la transmisión del CMV por áfidos (Cohen, 1982).

- Más recientemente se ha descubierto un quinto tipo de resistencia en una línea procedente de China: una tendencia a recuperarse tras una infección sistémica, probablemente asociada a un bajo nivel de multiplicación viral en las hojas jóvenes (Pochard y Daubèze, 1989).

Villalón también ha encontrado cierta resistencia a CMV en *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, y algunos pimientos silvestres y primitivos de Texas y Méjico, y los ha introducido en programas de Mejora. Webb y Smith (1969) encuentran resistencia a infección sistémica en *C. frutescens*. Barrios et al (1971) también encuentran una resistencia en *C. frutescens*, al parecer producida por un gen recesivo.

En España, Gil-Ortega y Luis-Arteaga (1982, 1988) han estudiado el comportamiento en la inoculación artificial con cepas españolas del CMV de variedades de pimiento autóctonas y extranjeras con cierta resistencia al virus, y concluyen que la variedad "Perennial" es la que presenta mayor tolerancia de todas las estudiadas.

## OBJETIVOS

## II. OBJETIVOS

El laboratorio de Virología Vegetal del Departamento de Protección Vegetal del CIT-INIA tradicionalmente ha dedicado un considerable esfuerzo al diagnóstico de virus vegetales con importancia económica en España, tratando de desarrollar técnicas específicas, rápidas y sensibles, siendo una de sus finalidades la transferencia de esta tecnología a los laboratorios de Sanidad Vegetal y Servicios de Protección de los Vegetales de las diferentes Comunidades Autónomas. Otra línea de investigación llevada a cabo en nuestro laboratorio estudia las relaciones huésped-parásito, entre las que se encuentran las resistencias a virosis presentes en algunos cultivos.

Dentro de este marco de trabajo, los objetivos concretos de la presente tesis han sido:

- Estudio y comparación de diferentes métodos de diagnóstico rutinario aplicables a un número elevado de muestras para un virus ampliamente distribuido en España e inductor de importantes enfermedades como es el virus del mosaico del pepino (CMV). Estos métodos son tanto aquellos que detectan las proteínas virales (ELISA) como aquellos que detectan los ácidos nucleicos virales (análisis electroforético de RNAs bicatenarios, hibridaciones sobre membranas con clones de cDNA y amplificación enzimática previa transcripción inversa de fragmentos del genoma viral).

- Desarrollo de técnicas de detección mediante amplificación enzimática de parte del genoma del patógeno (PCR), caracterizada por su alta sensibilidad, y hasta ahora de una aplicabilidad limitada, para su utilización en un diagnóstico rutinario, aplicables a virus morfológicamente muy diferentes y a patógenos subvirales como satélites y viroides.

- Aplicación de algunas de estas técnicas de detección a un estudio epidemiológico para la determinación de la presencia del CMV en campo, e identificación del subgrupo al que pertenecen.

- Búsqueda de resistencia a CMV en diferentes líneas de un germoplasma de pimiento procedentes de la zona originaria de este cultivo, Centro y Sudamérica, y recogido en su mayoría creciendo de forma silvestre, lo cual constituye un material genéticamente muy variable, e idóneo para buscar resistencias.

# MATERIALES Y METODOS

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 1. MATERIALES

##### 1.1. Patógenos.

Se utilizaron los siguientes patógenos infectando las siguientes plantas: un aislado de CMV procedente de una platanera canaria (Peña-Iglesias et al, 1979) y un segundo aislado denominado Fny (Owen y Palukaitis, 1988) se mantuvieron infectando plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi nc, *N. glutinosa* L., y pimiento (*Capsicum annuum* L.) "Yolo Wonder"; el cucumovirus de la aspermia del tomate (TAV) se inoculó en *N. tabacum* cv Xanthi nc; el potyvirus mosaico amarillo de la judía (BYMV) (Castro et al, 1992) se inoculó en hojas de haba (*Vicia faba* L.); el nepovirus entrenudo corto infeccioso de la vid (GFLV) infectando vid (*Vitis vinifera* L.) (Fresno, 1992); el luteovirus enrollado de la patata (PLRV) en patatas (*Solanum tuberosum* L.); el tospovirus bronceado del tomate (TSWV) infectando pimiento; el viroide PSTVd en plantas de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ram). Todas estas plantas se conservaron en invernadero. Hojas de naranjo (*Citrus sinensis* Osbeck) infectadas con el closterovirus de la tristeza de los cítricos (CTV) se mantuvieron a 4°C. Hojas de *Nicotiana benthamiana* L. infectadas con el tobamovirus moteado suave del pimiento (PMMV) (Alonso et al, 1991) y varetas de nogal (*Juglans regia* L.) infectadas con el nepovirus enrollado del cerezo (CLRV) (Borja, 1991) se mantuvieron congeladas a -20°C.

##### 1.2. Anticuerpos.

Para la detección de CMV se utilizaron: a) anticuerpos policlonales polivalentes de la casa Sanofi (Francia) que detectan los serotipos DTL, ToRS y Co, b) anticuerpos policlonales de Agdia Inc. (USA) que detectan CMV-cr, y c) un kit compuesto por tres anticuerpos monoclonales de Sanofi: polivalentes, específicos del subgrupo ToRS y específicos del subgrupo DTL.

Para el resto de los patógenos se utilizaron: anticuerpos policlonales para GFLV, PLRV y CLRV de Bioreba, Boehringer y donado por el Dr. Rowhani (U. Davis, California, EEUU), respectivamente; anticuerpos monoclonales de Ingenasa y Agdia en el caso de CTV y BYMV (anti-PTY) respectivamente; anticuerpos

policlonales de sueros brutos sin purificar cedidos por el Dr. Gonsalves (U. Cornell, NY, EEUU) y la Dra. Serra (CSIC, Madrid) en el caso de TSWV y PMMV, respectivamente; líquido ascítico conteniendo anticuerpos monoclonales específicos de RNAs-bc fue donado por el Dr. Powell (U. Florida, FA, EEUU).

### 1.3. Soluciones y tampones

- PBS: fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 3 mM,  $\text{NaN}_3$  3 mM.
- PBS-Tween: PBS conteniendo Tween-20 al 0,05%.
- TAMPON DE EXTRACCION DE MUESTRAS INFECTADAS CON CMV: citrato 0,5 M pH 6,5 conteniendo Triton X-100 al 0,1% y ácido mercaptoacético al 0,1%.
- TAMPON DE EXTRACCION GENERAL: Tris-HCl 0,5 M pH 8,2, PVP-40 al 2%, PEG-6000 al 1%, NaCl 140 mM, Tween-20 al 0,05%, azida sódica 3 mM.
- TAMPON SUSTRATO PARA FOSFATASA ALCALINA: dietanolamina al 9,7% pH 9,8, conteniendo azida sódica 3 mM.
- STE: NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.
- TAE: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.
- TBE: Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0.
- TAMPON DE LISIS: glucosa 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8,0, EDTA 10mM, 4 mg/ml lisozima.
- TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0.
- SSC 20 X: NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7,0.
- TNE :Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.
- Solución de Denhardt 50 X: Ficoll 400 al 1%, PVP-40 al 1%, seroalbúmina bovina al 1% (p/v).

#### 1.4. Medios de cultivo.

- Medio LB (Luria-Bertani) líquido tamponado: Bacto-triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%, pH 7,5.

#### 1.5. Estirpes bacterianas.

Los genotipos de las estirpes bacterianas utilizadas son:

- *Escherichia coli* NM522: *recA*<sup>+</sup> (*supE*, *thi*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), *hsd5*, [F', *proAB*, *lacI*<sup>Q</sup>, *lacZ* $\Delta$ M15])
- *Escherichia coli* XL1-blue: *recA*<sup>-</sup> (*recA1*, *lac*<sup>-</sup>, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, [F', *proAB*, *lacI*<sup>Q</sup>, *lacZ* $\Delta$ M15, Tn10]).

#### 1.6. Productos.

- Endonucleasas de restricción: se emplearon endonucleasas de restricción de Boehringer Mannheim y Amersham, utilizadas generalmente con los tampones y condiciones sugeridos en los catálogos de los proveedores.
- Otras enzimas: DNA polimerasa termoestable (PyroStasa) de Boehringer, M-MLV-RT (transcriptasa inversa del MMLV) de Gibco BRL.
- Material radiactivo:  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP de Amersham.
- Productos químicos: en general se utilizaron reactivos procedentes de Merck, Sigma, Panreac, Pharmacia, Prolabo y Carlo Erba.
- Otros: kit "Multiprime labelling system" (Amersham), kit "DNA labeling and detection nonradioactive" (Boehringer), líquido de centelleo (Ready Value™, Beckman), inhibidor de ribonucleasas (HPRI, Amersham), placas ELISA de poliestireno (Nunc), marcador de pesos moleculares 1 Kb ladder (Gibco BRL). El marcador DNA del fago lambda cortado con la enzima de restricción PstI fue preparado en el laboratorio por los métodos estándar de Sambrook et al (1989). Los cebadores fueron sintetizados mediante encargo por Biosynthesis S. L.

#### 1.7. Equipo

- Ultracentrífuga Beckman L8-55M y Beckman TL-100.
- Espectrofotómetro Zeiss PMQ3.
- Espectrofotómetro para placas Titertek Multiskan Plus MK II.
- Contador de centelleo (Beckman LS 1801).

- Horno con movimiento rotatorio (Hybaid mini hybridisation oven).
- Termociclador de tubos: Intelligent Heating Block IHB 2024 (Cambio) y Perkin Elmer Cetus gene amp PCR system 9600. Termociclador de placas: Techne PHC-3, con un adaptador para placas.
- Fluorímetro TKO 100 (Hofer)

## 2. INOCULACION MECANICA DE LOS VIRUS

Hojas de muestras infectadas se trituraron en un mortero en presencia de tampón fosfato 0,01 M pH 7,0. Las plantas a inocular se pulverizaron previamente con el abrasivo carborundo 600 mesh, capaz de originar microheridas que facilitan la entrada del virus al interior de la célula vegetal. A continuación el macerado vegetal se frotó sobre las hojas y las plantas se conservaron en condiciones de invernadero o en cámaras de cultivo.

## 3. TECNICAS INMUNOENZIMATICAS

### 3.1. La técnica ELISA.

Con los antisueros policlonales de CMV (Sanofi, Agdia) se realizaron ensayos ELISA-DAS en placas de poliestireno, que se realizan básicamente según Clark y Adams (1977) sólo que los volúmenes utilizados fueron 0,1 ml. Se utilizaron las diluciones sugeridas por las casas comerciales para los anticuerpos y conjugados. El tampón de extracción de las muestras en la proporción 1/10 (p/v) fue citrato 0,5 M pH 6,5 conteniendo Triton X-100 0,1% y ácido mercaptoacético 0,1%. Las muestras se procesaron en mortero, o en el caso de las hojas, en bolsa de plástico con la ayuda de un tubo de vidrio. En los ensayos con los anticuerpos de Sanofi, conjugados con fosfatasa alcalina, el sustrato utilizado fue p-nitrofenilfosfato y las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 405 nm, mientras que con los anticuerpos de Agdia, conjugados con peroxidasa, el sustrato utilizado fue o-fenilendiamina y las lecturas se hicieron a 490 nm. Las placas se dejaron a temperatura ambiente en oscuridad, y se realizaron lecturas espectrofotométricas a distintos tiempos.

Para la identificación de los subgrupos de CMV se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos (Sanofi) en ensayos de ELISA-TAS realizados según las instrucciones de la casa comercial.

### 3.2. Estandarización de la técnica ELISA.

Con el objeto de determinar el tiempo idóneo para realizar las lecturas espectrofotométricas, que es aquél que presenta mayor diferencia entre la absorbancia de la muestra infectada y la de la sana (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1981), se hizo un análisis de las absorbancias obtenidas a distintos tiempos con varias muestras en distintos huéspedes tanto para los anticuerpos policlonales de Sanofi como para los de Agdia.

Para estandarizar el ensayo de detección de subgrupo al que pertenece el virus se siguió el procedimiento de Kearney et al (1990) realizando un ensayo ELISA-TAS con anticuerpos de los dos subgrupos utilizando muestras de serogrupo conocido mantenidas en invernadero (CMV de la platanera canaria, perteneciente al grupo ToRS, y CMV-Fny perteneciente al DTL), en el que se generan dos valores de  $A_{405}$  que representados en un gráfico dan lugar a dos zonas limitadas por dos rectas, que engloban a los dos subgrupos.

Otro factor a estandarizar fue el de los tampones utilizados en la homogeneización de las muestras. Se estudiaron varios tampones: el recomendado por la casa comercial de Sanofi y los utilizados por otros autores (Clark y Bar-Joseph, 1984; Fresno, 1992) a fin de elegir el que diera mejor resolución entre la planta sana y la planta enferma.

## 4. PURIFICACION DE CMV Y DE LOS RNAS VIRALES

### 4.1. Purificación del virus

Para la purificación del virus se utilizaron hojas de *N. tabacum* cv Xanthi inoculadas con un aislado de CMV, y se siguió el protocolo descrito por Lot et al (1972) que utiliza como tampón de extracción citrato 0,5 M pH 6,5 conteniendo ácido mercaptoacético 0,1%, y clarifica con cloroformo. El virus se concentra por precipitación con polietilenglicol, seguido de dos ciclos de centrifugaciones a baja y alta velocidad, y una centrifugación en gradiente de sacarosa 5-30%. El virus se

cuantificó por lectura espectrofotométrica considerando que ( $E_{10\text{mm}}^{0,1\%}$ ) a 260 nm: 5,  $A_{260}/A_{280}=1,7$  (Francki et al, 1979).

#### 4.2. Extracción del RNA viral.

El virus suspendido en tampón fosfato 20 mM pH 7,0 se fenolizó con fenol saturado con agua conteniendo SDS al 0,1%. Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa se precipitaron con 2,5 volúmenes de etanol absoluto a  $-70^{\circ}\text{C}$  en presencia de acetato sódico 0,3 M pH 5,2. Tras centrifugar, el precipitado se resuspendió en agua estéril, y se mantuvo a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El RNA se cuantificó por lectura espectrofotométrica donde ( $E_{10\text{mm}}^{0,1\%}$ ) a 260 nm: 25.

#### 5. ANALISIS DE RNAS BICATENARIOS

Se utilizó el método descrito por Morris y Dodds (1979) con pequeñas modificaciones como se ha descrito previamente (Romero et al, 1988). Se extrajeron los ácidos nucleicos totales en 2 ml/g (v/p) de STE 2X, 1,5 ml/g de fenol saturado en agua, 1,5 ml/g de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), 0,1 ml/g de SDS 10%, 10  $\mu\text{l/g}$  de 2-mercaptoetanol y bentonita como abrasivo. El conjunto se agitó en tubos de centrífuga durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 7500 g durante 20 min. A la fase acuosa se le añadió etanol hasta una concentración final del 15%, y la muestra se cromatografió a través de una columna de 3 ml de volumen de celulosa CF 11 (Whatman) preequilibrada con STE conteniendo 15% etanol. En estas condiciones los RNAs-bc quedan específicamente retenidos en la celulosa, y posteriormente se eluyen con tampón STE sin etanol.

Los RNAs-bc se precipitaron con etanol en presencia de 0,3 M acetato sódico y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE o poliacrilamida al 5% en tampón TBE. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 1  $\mu\text{g/ml}$  y el DNA se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Algunos geles de poliacrilamida fueron teñidos posteriormente con nitrato de plata según el método de Sammons et al (1981) descrito por Igloi (1983).

## 6. DETECCIÓN DE CMV POR HIBRIDACIONES SOBRE MEMBRANA.

### 6.1. Clones de cDNA.

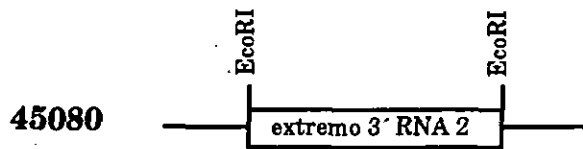
Se utilizaron tres clones para preparar las sondas (Figura 12):

a) **45080**, obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC), portador de un inserto de cDNA de 422 nt del extremo 3' del RNA 2 (residuos 2479-2900) de la cepa CMV-Q perteneciente al grupo ToRS y clonado en el fago M13mp7. Para su multiplicación se incubó *Escherichia coli* NM522 a 37°C en medio LB y se transfectó con este clon. Se hizo una preparación de las formas replicativas según Sambrook et al (1989), y se purificaron según Morelle (1988), mediante lisis alcalina del cultivo, concentración de ácidos nucleicos por isopropanol y purificación por centrifugación en gradiente de CsCl.

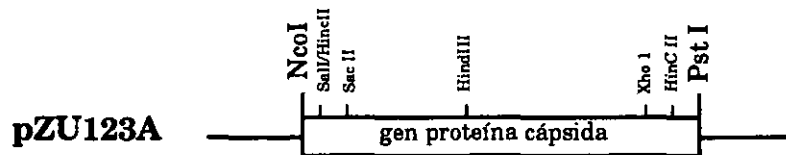
El inserto se liberó por escisión con la enzima de restricción Eco RI, y se purificó a partir de un gel de agarosa al 1,5% con tiras de papel de cambio de iones DEAE Trans-Blot™ (Bio-Rad). El DNA se extrajo de éste por incubación a 70°C durante una hora con tampón de extracción (arginina 0,01M, NaCl 1M), con una posterior fenolización y concentración del inserto por precipitación con etanol absoluto. Una vez resuspendido en TE pudo ser utilizado en posteriores ensayos.

b) **pZU123A**, donado por el Dr. A. Schram, de Zaadunie Biotechnology (Holanda). Este clon es portador de un inserto de cDNA de 659 nt del gen de la proteína de cubierta de un aislado de CMV-T<sub>2</sub> y clonado en pBin 19. Una colonia de *E. coli* XL1-blue portadora del plásmido con el inserto se creció en medio LB con 50 µg/ml de kanamicina, y los plásmidos se purificaron según el método de Morelle (1988), seguido de una centrifugación en CsCl. Para obtener la sonda se amplificó un fragmento de 496 pb del inserto utilizando los cebadores B y D (Figura 13) según el protocolo de PCR (ver apartado 7.2).

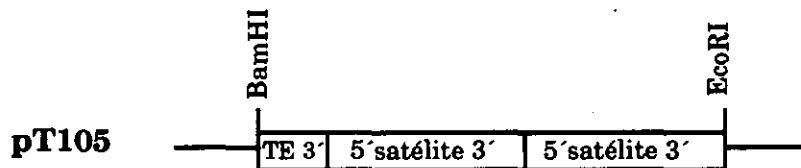
c) **pT 105**, cedido por el Dr. B. Harrison (SCRI, Dundee, Gran Bretaña), portador de un inserto conteniendo dos secuencias completas y otra parcial de un satélite de CMV-I<sub>17</sub>N en un vector de expresión basado en el sistema plásmido Ti (Baulcombe et al, 1986). El plásmido se purificó según el método de Morelle (1988) y para liberar el inserto se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (Sambrook et al, 1989). El inserto se purificó como se ha explicado previamente en el apartado a) de esta sección.



a) CLON 45080 en M13mp7, portador de un cDNA de 422 nt del extremo 3' (residuos 2479-2900) del RNA 2 de la cepa CMV-Q.



b) CLON pZU123A, en pBin 19, portador de un cDNA de 659 nt de la proteína de la cápsida de CMV-T<sub>2</sub>.



c) CLON pT105 en pásmido Ti portador de cDNA de satélite de CMV. TE= 108 nt de la posición 227-335 de la secuencia del satélite. A continuación hay dos unidades del satélite completas (Baulcombe et al, 1986).

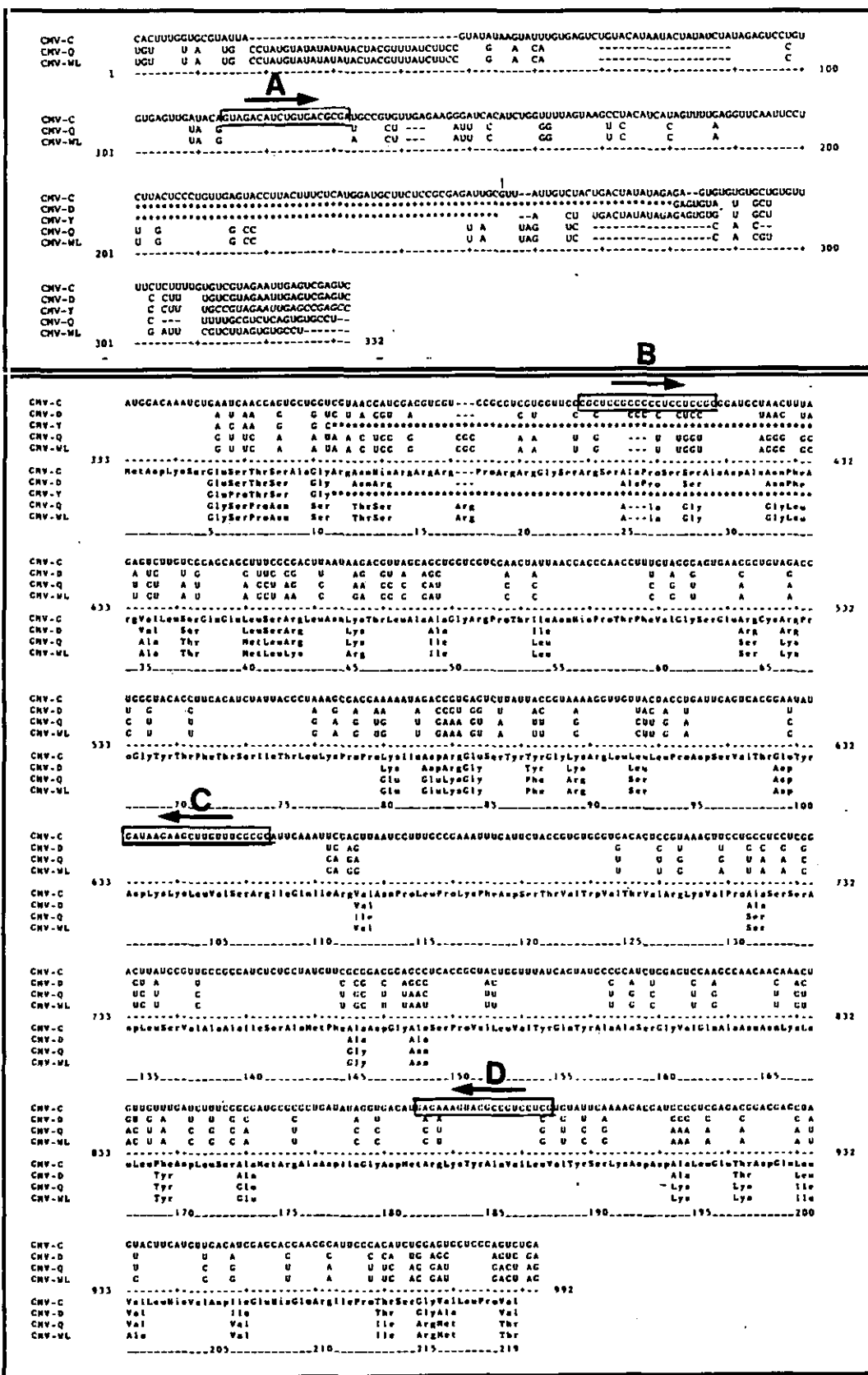
**500 nt**

---

**Fig 12.** Clones de CMV utilizados como sondas en las hibridaciones.

**Región  
intergénica  
no codificante**

**Gen de la  
proteína  
de la cápsida**



**Fig 13.** Cebadores diseñados para detectar CMV por RT-PCR (Secuencias de Quemada et al, 1989).

## 6.2. Transferencia tipo Southern de DNA a membranas.

Los DNAs se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE y se transfirieron a membranas de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham, Inc.) mediante transferencia alcalina con NaOH 0,4 M durante toda la noche (Sambrook et al, 1989). Después de la transferencia, las membranas se enjuagaron en una solución SSC 2X y se guardaron envueltas en plástico a 4°C hasta el momento de la hibridación.

## 6.3. "Dot-blot" de macerados vegetales sobre membranas.

El macerado vegetal de las muestras se extrajo de forma análoga a los ensayos ELISA con el mismo tampón de extracción, realizando en ocasiones diluciones seriadas de las muestras.

Membranas de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) o nitrocelulosa (Hybond C de Amersham o Schleicher & Schuell BA-85) cortadas al tamaño adecuado se lavaron en primer lugar en agua destilada para ser posteriormente saturadas en SSC 20X (nitrocelulosa) o 5X (nylon). De cada muestra previamente desnaturalizada a 65°C 5 min se pipetearon 10 µl en un punto ("dot") y se dejaron secar. Los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana por tratamiento térmico (80°C 2 h en el caso de nitrocelulosa) o por tratamiento alcalino (NaOH 50 mM durante 5 minutos en el caso de Hybond N<sup>+</sup>), seguido de breve inmersión en SSC 2X con agitación. Las membranas se guardaron envueltas en plástico a temperatura ambiente (nitrocelulosa) o a 4°C (nylon) hasta el momento de la hibridación.

## 6.4. Marcaje de las sondas.

Los insertos purificados o los fragmentos amplificados por PCR se marcaron radiactivamente por síntesis con oligonucleótidos al azar y  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP en presencia del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (kit "Multiprime labelling system"). Los nucleótidos marcados no incorporados se eliminaron mediante cromatografía en una columna de Sephadex G-50 según el método descrito por Sambrook et al (1989), y se midió la incorporación de radiactividad en un contador de centelleo con líquido de centelleo.

El marcaje no radiactivo se llevó a cabo con digoxigenina mediante el kit "DNA labeling and detection nonradioactive". DNA desnaturalizado 10 min a 95°C se mezcló en un tubo eppendorf con hexanucleótidos al azar, dNTPs (dATP 0,1 mM

+ dCTP 0,1 mM + dGTP 0,1 mM + dTTP 65  $\mu$ M + dig-dUTP 35  $\mu$ M), y 2 unidades del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (volumen final de 20  $\mu$ l), y se incubó 1 h a 37°C. Se detuvo la reacción con 2  $\mu$ l de EDTA 0,2 M pH 8,0, y el DNA se precipitó con 2,5  $\mu$ l de LiCl 4 M y tres volúmenes de etanol frío. Tras dejar a -70°C 30 min se centrifugó y resuspendió en TE.

#### 6.5. Hibridación con sondas radiactivas.

Las membranas con las muestras a analizar se prehibridaron a 65°C en un horno con movimiento rotatorio durante al menos una hora en 50  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> de tampón SSC 5X, solución de Denhardt 5X, SDS al 0,5%, conteniendo 20  $\mu$ g/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado mediante calor (100°C durante 5 min) (Sambrook et al, 1989). La hibridación se realizó durante toda la noche a 65°C en el mismo horno y con la misma solución de prehibridación a la que se añadió la sonda marcada previamente desnaturalizada a 100°C durante 5 minutos. Después de la hibridación, las membranas se lavaron tres veces durante 15 min en SSC 2X, SDS 0,1% a 65°C, una vez durante 10 min en SSC 2X, SDS 0,1% a 65°C, y una vez durante 5 min en SSC 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente. Una vez secas las membranas se expusieron con pantalla intensificadora a una película de rayos X (Kodak XAR 5) y se mantuvieron a -70°C hasta el momento del revelado.

#### 6.6. Hibridación con sondas no radiactivas (digoxigenina).

La prehibridación de las membranas se realizó en 200  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> de una solución SSC 5X conteniendo agente de bloqueo al 5% (p/v), sarkosil al 0,1%, y SDS al 0,02% durante al menos 1 h. en horno con movimiento rotatorio a 65°C. La hibridación se realizó durante toda la noche a 65°C con la misma solución de prehibridación a la que se añadió la sonda marcada y desnaturalizada durante 5 min a 100°C. Después de la hibridación, las membranas se lavaron cuatro veces en SSC 2X, SDS 0,1% a 65°C (condiciones de hibridación restrictivas). La digoxigenina se detectó mediante anticuerpos anti-digoxigenina (fragmentos Fab) conjugados con fosfatasa alcalina que en presencia de NBT (nitrato azul de tetrazolio) y solución X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato de toluidinio) revelan su posición por una reacción colorimétrica.

## 7. DETECCION DE VIRUS Y PATOGENOS SUBVIRALES POR AMPLIFICACION ENZIMATICA

### 7.1. Oligonucleotidos cebadores.

A fin de diseñar unos cebadores para la detección de CMV se compararon las secuencias publicadas del RNA 3 pertenecientes a las cepas de los dos subgrupos (Quemada et al, 1989), buscando zonas conservadas y evitando el extremo 3' con estructura secundaria en forma de tRNA. Se eligió un primer cebador A (19 mer) homólogo al fragmento de la región intergénica no codificante situado entre los nt 114 y 132 (numeración de estos autores), y un segundo cebador C (21 mer) complementario al fragmento situado entre los residuos 633 y 653 del gen de la proteína de cubierta, de manera que la zona amplificada tiene un tamaño esperado de 540 nt (Tabla 2). Con el objeto de amplificar parte del gen de la proteína de cubierta se utilizaron otros dos cebadores B y D que amplifican un fragmento de 497 pb entre los residuos 398 y 894 (Figura 13).

En el caso de PLRV y CLRV se utilizaron los cebadores descritos por Robertson et al (1991) y Borja y Ponz (1992), respectivamente. Los cebadores para TSWV fueron donados por el Dr. A. Schram (Zaadunie Biotechnology, Holanda). El resto de los cebadores fueron diseñados según las secuencias publicadas de los patógenos y recogidas en la Tabla 2, utilizándose en algunos casos el programa informático OLIGO™ (Oligo software). En esta tabla están especificadas las secuencias de todos los cebadores utilizados, así como las regiones que se amplifican.

### 7.2. RT-PCR a partir de un macerado vegetal.

El ensayo se realizó básicamente según Borja y Ponz (1992) con pequeñas modificaciones en las concentraciones de los reactivos. Una primera reacción de transcripción inversa (RT), se llevó a cabo en tubos eppendorf (1,5 ml) en un volumen final de 20 µl, en la que al macerado vegetal de la planta extraído en Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tween-20 al 0,05%, gelatina al 0,01%, KCl 50 mM (concentraciones finales), se le añadieron 20 pmoles de cebador 3', 1 mM dNTPs, 25 unidades de inhibidor de ribonucleasas, y 200 unidades de transcriptasa inversa. Se incubó a 37°C durante una hora, a fin de sintetizar el cDNA de cadena sencilla.

**Patógeno**

**Cebador 5'**  
 BYMV 5'-GCCTTATGGTGTGGTGCATAG-3'  
 CLRV 5'-CATGACGAGTGGGCGTC-3'  
 CMV 5'-GTAGACATCTGTGACGCGA-3' (A)  
 CMV-sat 5'-GATGGAGAATTGCCGACAGGG-3'  
 CTV 5'-ATGGACGACGAAACAAAGAA-3'  
 GFLV 5'-CCGTGAGAGGATTGGCTGGTA-3'  
 PLRV 5'-CCAGTGGTTRTGGTC-3'  
 PMMV 5'-TGTCTGCTATGCTGCCTTCC-3'  
 PSTV 5'-GGGTTTTACCCCTTCC-3'  
 TSWV 5'-ATCAAGCTTCTGAAGGTCAT-3'

**Cebador 3'**

5'-CAAGCATGGTGTGCATATCACG-3'  
 5'-GCGTCGGAAAGATTACG-3'  
 5'-GCGCGAAACAAGCTTCTTATC-3' (C)  
 5'-CATTACGGAGATCAGCATAGC-3'  
 5'-CAAGAAATCCGCACACAAGT-3'  
 5'-ATGGGAGGGCAAGTGAGAAAT-3'  
 5'-GTCTACCTATTTGG-3'  
 5'-CCTTTTCCCCTCGTTCTGTAA-3'  
 5'-GAGAAAAAGCGGTTCTCGGG-3'  
 5'-CATGGATCCTGCAGAGCAATTGTGTCA-3'

<u>Patógeno</u>	<u>Tamaño fragmento</u>	<u>Región amplificada</u>	<u>Parte del genoma</u>	<u>Referencia</u>
BYMV	447 pb	389-835	gen de la PC	Hammond y Hammond, 1989
CLRV	453 pb	1210-1662	RNA 1	Borja, 1991
CMV	540 pb	114-653	RNA 3	Quemada et al, 1989
CMV-sat	303 pb	10-312	total	Kaper et al, 1988
CTV	541 pb	1-540	gen de la PC	Sekiya et al, 1991
GFLV	568 pb	2040-2607	gen de la PC	Sánchez et al, 1991
PLRV	534 pb	3687-4220	gen de la PC y proteína 17 kDa	Robertson et al, 1991
PMMV	496 pb	735-1230	gen de la proteína 126 kDa	Alonso et al, 1991
PSTV	130 pb	174-303	total	Gross et al, 1978
TSWV	456 pb	2473-2916	RNA S	de Haan, 1990

**Tabla 2.** Cebadores específicos utilizados para detectar diferentes patógenos y regiones amplificadas. La secuencia subrayada corresponde a una cola no complementaria al genoma viral. PC: proteína de cubierta. A y C corresponden a los cebadores descritos en la Figura 13.

La segunda cadena del cDNA y la amplificación se llevó a cabo en un volumen de 100  $\mu$ l, añadiendo a la solución de RT 20 pmoles de cebador 5' y tampón Pyroxtasa 10X (suministrado con la enzima), de forma que las concentraciones finales de la solución de amplificación fueron Tris-HCl 60 mM pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 2,1 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, albúmina de suero de bovino al 0,005%, dNTPs 0,2 mM y 0,2  $\mu$ M de cada cebador. La solución se cubrió con 100  $\mu$ l de aceite mineral para prevenir evaporaciones. Se desnaturalizó a 92°C 2 min, se añadieron 2 u de DNA polimerasa termoestable (Pyroxtasa) a 72°C, y se sometieron las soluciones a 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 1 min, anillamiento a 54°C 1 min, y extensión a 72°C 1 min en un termociclador. El tiempo de extensión se alargó en el último ciclo a 7 min para completar la síntesis de DNA en todas las cadenas.

Después de la amplificación, en algunas ocasiones se concentró el DNA añadiendo 150  $\mu$ l de cloroformo, y recuperando la fase acuosa. El DNA se precipitó a -70°C durante 30 min con 10  $\mu$ l de acetato sódico 3M pH 5,2, y 250  $\mu$ l de etanol absoluto, y se centrifugó a 4°C durante 15 min. El DNA se resuspendió en TE pH 8,0 y una alícuota se sometió a electroforesis tal como se describe en el apartado 5.

7.3. RT-PCR basada en captura del virus con anticuerpos específicos en placas de microtitulación.

Se tapizaron placas de microtitulación de fondo cóncavo con 50  $\mu$ l de una suspensión de los anticuerpos correspondientes en tampón carbonato pH 9,6 a la dilución habitual utilizada para ELISA o en el caso de los antisueros brutos a 1/500. La temperatura y periodo de incubación fue igual que para ELISA. Los tejidos de planta se procesaron en 1/10 (p/v) de tampón de extracción general, y se añadieron 50  $\mu$ l por pocillo tras lavar tres veces con PBS-Tween pH 7,4. Después de incubar toda la noche a 4°C se lavaron los pocillos con extremo cuidado para evitar contaminaciones y se procedió a la amplificación.

En un principio, a fin de permitir la apertura de los viriones inmovilizados en la placa se llevó a cabo un tratamiento térmico: las placas vacías se congelaron a -70°C durante al menos una hora, se añadieron 50  $\mu$ l de agua tratada con DEPC a cada pocillo, y, tras incubar durante 20 min a 65°C, se recogieron 10  $\mu$ l para realizar la transcripción inversa. Más adelante, este paso se omitió y sin tratamiento previo 20  $\mu$ l de premezcla de transcripción inversa (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, 1 mM de cada dNTP, cebador 3' 1  $\mu$ M, y 200 unidades de transcriptasa inversa se añadieron directamente a cada pocillo, la placa se tapó

cuidadosamente y se incubó 1 hora a 37°C con agitación, a fin de recuperar la máxima cantidad de virus.

La amplificación se llevó a cabo bien en tubos eppendorf (en la mayoría de los casos durante el desarrollo del método) o bien en los mismos pocillos de la placa donde se realizó la transcripción inversa (en este caso se utilizaron placas de policarbonato Techne), a fin de comprobar que podía realizarse el ensayo completo en la misma placa. En estos casos se utilizó un termociclador adaptado a placas. En cualquier caso, se realizó la amplificación añadiendo 80 µl de mezcla de amplificación y se añadió 100 µl de aceite mineral a fin de evitar evaporaciones. Las concentraciones finales (volumen final de 100 µl) de los reactivos fue: Tris-HCl 60 mM pH 9, KCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,1 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada cebador y albúmina de suero de bovino al 0,005%. Después de una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, se llevó la temperatura a 72°C y se añadieron 1,6 unidades de DNA polimerasa termoestable (PyroTasa) y la amplificación tuvo lugar a través de 30 ciclos (ó 35 en el caso de PLRV y PSTVd). Cada ciclo consistía en una fase de anillamiento de 1 min a 52°C (41°C en el caso de PLRV o 45°C para PSTVd), una fase de elongación de 1 min a 72°C y una fase de desnaturalización de 30 s a 93°C. Un ciclo final con una fase de elongación de 5 min terminaba el proceso. La detección de los productos de PCR normalmente se realizó por electroforesis de 1/3 del volumen de la mezcla de reacción, tinción por bromuro de etidio 1 µg/ml y visualización con luz UV. Alternativamente, el DNA amplificado se cuantificó por fluorimetría, según se explica en el apartado 7.7.

#### 7.4. RT-PCR realizada sobre placas ensayadas previamente con la técnica ELISA.

Tras terminar un ensayo con la técnica ELISA, la solución presente en el pocillo se eliminó lavando una vez con PBS-Tween pH 7,4, se añadieron a los pocillos 20 µl de la mezcla de transcripción inversa, y se continuó como se ha descrito en el apartado 7.3.

#### 7.5. RT-PCR basada en captura del virus por adsorción directa al poliestireno.

Se adsorbieron directamente a la placa 50 µl de extractos de planta 1/10 (p/v) en tampón carbonato 0,05 M pH 9,6, conteniendo PVP al 1%. Tras incubación toda la noche a 4°C y lavar, las placas se procesaron como se ha descrito en el apartado 7.3.

## 7.6. RT-PCR basada en captura de RNA bicatenario.

Se tapizaron los pocillos con 50  $\mu$ l de líquido ascítico conteniendo anticuerpos monoclonales específicos de RNA-bc, diluído 1/100 en tampón carbonato 0,05 M pH 9,6. Se añadieron a los pocillos 50  $\mu$ l de extractos de planta 1/10 (p/v) en el tampón de extracción general, se incubaron toda la noche y la placa se lavó tres veces con PBS-Tween pH 7,4. A cada pocillo se añadieron 20  $\mu$ l de agua tratada con DEPC conteniendo cebador 3' 1  $\mu$ M, se incubó durante 5 min a 90°C y se enfrió rápidamente. Se recogió un volumen de 12,5  $\mu$ l y se transfirió a un tubo eppendorf, añadiendo el resto de los componentes de la transcripción inversa descritos anteriormente hasta completar el volumen de 20  $\mu$ l. Los siguientes pasos fueron como se ha descrito en el apartado 7.3.

Las hojas infectadas con PSTVd, por replicarse y acumularse este viroide dentro de los núcleos (ver Introducción), fueron tratadas a fin de romper éstos. Las hojas de crisantemo infectadas se pulverizaron en mortero en presencia de nitrógeno líquido, y se homogeneizaron con el tampón de extracción mencionado al que se añadió Triton X-100 al 0,1% y Nonidet P-40 al 0,1 %. Se agitó durante 5 min a 4°C, 50  $\mu$ l de estos extractos se añadieron a los pocillos y se continuó el procedimiento como se ha descrito en el apartado 7.3.

## 7.7. Cuantificación del DNA amplificado por fluorimetría.

En algunos experimentos se cuantificaron los productos de amplificación por fluorimetría. Para ello se diluyó 1/3 del volumen de la reacción en 2 ml de TNE conteniendo 1  $\mu$ g/ml de fluorocromo Hoechst 33258. La mezcla se excitó a 353 nm y la fluorescencia emitida se leyó en un fluorímetro a 453 nm.

## 8. DETECCION DE CMV EN MUESTRAS DE CAMPO.

Durante las campañas agrícolas de los años 1990 y 1991 se recogieron en diferentes regiones españolas muestras de campo, en su mayoría hortícolas, con síntomas de virosis, en algunos casos sin síntomas y también algunas malas hierbas. A fin de evitar contaminaciones, se recogieron en bolsas separadamente (directamente a través de la bolsa o con guantes), y se introdujeron inmediatamente

en una nevera portátil con hielo hasta su conservación a 4°C, -20°C o desecación con gel de sílice. La descripción de este material se encuentra en el anexo I.

Las muestras fueron ensayadas por ELISA-DAS con anticuerpos policlonales para determinar su posible infección con CMV. En los ensayos de 1991, las muestras positivas fueron ensayadas con anticuerpos monoclonales específicos de grupo para determinar su serotipo (técnicas descritas en 3.2).

## 9. BUSQUEDA DE RESISTENCIA A CMV EN GERMOPLASMA DE PIMIENTO.

El Centro de Conservación de Recursos Fitogenéticos (CCRF) del CIT-INIA (Centro de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias), ubicado en la Finca de El Encín (Alcalá de Henares, Madrid), dispone de una amplia colección de líneas de pimiento. Muchas de éstas provienen de la zona originaria de la especie *Capsicum*, en Centro y Sudamérica, cedidas por el Banco de Germoplasma de la Universidad de La Molina (Lima, Perú) y del Banco de Germoplasma de C.A.T.I.E. (Costa Rica). En los últimos años, estas líneas están siendo caracterizadas morfológicamente en el propio Centro por Nicolás Gonzales. Para ello ha realizado un seguimiento de la segregación de caracteres morfológicos durante tres años: en 1988 de cada línea sembró 10 semillas (NG-080-1, NG-080-2, etc.; de éstas en 1989 sembró 5 de cada una (NG-080-1-1, 080-1-2, etc); y de éstas en 1990 sembró tres semillas (NG-080-1-1-1, etc).

Con el objeto de buscar resistencias a CMV se analizaron semillas de diferentes especies del género *Capsicum* (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*, *C. spp.*) de esta colección, y cuya descripción se encuentra en el anexo II.

Las semillas se trataron con fungicida (materia activa Mancozeb) y se pusieron a germinar sobre papel de filtro humedecido en agua estéril dentro de placas Petri en una cámara oscura a 30°C. Una vez germinadas, una media de 9 semillas de cada línea se trasplantaron a bandejas de plástico (64 pocillos/bandeja) con vermiculita (Termita, Asfaltex, S. A.) inmersas en 1g/l de solución nutritiva (abono foliar Hakaphos azul 15.11.15.0,8, Basf). En cada bandeja se pusieron al menos dos controles de la variedad susceptible "Yolo Wonder". Las bandejas se mantuvieron en una cámara de cultivo de plantas a 24 ±1°C de temperatura máxima, 14 ±1°C de temperatura mínima, con un fotoperiodo de 16h luz y 8 de oscuridad, y una iluminación de 110-100 µEm<sup>-1</sup>s<sup>-2</sup>. Al alcanzar un estadio de 4-6

hojas expandidas se procedió a su inoculación según se ha descrito en el apartado 2. Como inóculo se utilizó un extracto 1/5 (p/v) de hojas de tabaco infectadas con CMV en tampón fosfato 0,01 M pH 7,0. Generalmente se inoculó con el aislado Fny (Owen y Palukaitis, 1988), que se caracteriza por producir síntomas graves, aunque en algunos casos en que éste no se encontraba en óptimas condiciones se utilizó el aislado de la platanera canaria o muestras de Almería pertenecientes al grupo DTL.

Al cabo de un mes aproximadamente se procedió a un primer análisis visual de las plantas. Las líneas que presentaron síntomas de infección (mosaico, deformación de las hojas y/o retraso en el crecimiento) fueron consideradas sensibles al virus, y las líneas asintomáticas fueron analizadas con el test ELISA con anticuerpos policlonales (Sanofi) polivalentes. Las que resultaron ser ELISA negativas fueron trasplantadas a tierra y fueron reinoculadas. Las que a pesar de la reinoculación seguían siendo negativas se llevaron a campo o se mantuvieron en invernadero con el objeto de obtener descendencia por autofecundación a fin de continuar el estudio de la resistencia. En algunos casos además se realizaron cruzamientos genéticos con otras líneas.

# RESULTADOS

## IV. RESULTADOS

### 1. PUESTA A PUNTO Y EVALUACION DE LAS TECNICAS DE DETECCION RUTINARIA DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV).

Se han puesto a punto varias técnicas de detección de CMV a fin de evaluar su aplicabilidad a un diagnóstico rutinario de un número elevado de muestras. Estas técnicas son tanto aquellas que detectan las proteínas virales (ELISA) como las que detectan los ácidos nucleicos virales (análisis electroforético de RNAs bicatenarios, hibridación sobre membranas con clones de cDNA y amplificación enzimática previa transcripción inversa de fragmentos del genoma viral).

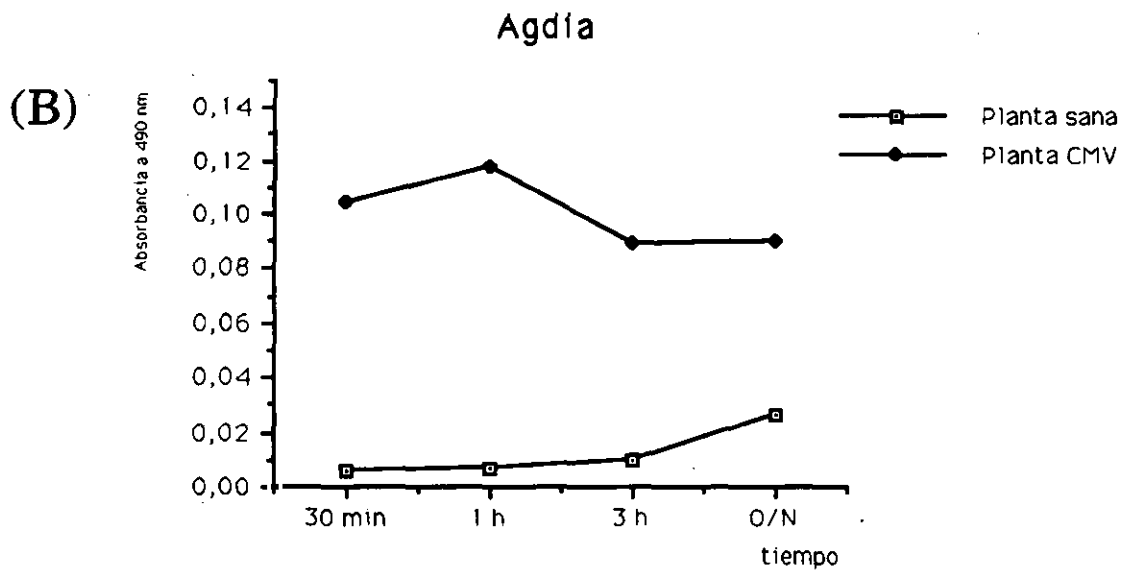
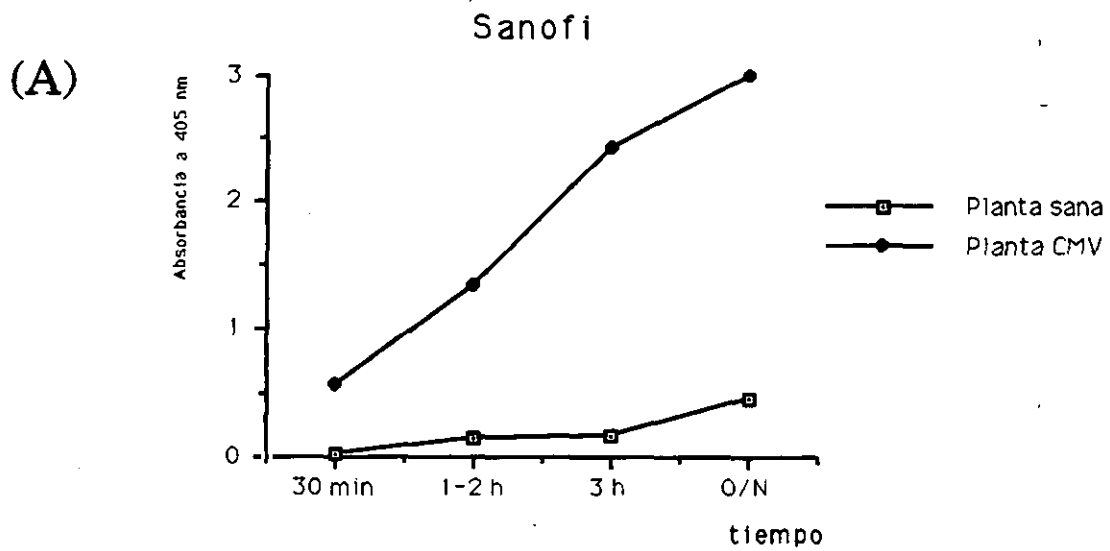
#### 1.1. DETECCION DE CMV POR ELISA.

##### 1.1.1. Estandarización de la técnica.

##### 1.1.1.1. Tiempo idóneo de lectura.

Las absorbancias obtenidas con varias muestras en distintos huéspedes y en diferentes placas de poliestireno mediante un ensayo ELISA-DAS realizado con los anticuerpos policlonales de Sanofi o de Agdia permitieron encontrar cuál es el tiempo idóneo para realizar las lecturas espectrofotométricas. En la Figura 14 (A) se aprecia claramente una mayor diferencia entre las  $A_{405}$  de muestras sanas e infectadas obtenidas a las 3 h o tras toda la noche frente a lecturas anteriores. Como con las lecturas O/N el fondo subía bastante, se utilizó la lectura de las 3 h preferentemente. Sin embargo, cuando se utilizaron los anticuerpos de Agdia conjugados con peroxidasa (Figura 14 B), se observó que es preferible realizar la lectura a la 1/2 ó 1 h. En general, y utilizando estos resultados como guía, para cada placa se estudió la evolución de las absorbancias a lo largo del tiempo y se eligió la lectura más alta en la que los fondos no hubieran subido demasiado ( $A_{405} < 0,15$ ).

Se utilizaron varios lotes de anticuerpos de Sanofi a lo largo de este estudio, no observándose diferencias significativas de comportamiento entre



**Fig 14.** Medias de las absorbancias obtenidas con múltiples muestras a diferentes tiempos en un ensayo ELISA-DAS con: (A) anticuerpos policlonales polivalentes anti-CMV de Sanofi conjugados con fosfatasa alcalina. (B) anticuerpos policlonales anti-CMV-cr de Agdia conjugados con peroxidasa.

unos y otros, aunque Elisa Sáez (SPV, Almería, comunicación personal) encontró algún lote que presentaba problemas para detectar virus en pepino. Sólo se utilizó un lote de anticuerpos Agdia.

#### 1.1.1.2. Positivo o negativo.

A fin de elaborar un criterio para determinar qué se consideraba como respuesta positiva y qué como respuesta negativa, se hizo un estudio estadístico de los valores de absorbancia obtenidos para las plantas sanas de diferentes huéspedes con los anticuerpos policlonales de Sanofi, obteniéndose unos valores medios a las 3 h de 0,07, 0,09, y 0,005 para pimiento, tabaco y judía sana respectivamente, aunque con unas desviaciones estándar muy elevadas en pimiento y tabaco, de 0,17 y 0,19, respectivamente. Aunque la casa comercial de Sanofi recomienda establecer como resultado positivo cuando se obtengan 2 veces la absorbancia de la media de las plantas sanas, se observó que plantas de judía consideradas como positivas según este criterio al ser ensayadas por otros métodos (por ej. PCR) resultaron negativas. En cambio, algunas plantas consideradas como positivas o dudosas según este criterio inoculadas a plantas huésped provocaron posteriormente en éstas una clara infección viral, o algunas plantas consideradas como negativas con los anticuerpos policlonales resultaron positivas con los monoclonales. Debido a que la franja de dudosos era relativamente amplia, establecimos arbitrariamente para los muestreos el positivo en tres veces la media de las absorbancias obtenidas con las plantas sanas, prefiriendo incurrir más en el error tipo II (falsos negativos).

Utilizando los anticuerpos de Agdia conjugados con peroxidasa las absorbancias obtenidas para las plantas infectadas son más bajas (Figura 14 B), con una media de  $A_{490}=0,037$  para las plantas sanas, y con una desviación estándar de 0,023, por lo que en este caso se estableció como respuesta positiva aquella que presentaba dos veces la media de las  $A_{490}$  de las plantas sanas.

En todos los ensayos se utilizaron como controles tampón de extracción y planta sana, que dieron en general resultados parecidos. Se hicieron generalmente dos repeticiones por muestra.

#### 1.1.1.3. Determinación del subgrupo.

Para estandarizar el ensayo de detección de subgrupo al que pertenece el virus se realizó un ensayo ELISA-TAS con los anticuerpos monoclonales

correspondientes a partir de muestras de subgrupo conocido mantenidas en invernadero. Al utilizar dos monoclonales se generaron dos valores de  $A_{405}$  que se representaron en una gráfica (Figura 15), en la que se pueden trazar dos rectas de pendiente 2 y 0,5 respectivamente, que limitan dos zonas que engloban a la mayoría de las muestras. Por tanto, se utilizó como criterio para incluir una muestra de CMV en un subgrupo el que presentara un valor de  $A_{405}$  dos veces mayor con el anticuerpo específico para dicho grupo que para el contrario.

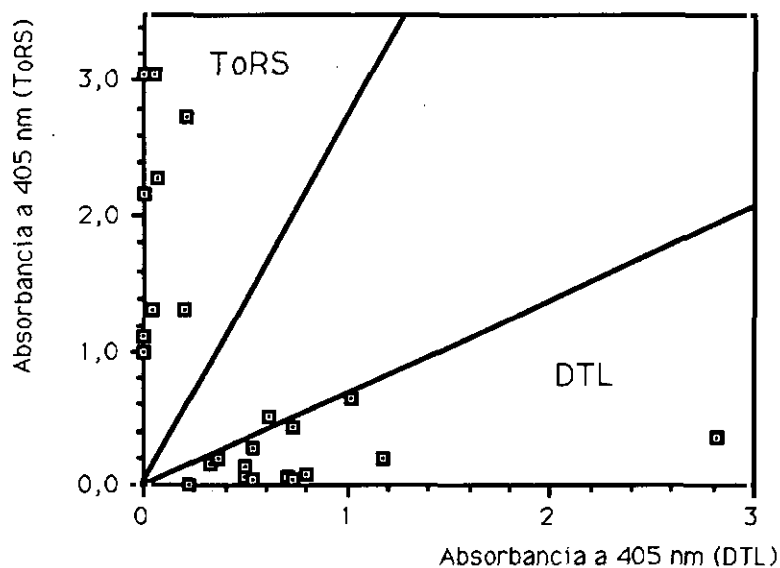
#### 1.1.1.4. Tampón de extracción.

Otro factor que hubo que estandarizar fueron los tampones utilizados en la homogeneización de las muestras, puesto que sobre todo en el caso de pimiento, se observaron unos valores de absorbancia algo elevados para la planta sana. En la Tabla 3 se observa una fuerte variación según el tampón que se utilice, obteniéndose los mejores resultados con los tampones nº 4 y nº 2. Aunque el tampón nº 4 distingue algo mejor la muestra infectada de la sana, se utilizó el tampón nº 2 para los muestreos de CMV en general por ser más sencillo de preparar, y el tampón nº 4 solamente cuando se realizaron extracciones para ser ensayadas con anticuerpos que detectan otros virus además de CMV.

#### 1.1.2. Límite de detección en un macerado vegetal.

Para estudiar el límite de detección o detectabilidad del ensayo con los anticuerpos policlonales polivalentes (Sanofi) en diferentes huéspedes, empleamos muestras que presentaban niveles de infección semejantes (aproximadamente  $A_{405}=3$  para la dilución 1/10). Se realizaron diferentes diluciones de macerado vegetal con el tampón de extracción y se analizaron en ELISA-DAS. Según nuestro criterio de considerar como positivas aquellas muestras que dieron una lectura espectrofotométrica de al menos tres veces el valor de la planta sana, se observó en la Figura 16 que el límite de detectabilidad en orden decreciente para los distintos huéspedes era (p/v): tomate > 1/80.000, tabaco 1/70.000, y pimiento y pepino 1/10.000. Puesto que en cada pocillo hay un volumen de 100  $\mu$ l de muestra, estos niveles de detección son de <1,25  $\mu$ g, 1,42  $\mu$ g y 5  $\mu$ g de tejido infectado, respectivamente.

El límite de dilución del ensayo ELISA-TAS se analizó con los anticuerpos monoclonales polivalentes de Sanofi conjugados con fosfatasa alcalina en tabaco. La Figura 17 muestra que el límite de detección es 1/20.000, equivalente a 5  $\mu$ g de tejido infectado/pocillo.



**Fig 15.** Absorbancias obtenidas en un ensayo ELISA-TAS con los anticuerpos monoclonales de Sanofi específicos para los subgrupos DTL y ToRS de CMV.

TAMPON	PLANTA	1/2 h	1 h	2 h	3 h	O/N
1	P. sano	0	0	0	0	0
	P. CMV	0,15	0,30	0,61	0,92	2,23
2	P. sano	0,03	0,06	0,14	0,20	0,65
	P. CMV	0,46	0,83	1,60	2,31	3,14
3	P. sano	0,01	0,01	0,03	0,04	0,18
	P. CMV	0,24	0,42	0,89	1,33	2,77
4	P. sano	0,03	0,08	0,19	0,28	0,78
	P. CMV	0,59	1,13	2,58	3,47	3,41
5	P. sano	0,01	0,02	0,03	0,06	0,12
	P. CMV	0,13	0,24	0,52	0,80	2,31

TAMPON 1: PBS-Tween + 2% PVP

TAMPON 2: Citrato sódico 0,5M pH 6,5, 0,1% ácido mercaptoacético

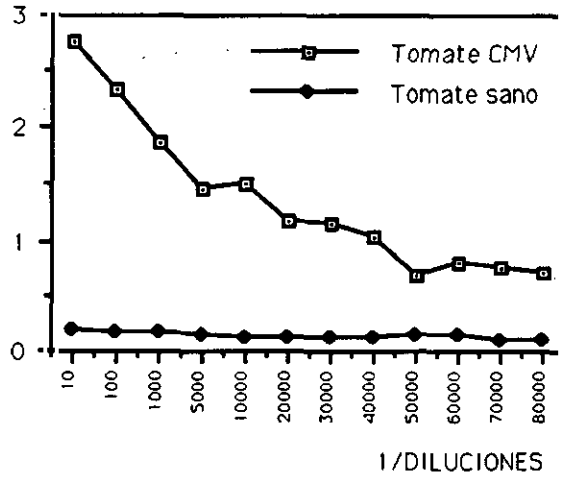
TAMPON 3: Citrato sódico 0,5M pH 6,5, 0,1% ácido mercaptoacético, 0,1% Triton X-100.

TAMPON 4: Tris-HCl 0,5 M (pH 8,2), 2% PVP, 1% PEG 6000, 0,8% NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% NaN<sub>3</sub>.

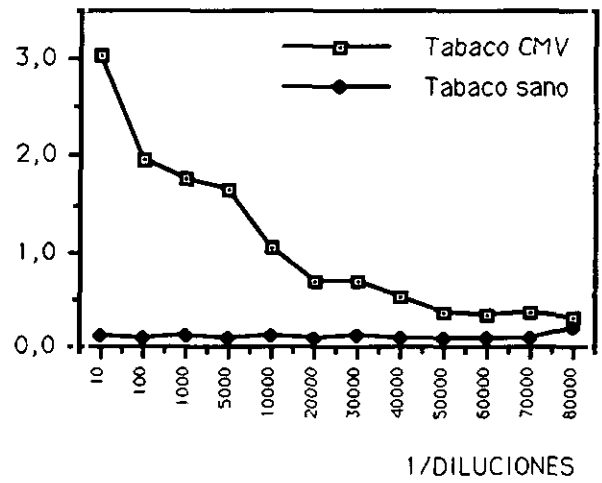
TAMPON 5: fosfato 0,03M pH 7,2, 0,2% dietilditiocarbamato

**Tabla 3.** Absorbancias obtenidas (a 405 nm) con los diferentes tampones utilizados para extraer el macerado vegetal de hojas de pimienta en un ensayo ELISA-DAS con anticuerpos policlonales de Sanofi conjugados con fosfatasa alcalina.

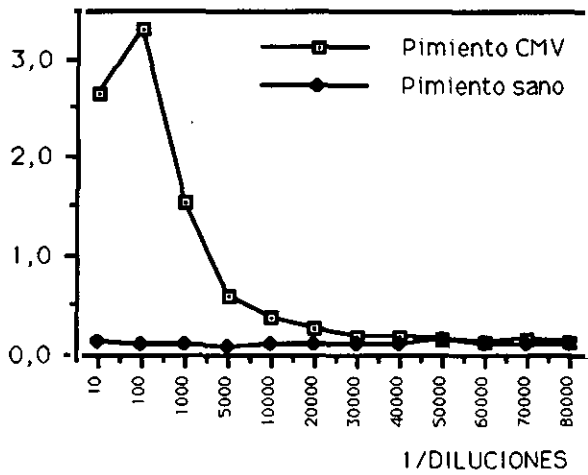
A405 Extracto bruto de tomate



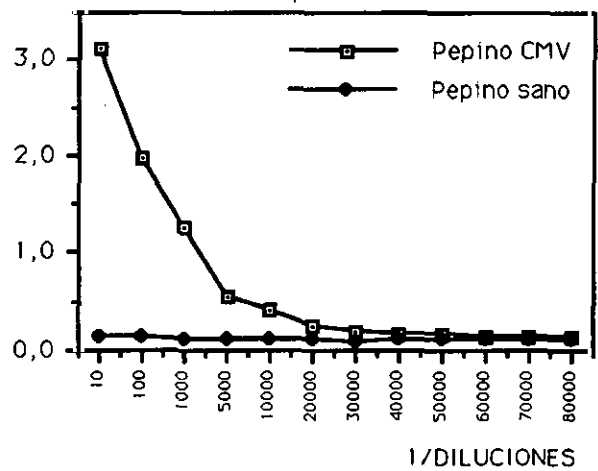
A405 Extracto bruto de tabaco



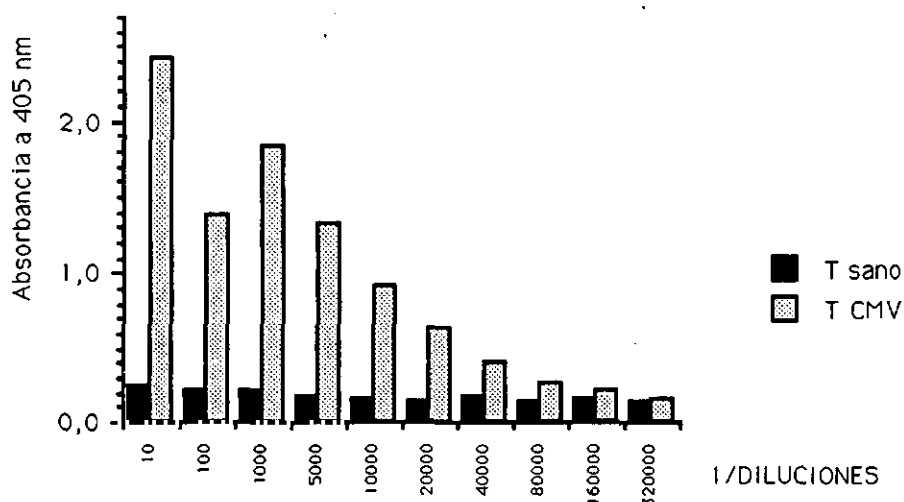
A405 Extracto bruto de pimiento



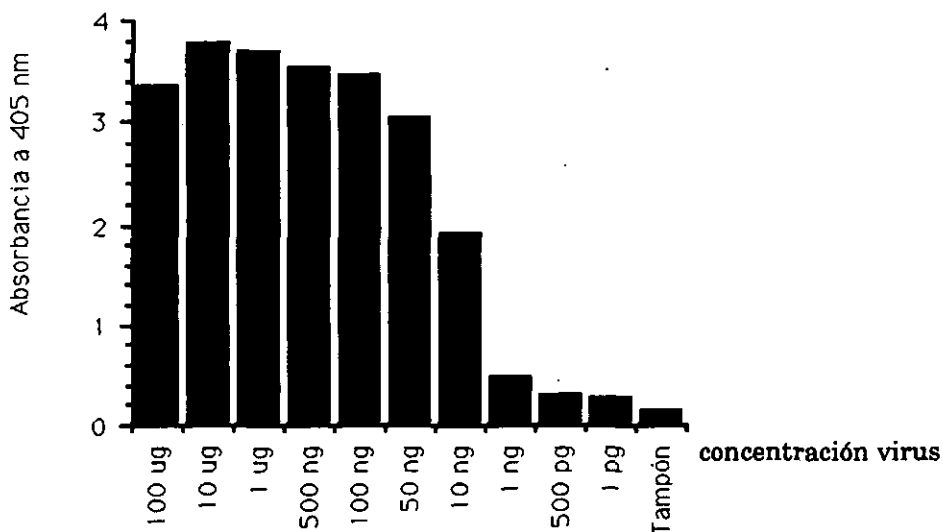
A405 Extracto bruto de pepino



**Fig 16.** Límites de detección obtenidos en ensayos ELISA-DAS con anticuerpos policlonales polivalentes (Sanofi) a partir de macerado vegetal de hojas de diferentes huéspedes infectados con CMV.



**Fig 17.** Límite de dilución obtenido en un ensayo ELISA-TAS con los anticuerpos monoclonales polivalentes de Sanofi a las tres horas de añadir el sustrato a partir de diluciones de un macerado vegetal de hojas de tabaco infectadas con CMV.



**Fig 18.** Límite de dilución obtenido en un ensayo ELISA DAS para la detección de CMV realizado con anticuerpos policlonales conjugados con fosfatasa alcalina. Se utilizó virus purificado a una concentración de 12,8 mg/ml sin diluir. Como control se empleó tampón PBS-Tween.

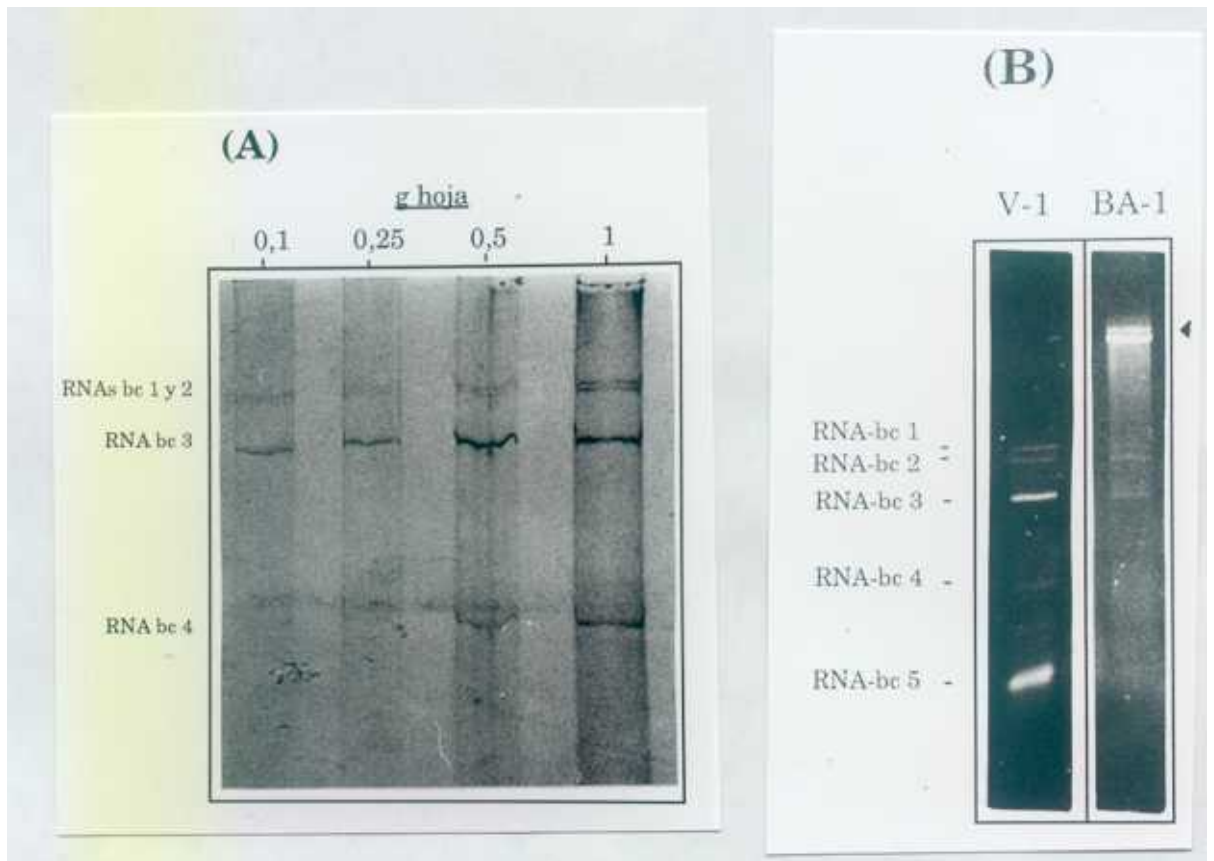
### 1.1.3. Límite de detección con virus purificado.

Para estudiar el límite de detectabilidad del ensayo ELISA-DAS con los anticuerpos policlonales polivalentes (Sanofi) a partir de virus purificado, se realizó una purificación previa de éste, para lo cual se inocularon plantas de *N. tabacum* "Xanthi" con la muestra de CMV BA-39 (ver apartado 3), a los seis días se recogieron las hojas y se purificó el virus, con un rendimiento de 8,5 mg de virus por cada 100 g de hoja de tabaco, y una concentración de 12,8 mg/ml, y se utilizó inmediatamente debido a la inestabilidad del CMV. Se realizaron diluciones del virus con tampón PBS-Tween desde 100 µg hasta 1 pg. En la Figura 18 se muestra que se pudo detectar hasta 1 ng de virus purificado, utilizando el criterio de considerar como positivas aquellas muestras que dieron una lectura espectrofotométrica de al menos tres veces el tampón, que corresponde a una concentración de 10 ng/ml.

### 1.2. Detección de CMV por análisis de los RNAs bicatenarios.

Se puede detectar CMV mediante extracción de los ácidos nucleicos virales bicatenarios (RNAs-bc), más estables y fáciles de extraer que los RNAs monocatenarios, que requieren una purificación previa del virus. A fin de estudiar la mínima cantidad de material vegetal que puede utilizarse con este método, se inocularon plantas de tabaco con CMV (aislado de la platanera canaria) y se extrajeron los RNAs-bc a partir de distintas cantidades preparando muestras homogéneas. En este ensayo se pudo detectar la presencia de las formas replicativas en 0,1 g de hoja infectada, como podemos ver en la Figura 19 (A).

Con esta técnica también fue posible detectar la presencia de RNA satélites en muestras de campo, como se observa en el análisis de los ácidos nucleicos bicatenarios de una muestra de tomate de Valencia con fuertes síntomas de necrosis en el año 1990 (ver síntomas en Figura 9), y otra muestra de pimiento procedente de Badajoz del mismo año, sin presencia de satélite (Figura 19 B). En esta muestra de pimiento se observa la presencia de RNAs-bc específicos de la planta huésped, similares a los descritos por Valverde et al (1990).



**Fig 19.** Análisis de RNAs-bc de CMV. (A) Electroforesis de RNAs-bc obtenidos a partir de cantidades decrecientes de hoja de tabaco infectada con CMV, en gel de poliacrilamida al 5% teñido con nitrato de plata. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% (teñido con bromuro de etidio) de RNAs-bc obtenidos a partir de una muestra de tomate (V-1) de Valencia y otra de pimiento (BA-1) de Badajoz. La flecha indica la presencia de RNAs-bc específicos de la planta de pimiento, descritos por Valverde et al (1990). La descripción de estas muestras se encuentra en el anexo I.

### 1.3. Detección de CMV por hibridaciones sobre membrana ("dot blot").

Este ensayo fue realizado con las mismas diluciones de la muestra de hoja de tabaco infectado con CMV (aislado de la platanera canaria) que se utilizaron para el ensayo ELISA (1.1.2). Se prepararon membranas de nylon (Hybond N<sup>+</sup>) en las que se colocaron 10 µl por cada dilución. Utilizando la sonda 45080 de CMV marcada radiactivamente con una actividad específica de aproximadamente  $15 \times 10^8$  cpm/µg se llegó a detectar la dilución 1/500 (equivalente a detectar virus en 20 µg de tejido de hoja) cuando la autorradiografía se expuso durante 7 días (Figura 20 A).

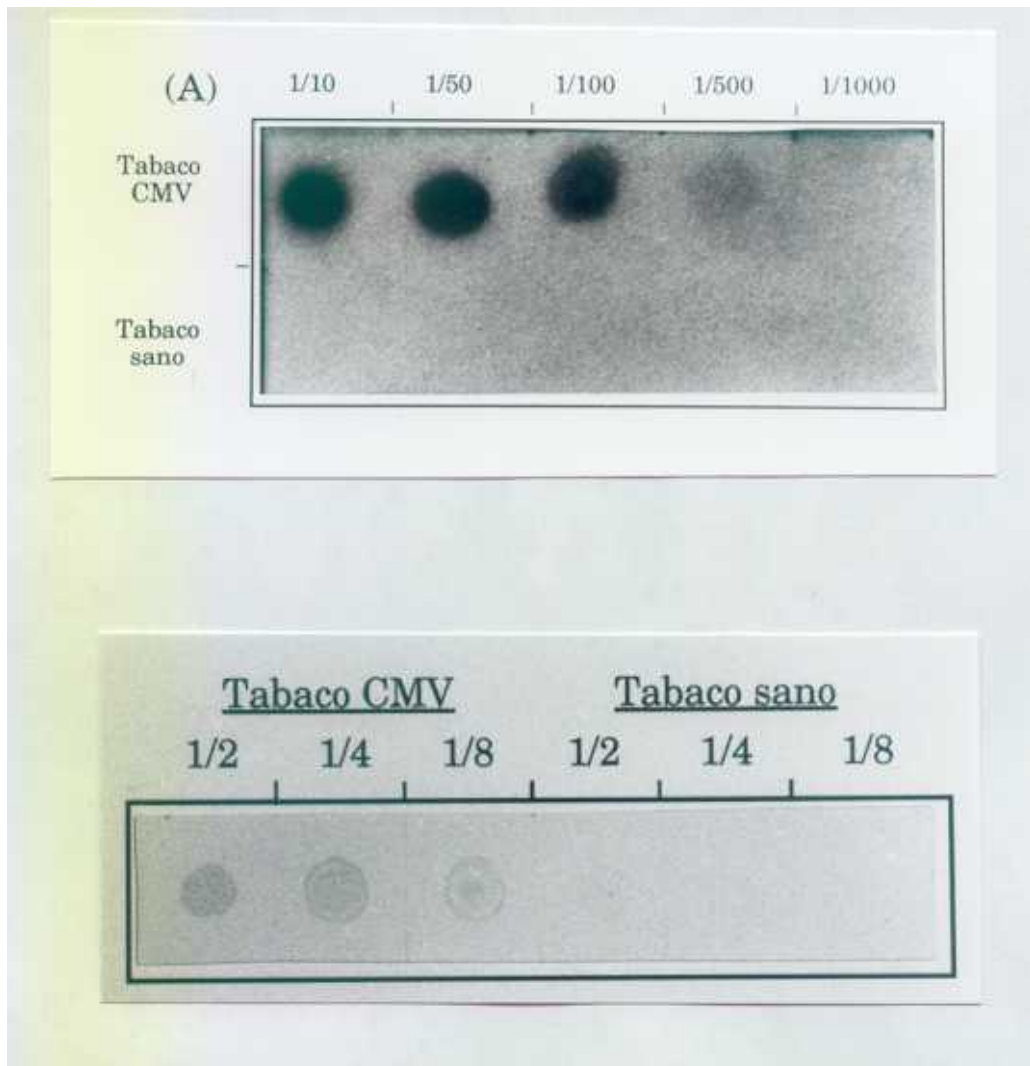
En el caso del marcaje no radiactivo, se ha conseguido detectar hasta diluciones de 1/8 (1,25 mg de tejido) en hibridaciones con la sonda pZU123A marcada con digoxigenina, aunque no se ha determinado el límite de detectabilidad con este marcaje (Figura 20 B). En el caso de las plantas sanas no se observaba reacción con la digoxigenina.

En ensayos de hibridaciones con marcaje radiactivo, las membranas de nitrocelulosa mostraron una mayor sensibilidad. En la Figura 21 se observa una mayor señal de hibridación en idénticas muestras de campo infectadas con CMV en membranas de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) que en las de nylon (Hybond N<sup>+</sup>) con la sonda pZU123A marcada radiactivamente con una actividad específica de aproximadamente  $3 \times 10^8$  cpm/µg a los 12 días de exposición.

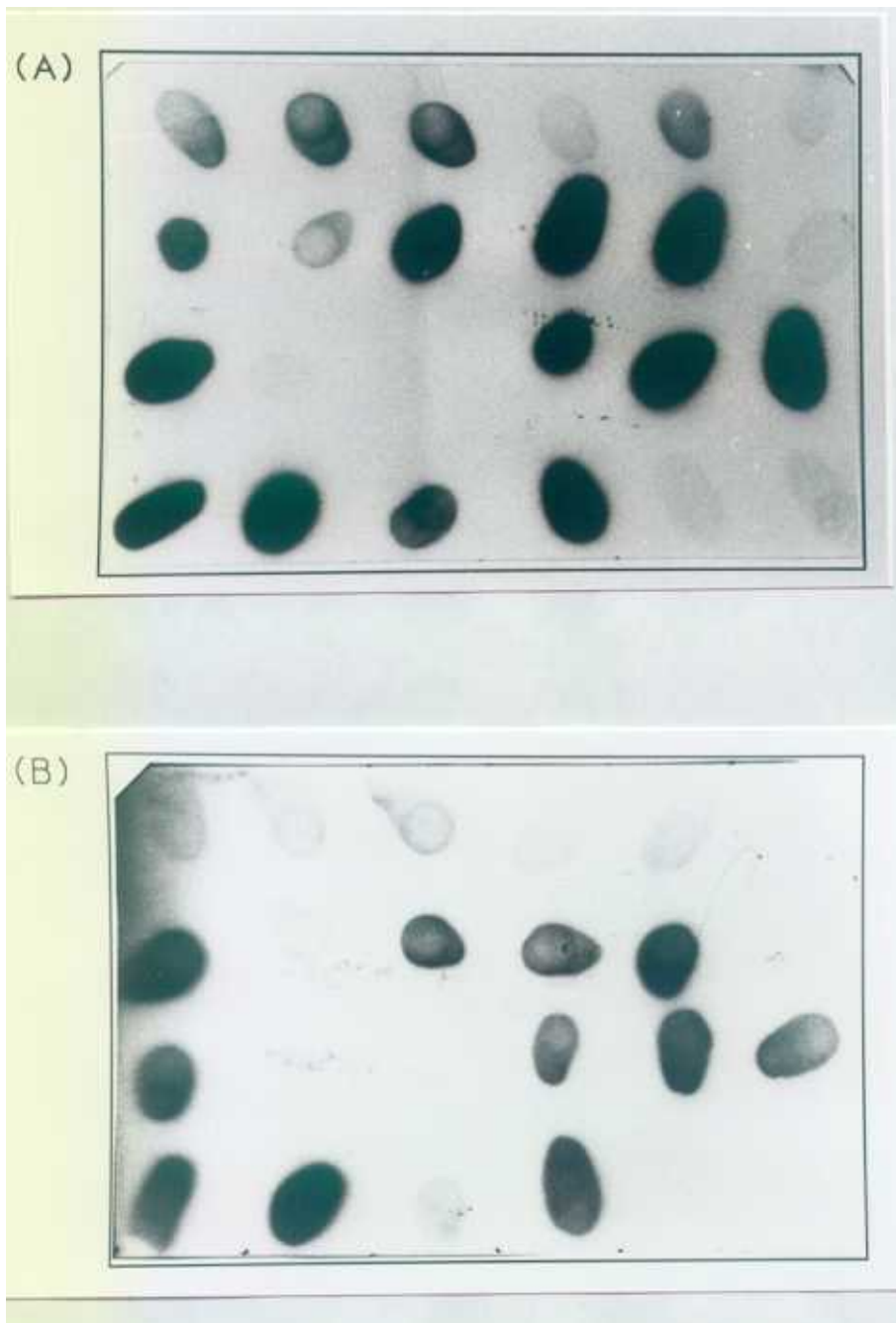
### 1.4. Detección de CMV por RT-PCR en un macerado vegetal.

Este método se ha ensayado con éxito con los cebadores A y C (ver Materiales y Métodos, Figura. 13) en plantas infectadas con CMV de los dos subgrupos y en varios huéspedes como tabaco, tomate y pepino. Sin embargo, no fue posible la detección cuando el huésped utilizado fue pimiento. En los primeros experimentos ocasionalmente se observaron bandas del tamaño esperado en algunas plantas no inoculadas, hecho que dejó de producirse al poner un extremo cuidado en la recogida de las muestras (hacerlo a través de una bolsa de plástico o lavándose las manos minuciosamente después de tocar una muestra infectada y antes de recoger otra). Se consideró una muestra como positiva cuando el tamaño del producto amplificado era de 540 pares de bases, y negativa cuando no estaba presente un producto de este tamaño.

A fin de optimizar la concentración de iones magnesio en el tampón de reacción de la RT-PCR, se realizó un ensayo con concentraciones crecientes de MgCl<sub>2</sub> en el medio, tanto en la transcripción inversa, como en la amplificación



**Fig 20.** Hibridación de un macerado de hojas de tabaco infectadas con CMV (aislado de la platanera canaria). (A): Autorradiografía (en película Kodak XAR 5) de la hibridación con la sonda 45080 marcada radiactivamente utilizando membranas de nylon (10  $\mu$ l/muestra). (B): Hibridación con la sonda pZU123A marcada con digoxigenina utilizando una membrana de nitrocelulosa (10  $\mu$ l/muestra).



**Fig 21.** (A)- Hibridación de un macerado de diferentes plantas de campo sobre membranas de nitrocelulosa (10  $\mu$ l/ muestra) con la sonda de CMV pZU 123A marcada radiactivamente. Autorradiografía realizada en películas Kodak XAR 5. (B): Idem con membranas de nylon Hybond N<sup>+</sup>

posterior. En la Figura 22 (A) se observa que concentraciones de 2,5 ó 3 mM rinden mayor cantidad de producto sin que se observen bandas inespecíficas en los controles sanos.

El límite de detección obtenido con un macerado vegetal es más alto que los obtenidos con otras técnicas, llegándose a detectar una dilución de  $10^{-7}$  (Figura 22, B), que equivale a aproximadamente 1 ng de tejido infectado, ya que el ensayo requiere unos 10  $\mu$ l.

Para estudiar la detectabilidad con virus purificado, se utilizó el CMV obtenido en el apartado 1.1.3 y los RNAs virales extraídos, a una concentración de 12,8 ng/ $\mu$ l, se diluyeron con el tampón de la transcripción inversa. El análisis de los productos de la amplificación por electroforesis nos permitió detectar hasta 100 fg de RNA viral (Figura 22 C). Ya que los viriones contienen un 18% de RNA (Francki et al, 1979) esta cantidad equivale a 55 pg de partículas virales ml<sup>-1</sup>. Siendo el peso molecular de la partícula de CMV de  $5,8-6,7 \times 10^6$  D (Francki et al, 1979), se han detectado unas 50.000 partículas de virus.

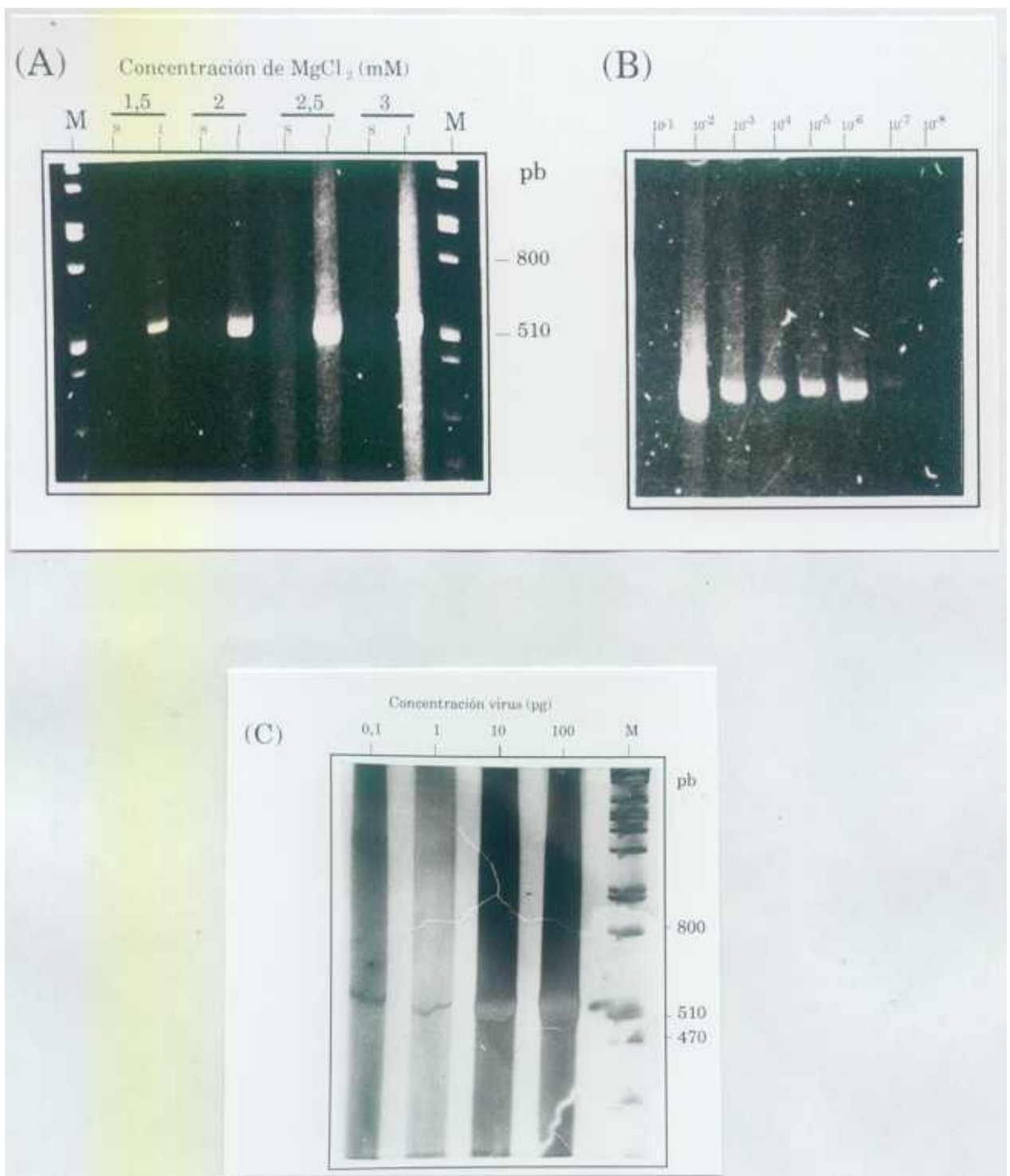
Para probar que los productos amplificados por PCR eran específicos del CMV, se realizó una transferencia tipo "Southern" del DNA a membranas de nylon y se hibridó con la sonda pZU123A marcada con digoxigenina. En la Figura 23 se puede apreciar que la sonda de CMV hibridaba con el DNA cuya movilidad era del tamaño esperado, y no había señal con las plantas sanas ni con el cucumovirus TAV.

## 2. DETECCION DE VIRUS Y PARTICULAS SUBVIRALES POR RT-PCR PREVIA CAPTURA EN PLACAS DE MICROTITULACION

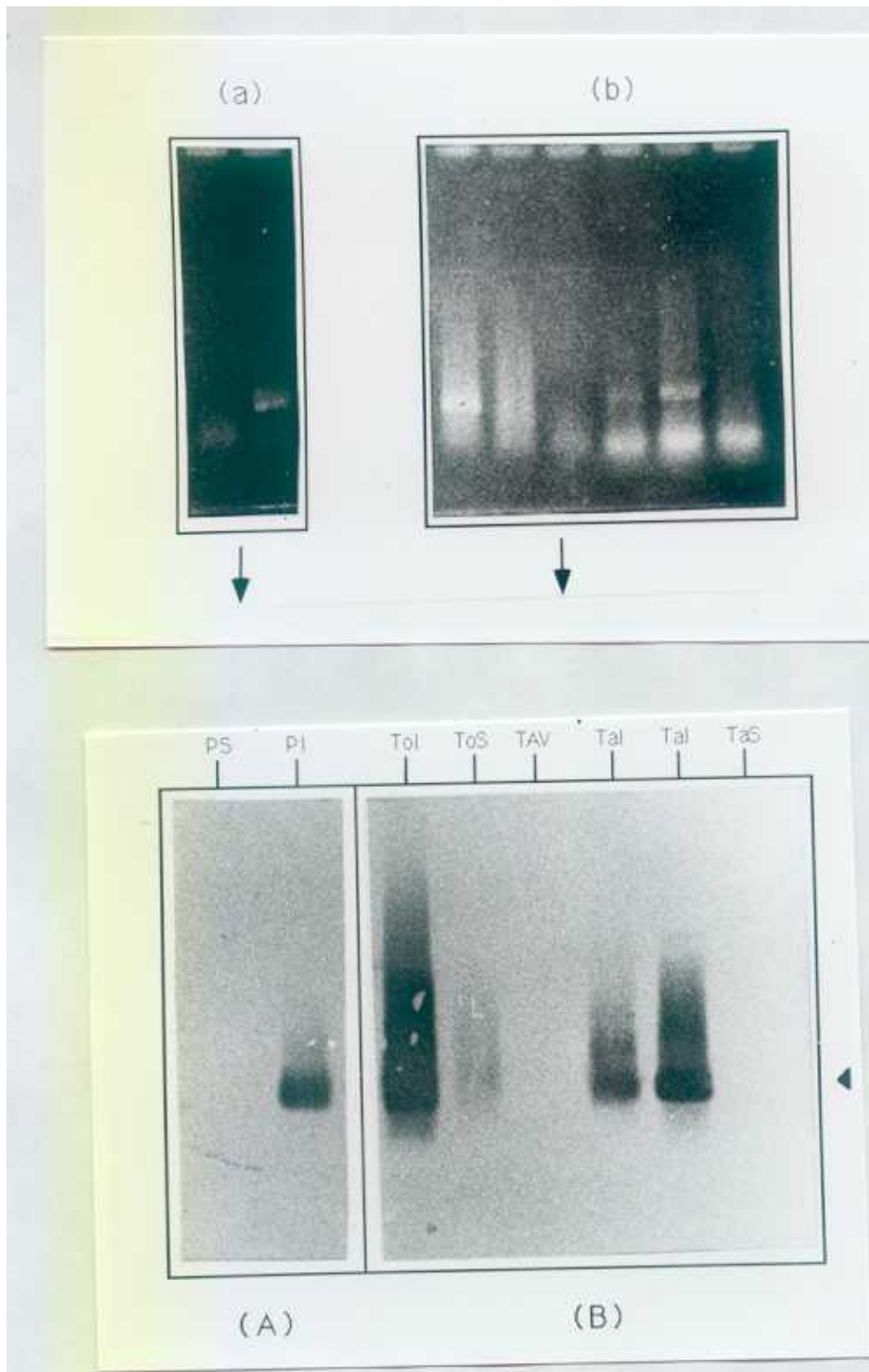
En un intento de resolver el problema que presentaba el macerado vegetal de determinados huéspedes en la inhibición de las reacciones de la RT-PCR, y a la vez facilitar un diagnóstico rutinario, se puso a punto la detección de CMV y otros patógenos mediante RT-PCR en una placa ELISA, lo cual facilita el análisis de un número elevado de muestras.

### 2.1. Captura del virus con anticuerpos específicos.

El método descrito en Materiales y Métodos fue diseñado en nuestro laboratorio por Gustavo Nolasco (UCTA, Universidad del Algarve, Faro, Portugal)



**Fig 22.** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de productos de RT-PCR y posterior tinción con bromuro de etidio. (A) ensayo con diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  en el tampón de la reacción de RT-PCR. (B) Ensayo de límite de detección con macerado de una muestra de tabaco infectada con CMV. (C) Límite de detección con RNA viral purificado (gel teñido con nitrato de plata). **M:** marcador de pesos moleculares (fago lambda digerido con PstI). **S:** tabaco sano. **I:** tabaco infectado

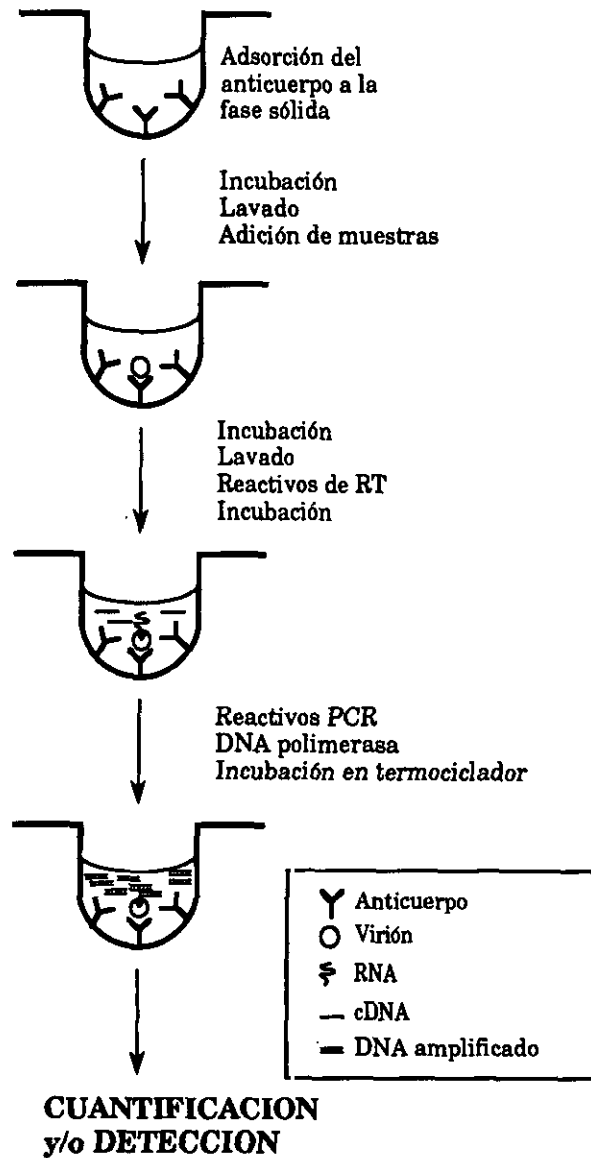


**Fig 23.** Paneles A y B: hibridación tipo Southern de productos de RT-PCR transferidos de los geles (a) y (b) a una membrana de nylon con la sonda pZU123A de CMV marcada con digoxigenina. **A:** amplificación previa captura en placas de microtitulación. **B:** amplificación a partir de macerado vegetal. La flecha indica el tamaño esperado para la banda específica de CMV. **I:** muestra infectada. **S:** muestra sana. **To:** tomate. **Ta:** tabaco. **TAV:** virus de la aspermia del tomate

para ser aplicado a la detección de GFLV en tejidos de plantas de vid. Consecuentemente, las temperaturas utilizadas en un principio para desensamblar el virión y liberar el RNA reflejaban propiedades de estabilidad térmica descritas para este virus por Quacquarelli et al (1976). Al estudiar el comportamiento de la técnica con otros virus, observamos que el mismo tratamiento térmico daba resultado con virus RNA vegetales tan diferentes como BYMV (flexuoso filamentoso) o TSWV (con envueltas externas a la cubierta proteica). Experimentos posteriores realizados sin este tratamiento térmico dieron lugar a un método, esquematizado en la Figura 24, que ha resultado válido para todas los virus ensayados hasta ahora y para un satélite asociado a CMV (Tabla 4). Los pasos principales del método son: inmunocaptura de las formas virales utilizando placas de microtitulación (poliestireno o policarbonato) tapizadas con anticuerpos específicos, RT-PCR de un fragmento del genoma del patógeno, y detección de los productos amplificados. Todos los pasos pueden llevarse a cabo en la misma placa. La puesta a punto de esta técnica ha llevado a presentar una solicitud de patente en el Registro de la Propiedad Industrial de España con el nº P9201232 (fecha 12/6/92).

En la Figura 25 se observa que los fragmentos amplificados fueron del tamaño esperado para todos los virus. En algunos experimentos se pudieron observar algunas bandas tenues además del fragmento esperado; estas bandas parecían ser específicas del virus, ya que no se observaban en los controles sanos. En el caso del PMMV un segundo fragmento de alrededor de 350 pb se detectaba siempre en las muestras infectadas. Un análisis más detallado de la secuencia reveló que el cebador 3' presentaba un 62% de homología con la región comprendida entre los nt 1062 y 1082. Un anillado inespecífico durante la transcripción inversa daría lugar a un cDNA que se extendería hasta el nt 735, amplificándose posteriormente un producto de 347 pb.

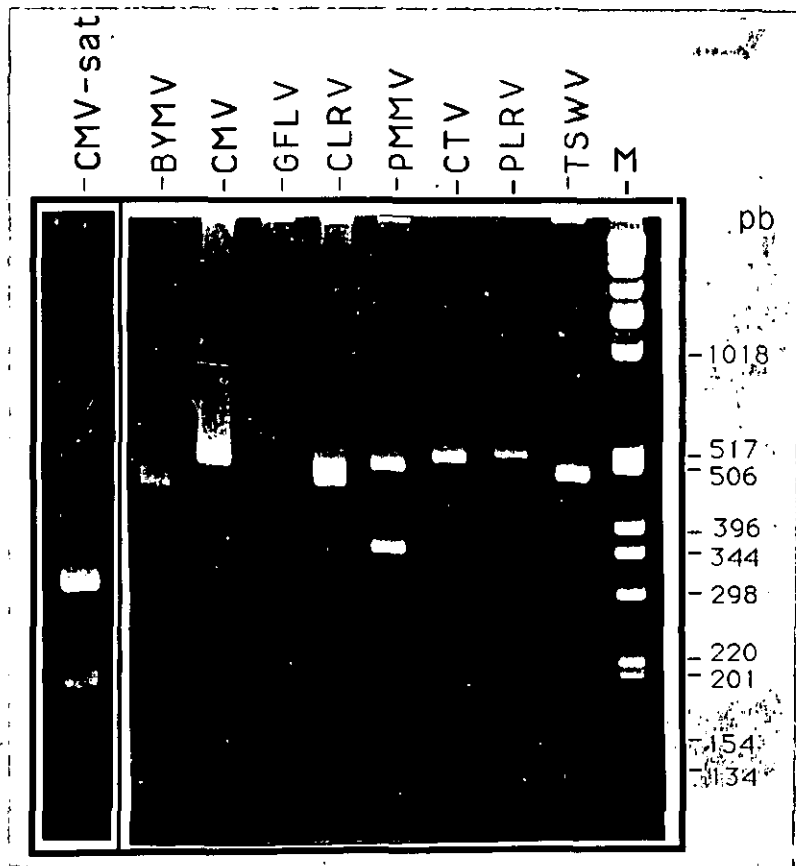
En el caso del RNA satélite se observaron ocasionalmente bandas adicionales de 190 pb y 140 pb (Figuras 25, 30, y 31), probablemente también producidas por anillados inespecíficos. Incluso se observó que era posible amplificar el RNA satélite con un único cebador (Figura 26, carril D). Un estudio detallado de la secuencia en el ordenador con ayuda del programa OLIGO™, reveló que probablemente a 37°C y en las condiciones de la transcripción inversa, el cebador 5', parcialmente complementario al extremo 3', se va a unir al RNA satélite de la siguiente forma:



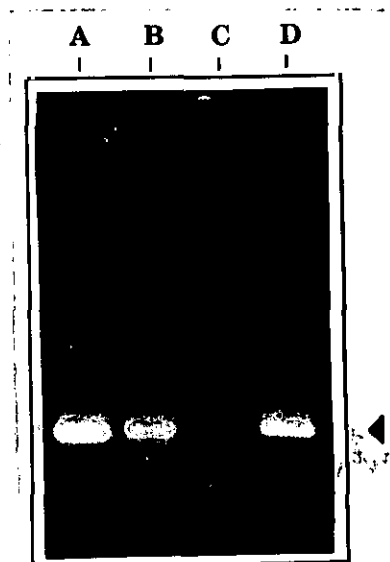
**Fig 24.** Método de detección de virus y patógenos subvirales mediante RT-PCR con una purificación previa por captura a una fase sólida mediante anticuerpos específicos.

<b><u>Grupo de virus</u></b>	<b><u>Morfología de las partículas</u></b>	<b><u>Genoma</u></b>
Tobamovirus (PMMV)	Rígida helicoidal, 312 x 18 nm	sin dividir, RNA mc, mensajero
Potyvirus (BYMV)	Flexuosa filamentosa, 750 x 15 nm	sin dividir, RNA mc, mensajero
Closterovirus (CTV)	Flexuosa filamentosa, 2000 x 12 nm	sin dividir, RNA mc, mensajero
Luteovirus (PLRV)	Isométrica, 24 nm ø	sin dividir, RNA mc, mensajero
Nepovirus (CLRV, GFLV)	Isométrica, 30 nm ø	dividido en 2 segmentos RNA mc, mensajero
Cucumovirus (CMV)	Isométrica, 30 nm ø	dividido en 3 segmentos, RNA mc, mensajero
Tospovirus (TSWV)	Isométrica, con envuelta, 80-110 nm ø	dividido en 3 segmentos, RNA mc, sentido (-)
<b><u>Patógenos subvirales</u></b>		
Satélites (CMV sat-RNA)		RNA mc
Viroides (PSTVd)		RNA mc

**Tabla 4.** Diferentes virus y patógenos subvirales que se han detectado por RT-PCR previa captura con un anticuerpo en una placa de microtitulación.



**Fig 25.** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de productos de RT-PCR generados a partir de muestras infectadas con virus y RNA satélite amplificados previa captura por un anticuerpo específico en una placa de poliestireno. M: marcador de pesos moleculares (DNA 1 Kb ladder, Gibco, BRL).



**Fig 26.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de RT-PCR a partir de RNA satélite amplificado con : A, cebador 3' en la transcripción inversa, añadiendo el cebador 5' en la PCR. B, cebador 5' en la RT, añadiendo el cebador 3' en la PCR. C, cebador 3' en la RT. D, cebador 5' en la RT.



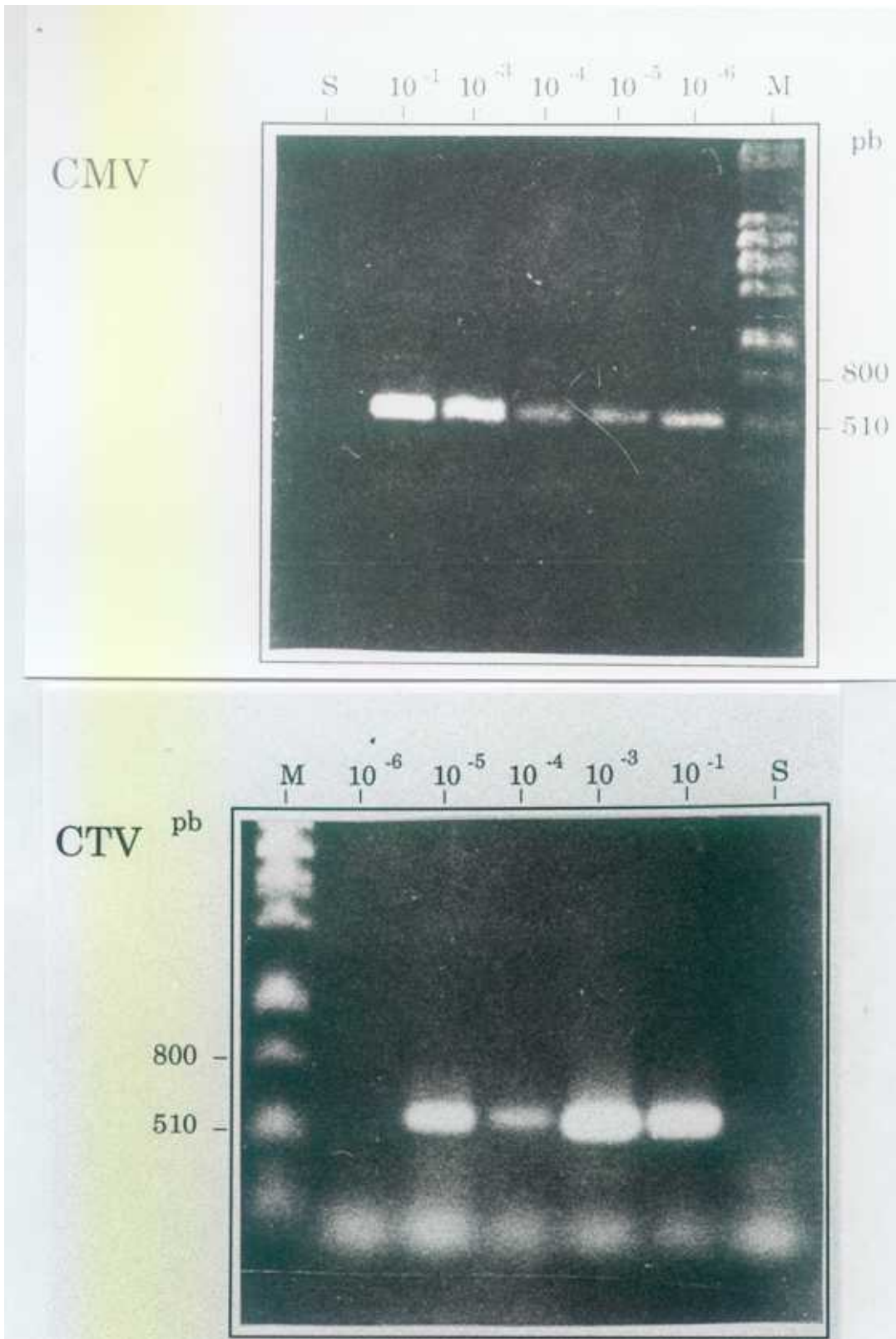
y mediante la acción de la transcriptasa inversa puede formar un cDNA de tamaño 335+6 nt. En el primer ciclo de amplificación, el cebador 5' se unirá a los nt 10-30 del cDNA, de los que es complementario, dando lugar a otra cadena de 332 nt, en la que los últimos 21 nt son ahora complementarios al cebador 5'. Esto explicaría la amplificación ocurrida con un único cebador.

La especificidad de la amplificación se confirmó en el caso de CMV por una hibridación tipo Southern de los productos de PCR con una sonda de cDNA, como se observa en la Figura 23, en la que se puede apreciar que se obtiene una banda más nítida con este método que cuando se amplifica a partir de macerado vegetal. También se observó especificidad de la banda amplificada en el caso del satélite al hibridar con la sonda pT105 (resultados no mostrados).

El límite de detección del método se determinó con diluciones seriadas de las muestras infectadas, viendo que era al menos  $10^{-6}$  para CMV (semejante al obtenido con macerado vegetal), y  $10^{-5}$  para CTV, un closterovirus de bajo título limitado al floema (Figura 27). En comparación con ELISA en experimentos paralelos (Tabla 5) este método resultó ser al menos 10 veces más sensible en el caso de CMV y mil veces más sensible en el caso de CTV.

Otra aplicación del método fue en aquellas placas de ELISA en las que se originaban valores dudosos: tras eliminar el sustrato enzimático y sus productos de hidrólisis de la placa, fue posible detectar un producto claro de PCR a partir de amplificación del RNA viral retenido todavía en el pocillo de poliestireno (resultados no mostrados).

Para explicar la accesibilidad del RNA viral a la acción de la transcriptasa inversa sin necesidad de un tratamiento térmico o químico, se pensó que los anticuerpos inmovilizados podrían estar atrapando en vez de viriones algunos RNAs parcialmente encapsidados. Para investigar esta posibilidad se ensayó el método con virus GFLV purificado, cuya integridad había sido chequeada por tinción negativa al microscopio electrónico, realizando un ensayo paralelo con un tratamiento térmico previo a la transcripción inversa, y sin éste. En la Figura 28 se observa que la amplificación de la parte esperada del genoma viral ocurría en



**Fig 27.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de RT-PCR a partir de diluciones de macerado de muestras infectadas con CTV y CMV. **M:** marcador de pesos moleculares (DNA de fago lambda cortado por la enzima de restricción PstI). **S:** planta sana.

Dilución de muestras infectadas (*)	CTV	
	ELISA†	Fluorimetría
10 <sup>-1</sup>	2,101	-
10 <sup>-3</sup>	0,185	-
10 <sup>-4</sup>	0,109	118
10 <sup>-5</sup>	0,105	54
10 <sup>-6</sup>	0,092	10
Control sano		
10 <sup>-1</sup>	0,134	22

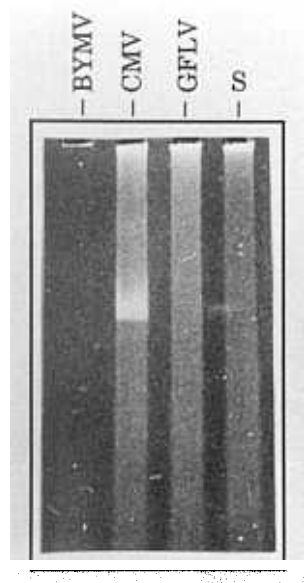
(\*) Estas diluciones corresponden a las de la Fig 27.

(†) A<sub>405</sub>.

**Tabla 5.** Absorbancias obtenidas con diluciones de macerado vegetal de muestras infectadas por CTV, y datos preliminares de cuantificación relativa por fluorimetría de DNA amplificado en la detección de CTV.



**Fig 28.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa de 1/3 del volumen del producto de RT-PCR a partir de virus GFLV purificado retenido en una placa de poliestireno por captura con un antisuero específico. **A:** Sin tratamiento térmico. **B:** Con una desnaturalización térmica previa a la transcripción inversa. Se realizaron dos repeticiones por muestra. Los productos amplificados no fueron precipitados con etanol. La flecha indica la banda del tamaño esperado.



**Fig 29.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de 1/2 del volumen de productos de RT-PCR a partir de macerado de muestras infectadas con virus atrapados directamente a placas de poliestireno. **S:** planta sana.

ambos casos y que no había diferencias notorias entre ambos experimentos. Es decir, una desnaturalización térmica previa, para la cual este virus en particular es muy sensible (Quacquarelli et al, 1976), no mejora apreciablemente la capacidad de amplificar el fragmento genómico (comparar carriles A y B).

## 2.2. Captura inespecífica del virus.

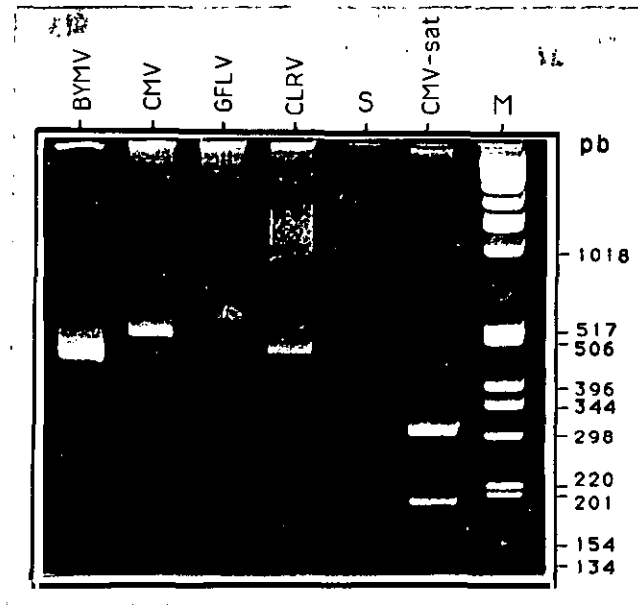
Con el objeto de poder aplicar este método en aquellos casos donde no hubiera disponible un anticuerpo específico y para los viroides que no disponen de cubierta proteica, se ensayó la adsorción directa de los viriones al poliestireno. Este método alternativo dió resultado con CMV, pero no con GFLV o BYMV (Figura 29).

Otra alternativa fue utilizar anticuerpos específicos de RNAs-bc para capturar las formas replicativas del patógeno. De esta manera se obtuvo amplificación del tamaño esperado con varios virus, como BYMV, CMV, GFLV, y CLRV además del RNA satélite asociado a CMV (Figura 30). Este método fue igualmente aplicado con éxito a la amplificación de un virus con envuelta, el TSWV (resultados no mostrados). Cuando se comparan estos resultados con los obtenidos con anticuerpos específicos (Figura 24), no se observan diferencias significativas.

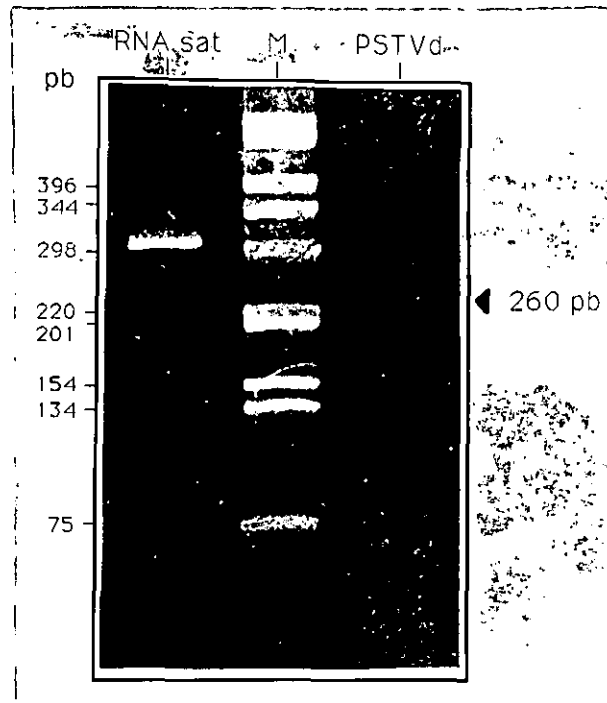
Para amplificar el viroide PSTVd fue necesario añadir Triton X-100 y Nonidet P-40 al tampón de extracción a fin de romper los núcleos, en cuyo interior se replica y acumula el viroide. De esta forma se consiguió una amplificación de una banda del doble del tamaño esperado, aunque no se observaron bandas del tamaño esperado (Figura 31). Un análisis más detallado de las secuencias reveló una alta complementaridad de los cebadores que podrían dar lugar a la formación de dímeros. También se observaron varios fragmentos menores de 80 nt, probablemente formados al no poder penetrar la polimerasa en la compacta estructura secundaria del viroide.

## 2.3. Análisis de resultados por fluorimetría.

Para evaluar la posibilidad de evitar la electroforesis como método de análisis de los resultados, en algunos ensayos parte del DNA amplificado se cuantificó por fluorimetría. La Tabla 5 muestra los datos obtenidos en la detección de CTV, un closterovirus de bajo título limitado al floema, utilizando el método descrito y comparado con los resultados obtenidos por ELISA. Aunque el número reducido de ensayos y muestras no permitió fijar un criterio claro para distinguir el negativo del positivo, la diferencia entre muestra sana e infectada parece estar bien



**Fig 30.** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de productos de RT-PCR a partir de muestras infectadas con virus y RNA satélite de CMV previa captura con anticuerpos específicos de RNAs-bc. **M:** marcador de pesos moleculares (DNA 1 Kb ladder, Gibco, BRL). **S:** tabaco sano.



**Fig 31.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de productos amplificados a partir de RNA satélite de CMV y del viroide PSTVd mediante captura con anticuerpos específicos de RNA-bc. **M:** marcador de pesos moleculares (DNA 1 Kb ladder, Gibco, BRL)

marcada y los límites de detección obtenidos por fluorimetría son del mismo orden de magnitud que los obtenidos por electroforesis.

### 3. DETECCION DE CMV EN MUESTRAS DE CAMPO.

Durante la campaña agrícola de los años 1990 y 1991 se recogieron en 18 provincias españolas, sobre todo en las zonas hortícolas del mediterráneo, Valle del Ebro, Extremadura y Galicia, muestras de plantas con síntomas de infección viral (en general mosaicos más o menos severos, deformaciones de hojas o frutos, enanismo, amarilleamientos, etc.). Se hizo una especial incidencia en el cultivo del pimiento. Los síntomas de algunas plantas que resultaron estar infectadas por CMV se reflejan en la Figura 32.

Las muestras fueron analizadas por ELISA-DAS con anticuerpos policlonales de Sanofi (años 1990 y 1991) y de Agdia (año 1990), y las que resultaron positivas en el año 1991 fueron analizadas con anticuerpos monoclonales en ensayos ELISA-TAS para identificar el subgrupo. Como criterio para reflejar los resultados (ver 3.1.1.) se eligió:

+: D.O.> tres veces el fondo	anticuerpos policlonales
++: D.O.> diez veces el fondo	Sanofi (lectura a las 3 h)
+: D.O.> dos veces el fondo	anticuerpos policlonales
++: D.O.> diez veces el fondo	Agdia (lectura a la 1 h)

Se observó que las muestras, ya fueran guardadas a 4°C o -20°C, que no fueron procesadas pronto, perdían los epítomos rápidamente y los anticuerpos tanto policlonales polivalentes como monoclonales para subgrupo dejaban de reconocerlos.

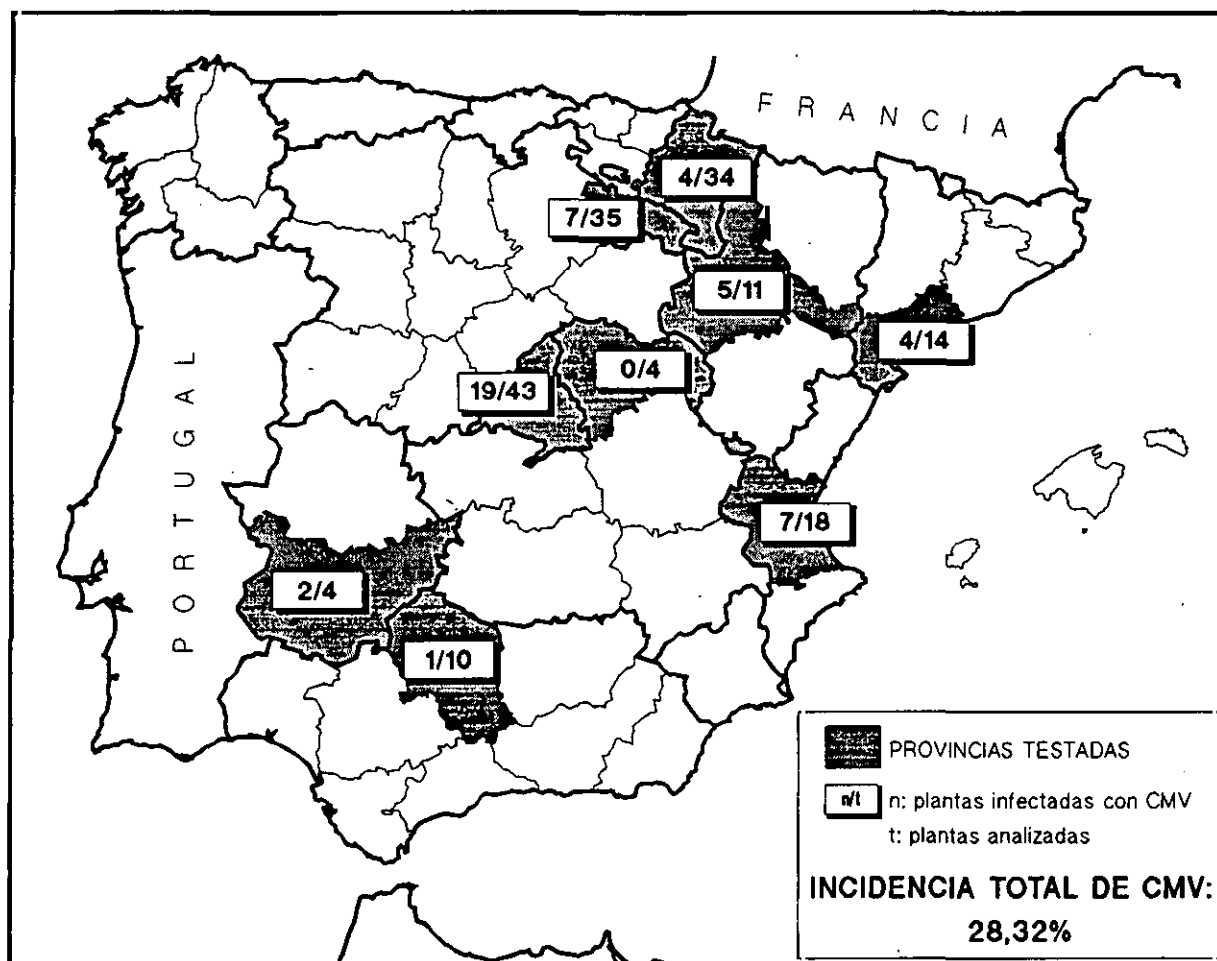
El anexo I presenta las muestras recogidas ordenadas por provincias, el cultivo, los síntomas que presentaban, la fecha de recolección, el lugar y el resultado del análisis. Al lado del número de la muestra se pone en algunos casos idéntica letra a las muestras que fueron recogidas en la misma parcela. También se consignan los casos de infecciones mixtas cuando se encontraron otros virus en estas muestras al ser analizadas en nuestro laboratorio.

En el año 1990 (Figura 33) se observó una incidencia de CMV del 28,32% en el total de las plantas muestreadas. Destaca un 44,18% de incidencia en Madrid



**Figura 32.** Síntomas que presentaban algunas de las muestras de campo infectadas con CMV. (A) Hojas de melón (T-1) con enaciones y mosaico. (B) Mala hierba (*Nicotiana alba*) (AL-17) con mosaico. (C) Tomate (AL-33) con filimorfismo. (D) Pimiento (BA-43) con arrugamiento de nervios y mosaico mate filiforme generalizado a toda la planta. La relación de estas muestras se encuentra en el Anexo I.

Cultivo	Total	BA	CO	GU	LO	M	NA	T	V	Z
Acelga	1+2					1+2				
Apio	0/1							0/1		
Berenjena	0/1								0/1	
Calabacín	5+8					4+7			1+1	
Col	0/1					0/1				
Garbanzo	0/9		0/9							
Judía	6+15					6+15				
Lechuga	0/3							0/1	0/2	
Mala hierba	0/3							0/2	0/1	
Melón	6+9							3+4	2+2	1+3
Patata	0/2					0/1			0/1	
Pepino	2+5					2+4			0/1	
Pimiento	23+94	1+2			7+35	5+10	4+34	1+1	1+4	4+8
Sandía	0/2							0/1	0/1	
Tomate	6+14	1+2	1+1			1+3		0/4	3+4	
Yaros	0/4			0/4						
<b>TOTAL</b>	<b>49+173</b>	<b>2+4</b>	<b>1+10</b>	<b>0/4</b>	<b>7+35</b>	<b>19+43</b>	<b>4+34</b>	<b>4+14</b>	<b>7+18</b>	<b>5+11</b>



**Fig 33.** Incidencia de CMV en diferentes cultivos y provincias españoles en la campaña agrícola de 1990.

(zonas de Aranjuez y Villa del Prado), principalmente en pimiento, judía verde, calabacín y pepino. Por cultivos, en pimiento se detectó un 24,46% de CMV, un 66,66% en melón, un 42,85% en tomate, y un 40% en pepino. No se detectó infección en ninguno de estos cultivos: apio, berenjena, col, garbanzo, lechuga, malas hierbas, patata, sandía o yeros.

Los anticuerpos policlonales polivalentes de Sanofi están comercializados como capaces de detectar todas las cepas de CMV, pertenecientes a los subgrupos DTL, ToRS y Co, pero se encontraron 8 muestras (BA-4, LO-29, M-7, M-9, M-18, NA-9, V-6, V-10) que los anticuerpos de Sanofi no reconocieron, mientras que los de Agdia, que sólo reconocen un tipo (inclasificado), reconocía. Estas muestras suponen un 16,3% del total de las muestras recolectadas en el año 1990 y positivas para CMV.

En el año 1991 (Figura 34) se detectó un 28,63% de plantas infectadas por CMV. Destaca un 92,3% de incidencia en tomates de Almería, un 50% de las 6 malas hierbas muestreadas (*N. alba*, bledo y *Datura sp.*), y un 31,16% en pimientos a nivel general. No se detectó infección en ninguno de estos cultivos: alfalfa, *Brassica sp*, haba, maíz, o pepino.

En cuanto a los subgrupos, se detectaron 57 muestras infectadas con DTL (76%) y 15 con ToRS (20%), así como 3 muestras con una infección mixta (4%), al parecer divididos por zonas (Figura 35). ToRS se detectó en La Rioja (tanto en abril como en octubre) y Pontevedra (septiembre), y DTL en Navarra, Zaragoza, Madrid, y zona del Mediterráneo. Sólo en Badajoz se detectaron los dos subgrupos, con la presencia de una muestra de ToRS y 3 con infección mixta.

#### 4. BUSQUEDA DE RESISTENCIA A CMV EN GERMOPLASMA DE PIMIENTO.

Se han analizado 160 líneas correspondientes a las siguientes especies:

Nº de líneas analizadas	Especie	Procedencia
22	<i>C. annuum</i>	Perú y Costa Rica
4	<i>C. baccatum</i>	Perú y Costa Rica
82	<i>C. chinense</i>	Perú
32	<i>C. frutescens</i>	Perú
2	<i>C. pubescens</i>	Costa Rica
18	<i>C. spp.</i>	Perú y Costa Rica

Algunas de estas 160 líneas procedían de los mismos genitores, pero por no ser líneas homogéneas se analizaron por separado.

Cultivo	Total	AL	BA	CC	CO	CS	Castilla León	LO	M	MU	NA	PO	SE	V	Z
Alfalfa	0/1		0/1												
Borraja	1+/6							1+/6							
Brassicas	0/2											0/2			
Garbanzo	1+/18				0/15								1+/3		
Haba	0/1	0/1													
Judía	5+/84	1+/4					3+/47					1+/33			
Maíz	0/1											0/1			
Mala hierba	3+/6	2+/4										0/1			1+/1
Melón	2+/2								1+/1						1+/1
Pepino	0/2	0/2													
Pimiento	14+/308	5+/16	12+/39	0/3		2+/2	0/2	5+/20	3+/6	26+/61	25+/79	10+/20		4+/30	2+/30
Tomate	26+/37	24+/26	0/6				0/1					2+/4			
Total	35+/468	35+/53	12+/46	0/3		2+/2	3+/50	6+/26	4+/7	26+/61	25+/79	13+/61	1+/3	4+/30	4+/32

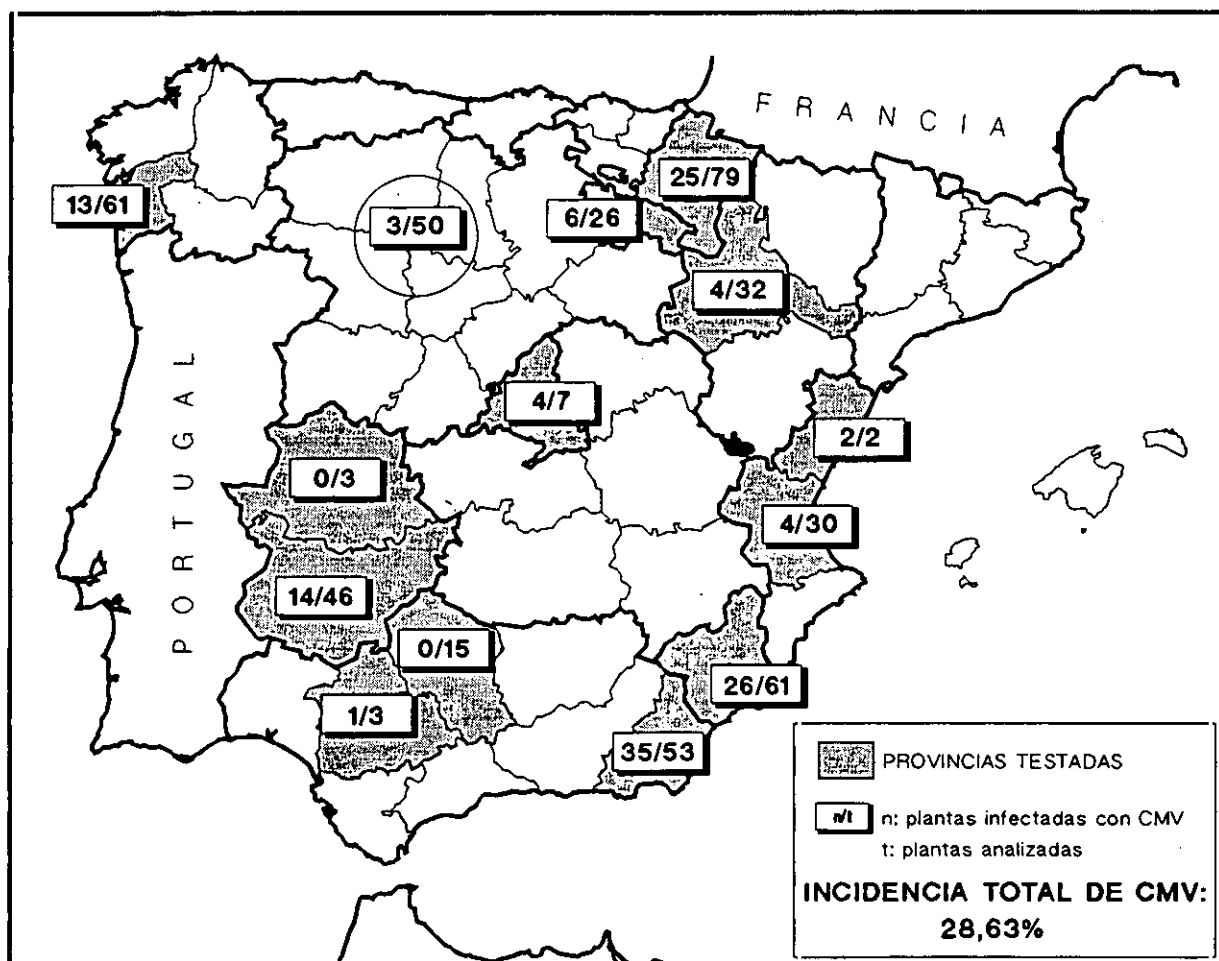
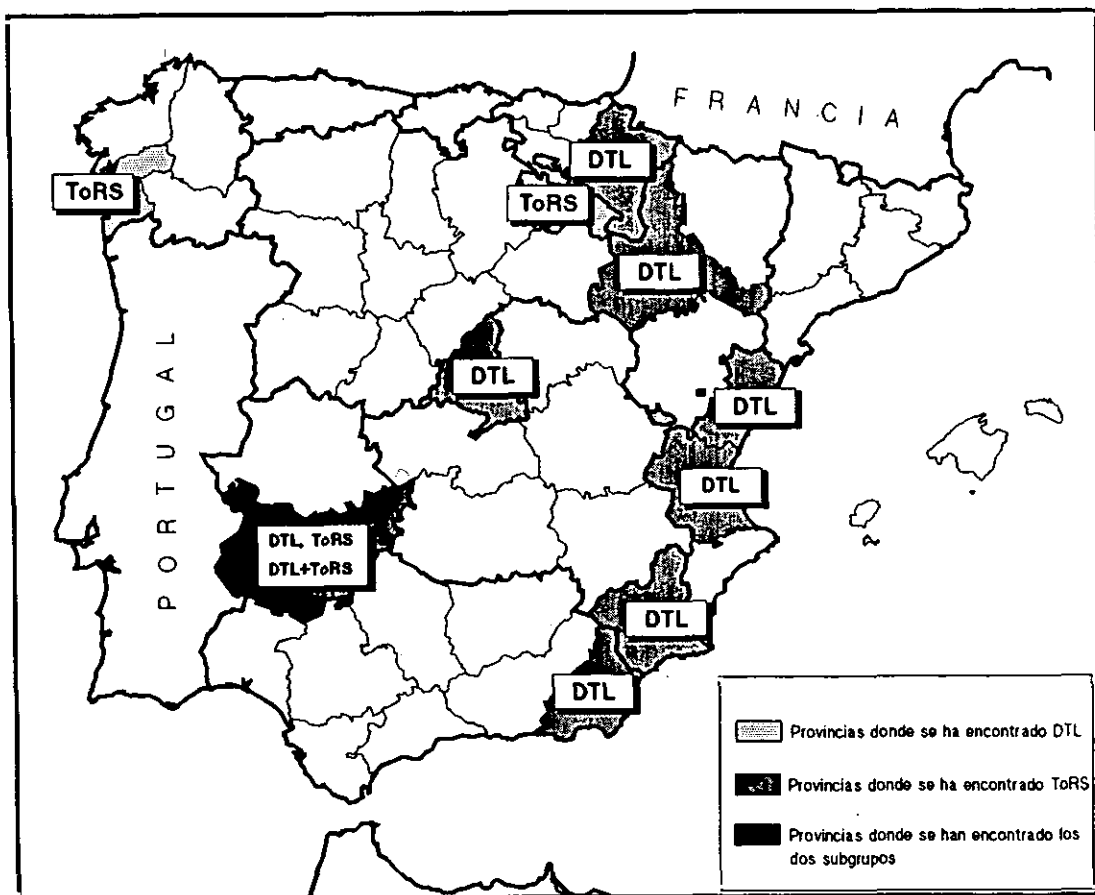


Fig 34. Incidencia de CMV en diferentes cultivos y provincias españoles en la campaña agrícola de 1991.



PROVINCIA	DTL	ToRS	DTL+ ToRS
<b>Almería</b> (octubre)			
Tomate	22		
Mala hierba ( <i>N. alba</i> )	1		
<b>Badajoz</b> (julio)			
Pimiento	6	1	3
<b>Castellón</b> (julio)			
Pimiento	2		
<b>Logroño</b> (abril+octubre)			
Borraja		1	
Pimiento		4	
<b>Madrid</b> (agosto+noviembre)			
Pimiento	3		
Melón	1		
Judía	2		
<b>Murcia</b> (septiembre)			
Pimiento	1		
<b>Navarra</b> (octubre)			
Pimiento	14		
<b>Pontevedra</b> (septiembre)			
Pimiento		9	
<b>Valencia</b> (septiembre)			
Pimiento	1		
<b>Zaragoza</b> (octubre)			
Pimiento	3		
Mala hierba ( <i>Datura</i> sp.)	1		
<b>TOTAL</b>	57 (76%)	15 (20%)	3 (4%)

**Fig 35.** Presencia de los dos subgrupos de CMV en cultivos agrícolas españoles en muestras recogidas durante 1991.

En el anexo 2 se consignan los datos de este trabajo, mostrando las especies analizadas, la clave para cada línea, su procedencia, fecha de germinación, n° de plantas trasplantadas, n° de bandeja a la que se trasplantaron, n° de plantas inoculadas, plantas que mostraron síntomas, resultado del ELISA, plantas que fueron posteriormente trasplantadas a tierra, reinoculación de éstas y ELISA de las plantas reinoculadas.

De todas las líneas analizadas, las siguientes han mostrado algún tipo de resistencia o tolerancia (Figura 36):

a) NG-025-5-2 (complejo de *C. annuum* + *C. frutescens* + *C. chinense*, con predominancia de *C. annuum*). En un primer ensayo se inocularon 5 plantas que resultaron asintomáticas, mientras que el resto de las líneas de la bandeja mostraban un mosaico pronunciado y retraso en el crecimiento. No se realizó ELISA por no disponer entonces de antisueros para CMV. De estas 5 plantas se obtuvo semilla por autofecundación, que al ser analizada, de 39 plantas inoculadas, 9 resultaron positivas en un ensayo ELISA (23,07% de infección). Al ser cruzada con CAP<sub>1</sub> (*C. annuum* var comercial "Botijillo"), sensible al CMV, sólo se pudo inocular una planta, que no mostró síntomas.

Se analizó la línea parental NG-025-5, obtenida el año anterior, y de 5 plantas inoculadas, todas resultaron asintomáticas. Al realizar cruces con la línea NG-047-8 (complejo de *C. annuum* + *C. frutescens* + *C. chinense*, con predominancia de *C. chinense*), y también sensible al CMV, se inocularon 5 plantas. En ninguna de estas plantas inoculadas se pudo detectar virus por ELISA. En cambio, otras líneas emparentadas analizadas (NG-025-1-2 y NG-025-1-4) resultaron sensibles.

Estos datos parecen indicar que se trata de una resistencia determinada por un solo gen dominante (ver Discusión).

b) NG-044-5-4 (complejo de *C. annuum* + *C. frutescens* + *C. chinense*, con predominancia de *C. frutescens*). En un primer ensayo se inocularon 5 plantas con CMV, de las que cuatro resultaron con fuertes síntomas y una permaneció asintomática y muy vigorosa. Como la línea era heterogénea, se decidió seleccionar esta planta asintomática. De la descendencia obtenida por autofecundación de esta planta, se inocularon 87 plantas, de las que 44 resultaron con síntomas (50,57% de infección). De estos datos sólo se puede deducir que esta resistencia no está codificada por un solo gen, y que al menos uno de los genes que intervienen es dominante. Otras líneas cercanas analizadas (NG-044-1-1, NG-044-1-2, NG-044-1-3, NG-044-1-5, NG-044-5-1, NG-044-5-2, y NG-044-5-3) resultaron sensibles.

c) NG-218-8-4 (*C. chinense*). Esta línea se analizó por tres veces. La primera vez, en febrero de 1991, las plantas se mantuvieron en cámara climatizada a 25-28°C, y



Fig 36. Líneas de pimienta que han mostrado cierta resistencia al virus del mosaico del pepino (CMV).

resultaron en un 100% infectadas por ELISA, aunque las plantas resultaron asintomáticas. Se puso otro lote en julio de 1991, esta vez en invernadero, donde se alcanzan temperaturas de hasta 35°C en esta época, y se obtuvo esta vez un 25% de plantas con síntomas. En un tercer análisis realizado en marzo de 1992, otra vez en invernadero, pero en esta época con temperaturas más controladas de alrededor de 18-23°C, se obtuvo otra vez un 100% de plantas asintomáticas de un total de 23 que se analizaron.

Estos datos parecen indicar que se trata de una tolerancia dependiente de la temperatura.

d) NG-8990 (*C. pubescens*). En un primer ensayo al inocular dos plantas resultaron las 2 negativas en el ensayo ELISA. Repitiendo con 6 plantas, las 6 resultaron negativas. En un tercer ensayo, de un total de cuatro plantas inoculadas, dos resultaron infectadas. Es posible, que esta línea, por presentar una hoja rugosa y muy dura, resulte más difícil de ser infectada por inoculación mecánica.

e) En una fase más preliminar están las líneas NG-15441 (*C. annuum*), de la que 8 plantas inoculadas fueron ELISA negativas, y la NG-15644 (*C. annuum*), de la que en 13 plantas inoculadas sólo una resultó infectada por ELISA.

## DISCUSSION

## V. DISCUSION

### 1. TECNICAS DE DETECCION DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV).

Siendo la detección de virus muy importante por múltiples razones (ver Introducción), se decidió estudiar y comparar varias técnicas para un diagnóstico rutinario de un elevado número de muestras, aplicándolas a la detección de un virus de gran importancia económica, presente en numerosos cultivos hortícolas y distribuido por todo el mundo, como es el CMV. Estas técnicas fueron: ELISA con anticuerpos policlonales y monoclonales comerciales, análisis electroforético de RNAs bicatenarios, hibridaciones sobre membrana ("dot blot") con sondas específicas, y amplificación enzimática de una parte del genoma viral por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

#### ELISA

La técnica inmunoenzimática ELISA (Clark y Adams, 1977) ha sido utilizada para detectar antígenos virales en extractos de macerado vegetal de un amplio número de plantas infectadas. Aunque es la técnica de diagnóstico más utilizada, se ha descrito que no da buenos resultados en la detección de virus inestables como el CMV (Morris et al, 1983), probablemente por presentar CMV una baja capacidad inmunogénica (Francki et al, 1979), siendo por tanto difícil conseguir antisueros con un título alto si no se estabilizan previamente las partículas (Porta et al, 1989). En nuestros experimentos resultó la técnica más sencilla y rápida de las ensayadas, y aunque no se ha utilizado un sistema automatizado, salvo en la lectura espectrofotométrica de las placas, el nivel de simplificación conseguido es muy alto. Además, el ensayo ELISA con anticuerpos policlonales ha mostrado ser de una elevada sensibilidad para detectar CMV (Figuras 16 y 18). El mayor problema que encontramos con esta técnica es la presencia de numerosos casos dudosos que no se sabe si corresponden a valores negativos (plantas no infectadas) altos o a valores positivos (plantas infectadas) débiles: a) por un lado en un estudio estadístico de las absorbancias obtenidas con numerosas plantas sanas, se obtuvo una media de 0,08 para pimiento y tabaco, aunque con una desviación estándar de 0,18; ésto supone que con el criterio

recomendado por la casa comercial de considerar como positiva aquellas muestras que presenten dos veces la absorbancia de la media de las plantas sanas, se está incurriendo en numerosos errores de tipo I (falsos positivos), y b) al analizar plantas con absorbancias entre dos y tres veces la media de las sanas por otras técnicas (PCR o inoculación a plantas huésped) se obtuvieron en unos casos valores positivos y en otros valores negativos. Se puede fijar un criterio más o menos restrictivo para determinar las respuestas positivas en 2 ó 3 veces la absorbancia obtenida con las muestras sanas (Tijssen, 1985), pero en cualquier caso se incurrirá en un número mayor o menor de falsos positivos o falsos negativos. Una forma de resolver los resultados dudosos sería por análisis de las muestras con otras técnicas.

Los anticuerpos policlonales polivalentes de la casa comercial Sanofi no reconocieron el 16,3% de las muestras positivas, que sí reconocieron los de Agdia. Este resultado indica que o bien hay epítomos en algunos aislados de CMV que los anticuerpos de Sanofi no reconocen, lo cual no sería de extrañar por la enorme variabilidad serológica que presenta CMV (Palukaitis et al, 1992) o bien los anticuerpos de Agdia presentan reacciones cruzadas con algún otro virus relacionado, y que los anticuerpos de Sanofi no presentan, o una combinación de ambos. El problema de los anticuerpos comerciales, que son los utilizados en los Laboratorios de Diagnóstico de los Servicios de Protección de los Vegetales y en los Servicios de Sanidad Vegetal a nivel nacional, que requieren una estandarización de las técnicas, es que normalmente se comercializan sin la información adecuada: si se utiliza el mismo aislado para obtener los diferentes lotes, si se inmuniza siempre el mismo animal, si se utiliza siempre la misma planta huésped para purificar el virus, si presentan reacciones cruzadas con otros virus, el título de los anticuerpos, etc. Es por tanto importante evaluar los antiseros comerciales, que a estas desventajas añaden el estar preparados en su mayoría contra aislados de otros países, y se desconoce su comportamiento con los aislados nacionales. Según estos resultados, se podría pensar que puede haber algún aislado de CMV que no hayan reconocido ninguno de los dos anticuerpos.

Los anticuerpos policlonales, en general, comprenden un número de diferentes anticuerpos que han sido producidos contra los epítomos presentes en el antígeno inyectado a la especie animal inmunizada. Por tanto, son capaces de reaccionar con una amplia gama de cepas o variantes del virus que compartan epítomos comunes. En cambio, los anticuerpos monoclonales son específicos de un solo epítomo, y reaccionan sólo con aquellas cepas del virus que lleven ese epítomo. Los anticuerpos monoclonales tienen por tanto un mayor potencial para diferenciar

cepas, aunque se puede preparar una mezcla de anticuerpos monoclonales para obtener uno polivalente, que parece ser el caso de los comercializados por Sanofi. El problema actualmente de estos anticuerpos en general es su coste, y que hay muy pocos comercializados, pero permitirían una mayor estandarización de la técnica y una más fácil interpretación de los resultados.

En nuestros resultados se ha conseguido una mayor detectabilidad con anticuerpos policlonales que con los monoclonales (Figuras 16 y 17), probablemente por una diferencia en el título, que las casas comerciales no indican.

Otro de los factores importantes a estandarizar para conseguir una buena interpretación de los resultados es el tampón de extracción que se utilice, pues como se presenta en la Tabla 3, con un tampón tris o citrato se consigue una mayor diferencia entre las absorbancias de las plantas infectadas y las de las sanas que cuando se utiliza un tampón fosfato. El tampón fosfato, de uso muy extendido probablemente por ser el más utilizado para tejidos animales, en los que se empezó aplicando el ELISA, no parece ser el más adecuado para los tejidos vegetales, cuyos extractos son en general más ácidos, según los resultados obtenidos también por otros autores (Walter et al, 1983; Fresno, 1992).

### Análisis de RNAs bicatenarios

El análisis de los RNAs bicatenarios, utilizado para el diagnóstico de enfermedades virales (Matthews, 1991), tiene una aplicación limitada para un diagnóstico rutinario de un número elevado de muestras, por la complejidad del procedimiento y la utilización de componentes orgánicos nocivos (Morris et al, 1983). Además, el límite de dilución obtenido por análisis electroforético de los RNAs-bc de CMV no es comparable con el obtenido con los demás métodos. La principal utilidad de esta técnica es su capacidad de detectar RNAs satélites, virus crípticos, en aquellos casos en los que no se dispone de ninguna información previa del virus en los que puede aportar datos para saber al menos el grupo al que pertenece, o para aquellos virus de los que no se disponga ni de antisueros, ni de sondas, ni datos de secuencia que permitan realizar una RT-PCR (Coffin y Coutts, 1992). En esta tesis se han observado RNAs satélites en una muestra de tomate con síntomas de necrosis y ausencia de ellos en otra muestra de pimiento (Figuras 9 y 19 B), lo que concuerda con observaciones previas de la presencia de éstos en campo (Murant et al, 1990; Jordá et al, 1992).

### Hibridaciones sobre membrana ("dot blot")

Otra técnica alternativa a la detección rutinaria de macerado vegetal de plantas infectadas es la hibridación sobre membranas ("dot blot") utilizando una sonda marcada radiactivamente. Aunque se inició como una técnica muy prometedora, no se ha extendido su uso, principalmente porque no resultan análisis más sensibles y sí más laboriosos que el ELISA.

Como sondas para esta técnica se han utilizado dos clones de cDNA de CMV. La sonda pZU123A que contiene el cDNA del gen de la proteína de cubierta, presenta la ventaja de hibridar con el RNA 3 y con el RNA 4, por contener ambos dicho gen (Gould y Symons, 1978), aumentando la señal de hibridación. Con la sonda 45080, portadora del extremo 3' del RNA 2, por estar esta región muy conservada en los 4 RNAs (Gould y Symons, 1977, 1978), también presentaría hibridación parcial con éstos.

La amplificación del cDNA del clon 45080 se llevó a cabo por métodos clásicos (Sambrook et al, 1989), pero el clon pZU123A se amplificó por PCR con cebadores específicos del gen de la proteína de cubierta, lo cual supuso un importante ahorro de esfuerzo y tiempo. Se probaron dos tipos de membranas para evaluar su comportamiento con un macerado vegetal. En las condiciones utilizadas, la nitrocelulosa permitía una mayor sensibilidad que el nylon (Figura 20), lo que coincide con los resultados obtenidos por otros autores (Borja y Ponz, 1992).

Se podría haber mejorado la sensibilidad de las hibridaciones con membranas de nitrocelulosa o sondas RNA (Robinson y Romero, 1991), pero las membranas de nitrocelulosa son más frágiles y las sondas de cRNA presentan el inconveniente de que el RNA se degrada fácilmente por acción de las RNAsas, presentes en las manos, el material no estéril, y el propio macerado, lo que dificultaría su utilización como sonda para un número elevado de muestras.

Para un diagnóstico rutinario es aconsejable la utilización de marcaje no radiactivo a fin de evitar los riesgos que implica la utilización de radiactividad. La hibridación con sondas no radiactivas está descrita como un método menos sensible (Zwadyk y Cooksey, 1987), aunque Kanematsu et al (1991), y Hopp et al (1991) alcanzan unos niveles de detectabilidad muy considerables para virus y viroides de patata utilizando sondas marcadas con biotina (ver Tabla 6).

## RT-PCR

El hecho de que el ensayo de transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) sea muy sensible, no radiactivo, rápido y necesite pocas moléculas de RNA molde hace que sea una buena alternativa a los ELISAs convencionales y a la hibridación sobre membranas para la detección rápida de virus. El diseño de los cebadores para detectar CMV, basado en la comparación de secuencias conocidas del gen de la proteína de cubierta de los dos subgrupos, y en el que se eligieron regiones conservadas en el RNA 3, da lugar a ensayos de amplio espectro respecto a CMV, ya que se pudieron detectar todos los aislados con que se comprobó, pertenecientes a diferentes subgrupos y distintas zonas de origen. Sería posible igualmente diseñar cebadores específicos para diferenciar los dos subgrupos, ya que entre ambos sólo hay un 75% de homología, frente al 95% existente entre cepas pertenecientes al mismo subgrupo (Quemada et al, 1989; Rizzo y Palukaitis, 1989). Recientemente se ha publicado que se pueden diferenciar los subgrupos de CMV mediante RT-PCR utilizando cebadores para amplificar la proteína de cubierta, y posterior análisis con enzimas de restricción (Rizos et al, 1992).

Una de las mayores ventajas de la PCR, su sensibilidad, puede convertirse en uno de sus mayores problemas. En un principio se obtuvieron en algunos ensayos amplificaciones en plantas no inoculadas, debido probablemente a contaminaciones en el momento de la recogida de las muestras. Esto puede dificultar el diagnóstico rutinario cuando es el propio agricultor el que recoge las muestras por posibles contaminaciones de muestras negativas con otras positivas recogidas anteriormente con las manos o herramientas, por lo que debería recibir instrucciones al respecto. Esta técnica requiere, por tanto, una cuidadosa recogida de las muestras, así como la utilización de material estéril y desechable, mientras que con ELISA no es estrictamente necesario.

Otro problema que presenta actualmente esta técnica es el elevado precio de los reactivos, aunque éste va disminuyendo notablemente. Es de esperar, que al ir aumentando la demanda de éstos, los costes disminuyan.

Pero una ventaja importante es que mientras ELISA requiere la utilización de anticuerpos, y para la mayoría de los virus hay un número muy limitado de anticuerpos en el mercado, o para las hibridaciones hace falta obtener una sonda, los reactivos necesarios para la RT-PCR son comerciales de uso corriente, y sólo necesita cebadores específicos, también comerciales. Sólo es necesario tener datos

de la secuencia viral, pero actualmente se conoce la secuencia de un buen número de virus de casi todos los grupos conocidos.

Un resultado sorprendente fue encontrar que no se pueden utilizar macerados vegetales muy concentrados, pues a la dilución 1/10 no se obtiene amplificación (Figura 22 B) debido probablemente a que los componentes de la planta o un exceso de molde inhiben la transcripción inversa. Este fenómeno es frecuente también en las hibridaciones (Maule et al, 1983; Owens y Diener, 1981; Borja y Ponz, 1992). También se encuentran problemas con determinados huéspedes como el pimiento, en el que no fue posible detectar por esta técnica en ningún caso el virus en un macerado de esta planta, sabiendo que estaba fuertemente infectada.

#### Límite de detección

En este trabajo se ha utilizado el concepto de límite de detección o detectabilidad como la cantidad más pequeña capaz de ser detectada en un ensayo. Las detectabilidades obtenidas con las diferentes técnicas por otros autores con éste y otros virus se encuentran en la Tabla 6, en la que también se han incluido los resultados obtenidos en esta tesis. Como se puede observar en esta tabla, el límite de detección obtenido tanto con virus purificado como con extractos de tejidos infectados son equivalentes a los obtenidos por otros autores.

Es difícil comparar unas técnicas con otras, por detectar cada una diferentes partes del virus, ya que ELISA, como método inmunológico, detecta proteínas virales (que pueden ir asociadas a RNA o no), y PCR e hibridaciones los ácidos nucleicos, que pueden estar en forma monocatenaria (formas encapsidadas) o bicatenaria (formas replicativas), etc. Con la técnica ELISA se detectó 1 ng de partículas virales de CMV, y teniendo en cuenta que éstas contienen aproximadamente un 18% de RNA, esta cantidad equivaldría a unos 180 pg de RNA. Por electroforesis en gel de productos amplificados por RT-PCR se detectaron 0,1 pg (unas 50.000 partículas virales), lo que supone una cantidad 1.800 veces menor, es decir, en nuestras condiciones de ensayo RT-PCR tiene una sensibilidad tres órdenes mayor que ELISA para detectar partículas virales de CMV purificadas.

Cuando se utiliza tejido infectado, en nuestras condiciones ELISA es más sensible que las hibridaciones, ya que requirió 1,4 µg de tejido infectado en un

VIRUS Y VIROIDES	VIRUS PURIFICADO			JUGO BRUTO			REFERENCIA
	ELISA	HIBRIDACIONES	PCR	ELISA	HIBRIDACIONES	PCR	
ArMV	<30ng/ml			1/10000			Clark y Adams, 1977
RRSV	<10 ng/ml			1/10000			
PPV	<1 ng/ml			1/100000			
HpMV	<10 ng/ml			1/50000			
BWYV		100 pg	0,3-1,5 pg				Jones et al, 1991
BWYV	2ng/ml						Hewings y D'Arcy, 1984
BYDV	30-60ng/ml						Lister y Rochow, 1979
BYMV		600 ng	300 pg ( <sup>32</sup> P)		1/125	1/2000 (†)	Vunah et al, 1990
CLRV	6-24 ng/ml			1/5000			Edwards y Cooper, 1985
CLRV	40 ng (200 ng/ml)			1/160	1/640 ( <sup>32</sup> P)	2,5x10 <sup>-9</sup> (†)	Borja y Ponz, 1992
CMV	0,01-0,1 ng			1/10000			Gera et al, 1978
PLRV		1,6 ng-64 pg ( <sup>32</sup> P)			1/25-1/625 ( <sup>32</sup> P)		Robinson y Romero, 1991
Potyvirus			6ng-6pg				Langeveld et al, 1991
PPV	1 ng	5 pg ( <sup>32</sup> P)		1/2000	1/625 ( <sup>32</sup> P)		Varveri et al, 1987
PPV			10 fg				Wetzel et al, 1991
PPV				1/3200	1/12000	1/12000 (†) 1/50000(Biot)	Korschineck et al, 1991
PSTVd		0,2-20 pg (Biot) 200 pg (Digox)			1/1250 (Biot) 1/250 (Digox)		Kanematsu et al, 1991
PVX	4,3ng (21,5ng/ml)	50 pg ( <sup>32</sup> P)					Baulcombe et al, 1984
SCSV	400 pg	1 pg ( <sup>32</sup> P)		1/625	1/125 ( <sup>32</sup> P)		Chu et al, 1989
TMV	5-10 ng	2,5 pg ( <sup>32</sup> P)					Sela et al, 1984
TMV		2 ng ( <sup>32</sup> P)					Koenig et al, 1988
ToRSV	40 ng/ml			1/4000			Converse, 1978
TSWV		1 pg	0,1 pg		1/10000	1/50000	de Haan et al, 1991
CMV	1ng(10ng/ml)		0,1 pg	10 <sup>-4</sup> -10 <sup>-5</sup>	1/500 ( <sup>32</sup> P)	10 <sup>-7</sup> (†)	ESTA TESIS

(†): detección de productos amplificados por electroforesis. Biot: sondas marcadas con biotina. Digox: sondas marcadas con digoxigenina. (<sup>32</sup>P): sondas marcada radiactivamente

**Tabla 6.** Límites de detección de virus y viroides purificados, así como de jugo bruto de muestras infectadas, observados por diferentes autores con tres técnicas distintas. En esta tabla se incluyen los resultados obtenidos en la presente tesis

ensayo con anticuerpos policlonales, mientras que las hibridaciones necesitaron 20 µg. Este resultado coincide con lo descrito por Chu et al (1989 b). RT-PCR sigue siendo la técnica más sensible, pues llegó a detectar 1 ng de tejido infectado. Por tanto, en las condiciones ensayadas, RT-PCR resulta 1.400 veces más sensible que ELISA con anticuerpos policlonales (equivalente a la diferencia de detectabilidad obtenida con virus purificado) y ELISA unas 10 veces más sensible que las hibridaciones con sondas marcadas radiactivamente.

## 2. DETECCION DE VIRUS Y PATOGENOS SUBVIRALES POR RT-PCR PREVIA CAPTURA EN UNA PLACA DE MICROTITULACION.

Con el fin de resolver los problemas que presentaba el macerado vegetal de determinados huéspedes inhibiendo las reacciones de RT-PCR y para facilitar el diagnóstico rutinario de un nº elevado de muestras, se ha desarrollado un método muy sensible de diagnóstico viral que incluye un paso previo de purificación parcial de las partículas virales mediante la unión a anticuerpos inmovilizados en una fase sólida, seguido de amplificación de parte del genoma viral por RT-PCR. Una importante característica de este método es que la preparación de las muestras requiere exactamente el mismo trabajo que para la técnica ELISA y no necesita de laboriosas extracciones con fenol. La posibilidad de llevar a cabo todo el proceso en una placa de microtitulación utilizando termocicladores adaptados a la placa, y fluorímetros lectores de placas permitiría una automatización exactamente igual a la que se consigue con la técnica ELISA, y llevada a cabo por personal con un grado técnico de preparación similar.

El límite de detección conseguido con este método es semejante al obtenido con RT-PCR realizada directamente con macerado vegetal, y éste de orden de magnitud normalmente superior al descrito para otros virus RNA de plantas realizando purificaciones previas del RNA (ver Tabla 6). Esto ocurre probablemente porque al ir diluyendo el macerado vegetal se consigue prácticamente eliminar los posibles inhibidores de las reacciones enzimáticas.

Una de las características más importantes del método es el hecho de que el cDNA pueda ser sintetizado directamente a partir de las partículas virales retenidas en el pocillo mediante un anticuerpo. Esto implica que o bien es algún intermediario en el ciclo de la replicación parcialmente asociado con la proteína de cubierta el que expone, al menos parcialmente, el RNA a la acción de la

transcriptasa inversa, o bien que los viriones se distorsionan en el proceso de inmunocaptura lo suficiente como para permitir el acceso de la enzima al RNA normalmente oculto. Nuestra evidencia experimental actual no permite todavía distinguir entre estas posibilidades, y probablemente ambas pueden ocurrir simultáneamente en una muestra de macerado vegetal. Los experimentos en los que se inmunocapturó GFLV purificado y tuvo lugar una amplificación por PCR (Figura 28) demuestran que la segunda hipótesis es posible. Resultados de otros autores indican que los anticuerpos unidos a una fase sólida pueden producir cambios conformacionales en las partículas virales: Dekker et al (1989), realizando estudios con diferentes anticuerpos monoclonales preparados contra la proteína de cubierta de TMV, observaron que algunos de estos anticuerpos no reaccionan con los antígenos en una fase líquida, mientras que son capaces de unirse a ellos cuando están unidos a una fase sólida. Jaegle et al (1988) observaron que anticuerpos formados contra un péptido sintético de la región amino-terminal de la proteína de cubierta del tombusvirus del achaparrado peludo del tomate (TBSV) reaccionaron con el virus completo en ensayos ELISA. Dado que esta región amino-terminal está en el interior de una cubierta muy compacta, este resultado debe significar que la estructura del virus se abre lo suficiente sobre la placa de microtitulación como para permitir a los anticuerpos reaccionar con esta región normalmente escondida (Matthews, 1991). Resultados similares obtienen MacKenzie y Tremaine (1986) con el virus del mosaico de la judía del sur (SBMV). En cambio, Dubs et al (1991), trabajando con TMV atrapado por anticuerpos inmovilizados en una matriz de dextrano (soporte flexible, no rígido), llegaron a la conclusión opuesta, es decir que las partículas virales mantenían su integridad conformacional, debido probablemente a utilizar una fase sólida distinta a la de los anteriores autores.

Aparte de estas evidencias experimentales de otros autores, fue revelador nuestro experimento en el que no se utilizaron anticuerpos sino que se adsorbieron directamente los virus al poliestireno, siendo bien conocido que la adsorción directa de antígenos a la superficie del poliestireno a menudo produce cambios en la conformación y antigenicidad de las proteínas virales (Al Moudallal et al, 1985; McCullough et al, 1985; Smith y Wilson, 1986; Jordan y Hammond, 1991). En este caso sólo se amplificó CMV (Figura 29), lo que podría ser debido a que en este virus las subunidades proteicas se empaquetan muy laxas en la cápsida dejando huecos (Jacrot et al, 1977) (Figura 6), de forma que las ribonucleasas pueden penetrar en las cápsidas intactas y degradar el RNA encapsidado (Francki, 1968; Habili y Francki, 1974). De la misma forma podría quedar accesible a la transcriptasa

inversa. El fracaso en la amplificación enzimática del resto de los virus parece indicar que el desensamblaje del virión no está producido por factores químicos, como cambios en el pH o concentraciones de los componentes del tampón de la transcriptasa inversa.

Por tanto, estos datos indican que en nuestro método la desencapsidación, al menos parcial, del RNA, podría estar mediada por su unión a los anticuerpos inmovilizados en la fase sólida, y dependiendo de la naturaleza de ésta. Estos anticuerpos unidos a la fase sólida producirían cambios conformacionales en las proteínas de cubierta y harían que el RNA viral quedara expuesto a la acción de la transcriptasa inversa.

Este método parece tener una validez general, ya que ha dado resultado con todos los virus y huéspedes ensayados: BYMV, CLRV, CMV, CTV, GFLV, PLRV, PMMV, y TSWV, además de RNA satélite de CMV y el viroide PSTVd (Tabla 4), en huéspedes tan distintos como tabaco, pimiento, haba, vid, patata, crisantemo, naranjo, o nogal.

En un diagnóstico rutinario, la especificidad requerida varía dependiendo de los casos particulares, desde la necesidad de identificar una cepa viral particular a la conveniencia de detectar cualquier miembro de un grupo particular de virus, o incluso cualquier virus presente en la muestra. La especificidad del método de la inmunocaptura-RT-PCR reside tanto en la interacción virus-anticuerpo como en la del cebador-RNA molde. Las opciones para controlar la primera están limitadas a la disponibilidad de anticuerpos comerciales con diferentes grados de especificidad. La secuencia de los cebadores y las condiciones de amplificación (entre otros la concentración de iones  $Mg^{++}$ , el número de ciclos y las temperaturas de anillado) pueden ser manipuladas para especificidad. Con algunos patógenos se obtuvieron siempre fragmentos amplificados adicionales a los esperados (casos del PMMV y RNA satélite asociado al CMV), probablemente producidos por hibridaciones de los cebadores con secuencias parcialmente complementarias (señaladas ya en resultados) que no se tuvieron en cuenta en el momento de diseñar los cebadores, bien por carecer de la secuencia completa en ese momento, bien por no utilizar programas informáticos que abarcaran toda la secuencia del patógeno. En esta tesis, en un principio se diseñaron los cebadores basándose en las secuencias publicadas de los diferentes patógenos y siguiendo las directrices de Innis et al (1990), y posteriormente se utilizó el programa OLIGO™ que permite una mayor estandarización y utilizar secuencias de un banco de datos. Los cebadores se pueden diseñar para detectar grupos enteros de virus, como es el caso de los potyvirus (Langeveld et al, 1991) o luteovirus (Robertson et al, 1991), mediante

cebadores en parte degenerados dirigidos contra la proteína de cubierta, muy conservada en estos grupos. Por otro lado, a fin de evitar amplificaciones en la PCR distintas de la esperada, nuestros ensayos han sido realizados comenzando los ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94°C del DNA junto con el resto de los reactivos, excepto la DNA polimerasa, lo que permite que se deshagan todas las posibles hibridaciones de los cebadores con secuencias no deseadas y que pueden darse cuando se han mezclado todos los reactivos, en los instantes precedentes a la PCR. Hay un mayor problema de especificidad con la transcripción inversa, que se realiza a 37°C, y por tanto a esta temperatura los cebadores pueden unirse a zonas parcialmente complementarias, y dar lugar a la formación de cDNAs no deseados. Actualmente se están empezando a comercializar transcriptasas inversas termoestables, que posiblemente ayudarán a resolver este problema.

Hay descritos varios métodos de detección de los productos amplificados. El más clásico es la electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida seguida de tinción con bromuro de etidio. Se puede aumentar la sensibilidad o comprobar la especificidad del producto amplificado mediante hibridación con sondas marcadas (Saiki et al, 1988; Innis, 1990). Otros formatos ensayados, hasta ahora generalmente sólo con virus animales, han sido: ensayo "sandwich" en el que el DNA amplificado con nucleótidos conteniendo biotina se captura a una fase sólida, y posteriormente se detecta con estreptavidina-avidina (Keller et al, 1991; Korschineck et al, 1991); una variante en que el DNA amplificado se inmoviliza en placas ELISA, se hibrida con una sonda marcada con biotina, y ésta por  $\beta$ -galactosidasas conjugadas con estreptavidina (Inouye y Hondo, 1990); por fluorescencia (Dahlén et al, 1991; Landgraf et al, 1991); o por quimioluminiscencia (Schmidt, 1991).

Para nuestro formato de ensayo en placas de microtitulación, la utilización de la fluorescencia como forma de detección y cuantificación de los resultados pareció la forma más sencilla de evitar la electroforesis, no adecuada para un nº elevado de muestras, y los resultados obtenidos parecen prometedores. La presencia de cebadores y nucleótidos remanentes no incorporados no parece aumentar el fondo, permitiendo una cuantificación directa del DNA amplificado sin tener que eliminar estos cebadores no incorporados. Además, es un método más rápido y barato que la utilización de cebadores marcados por biotina y compuestos fluorescentes descritos por Landgraf et al (1991). Aunque se pierde alguna información a causa de que la cuantificación fluorimétrica no permite una identificación del producto de amplificación, la utilización de anticuerpos específicos en la inmunocaptura provee un grado adicional de especificidad para

evitar los falsos positivos. Además en aquellos casos que se considerara conveniente, se podría analizar una alícuota por electroforesis.

Hasta ahora los RNAs satélites habían sido detectados por hibridaciones (Rosner et al, 1983; White y Kaper, 1987; Gallitelli et al, 1988; Jordá et al, 1992), por análisis electroforético de los RNAs bicatenarios (Kaper y Díaz-Ruiz, 1977; Valverde y Dodds, 1986; Romero et al, 1988) o incluso por detección serológica de éstos (García-Luque et al, 1986). En esta tesis se han detectado, además de por análisis de los RNAs-bc, por amplificación por RT-PCR con cebadores específicos de las cepas necróticas, y por hibridación de los productos amplificados con sondas específicas. Los cebadores están diseñados para detectar secuencias conservadas en las poblaciones necróticas, aunque debido a una alta homología con las variantes no necróticas, es de esperar que detecte una gran mayoría de éstas. Parece que la RT-PCR previa captura con anticuerpos específicos para RNAs bicatenarios sería muy indicada en el análisis rutinario de RNAs satélites, frente a la complejidad del procedimiento de las hibridaciones o del análisis de los RNAs bicatenarios. No parece que se haya extendido el uso de los anticuerpos para su detección.

### 3. DETECCION DE CMV EN CAMPO.

CMV ha sido descrito como un virus importante en los cultivos hortícolas en España, tanto sólo como asociado a RNAs satélites (Peña-Iglesias et al, 1979; García-Luque et al, 1983; García-Luque et al, 1984; Luis-Arteaga et al, 1988; Luis-Arteaga, 1989; Murant et al, 1990; Jordá et al, 1992). A la vez que se recogieron muestras para estudiar con ellas las técnicas de detección de CMV, se estudió la dispersión del virus en el campo, e identificaron los subgrupos presentes en las diferentes zonas hortícolas.

Los porcentajes de infección del 28,32% encontrados en 1990 (Figura 32) y de un 28,63% en 1991 (Figura 33), aunque el número de muestras analizadas de cada cultivo sea limitado y por tanto la incidencia de CMV no tenga significado estadístico, indican una alta y constante presencia del virus en campo, así como un porcentaje de infección sorprendentemente semejante entre sí y al encontrado por García-Luque et al (1983) del 30% en una prospección realizada en varias regiones españolas durante 3 años (1979-1982), y analizando las muestras por síntomas sobre plantas indicadoras, microscopía electrónica y ensayos serológicos. El criterio que se ha utilizado para considerar una muestra como positiva por ELISA es bastante

restrictivo, y parece muy posible que los anticuerpos utilizados no hayan sido capaces de reconocer todos los aislados del virus por presentar éste una gran variabilidad serológica, por lo que es posible que el porcentaje de infección sea aún ligeramente más alto.

Se han encontrado los dos subgrupos en España, distribuidos al parecer por zonas y por épocas del año (Figura 34). Es lógico que predomine el subgrupo DTL, ya que las cepas de ToRS son termosensibles por multiplicarse mal a temperaturas elevadas (Marchoux et al, 1976; Douine et al, 1979 a), y España es un país en el que en verano se alcanzan temperaturas muy elevadas en general. Ahora bien, en este resultado parece haber influido notablemente la época en que se recogieron las muestras, ya que Murant et al (1990) en sus prospecciones por la zona de Levante y Badajoz encuentran un 85% de cepas tipo ToRS, pero estas muestras se recogieron a principios de junio en una época muy temprana de la campaña agrícola, y Quiot et al (1980) ya observaron en el sur de Francia que en los meses de verano cambia el predominio de cepas ToRS a DTL, por selección de las cepas más termorresistentes, lo que ha sido comprobado en condiciones de invernadero (Douine et al, 1979 a). En cambio, la mayoría de los análisis se realizan con muestras procedentes de cultivos que están más avanzados, y los síntomas de virosis son más evidentes, lo que explicaría un mayor predominio en esta época de CMV tipo DTL. En Galicia, con veranos más suaves, sólo se ha encontrado ToRS. En La Rioja se ha encontrado ToRS tanto en una borraja recogida en abril como en pimientos recogidos en octubre, lo que parece indicar que es un subgrupo constante en la zona. Aunque esta región es semejante a la de Navarra, en la que se identificó exclusivamente DTL en la misma época, es posible que la proximidad del río Ebro a la zona en que se recogieron las muestras cree un microclima especial. En Badajoz se encontraron tanto muestras infectadas con CMV-DTL, como una con ToRS, así como tres que parecían infectadas con ambos. Estos resultados parecen estar relacionados con la época en que se recogieron las muestras, en el mes de julio, y comparando con las observaciones de Quiot et al (1980) y Douine et al (1979 a) parece que sería la época de transición de cepas termosensibles a termorresistentes. Estos datos de los subgrupos están en concordancia con la existencia de un gradiente en el que aumenta la presencia de DTL según aumenta la cercanía al ecuador: en Alemania, Inglaterra y Hungría se ha encontrado ToRS, en Francia, España, Argelia y Etiopía (clima mediterráneo o subtropical) se han encontrado las dos poblaciones, mientras que en Guadalupe, con un clima tropical, sólo se ha encontrado DTL (Quiot et al, 1979 a).

En nuestros experimentos hemos observado que el análisis de las muestras por ELISA-TAS debe hacerse rápidamente, en caso contrario los epítomos propios del subgrupo se pierden, aunque la muestra es reconocida por los anticuerpos policlonales. Haase et al (1989) observan que la diferenciación de los serotipos está basada en neotopos, solamente presentes en la partícula viral intacta, y en macerado vegetal las partículas virales, especialmente las del grupo DTL, se degradan rápidamente.

#### 4. BUSQUEDA DE RESISTENCIA EN GERMOPLASMA DE PIMIENTO.

La mejora genética para resistencia es un proceso largo y laborioso, pero la amplia distribución del CMV y las grandes pérdidas económicas que ocasiona en plantas hortícolas lo justifican. Otra forma de conseguir resistencias, como es la obtención de plantas transgénicas, también implica un proceso largo y laborioso, y en el caso del pimiento aún está en una fase muy preliminar, pues aunque se ha conseguido regenerar explantos, todavía no se ha obtenido ningún pimiento transgénico (ver introducción).

En la presente tesis se han buscado nuevas fuentes de resistencia a CMV en una colección de líneas de pimiento del CCRF, que resulta un material muy interesante para este propósito por varias razones: a) proceder de la zona originaria del género *Capsicum*, en Centro y Sudamérica; b) haber sido recogidas la mayoría de las plantas creciendo silvestres; c) estar constituido por varias especies distintas, algunas de ellas sin clasificar (*C. spp.*) d) muchas de las líneas no ser especies homogéneas, sino mezcla de *C. annuum*, *C. chinense*, y *C. frutescens*, ya que en el pimiento, al ser ligeramente alógamo, son muy frecuentes los cruzamientos interespecíficos. Estas características hacen que estas líneas presenten una considerable variabilidad genética que constituye una buena fuente donde buscar resistencias.

En el análisis de estas líneas por inoculación mecánica del virus y posterior observación de los síntomas y a veces ELISA, se han encontrado en estudios más o menos preliminares varias resistencias, resultado que puede ser de gran interés pues hasta ahora no se conoce ningún mecanismo de resistencia eficiente a CMV en las especies de *Capsicum*.

Los resultados de la segregación obtenida al autofecundar plantas resistentes de la línea NG-025-5-2 apuntan fuertemente a que esta resistencia está

codificada por un solo gen que se comporta como dominante. Si la planta que se autofecundó tenía un genotipo Rr (resistente) se obtendría una descendencia por autofecundación  $1RR : 2Rr : 1rr$ , que coincidiría con el 23,07% de plantas sensibles (genotipo rr) obtenido. En los cruzamientos prueba con plantas sensibles (Rr x rr) daría una segregación 1 Rr: 1 rr. En un cruce que se realizó sólo se obtuvo una planta, que resultó resistente.

El análisis de plantas procedentes de semillas de genitores de este individuo son consistentes con esta hipótesis. Los resultados obtenidos con plantas de la línea NG-025-5 parecen indicar que fuera de genotipo RR, pues todas fueron resistentes, y al cruzar con una planta susceptible se obtuvo un 100% de plantas resistentes en un total de 5 plantas, que corresponderían al genotipo Rr. En cambio, las líneas NG-025-1-2 y NG-025-1-4, que resultaron sensibles, corresponderían a un genotipo rr. Antes de estar seguros acerca del control genético de esta resistencia, será necesario estudiar más generaciones.

Esta línea, aunque es una mezcla de *C. annuum*, *C. chinense*, y *C. frutescens* tiene predominancia de *C. annuum*, lo cual es una ventaja por ser ésta la especie más cultivada a nivel mundial, y facilitaría la introducción de este gen en variedades comerciales mediante mejora genética.

No son frecuentes las resistencias en pimiento controladas por genes dominantes. Pochard (1982) encontró un gen Riv mayor dominante de resistencia a instalación del virus, también en una población silvestre de *C. annuum*, aunque la mayoría de las resistencias a CMV encontradas son poligénicas (Lecoq et al, 1982; Pochard, 1977; Pochard, 1985; Pochard y Daubèze, 1989). Se conoce una resistencia a CMV controlada por un gen dominante simple en *Phaseolus aureus* (Sittiyos et al, 1979).

Estudiando los orígenes de esta línea, parece proceder de una zona costera llana del Perú, donde se cultiva extensivamente el algodón, y siendo *Aphis gossypii* un pulgón muy frecuente en este cultivo, además de uno de los más comunes transmisores de CMV (Palukaitis et al, 1992), es posible que hubiera una presión selectiva positiva en las plantas a adquirir resistencia a este pulgón. Se ha descrito un caso de resistencia a *Aphis gossypii* en el melón PI-161-375 resistente a CMV (Lecoq et al, 1979).

En la línea NG-044-5-4 parece haber una resistencia que no está codificada por un solo gen, y siendo dominante al menos uno de los genes que intervienen. Esta resistencia parece más cercana a las poligénicas obtenidas por Pochard (1985). Esta característica tiene la ventaja de que, en general, cuanto más compleja o

multidimensional es una resistencia, parece que es más difícil de ser vencida por patotipos nuevos del patógeno.

Un caso curioso de tolerancia se observa con la línea NG-218-8-4, que parece ser del tipo termosensible: el virus se replica al ser inoculado, pero sólo hay aparición de síntomas a altas temperaturas. Hay numerosas resistencias descritas dependientes de la temperatura, por ej. la presente en la línea de *Vigna unguiculata* Chinese red x Iron al CPMV (Ponz y Bruening, 1986), que muestra una resistencia de hipersensibilidad al virus a 26°C, mientras que sufre infección sistémica a 34°C. También se ha descrito que el tabaco Samsun NN se infecta sistémicamente con TMV a temperaturas por encima de 28°C (van Loon, 1975). Al contrario, Pink y Walkey (1985) encuentran el cultivar Cinderella de calabacín más resistente a CMV a altas temperaturas.

Las otras tres posibles resistencias encontradas en las líneas NG-15644 (*C. annuum*), NG-15441 (*C. annuum*), y NG-8990 (*C. pubescens*) están en una fase más preliminar de estudio. Se va a obtener descendencia por autofecundación y cruzamientos prueba con líneas sensibles para analizar la descendencia de cada planta individualmente.

Estas líneas habrán de ser analizadas también frente a otras cepas del virus, ya que el problema de los genes de resistencia a CMV es que normalmente son "débiles" y de vida corta, debido al menos en parte, a las muchas cepas de CMV que existen en el campo (Matthews, 1991). En estos casos es importante conocer la distribución de cepas en las diferentes regiones españolas. Por ej., en aquellas zonas donde sólo esté presente el subgrupo ToRS que no se replica a altas temperaturas, se podrán utilizar estas plantas tolerantes que sólo muestran síntomas a elevadas temperaturas, ya que en este caso no habría síntomas de infección viral. El problema de estas plantas es actuar como reservorios para otras plantas sensibles, pero podrían ser una alternativa interesante, en caso de no disponer de otras plantas resistentes. También habrán de ser analizadas frente a inoculación con pulgones, que es la vía de transmisión natural en campo.

# CONCLUSIONES

## VI. CONCLUSIONES

En la presente tesis se ha abordado el estudio y comparación de cuatro técnicas para la detección del virus del mosaico del pepino (CMV) de gran importancia económica en España y a nivel mundial, encaminadas a un diagnóstico rutinario. La técnica ELISA es la más rápida y sencilla de las ensayadas, y presenta una alta detectabilidad. El mayor problema que se ha encontrado con esta técnica es la evaluación de numerosos casos dudosos que se presentan, que podrían explicarse por la inestabilidad del virus y por su complejidad serológica, que se han de resolver por análisis con otras técnicas. Los anticuerpos policlonales polivalentes de Sanofi (Francia) no reconocieron el 16% de las muestras que en cambio sí reconocieron los anticuerpos policlonales anti-CMV-cr de Agdia. Se consiguieron mejores resultados con tampones de extracción citrato o tris que con tampones fosfato. El análisis electroforético de RNAs bicatenarios y la hibridación sobre membranas con sondas de cDNA viral marcadas radiactiva y no radiactivamente tienen una aplicación limitada, por la complejidad del procedimiento. Las membranas de nitrocelulosa permitieron una mayor sensibilidad que las de nylon. La amplificación enzimática de parte del cDNA viral obtenido previa transcripción inversa realizada directamente en un macerado de muestras infectadas, mostró un límite de detección para CMV tres órdenes superior a la técnica ELISA, resultando un método rápido, pero que requiere diluciones elevadas del extracto, trabajar en condiciones que eviten toda posibilidad de contaminaciones, y con determinados huéspedes, como el pimiento, se producen inhibiciones de la reacción.

En un diagnóstico rutinario de virus para un número elevado de muestras, se piensa que actualmente el método más adecuado es ELISA, resolviendo los casos dudosos por RT-PCR. Este último método sería el más adecuado en aquellos casos en que la concentración del patógeno sea baja, como por ejemplo en el estudio de transmisión de virus por semilla.

Se ha desarrollado un método para el diagnóstico de virus y patógenos subvirales que combina la inmunocaptura de los patógenos mediante anticuerpos inmovilizados en placas de microtitulación, con una amplificación de una parte del genoma previa transcripción inversa (RT-PCR), sin necesidad de llevar a cabo ningún tratamiento térmico o químico para desencapsidar el virión. Datos

preliminares de la detección del producto amplificado por fluorescencia indican que se puede llevar a cabo todo el proceso en una placa de microtitulación, dando lugar a un grado de automatización equivalente al de la técnica ELISA. Este método ha demostrado tener una validez general, ya que ha dado resultado con todos los patógenos virales y subvirales y huéspedes ensayados: BYMV, CLRV, CMV, CTV, GFLV, PLRV, PMMV, y TSWV, así como RNA satélite de CMV y el viroide PSTVd. En este procedimiento se pueden sustituir los anticuerpos específicos del virus por anticuerpos monoclonales específicos de RNAs bicatenarios, ofreciendo así la posibilidad de diagnóstico en aquellos casos en que no se disponga de anticuerpos específicos, o donde los métodos inmunológicos sean difíciles de utilizar, como es el caso de los patógenos subvirales, RNAs satélites y viroides. El método descrito presenta la sensibilidad típica de los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa, y con un grado de dificultad semejante al de la técnica ELISA. La especificidad del ensayo parece depender en gran manera de que los cebadores utilizados hayan sido diseñados correctamente. Sobre este método se ha presentado una solicitud de patente en el Registro de la Propiedad Industrial de España.

En prospecciones realizadas en diferentes regiones españolas y en diferentes cultivos durante los años 1990 y 1991, se han encontrado infecciones de CMV del 28% en ambos casos. El virus está presente en altos porcentajes en las principales hortícolas españolas: melón, pimiento, tomate, calabacín, judía, y pepino. También se ha detectado un alto porcentaje de infección en las malas hierbas muestreadas. Se han identificado los dos subgrupos de CMV, DTL y ToRS, distribuidos al parecer según zonas y época de recolección, encontrándose algunas plantas infectadas con ambos. Estos datos se correlacionan con las propiedades de termosensibilidad de los dos subgrupos. El subgrupo termosensible ToRS aparece en épocas tempranas de la estación y en zonas que no parecen alcanzar elevadas temperaturas, mientras que el grupo termorresistente DTL se ha encontrado tanto en la región mediterránea, como en el interior de la Península. En la provincia de Badajoz se encontraron ambos subgrupos, e incluso plantas con infecciones mixtas, en la época de transición de primavera a verano.

Se han buscado resistencias al CMV en líneas de germoplasma pertenecientes a diferentes especies del género *Capsicum*, mediante inoculación mecánica del virus y posterior observación de síntomas. Una línea NG-025-5-2 perteneciente a *C. annuum* ha mostrado una resistencia asociada a una falta de síntomas y ausencia de presencia viral según un análisis ELISA, carácter que

parece determinado por un gen monogénico dominante, según el estudio de la descendencia obtenida por la autofecundación de un individuo resistente al virus. Otra línea NG-044-5-4 de *C. frutescens* presentó una resistencia que no parece estar codificada por un único gen, y en la que al menos uno de los genes que intervienen es dominante. Una tercera línea de *C. chinense*, la NG-218-8-4, parece presentar una tolerancia al virus de tipo termosensible, es decir, el virus se replica al ser inoculado, pero sólo hay aparición de síntomas a temperaturas elevadas. El resto de las líneas se encuentran en un estudio más preliminar.

## BIBLIOGRAFIA

## VII. BIBLIOGRAFIA

Alonso, E., García-Luque, I., de la Cruz, A., Avila-Rincón, M.J., Serra, M.T., Castresana, C. y Díaz-Ruiz, J.R. (1991). Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *Journal of General Virology* 72: 2875-2884.

Al Moudallal, Z., Briand, J. P., y van Regenmortel, M. H. V. (1985). A major part of the polypeptide chain of tobacco mosaic virus is antigenic. *EMBO Journal* 4: 1231-1235.

Anderson, M. L. M. y Young, B. D. (1985). Quantitative filter hybridisation. En "Nucleic acid hybridisation: a practical approach". Hames, B. D. y Higging, S. J. (eds.). IRL Press. Oxford. Washington D. C.

Arroyo, R. y Revilla M. A. (1991). *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Reports* 10: 414-416.

Barbara, D. J. y Clark, M. F. (1982). A simple indirect ELISA using F(ab') fragments of immunoglobulin. *Journal of General Virology* 58: 315.

Bar-Joseph, M. y Malkinson M. (1980). Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): A comparison of two plant viruses. *Journal of Virological Methods* 1: 179.

Bar-Joseph, M. y Rosner, A. (1984). Diagnosis of plant viruses by the molecular hybridization method. *Phytoparasitica* 12: 214.

Bar-Joseph, M., Rosner, A., Moscovitz, M. y Hull, R. (1983). A simple procedure for the extraction of double-stranded RNA from virus infected plants. *Journal of Virological Methods* 6: 1-8.

Barrios, E. P., Mosokar, H. I. y Black, L. L. (1971). Inheritance of resistance to tobacco etch and cucumber mosaic viruses in *Capsicum frutescens*. *Phytopathology* 61: 1318.

Baulcombe, D. (1989). Strategies for virus resistance in plants. *Trends in Genetics* 5: 56-60.

Baulcombe, D., Flavell, R. B., Boulton, R. E., y Jellis, G. J. (1984). The sensitivity and specificity of a rapid nucleic acid hybridization method for the detection of potato virus X in crude sap samples. *Plant Pathology* 33: 361-370.

Baulcombe, D. C., Saunders, G. R., Bevan, M. W., Mayo, M. A. y Harrison, B. D. (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321: 446-449.

Beachy, R. N., Loesch-Fries, S. y Tumer, N. E. (1990). Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annual Review of Phytopathology* 28: 451-474.

Bevan, M. W., Mason, S. E., y Goelet, P. (1985). Expression of tobacco mosaic virus coat protein by a cauliflower mosaic virus promoter in plants transformed by *Agrobacterium*. *EMBO Journal* 4: 1921-1926.

Bialy, H., y Klausner, A. (1986). A new route to virus resistance in plantas. *Bio/Technology* 4: 96.

Binnie, C. (1991). Designing the optimal oligo. *TIBTECH* 9: 145-146.

Borja, M. J. (1991). Secuencias no codificantes repetidas en el genoma del virus del enrollado del cerezo y su aplicación al diagnóstico viral. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Borja, M. J. y Ponz, F. (1992). An appraisal of different methods for the detection of the walnut strain of cherry leafroll virus. *Journal of Virological Methods* 36: 73-83.

Bos, L. (1970). Symptoms of virus diseases in plants. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, 206 pp.

Bos, L. y Maat, H. Z. (1974). A strain of cucumber mosaic virus, seed-transmitted in beans. *Netherland Journal of Plant Pathology* 80: 113-123.

Branch, A. D. y Robertson, H. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* 223: 450-455.

Broadbent, L. (1964). The epidemiology of tomato mosaic. VII. The effect of TMV on tomato fruit yield and quality under glass. *Annals of Applied Biology* 54: 209-224.

Bruening, G., Buzayan, J. M., Hampel, A., y Gerlach, W. L. (1988). Replication of small satellite RNAs and viroids: possible participation of non-enzymic reactions. pp.12-145. En "RNA Genetics". vol II. E. Domingo, J. J. Holland, y P. Ahlquist, eds. CRC Press, Boca Raton, FL.

Bryant, J. A. (1988). Immunization of plants against viruses. *Tibtech* 6: 136-137.

Castro, S., Carazo, G., Sáiz, M., Romero, J. y de Blas, C. (1992). Bean yellow mosaic virus naturally infecting *Phaseolus vulgaris* L. in Spain: use of enzymatic cDNA amplification as a method of detection. (Sometido a publicación).

Chèn, B. y Francki, R. I. B. (1990). Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology* 71: 939-944.

Chu, P. W. G., Waterhouse, P. M. y Helms, K. (1989 a). Diagnostic assays for routine detection of subterranean clover stunt virus in pastures. En *Proceedings of the 7th Australasian Plant Pathology Society Conference, Brisbane, 3-7 julio*, p. 95.

Chu, P. W. G., Waterhouse, P.M., Martin, R.R. y Gerlach, W.L. (1989 b). New approaches to the detection of microbial plant pathogens. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 7: 45-110.

Clark, M. F. y Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.

Clark, M.F. y Bar-Joseph, M. (1984). Enzyme immunosorbent assays in plant virology. *Methods in Virology* 7: 51-85.

Coffin, R. S. y Coutts, R. H. A. (1992). DsRNA cloning and diagnosis of beet pseudo-yellows virus by PCR and nucleic acid hybridization. *Intervirology* 33: 197-203.

Cohen, S. (1982). Resistance to cucumber mosaic virus transmission by aphids in peppers. En "La sélection des plantes pour la résistance aux maladies". Ed. INRA, Paris, p. 59-64.

Conti, M. y Marte, M. (1983). Virosi e micoplasmosi del peperone. *L'Italia Agricola. Le virosi delle piante ortive* 120: 132-152.

Converse, R. H. (1978). Detection of tomato ringspot virus in red raspberry by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Disease Reporter* 62: 189-192.

Cuozzo, M., O'Connell, K. M., Kaniewski, W., Fang, R.-X., Chua, N.-H. y Tumer, N. E. (1988). Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6:549-557.

Dahlén, P. O., Iltiä, A. J., Skagius, G., Frostell, A., Nunn, M. F., y Kwiatkowski, M. (1991). Detection of human immunodeficiency virus type 1 bu using the polymerase chain reaction and a time-resolved fluorescence-based hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 798-804.

Davies, C. y Symons, R. H. (1988). Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA 3. *Virology* 165: 216-224.

Davis, R. F. y Hampton, R. O. (1986). Cucumber mosaic virus isolates seedborne in *Phaseolus vulgaris*: serology, host-pathogen relationships, and seed transmission. *Phytopathology* 76: 999-1004.

de Haan, P., Gielen, J., van Grinsven, M., Peters, D. y Goldbach, R. (1990). Detection of tomato spotted wilt virus in infected plants by molecular hybridization and PCR. Tesis Doctoral.

Dekker, E. L., Porta, C. y Van Regenmortel, M. H. V. (1989). Limitations of different ELISA procedures for localizing epitopes in viral coat protein subunits. *Archives of Virology* 105: 269-286.

De Miguel, A. (1991). Cultivos intensivos al aire libre. *Phytoma* 30: 3-12.

Devergne, J. C. y Cardin, L. (1973). Contribution a l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV) IV- Essai de classification de plusieurs isolats sur la base de leur structure antigénique. *Annales de Phytopathologie* 5: 409-430.

Devergne, J. C. y Cardin, L. (1978). Détection et identification sérologiques des infections naturelles par le virus de la mosaïque du concombre. *Annales de Phytopathologie* 10: 233-246.

Devergne, J. C. y Cardin, L. (1979). Phénomènes d'interférence entre souches du virus de la mosaïque du concombre (CMV). I.- Répartition des antigènes viraux dans le *Nicotiana tabacum* var Xanthi n.c. inoculé simultanément ou successivement par deux souches sérologiquement différentes. *Annales de Phytopathologie* 11: 409-419.

Devergne, J. C., Cardin, L., Burckard, J. y Van Regenmortel, M. H. V. (1981). Comparison of direct and indirect ELISA for detecting antigenically related cucumoviruses. *Journal of Virological Methods* 3: 193-200.

deZeeuw, D. J. y Crum, R. A. (1963). Inheritance of resistance to tobacco ringspot and cucumber mosaic viruses in black cowpea crosses. *Phytopathology* 53: 337-340.

Díaz, I., Moreno, R., y Power, J. B. (1988). Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Reports* 7: 210-212.

Díaz-Ruiz, J. R., y 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.

Diener, T. O., ed. (1987). *The viroids*. Plenum Press, New York. 344 pp.

Diener, T. O. (1991). Subviral pathogens of plants: viroids and viroidlike satellite RNAs. *FASEB Journal* 5: 2808-2813.

Dodds, J. A. (1982). Cross-protection and interference between electrophoretically distinct strains of cucumber mosaic virus in tomato. *Virology* 118: 235-240.

Dodds, J. A. (1986). The potential for using double-stranded RNAs as diagnostic probes for plant viruses. En "Developments and applications in virus testing" (R. A. C. Jones y L. Torrance, eds. ). *Developments of Applied Biology I*, pp. 71-86. Association of Applied Biologists, Wellsbourne.

Dodds, J. A., Morris, T. J. y Jordan, R. L. (1984). Plant viral double-stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology* 22: 151-168.

Dodds, J. A. , Lee, S. Q., y Tiffany, M. (1985). Cross protection between strains of cucumber mosaic virus: effect of host and type of inoculum on accumulation of virions and double-stranded RNA of the challenge strain. *Virology* 144: 301-309.

Doolittle, S.P. (1916). A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology* 6: 145-147.

Doolittle, S.P. y Walker J.C. (1926). Control of cucumber mosaic virus by eradication of wild host plants. U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. No. 1461, 15 pp.

Donovan, R.M., Bush, C.E., Peterson, W.R., Parker, L.H., Cohen, S.H., Jordan, G.W., Brink, K.M.V. y Goldstein, E. (1987). Comparison of nonradiative DNA hybridization probes to detect human immunodeficiency virus nucleic acid. *Molecular and cellular probes* 1: 359-366.

Dougherty, W. G., y Hiebert, E. (1985). Genome structure and gene expression in plant RNA viruses. En "Molecular Plant Virology", vol 2, Davies, J. W. Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 23.

Douine, L., Marchoux, G., Quiot, J. B., y Clément, M. (1979 a). Phénomènes d'interférence entre souches du virus de la mosaïque du concombre (CMV). II.- Effet de la température d'incubation sur la multiplication de deux souches de sensibilités thermiques différentes, inoculées simultanément ou succesivement à un hôte sensible *Nicotiana tabacum* var Xanthi n.c. Annales de Phytopathologie 11: 421-430.

Douine, L., Quiot, J. B., Marchoux, G. y Archange, P. (1979 b). Recensement des espèces végétales sensibles au virus de la Mosaïque du Concombre (CMV). Etude bibliographique. Annales de Phytopathologie 11: 439-475.

Dubs, M. C., Altschuh, D. y Van Regenmortel, M. H. V. (1991). Interaction between viruses and monoclonal antibodies studied by surface plasmon resonance. Immunology Letters 31: 59-64.

Dufour, O., Palloix, A., Gebre Selassie, K., Pochard, E. y Marchoux, G. (1989). The distribution of a cucumber mosaic virus in resistant and susceptible plants of pepper. Canadian Journal of Botany 67: 655-660.

Dumas de Vault, R., Chambonnet, R. D. y Sibi, M. (1982). In: Variability in plants regenerated from tissue culture. E. D. Earle y Y. Demarly (eds.), Praeger Publishers, New York, pp 92-98.

Edwards, M. C., y Gonsalves, D. (1983). Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. Phytopathology 73: 1117-1120.

Edwards, M. C., Gonsalves, D. y Provvidenti, R. (1983). Genetic analysis of cucumber mosaic virus in relation to host resistance: location of determinants for pathogenicity to certain legumes and *Lactuca saligna*. Phytopathology 73: 269-273.

Edwards, M. L., y Cooper, J. I. (1985). Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. Journal of Virological Methods 11: 309-319.

Edwardson, J. R. y Christie, R. G. (1991). Cucumoviruses. En "CRC handbook of viruses infecting legumes". 293-319. CRC Press Boca Raton.

Everett, D. y Harnett, S. (eds.) (1987). Plant resistance to viruses. Winchester, UK: Wiley.

Fari, M. y Czako, M. (1981). Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants cultured *in vitro*. Scientia Horticulturae 15: 207-213.

Forster, A. C., y Symons, R. H. (1987a). Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. Cell (Cambridge, Mass.) 49: 211-220.

Forster, A. C., y Symons, R. H. (1987b). Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. Cell (Cambridge, Mass.) 50: 9-16.

Fraille, A. y García-Arenal, F. (1991). Secondary structure as a constraint on the evolution of a plant viral satellite RNA. *Journal of Molecular Biology* 221: 1065-1069.

Francki, R. I. B. (1968). Inactivation of cucumber mosaic virus (Q strain) nucleoprotein by pancreatic ribonuclease. *Virology* 34: 694-700.

Francki, R. I. B. (1985). Plant virus satellites. *Annual Review of Microbiology* 39: 151-174.

Francki, R. I. B., Randles, J. W., Chambers, T. C. y Wilson, S. B. (1966). Some properties of purified cucumber mosaic virus (Q strain). *Virology* 28: 729-741.

Francki, R. I. B., Mossop D.W., y Hatta, T. (1979). CMI/AAB Descriptions of plant viruses n° 213.

Francki, R. I. B., Milne, R.G., y Hatta, T. (1985a). Atlas of Plant Viruses Vol. I. CRC Press, Boca Raton. 240 pp.

Francki, R.I.B., Milne, R.G., y Hatta, T. (1985b). Atlas of Plant Viruses Vol. II. CRC Press, Boca Raton. 304 pp.

Fraser, R.S.S. (1986). Genes for resistance to plant viruses. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 3: 257-294.

Fraser, R.S.S. (1987). *Biochemistry of Virus-Infected Plants*. Research Studies Press. 259 pp.

Fraser, R.S.S. (1990). The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 28: 179-200.

Fraser, R.S.S. y Gerwitz, A. (1991). The genetics of resistance and virulence in plant virus disease. En "Genetics and Plant Pathogenesis" (ed. por PR. Day y G.J. Jellis) pp 33-44. Blackwell Scientific Publications.

Fresno, J. (1992). Correlación bioecológica entre nematodos transmisores de virus y el virus del entrenudo corto (GFLV). Tesis Doctoral. Universidad Complutense, Madrid.

Fritzsche, R., Karl, E., Lehmann, W., y Proesler, G. (1972). *Tierische Vektoren Pflanzenpathogener Viren*. 521 pp. Jena: Veb. Gustav Fischer Verlag.

Fuchs, M., Pinck, M., Etienne, L., Pinck, L., y Walter, B. (1991). Characterization and detection of grapevine fanleaf virus by using cDNA probes. *Phytopathology* 81: 559-565.

Fulton, R. W. (1986). Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annual Review of Phytopathology* 24: 67-81.

Gabriel, C. J. (1986). Detection of double-stranded RNA by immunoblot electrophoresis. *Journal of Virological Methods* 13: 279-283.

Gallitelli, D., di Franco, A., Voulas, C., y Kaper, J. M. (1988). Infezioni miste del virus del mosaico del cetriolo (CMV) e di potyvirus di colture ortive di Puglia e Basilicata. *Inf. Fitopatol.* 38: 57-64.

Gallitelli, D., Vovlas, C., Martelli, G., Montasser, M. S., Tousignant, M. E., y Kaper, J. M. (1991). Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: II. Field test under natural epidemic conditions in southern Italy. *Plant Disease* 75: 93-95

García-Arenal, F. (1992). La importancia de los virus en horticultura. *Hortofruticultura* 5: 60-64.

García-Arenal, F., Zaitlin, M. y Palukaitis, P. (1987). Nucleotide sequence analysis of six satellite RNAs of cucumber mosaic virus: primary sequence and secondary structure alterations do not correlate with differences in pathogenicity. *Virology* 158: 339-347.

García-Luque, I., Díaz-Ruiz, J. R., Rubio-Huertos, M., y Kaper, J. M. (1983). Cucumovirus survey in Spanish economically important crops. *Phytopathologia Mediterranea* 22: 127-132.

García-Luque, I., Kaper, J. M., Díaz-Ruiz, J. R., y Rubio-Huertos, M., (1984). Emergence and characterization of satellite RNAs associated with Spanish cucumber mosaic virus isolates. *Journal of General Virology* 65: 539-547.

García-Luque, I., Brieva, A., Díaz-Ruiz, J.R., y Rubio, N. (1986). Isolation and partial characterization of a monoclonal antibody specific for a naturally occurring double-stranded RNA. *Virology* 152: 252-255.

Gera, A., Loebenstein, G., y Raccach, B. (1978). Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay. *Virology* 86: 542-545.

Gibbs, A., y Harrison, B.D. (1976). *Plant Virology: the Principles*. Arnold, London. 292 pp.

Gil-Ortega, R. y Luis-Arteaga, M. (1982). Comportamiento del pimiento en inoculación artificial frente al virus del mosaico del pepino. IV Jornadas de Selección y Mejora de Tomate y Pimiento. Publicaciones del CRIDA 03. Zaragoza. pp 351-361.

Gil-Ortega, R. y Luis-Arteaga, M. (1988). Response of pepper to two Spanish isolates of CMV. *Capsicum Newsletter* 7: 65-66.

Gil-Ortega, R. y Luis-Arteaga, M. (1992). Resistencia al virus Y de la patata y a tobamovirus en pimiento. *Hortofruticultura* 6: 64-68.

Goodman, R. N., Kiraly, y Z., Wood, K. R. (1986). *The biochemistry and physiology of plant disease*. Columbia, MO; Univ. Missouri Press.

Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., y Blinov, V. M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research* 17: 4713-4730.

Gordon, K. H. J. y Symons, R. H. (1983). Satellite RNA of cucumber mosaic virus forms a secondary structure with partial 3'-terminal homology to genomic RNAs. *Nucleic acids Research* 11: 947-960.

Gould, A. R. y Symons, R. H. (1977). Determination of the sequence homology between the four species of cucumber mosaic virus by hybridization analysis with complementary DNA. *Nucleic acids Research* 4: 3787-3802.

Gould, A. R. y Symons, R. H. (1978). Alfalfa mosaic virus RNA. Determination of the sequence homology between the four RNA species and a comparison with the four RNA species of cucumber mosaic virus. *European Journal of Biochemistry* 91: 269-278.

Gould, A. R., Palukaitis, P., Symons, R. H. y Mossop, D. W. (1978). Characterization of a satellite RNA associated with cucumber mosaic virus. *Virology* 84: 443-455.

Gross, H. J., Domdey, H., Lossow, C. H., Jank, P., Raba, M., Alberty, H. y Sanger, H. L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273: 203-208.

Haack, I., y Richter, J. (1987). Differenzierung von Isolaten des Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus) mit Hilfe von Testpflanzen. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* 23: 435-441.

Haase, A., Richter, J., y Rabenstein, F. (1989). Monoclonal antibodies for detection and serotyping of cucumber mosaic virus. *Journal of Phytopathology* 127: 129-136.

Habili, N. y Francki, R. I. B. (1974). Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic virus. II. Virus stability. *Virology* 60: 29-36.

Habili, N., McInnes, J. L. y Symons, R. H. (1987). Non-radioactive, photobiotin-labelled DNA probes for the routine diagnosis of barley yellow dwarf virus. *Journal of Virological Methods* 16: 224-238.

Hahn, Y. S., Strauss, E. G. y Strauss, J. H. (1989). Mapping of RNA temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. *Journal of Virology* 63: 3142-3150.

Halk, E. L. y De Boer, S.H. (1985). Monoclonal antibodies in plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 23: 321-350.

Hamilton, R. I., Edwardson, J. R., Francki, R. I. B., Hsu, H. T., Hull, R., Koenig, R. y Milne, R. G. (1981). Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. *Journal of General Virology* 54: 223-241.

Hammond, J. y Hammond, R. W. (1989). Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the bean yellow mosaic virus coat protein gene. *Journal of General Virology* 70: 1961-1974.

Harrison, B. D., Mayo, M. A., y Baulcombe, D. C. (1987). Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus. *Nature* 328: 799-802.

Haseloff, J., Mohamed, N. A., y Symons, R. H. (1982). Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. *Nature* 299: 316-321.

Heath, M. C. (1981). Non host resistance. En "Plant disease control" (Stapples y Toenissen, eds). pp. 201-235. J. Wiley

Hewings, A. D. y D'Arcy, C. J. (1984). Maximizing the detection capability of a beet western yellows virus ELISA system. *Journal of Virological Methods* 9: 131-142.

Hidaka, S., Hanada, K., Ishikawa, K., y Miura, K.-I. (1988). Complete nucleotide sequence of two new satellite RNAs associated with cucumber mosaic virus. *Virology* 164: 326-333.

Hill, S.A. (1984). Serological Techniques. En "Methods in Plant Virology" (Blackwell Scientific Publications) 1: 111-123.

Hodgman, T. C. (1988). A new superfamily of replicative proteins. *Nature (London)* 333: 22-23.

Hollings, M. (1955). Investigations of Chrysanthemum viruses. I. Aspermy flower distortion. *Annals of Applied Biology* 43: 86-102.

Hopp, H. E., Hain, L., Bravo Almonacid, F., Tozzimi, A. C., Orman, B., Arese, A. I., Ceriani, M. F., Saladrigas, M. V., Celnik, R., del Vas, M., y Mentalberry, A. N. (1991). Development and application of a nonradiative nucleic acid hybridization system for simultaneous detection of four potato pathogens. *Journal of Virological Methods* 31: 11-30.

Horne, R. W. (1967). Electron microscopy of isolated virus particles and their components. *Methods in Virology* 3: 522-574.

Hull, R. (1984). Rapid diagnosis of plant virus infections by spot hybridization. *TIBS* 4, 88-91.

Hull, R. y Al-Hakim, A. (1988). Nucleic acid hybridization in plant virus diagnosis and characterization. *TIBTECH* 6: 213-218.

Hutchins, C. J., Keese, P., Visvader, J. E., Rathjen, P. D., McInnes, J. L. y Symons, R. H. (1985). Comparison of plus and minus forms of viroids and virusoids. *Plant Molecular Biology* 4: 293-304.

Igloi, G. L. (1983). A silver stain for the detection of nanogram amounts of tRNA following two-dimensional electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 134: 184-188.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J. (eds.) (1990). PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press Inc.

Inouye, S. y Hondo, R. (1990). Microplate hybridization of amplified viral DNA segment. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 1469-1472.

Jacquemond, M. y Leroux, J. P. (1982). L'ARN satellite du virus de la mosaïque du concombre. II. Etude de la relation virus-ARN satellite chez divers hôtes. *Agronomie* 2: 55-62.

Jacquemond, M., Amselem, J. y Tepfer, M. (1988). A gene coding for a monomeric form of cucumber mosaic virus satellite RNA confers tolerance to CMV. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1: 311-316.

Jacrot, B., Chauvin, C., y Witz, J. (1977). Comparative neutron small-angle scattering study of small spherical RNA viruses. *Nature (London)* 266: 417-421.

Jaegle, M., Briand, J. P., Burckard, J., y van Regenmortel, M. H. V. (1988). Accesibility of three continuous epitopes in tomato bushy stunt virus. *Annales Institute Pasteur/Virologie* 139: 39-50.

Jagger, I.C. (1916). Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology* 6: 148-151.

Jansen, R. W., Siegl, G. y Lemon, S. M. (1990). Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 87: 2867-2871.

Jones, R. A. C. (1988). Seed-borne cucumber mosaic virus infection of narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*) in western Australia. *Annals of Applied Biology* 113: 507-518.

Jones, R. A. C., y McKirdy, S. J. (1990). Seed-borne cucumber mosaic virus infection of subterranean clover in western Australia. *Annals of Applied Biology* 116: 73-86.

Jones, R. A. C. y Proudlove, W. (1991). Further studies on cucumber mosaic virus infection of narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*): seed-borne infection, aphid transmission, spread and effects on grain yield. *Annals of Applied Biology* 118: 319-329.

Jones, T. D., Buck, K. W., y Plumb (1991). The detection of beet western yellows virus and beet mild yellowing virus in crop plants using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 35:287-296.

Jordá, C., Alfaro, A., Aranda, M. A., Moriones, E., y García-Arenal, F. (1992). Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes in eastern Spain. *Plant Disease* 76: 363-366.

Jordan, R. y Hammond, J. (1991). Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* 72: 25-36.

Kanematsu, S., Hibi, T., Hashimoto, J. y Tsuchizaki (1991). Comparison of nonradioactive cDNA probes for detection of potato spindle tuber viroid by dot-blot hybridization assay. *Journal of Virological Methods* 35: 189-197.

Kaper, J. M., y Re, G. G. (1974). Redetermination of the RNA content and the limiting RNA size of three strains of cucumber mosaic virus. *Virology* 60: 308-311.

Kaper, J. M. y Díaz-Ruiz, J. R. (1977). Molecular weights of the double-stranded RNAs of cucumber mosaic virus strain S and its associated RNA 5. *Virology* 80: 214-217.

Kaper, J. M. y Tousignant, M. E. (1977). Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. I. Role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA 5 with virions. *Virology* 80: 186-195.

Kaper, J. M. y Waterworth, H. E. (1977). Cucumber mosaic virus associated RNA 5: causal agent for tomato necrosis. *Science* 196: 429-431.

Kaper, J. M. y Waterworth, H.E. (1981). Cucumoviruses. En "Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis" (E. Kurstak, ed.) pp 257-332. Elsevier/North Holland, Biomedical Press, New York.

Kaper, J. M., Tousignant, M. E. y Steen, M. T. (1988). Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. XI. Comparison of 14 CARNA 5 variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence. *Virology* 163: 284-292.

Kaper, J. M., Gallitelli, D. y Tousignant, M. E. (1990). Identification of a 334-ribonucleotide viral satellite as principal aetiological agent in a tomato necrosis epidemic. *Res. Virol.* 141: 81-95.

Kassanis, B. (1981). Portraits of viruses. Tobacco necrosis virus and its satellite virus. *Intervirology* 15: 57-70.

Kearney, C. M., Zitter, T. A., y Gonsalves, D. (1990). A field survey for serogroups and the satellite RNA of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 80: 1238-1243.

Keller, G. H., Huang, D. P. y Manak, M. M. (1991). Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA by polymerase chain reaction amplification and capture hybridization in microtiter wells. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 638-641.

Kimble, K. A., Grogan, R. G., Greathead, A. S., Paulus, A. O., y House, J. K. (1975). Development, application, and comparison of methods for indexing lettuce seed for mosaic virus in California. *Plant Disease Reporter* 59: 461-464.

Kingsbury, D. T. (1987). DNA probes in the diagnosis of genetic and infectious diseases. *Trends in Biotechnology* 5: 107-111.

Koenig, R. (1981). Indirect ELISA for the broad specificity detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 55: 53.

Kohler, G. y Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

Korschineck, I., Himmler, G., Sagl, R., Steinkellner, H. y Katinger, H.W.D. (1991). A PCR membrane spot assay for the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. *Journal of Virological Methods* 31: 139-146.

Kurath, G. y Palukaitis, P. (1989). Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: recombinants constructed in vitro reveal independent functional domains for chlorosis and necrosis in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 91-96.

Landgraf, A., Reckmann, B. y Pingoud, A. (1991). Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. *Analytical Biochemistry* 193: 231-235.

Langeveld, S. A., Dore, J. M., Memelink, J., Derks, A. F. L. M., van der Vlugt, C. I. M., Asjes, C. J. y Bol, J. F. (1991). Identification of potyviruses using

the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of General Virology* 72:1531-1541.

Lecoq, H., Cohen, S., Pitrat, M., y Labonne, G. (1979). Resistance to cucumber mosaic virus transmission by aphids in *Cucumis melo*. *Phytopathology* 69: 1223-1225.

Lecoq, H., Pochard, E., Pitrat, M., Laterrot, H. y Marchoux, G. (1982). Identification et exploitation de résistances aux virus chez les plantes maraichères. *Cryptogam. Mycol.* 3: 333-345.

Lister, R. M. y Rochow, W. F. (1979). Detection of barley yellow dwarf virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 69:649-654.

Liu, W., Parrot, W. A., Hildebrand, D. F., Collins, G. B. y Williams, E. G. (1990). *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Reports* 9: 360-364.

Loesch-Fries, L. S., Merlo, D., Zinnen, T., Burhop, L., Hill, K., Krahn, K., Jarvis, N., Nelson, S., y Halk, E. (1987). Expression of alfalfa mosaic virus RNA-4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO Journal* 6: 1845-1851.

Lot, H. y Kaper, J. M. (1976). Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus. *Virology* 74: 223-226.

Lot, H., Marrou, J., Quiot, J.-B. y Esvan, C. (1972). Contribution a l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). II.- Méthode de purification rapide du virus. *Annales de Phytopathologie* 4: 25-38.

Lot, H., Jonard, G., y Richards, K.E. (1977). Cucumber mosaic virus RNA 5. Partial characterization and evidence for no large sequence homology with genomic RNAs. *FEBS Letters* 80: 395-400.

Lovisolò, D. y Conti, M. (1969). Biological characterization of some isolates of cucumber mosaic virus. *Annales de Phytopathologie* 1: 367-376.

Luis-Arteaga, M. (1989). Virosis y micoplasmosis del pimiento cultivado al aire libre en España. Identificación de virus y caracterización de cepas. Tesis Doctoral Universidad Politécnica, Madrid.

Luis-Arteaga, M., Rodríguez-Cerezo, E., Maestro, C. y García-Arenal, F. (1988). Detection and characterization of an isolate of cucumber mosaic virus (CMV) infecting borage (*Borago officinalis*) in Spain. *Plant Disease* 72: 265-267.

MacKenzie, D. J., y Tremaine, J. H. (1986). The use of a monoclonal antibody specific for the N-terminal region of southern bean mosaic virus as a probe of virus structure. *Journal of General Virology* 67: 727-735.

Mc Cullough, K. C., Crowther, J. R., y Butcher, R. N. (1985). Alteration in antibody reactivity with foot-and-mouth disease virus (FDMV) 146 S antigen before and after binding to a solid phase or complexing with specific antibody. *Journal of Immunological Methods* 82: 91-100.

Marchoux, G., Gebre Selassie, K. y Pochard, E. (1986). Les maladies à virus des piments et poivrons. *Phytoma-Défense des cultures* 379: 33-36.

Marchoux, G., Douine, L., y Quit, J. B. (1976). Comportement thermique différentiel de certaines souches du virus de la mosaïque du concombre. Hypothèse d'un mécanisme pleiotropique reliant plusieurs propriétés. *C. R. Acad. Sci. Paris Sér. D* 283: 1601-1604.

Marcos, J. F. y Flores, R. (1990). Subcellular location of avocado sunblotch viroid in avocado leaves. *Plant Science* 67: 237-244.

Marrou, J., Quiot, J. B., Marchoux, G., y Duteil, M. (1975). Caractérisation par la symptomatologie de quatorze souches du virus de la mosaïque du concombre et de deux autres Cucumovirus, tentative de classification. *Meded. Fac. Landbouwwet Rijkuniv. Gent.* 40: 107-121.

Martelli, G. P. y Russo, M. (1985). En "The plant viruses. vol 1: Polyhedral virions with tripartite genomes" (R. I. B. Francki, ed), pp. 163-205. Plenum, New York.

Matthews, R.E.F. (1979). The classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 11, 133-135.

Matthews, R.E.F. (1991) *Plant Virology*. 3th Edition. Academic Press Inc, New York. 835 pp.

Maule, A. J., Boulton, M. I. y Wood, K. R. (1980). Resistance of cucumber protoplasts to cucumber mosaic virus: a comparative study. *Journal of General Virology* 51: 271-279.

Maule, A. J., Hull, R. y Donson, J. (1983). The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. *Journal of Virological Methods* 6: 215-225.

Mi, S., Durbin, R., Huang, H. V., Rice, C. M., y Stollar, V. (1989). Association of the Sindbis virus RNA methyltransferase activity with the nonstructural protein nsp1. *Virology* 170: 385-391.

Migliori, A., Marchoux, G. y Quiot, J. B. (1978). Dynamique des populations du virus de la mosaïque du concombre en Guadeloupe. *Annales de Phytopathologie* 10: 455-466.

Miladinovic, Z., Mijatovic, M. y Stevanovic, D. (1986). Some results in breeding of pepper (*C. annuum* L.) for resistance to Cucumber Mosaic Virus. En: Rept 6 th Eucarpia meeting on *Capsicum* and Eggplant, Zaragoza, p.177-181.

Milne, R. G. (1984). En "Methods in Virology" (K. Maramorosch y H. Koprowski, eds.) vol 7, pp 87-116. Acad. Press, New York.

Morelle, G. (1988). A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. *Focus* 11: 7-8.

Morris, T. J., y Dodds, J. A. (1979). Isolation and analysis of double stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69: 854-858.

Morris, T. J., Dodds, J. A., Hillman, B. Jordan, R. L., Lommel, S. A. y Tamaki, S. J. (1983). Viral specific dsRNA: diagnostic value for plant virus disease identification. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 27-30.

Mossop, D. W. y Francki, R. I. B. (1977). Association of RNA 3 with aphid transmission of cucumber mosaic virus. *Virology* 81: 177-181.

Mossop, D. W. y Francki, R. I. B. (1979). Comparative studies on two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology* 95: 395-404.

Murant, A. F. y Mayo, M. A. (1982). Satellites of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 20: 49-70.

Murant, E., Ponz, F., Romero, J. y Harrison, B. (1990). Búsqueda del virus del mosaico del pepino y sus RNAs satélites en cultivos hortícolas de diferentes regiones españolas. II Congreso Nacional de Virología. Valladolid

Neergaard, P. (1977). *Seed Pathology*, 1187 pp. John Wiley & Sons, New York.

Nicolas, O. y Laliberté, J.F. (1991). The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. *Journal of Virological Methods* 32: 57-66.

Nitzany, F. E. y Tanne, E. (1962). Virus diseases of peppers in Israel. *Phytopathologia Mediterranea* 4: 80-82.

Nono-Wondim, R., Gebre-Selassié, K., Palloix, A. y Marchoux, G. (1992). Field evaluation of the resistance to Cucumber mosaic virus migration in bell pepper plants. 5th International Plant Virus Epidemiology Symposium "Viruses, vectors and the environment". Valenzano (Bari)-Italia pp 247-248.

Nylan, G. y Goheen, A. C. (1969). Heat therapy of virus diseases of perennial plants. *Annual Review of Phytopathology* 7: 331.

Owen, J. y Palukaitis, P. (1988). Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 495-502.

Owens, R. A. y Diener, T. O. (1981). Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213: 670-672.

Palukaitis, P. (1988). Pathogenicity regulation by satellite RNAs of cucumber mosaic virus: minor nucleotide sequence changes alter host responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1: 175-181.

Palukaitis, P. y Zaitlin, M. (1984). A model to explain the "cross protection" phenomenon shown by plant viruses and viroids. En *Plant Microbe Interactions: Molecular and Genetic Aspects*, ed. T. Kosuge, E. W. Nester, 1: 420-429. New York/London:Macmillan.

Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G., y R. I. B. Francki (1992). Cucumber mosaic virus. *Advances in virus research* 41: 281-348.

Pasamontes, L., Gubser, J., Wittek, R., y Viljoen, G. J. (1991). Direct identification of recombinant vaccinia virus plaques by PCR. *Journal of Virological Methods* 35: 137-141.

Peden, K. W. C., y Symons, R. H. (1973). Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. *Virology* 53: 487-492.

Peña-Iglesias, A., Fisac, R., Fresno, J., y Romero, J. (1978). La "necrosis del tomate" en España causada por una estirpe del virus del mosaico del pepino. I Jornadas Nacionales sobre Investigación Hortícola, Murcia.

Peña-Iglesias, A., Fisac, R., Romero, J., Fresno, J., y Carazo, G. (1979). El mosaico de la platanera canaria: I. Caracterización biológica, serológica, molecular y ultraestructural de una estirpe (de serotipo To) del virus del mosaico del pepino. *Anales INIA* 12: 155-179.

Phillips, G. C. y Hubstenberger, J. F. (1985). Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 4: 261-269.

Piazzolla, P., Diaz-Ruiz, J. R. y Kaper, J. M. (1979). Nucleic acid homologies of eighteen cucumber mosaic virus isolates determined by competition hybridization. *Journal of General Virology* 45: 361-369.

Piazzolla, P., Rubino, L., Tousignant, M. E., y Kaper, J. M. (1989). Two different types of satellite RNA associated with chicory yellow mottle virus. *Journal of General Virology* 70: 949-954.

Pink, D. A. C. (1987). Genetic control of resistance to cucumber mosaic virus in *Cucurbita pepo*. *Annals of Applied Biology* 111: 425-432.

Pink, D. A. C. y Walkey, D. G. A. (1985). Effect of temperature and light intensity on resistance in marrow (*Cucurbita pepo*) to cucumber mosaic virus. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 104: 325-329.

Pochard, E. (1977). Méthodes pour l'étude de la résistance partielle au virus du concombre chez le piment. En: Rept 3rd Eucarpia meeting : Capsicum 77, Montfavet, p. 93-104.

Pochard, E. (1982). A major gene with quantitative effect on two different viruses: CMV and TMV. *Capsicum Newsletter* 1: 54-56.

Pochard, E. (1985). Recherches sur le Piment. En: Rapport d'activité 1983-84, INRA, Sta. Amélior. Pl., 53-64.

Pochard, E. y Chambonnet, D. (1971). Méthodes de sélection du piment pour la résistance au *Phytophthora capsici* et au Virus du Concombre. En: Rept 1st Eucarpia meeting: Genetics and breeding of *Capsicum*, Torino, p. 270-281.

Pochard, E. y Daubèze, A. M. (1989). Progressive construction of a polygenic resistance to cucumber mosaic virus in the pepper. Proceedings of the 7th EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Capsicum and Eggplant, Kragujevac-Yugoslavia, pp 187-191.

Ponz, F. y Bruening, G. (1986). Mechanisms of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 24: 355- 381.

Ponz, F., Glascock, C. B. y Bruening, G. (1988). An inhibitor of polyprotein processing with the characteristics of a natural virus resistance factor. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 1: 25-31.

Porta, C., Devergne, J. C., Cardin, L., Briand, J. P., y Van Regenmortel, M. H. V. (1989). Serotype specificity of monoclonal antibodies to cucumber mosaic virus. *Archives of Virology* 104: 271-285.

Pound, G. S. y Cheo, P. C. (1952). Studies on resistance to cucumber virus 1 in spinach. *Phytopathology* 42: 301-306.

Powell-Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. y Beachy, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.

Provvidenti, R. (1976) Reaction of *Phaseolus* and *Macroptilium* species to a strain of cucumber mosaic virus. *Plant Disease Reporter* 60: 289-293.

Provvidenti, R., Robinson, R. W., y Shail, J. W. (1980). A source of resistance to cucumber mosaic virus in *Lactuca saligna* L. for lettuce *L. sativa* L.). *Hortscience* 15: 528-529.

Puchta, H., Ramm, K. y Sanger, H. L. (1988). The molecular structure of hop latent viroid (HLV) a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic acids Research*. 16: 4197-4216.

Putz, C., Kuszala, J., Kuszala, M., y Spindler, C. (1974). Variation du pouvoir pathogène des isolats du virus de la mosaïque du concombre associé a la nécrose de la tomate. *Annales de Phytopathologie* 6: 139-154.

Quacquarelli, A., Gallitelli, D., Savino, V. y Martelli, G.P. (1976). Properties of Grapevine Fanleaf Virus. *Journal of General Virology* 32:349-360.

Quemada, H., Kearny, C. Gonsalves, D., y Slightom, J.L. (1989). Nucleotide sequences of the coat protein genes and flanking regions of cucumber mosaic virus strains C and WL RNA 3. *Journal of General Virology* 70: 1065-1073.

Quiot, J. B. (1980). Ecology of cucumber mosaic virus in the Rhone valley of France. *Acta Horticulturae* 88: 9-21.

Quiot, J. B., Devergne, J. C., Marchoux, G., Cardin, L. y Douine, L. (1979 a). Ecologie et épidémiologie du virus de la mosaïque du concombre dans le Sud-Est de la France. VI.- Conservation de deux types de populations virales dans les plantes sauvages. *Annales de Phytopathologie* 11: 349-357.

Quiot, J. B., Devergne, J. C., Cardin, L., Verbrugge, M., Marchoux, G. y Labonne, G. (1979 b). Ecologie et épidémiologie du virus de la mosaïque du concombre dans le Sud-Est de la France. VII.- Répartition de deux types de populations virales dans des cultures sensibles. *Annales de Phytopathologie* 11: 359-373.

Randles, J.W. (1975). Association of two ribonucleic acid species with cadang-cadang disease of coconut palm. *Phytopathology* 65: 163-167.

Randles, J.W., Lillo, E. P. y Diener, T. O. (1976). The viroidlike structure and cellular location of anomalous RNA associated with the cadang-cadang disease. *Virology* 74: 128-139.

Riesner, D. (1991). Viroids: from thermodynamics to cellular structure and function. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4:122-131.

Risser, G., Pitrat, M., y Rode, J. C. (1977). Etude de la résistance du melon *Cucumis melo*. L. au VMC. *Ann. Amélior. Plantes* 27: 509-522.

Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D., y Gillings, M. R. (1992). Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73: 2099-2103.

Rizzo, T. M. y Palukaitis, P. (1989). Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 1. *Journal of General Virology* 70: 1-11.

Robertson, N.L., French, R. y Gray, S. (1991). Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *Journal of General Virology* 72: 1473-1477.

Robinson, D. J. y Romero, J. (1991). Sensitivity and specificity of nucleic acid probes for potato leafroll luteovirus detection. *Journal of Virological Methods* 34: 209-219.

Romero, J., de Blas, C., Castro, S., y Carazo, G. (1988). Double stranded RNA isolation: kinetics of ds-RNA production and analysis of working conditions in the detection of plant viruses. *Fitopatologia* 23: 5-9.

Rosner, A., Bar-Joseph, M., Moscovitz, M., y Mevarech, M. (1983). Diagnosis of specific viral RNA sequences in plant extracts by hybridization with a polynucleotide kinase-mediated, <sup>32</sup>P-labeled, double stranded RNA probe. *Phytopathology* 73: 699-702.

Rybicki, E. P. y von Wechmar, M. B. (1981). The serology of the Bromoviruses, 1. Serological interrelationships of the Bromoviruses. *Virology* 109: 309.

Rybicki, E. P. y von Wechmar, M. B. (1985). Serology and Immunochemistry. En "The Plant Viruses", Plenum Press, pp 207-244.

Rybicki, E. P. y Hughes, F. L. (1990). Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminivirus of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. *Journal of General Virology* 71: 2519-2526.

Sáez, E. (1991). Virus en "La planificación y utilización de la información para el control de plagas y enfermedades". *Phytoma-España* 28: 29-31.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 487-491.

Saldanha, J.A., Karayiannis, P., Thomas, H.C. y Monjardino, J.P. (1987). Use of biotinylated probes in serum hepatitis B virus DNA detection. *Journal of Virological Methods* 16: 339-342.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1659p.

Sammons, D. W., Adams, L. D., y Nishizawa, E. E (1981). Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gel. *Electrophoresis* 2: 135-141.

Sánchez, F., Chay, C., Borja, M. J., Rowhani, A., Romero, J., Bruening, G., y Ponz, F. (1991). cDNA sequence of the capsid protein gene and the 3' untranslated region of a fanleaf isolate of grapevine fanleaf virus. *Nucleic Acids Research* 19: 5440.

Sánchez-Vizcaíno, J. M., y Cambra, M. (1981). *Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal*. Monografías INIA Nº 29, 57 pp.

Saxena, P. K., Gill, R., Rashid, A. y S. C. Maheshwari (1981). Isolation and culture of protoplasts of *C. annuum* L. and their regeneration into plants flowering *in vitro*. *Protoplasma* 90: 357-360.

Schmidt, B. L. (1991). A rapid chemiluminescence detection method for PCR-amplified HIV-1 DNA. *Journal of Virological Methods* 32: 233-244.

Schwartz, E. F. y Stollar, B. D. (1969). Antibodies to polyadenylate-polyuridylylate copolymers as reagents for double strand RNA and DNA-RNA hybrid complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35: 115.

Sekiya, M. E., Lawrence, S. D., McCaffery, M. y Cline, K. (1991). Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Journal of General Virology* 72: 1013-1020.

Sela, I., Reichman, M., y Weissbach, A. (1984). Comparison of dot molecular hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay for detecting tobacco mosaic virus in plant tissues and protoplasts. *Phytopathology* 74: 385-389.

Semancik, J. S., Tsuruda, D., Zaner, L. Geelen, J. L. y Weathers, J. G. (1976). Exocortis disease: subcellular distribution of pathogenic (viroid) RNA. *Virology* 69: 669-676.

Serghini, M. A., Fuchs, M., Pinck, M., Reinbolt, J., Walter, B. y Pinck, L. (1990). RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of General Virology* 71: 1433-1441.

Sharma, O. P., Khatri, H. L., Bansal, R. D. y Komal, H. S. (1984). A new strain of cucumber mosaic virus causing mosaic disease of muskmelon. *Phytopath. Z.* 109: 332-340.

Sibi, M., Dumas de Vaulx, R. y Chambonnet, D. (1979). *Ann. Amelior. Plantes* 29: 583-606.

Sinclair, J. B. y Walker, J. C. (1955). Inheritance of resistance to cucumber mosaic virus in cowpea. *Phytopathology* 45: 563-564.

Singh, J. y Thakur, M. R. (1977). Genetics of resistance to tobacco mosaic virus, cucumber mosaic and leaf-curl virus in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) En: Rept 3rd Eucarpia meeting: Capsicum 77, Montfavet, p. 119-126.

Sittiyos, P., Poehlman, J. M. y Sehgal, O. P. (1979). Inheritance of resistance to cucumber mosaic virus infection in mungbean. *Crop Sci.* 19: 51.

Sleat, D. E. y Palukaitis, P. (1990). Site-directed mutagenesis of a plant viral satellite RNA changes its phenotype from ameliorative to necrogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2946-2950.

Slightom, J. L., Chee, P. P., y Gonsalves, D. (1990). Field testing of cucumber plants which express the CMV coat protein gene: field plot design to rest natural infection pressures. En: *Progress in plant cellular and molecular biology.* H. J. J. Nijkamp; L. H. W. van der Plas; J. van Aartrijk (Eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht. pp 201-206.

Smith, A. D., y Wilson, E. (1986). A modified ELISA that selectively detects monoclonal antibodies recognizing native antigen. *Journal of Immunological Methods* 94: 31-35.

Soler, C. Allibert, P., Chadonnet, Y., Cros, P., Mandrand, B. y Thivolet, J. (1991). Detection of human papillomavirus types 6,11, 16, and 18 in mucosal and cutaneous lesions by the multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 35: 143-157.

Soto, M. J. y Ponz, F. (1991). Principales virosis del pimiento en España y sus posibilidades de control. *Ciencia Agronómica Sept/Oct 1991*, 25-33.

Steger, G., Po, T., Kaper, J. y Riesner, D. (1987). Double-stranded cucumovirus associated RNA 5: which sequence variations may be detected by optical melting and temperature-gradient gel electrophoresis? *Nucleic Acids Research* 15: 5085-5103.

Stollar, B. D. (1975). The specificity and applications of antibodies to helical nucleic acids. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 3: 45-69.

Symons, R. H. (1981). Avocado sunblotch viroid: primary structure and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Research* 9: 6527-6537.

Symons, R. H. (1991). The intriguing viroids and virusoids: what is their information content and how did they evolve? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 111-121.

Takahashi, T., Yaguchi, S., Oikawa, S. y Kamita, N. (1982). Subcellular location of hop stunt viroid. *Phytopath. Z.* 103: 285-293.

Takanami, Y. (1981). A striking change on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology* 109: 120-126.

Thomas, P. (1983). Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods in Enzymology* 100: 255-266.

Tien, P., Zhang, X. H., Qiu, B. S., Quin, B. y Wu, G. S. (1987). Satellite RNA for the control of plant diseases caused by cucumber mosaic virus. *Annals of Applied Biology* 111: 143-152.

Tijssen, P. (1985). Practice and theory of enzyme immunoassays. (Burdon, R. H. y van Knippenberg, P. H., eds.). Elsevier Biomedical Press. Amsterdam, 549 pp.

Tolin, S.A., Isakson, O.W. y Troutman, J.L. (1970). *Plant Disease Reporter* 54, 935-938.

Tomlinson, J. A. (1975). Epidemiology and control of cucumber mosaic virus. En "Cucumber mosaic virus in Fundamental and Agricultural Research", Meded. Riksfac. Landbouwwet. Gent. 40, 163-169.

Tomlinson, J. A. (1987). Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals of Applied Biology* 110: 661-681.

Tomlinson, J. A. y Carter, A. L. (1970). Studies on the seed transmission of cucumber mosaic virus in chickweed (*Stellaria media*) in relation to the ecology of the virus. *Annals of Applied Biology* 66: 381-386.

Torrance, L. y Jones, R. A. C. (1981). Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses. *Plant Pathology* 30: 1-24.

Tumer, N. E., O'Connell, K. M., Nelson, R. S., Sanders, P. R., Beachy, R. N., Fraley, R. T. y Shah, D. M. (1987). Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO Journal* 6: 1181-1188.

Valverde, R. A., y Dodds, J. A. (1986). Evidence for a satellite RNA associated naturally with the US strain and experimentally with the U1 strain of tobacco mosaic virus. *Journal of General Virology* 67: 1875-1884.

Valverde, R. A., Nameth, S., Abdalha, O., Al-Musa, O., Desjardins, P. y Dodds, A. (1990). Indigenous double-stranded RNA from pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Science* 67: 195-201.

Van Dun, C. M. P., Bol, J. F. y Van Vloten-Doting, L. (1987). Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology* 159: 299-305.

van Loon, L. C. (1975). Polyacrilamide disk electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". III. Influence of temperature and virus strain on changes induced by tobacco mosaic virus. *Physiological Plant Pathology* 6: 289-300.

van Regenmortel, M.H.V. (1982). Serology and Immunochemistry of plant viruses. Academic Press, Inc., New York. 302 pp.

van Regenmortel, M.H.V. y Burckard, J. (1980). Detection of a wide spectrum of tobacco mosaic virus strains by indirect enzyme immunosorbent assays (ELISA). *Virology* 106: 327.

Varveri, C., Ravelonandro, M. y Dunez, J. (1987). Construction and use of a cloned cDNA probe for the detection of plum pox virus in plants. *Phytopathology* 77: 1221-1224.

Villalón, B. (1981). Breeding peppers to resist virus diseases. *Plant Disease* 65: 557-562.

Vunsh, R., Rosner, A., y Stein, A. (1990). The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Annals of Applied Biology* 117: 561-569.

Wakarchuk, D. A. y Hamilton, R. I. (1985). Cellular double-stranded RNA in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Molecular Biology* 5: 55-63.

Walkey, D. G. A. y Freeman, G. H. (1977). Inactivation of cucumber mosaic virus in cultured tissues of *Nicotiana rustica* by diurnal alternating periods of high and low temperature. *Annals of Applied Biology* 87: 375-382.

Walkey, D. G. A. y Pink, D. A. C. (1984). Resistance in vegetable marrow and other *Cucurbita* spp. to two British strains of cucumber mosaic virus. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 102: 197-205.

Walter, B., Vuittenez, A. J., Kuszala, J., Stocky, G., Burckard, J. y van Regenmortel, H. (1983). Serological detection of fanleaf virus of grapes by ELISA. *Agr. Sc. Prod. Veg. Environ. París. INRA* 4: 527-534.

Waterworth, H. E., Kaper, J. M. y Tousignant, M. E. (1979). CARNA 5, the small cucumber mosaic virus-dependent replicating RNA, regulates disease expression. *Science* 204,845-847.

Webb, R. E. y Smith, P. G. (1969). Resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum frutescens*. *Phytopathology* 59:1561.

Wellman, F.L. (1937). Control of southern celery mosaic in Florida by removing weeds that serve as sources of mosaic infection. U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. No. 548, 16 pp.

Wells, H. D., Corbett, M. K. y Forbes, Jr., I. (1964). Cucumber mosaic virus is seedborne in blue lupines. *Phytopathology* 54: 627 (Abstr.)

Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. y Dunez, J. (1991). A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* 33: 355-365.

Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. y Dunez, J. (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* 39: 27-37.

White, J. L. y Kaper, J. M. (1987). Absence of lethal stem necrosis in select *Lycopersicon* spp. infected by cucumber mosaic virus strain D and its necrogenic satellite CARNA 5. *Phytopathology* 77: 808-811.

Yoshida, K., Goto, T., y Iizuka, N. (1984). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 50: 92-93.

Zaitlin, M. (1979). How viruses and viroids induce disease. En "Plant disease", ed. J. G. Horsfall, E. B. Cowling, 4: 257-271. New York: Academic.

Zwadyk, P. y Cooksey, R.C. (1987). Nucleic acid probes in clinical microbiology. CRC critical reviews in clinical laboratory sciences 25: 71-103.

## ANEXO I

MUESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	MUESTRA	CULTIVO	CMV1	CMV 2	CMV 3	SINTOMAS CAMPO	PROCEDENCIA	FECHA	OTROSVIRUS
2	AL-1	Tomate 521	++		DTL		AL (enviada por E. Sáez)	ago-91	
3	AL-2 A	Tomate Ramy	+			necrosis hoja, bronceado	Palomares (AL)	octu-91	TSWV
4	AL-3 A	Tomate Ramy	-			necrosis hoja, bronceado	Palomares (AL)	octu-91	
5	AL-4 A	Tomate Ramy	++		DTL	filimorfismo, deformación hoja	Palomares (AL)	octu-91	
6	AL-5 A	Tomate Ramy	++		DTL	necrosis en fruto, filimorfismo	Palomares (AL)	octu-91	
7	AL-6 A	Tomate Ramy	++		DTL	filimorfismo muy fuerte	Palomares (AL)	octu-91	
8	AL-7 A	Tomate Ramy	++		DTL	mosaico, abullonamiento	Palomares (AL)	octu-91	
9	AL-8 A	Tomate Ramy	+			mosaico, abullonamiento, deformación de hoja	Palomares (AL)	octu-91	
10	AL-9 A	Tomate Ramy	++		DTL	no síntomas hoja, necrosis en fruto. 1 guía bien y otra mal	Palomares (AL)	octu-91	
11	AL-10 A	Tomate Ramy	-			mosaico suave y necrosis en hoja, anillos necróticos en fruto	Palomares (AL)	octu-91	
12	AL-11 B	Pepino Multipik inv.	-			hoja abarquillada	Palomares (AL)	octu-91	
13	AL-12 B	Pepino Multipik inv.	-			nervios encogidos, hoja recortada	Palomares (AL)	octu-91	
14	AL-13 B	malva hierba(bledo)	+			mosaico	Palomares (AL)	octu-91	
15	AL-14 B	judía Helda inv.	-			mosaico suavísimo	Palomares (AL)	octu-91	
16	AL-15 B	judía Helda inv.	-			mosaico suavísimo	Palomares (AL)	octu-91	
17	AL-16 B	judía Helda inv.	-			mosaico suavísimo	Palomares (AL)	octu-91	
18	AL-17 C	malva h.(N. alba)	++		DTL	mosaico, abullonamiento, campo arrasado	Palomares (AL)	octu-91	
19	AL-18 C	Tomate	++		DTL	Necrosis, mosaico	Palomares (AL)	octu-91	
20	AL-19 C	Haba	-			mosaico	Palomares (AL)	octu-91	
21	AL-20 D	Pimiento Andalus	-			Hoja coriácea, sin brillo, abullonamiento, bronceado en hojas	Palomares (AL)	octu-91	
22	AL-21 D	Pimiento Andalus	-			Hoja coriácea, sin brillo, abullonamiento	Palomares (AL)	octu-91	
23	AL-22 D	Pimiento Andalus(fru)	-			ringspot, arabescos, bronceado, anillos) misma planta	Palomares (AL)	octu-91	
24	AL-23 D	Pimiento Andalus	+			fruto } diferentes síntomas	Palomares (AL)	octu-91	
25	AL-24 D	Pimiento Andalus	-			alguno necrosis, hoja coriácea	Palomares (AL)	octu-91	
26	AL-25 D	Pimiento Andalus	-			filimorfismo	Palomares (AL)	octu-91	
27	AL-26 D	Pimiento Andalus	-			filimorfismo, bronceado	Palomares (AL)	octu-91	TSWV
28	AL-27 D	malva h.-Cerraja	-			filimorfismo	Palomares (AL)	octu-91	
29	AL-28 E	Tomate Royesta	++		DTL	filimorfismo y arpillado, sin síntomas fruto	Palomares (AL)	octu-91	
30	AL-29 E	Tomate Royesta	++		DTL	mosaico, abullonamiento, amarilleamiento, sin síntomas fruto	Palomares (AL)	octu-91	
31	AL-30 E	Tomate Royesta	++		DTL	abullonamiento, mosaico	Palomares (AL)	octu-91	
32	AL-31 E a	Tomate Royesta (fruto)	++		DTL	fruto mate	Palomares (AL)	octu-91	
33	AL-32 E b	Tomate Royesta (hoja)	++		DTL	mosaico en hoja, abullonamiento	Palomares (AL)	octu-91	
34	AL-33 F	Tom. 209 (Leopardo)	++		DTL	filimorfismo	Palomares (AL)	octu-91	
35	AL-34 F	Tom. 209 (Leopardo)	++		DTL	filimorfismo, mosaico, abullonamiento	Palomares (AL)	octu-91	
36	AL-35 G	Pimiento Andalus	-			mosaico, hoja coriácea, arpillado	Palomares (AL)	octu-91	
37	AL-36 G	Pimiento Andalus	-			hoja mate, nervios encogidos, entrenudo corto, muy fuerte, bronceado	Palomares (AL)	octu-91	
38	AL-37 G	Pimiento Andalus	-			arpillado, mosaico, nervios encogidos	Palomares (AL)	octu-91	
39	AL-38	Tomate Royesta	++		DTL	mosaico fuerte, bronceado en hoja	Palomares (AL)	octu-91	

CMV 1:ELISA con policlonales Sanofi, CMV 2:ELISA con policlonales Agdia, CMV 3:ELISA con Monoclonales Sanofi; inv: invernadero

MUESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
40	IAL-39 H	Tomate Royesta	++		DTL	mosaico fuerte, abullonamiento	Las Herrerías (AL)	octu-91	
41	IAL-40 H	Tomate Royesta	++		DTL	labarquillado hacia dentro, mosaico	Las Herrerías (AL)	octu-91	
42	IAL-41 H	Tomate Royesta	++		DTL	mosaico fuerte, abullonamiento	Las Herrerías (AL)	octu-91	
43	IAL-42 H	Tomate Royesta	++		DTL	mosaico fuerte, abullonamiento	Las Herrerías (AL)	octu-91	
44	IAL-43 I	Pimiento Andalus	+			hoja coriácea, mate, bronceado	Cuevas (AL)	octu-91	
45	IAL-44 I	Pimiento Andalus	-			hoja coriácea, mate, mosaico	Cuevas (AL)	octu-91	
46	IAL-45 I	Pimiento Andalus	-			hoja coriácea, mate, mosaico, arrepollado	Cuevas (AL)	octu-91	
47	IAL-46 I	Pimiento Andalus	+			imoteado, amarilleamiento	Cuevas (AL)	octu-91	PVY
48	IAL-47 I	Imala hierba-cenizo	-			hoja deforme, leve mosaico, vecina a muestra AL-46	Cuevas (AL)	octu-91	
49	IAL-48 J	Tomate Royesta	++		DTL	mosaico	Cuevas (AL)	octu-91	
50	IAL-49 J	Tomate Royesta	++		DTL	mosaico	Cuevas (AL)	octu-91	
51	IAL-50 J	Tomate Royesta	++		DTL	mosaico, amarilleamiento	Cuevas (AL)	octu-91	
52	IAL-51	Pimiento	++			hoja mate, mosaico	AL (enviada por E. Sáez)	octu-91	
53	IAL-52	Pimiento	++			hoja mate, mosaico	AL (enviada por E. Sáez)	octu-91	
54	IAL-53	Judía semilarga	+			Mosaico, abullonamiento	AL (enviada por E. Sáez)	ma-92	
55	IBA	9 muestras garbanzo	-			mosaico, amarilleamiento, necrosis apical	Manguilla (BA)	ma-91	BWVY
56	IBA-1	pim Yolowonder	+	-		filiforme, necrosis en venas	Balboa (BA)	juni-90	
57	IBA-2	tomate	-	-		mosaico suave	Balboa (BA)	juni-90	
58	IBA-3	pim Yolowonder	-	-		filiforme, necrosis en venas	Balboa (BA)	juni-90	
59	IBA-4	tomate	-	+		mosaico suave	Balboa (BA)	juni-90	
60	IBA-5	pim(Aranjuez)	-			manchas blanco-amarillentas hoja	Balboa (BA)	juli-91	
61	IBA-6	pim(Aranjuez)	-			manchas blanco-amarillentas hoja y abullonamiento	Balboa (BA)	juli-91	
62	IBA-7	pim(Aranjuez)	-			hoja mate y nervios hacia afuera	Balboa (BA)	juli-91	
63	IBA-8	pim(Aranjuez)	-			hoja mate y nervios hacia afuera y def de hoja	Balboa (BA)	juli-91	
64	IBA-9	pim(Aranjuez)	+			anillos y necrosis alrededor nervios	Balboa (BA)	juli-91	
65	IBA-10	pim Yolo Wonder	-			anillos, necrosis alrededor nervios y hoja mate	Balboa (BA)	juli-91	
66	IBA-11	pim Yolo Wonder	+			arabescos y necrosis flor	Balboa (BA)	juli-91	PVY
67	IBA-12	pim Yolo Wonder	+		DTL	mosaico y necrosis flor	Balboa (BA)	juli-91	PVY
68	IBA-13	pim Yolo Wonder	+			mosaico y abullonado	Balboa (BA)	juli-91	PVY
69	IBA-14	pim Yolo Wonder	+		ToRS+DTL	mosaico y abullonado	Balboa (BA)	juli-91	IPVY
70	IBA-15	pim Yolo Wonder	-			mosaico y abullonado	Balboa (BA)	juli-91	
71	IBA-16	pim¿Aranjuez?	-		DTL	hoja mate, fruto abullonado	Balboa (BA)	juli-91	
72	IBA-17	pim¿Aranjuez?	++		DTL	punteado	Balboa (BA)	juli-91	PVY
73	IBA-18	pim¿Aranjuez?	+		DTL	mosaico y necrosis de vena	Balboa (BA)	juli-91	PVY
74	IBA-19	pim¿Aranjuez?	-			Vein banding muy acusado	Balboa (BA)	juli-91	
75	IBA-20	pim Yolo Wonder	-		DTL	mosaico fuerte y bandeado de venas	Balboa (BA)	juli-91	PVY
76	IBA-21	pim Yolo Wonder	-		DTL?	mosaico fuerte y bandeado de venas	Balboa (BA)	juli-91	IPVY
77	IBA-22	pim Yolo Wonder	+		ToRS+DTL	mosaico fuerte y bandeado de venas	Balboa (BA)	juli-91	PVY
78	IBA-23	pimiento	-			hoja deformada	Balboa (BA)	juli-91	

MUESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
79	IBA-24	pimiento	-			comienzo mosaico, flores necróticas	Balboa (BA)	juli-91	
80	IBA-25	pimiento	-			abullonado y nervios marcados	Balboa (BA)	juli-91	
81	IBA-26	pimiento	-			abullonado y nervios marcados	Balboa (BA)	juli-91	
82	IBA-27	pim(Aranjuez)	-		DTL	mosaico	Guadiana del Caudillo (BA)	juli-91	
83	IBA-28	pim(Aranjuez)	-			mosaico	Guadiana del Caudillo (BA)	juli-91	
84	IBA-29	pim(Aranjuez)	-			mosaico	Guadiana del Caudillo (BA)	juli-91	
85	IBA-30	pim(Aranjuez)	-			hoja mate, anillos	Guadiana del Caudillo (BA)	juli-91	
86	IBA-31	pim(Aranjuez)	-			Planta achaparrada	Guadiana del Caudillo (BA)	juli-91	
87	IBA-32	pim(Aranjuez)	+			abullonado y mosaico	Guadiana del Caudillo (BA)	juli-91	
88	IBA-33	pim(Aranjuez)	-			Mosaico muy fuerte	Guadiana del Caudillo (BA)	juli-91	
89	IBA-34	pimiento	-		DTL?	hoja mate	Guadiana del Caudillo (BA)	juli-91	
90	IBA-35 A	pimiento	-			nervios hacia fuera	Valdelagalzada (BA)	juli-91	
91	IBA-36 A	pimiento	-			mosaico	Valdelagalzada (BA)	juli-91	
92	IBA-37 A	pimiento	-			mosaico	Valdelagalzada (BA)	juli-91	
93	IBA-38 A	¿tolerante CMV?	-		DTL?	mosaico	Valdelagalzada (BA)	juli-91	
94	IBA-39 B	pimiento	++	+	ToRS	mosaico	Valdelagalzada (BA)	juli-91	
95	IBA-40 B	pimiento	-			mosaico	Valdelagalzada (BA)	juli-91	
96	IBA-41 B	pimiento	-			mosaico	Valdelagalzada (BA)	juli-91	
97	IBA-42 B	pimiento	-		ToRS+DTU	mosaico	Valdelagalzada (BA)	juli-91	
98	IBA-43 a	pimiento hoja	++			Mosaico,deformación,abullonamiento,necrosis vena	Balboa (BA)	sept,91	
99	IBA-43 b	pimiento fruto	++			Mosaico,deformación,abullonamiento,necrosis vena	Balboa (BA)	sept,91	
100	IBA-44	alfalfa	-			mosaico	Balboa (BA)	sept,91	
101	IBA-45	tomate	-			Deformación,abarquillado hacia abajo, ligero mosaico, coriáceo	Balboa (BA)	sept,91	
102	IBA-46	tomate	-			Deformación,abarquillado hacia abajo, ligero mos, coriáceo y necrosis	Balboa (BA)	sept,91	
103	IBA-47 a	tomate Ohio hoja	-			mosaico, abullonamiento	Balboa (BA)	sept,91	
104	IBA-48 b	tomate Ohio fruto	-			mosaico, abullonamiento	Balboa (BA)	sept,91	
105	IBA-49	tomate	-			M, necrosis	Balboa (BA)	sept,91	
106	IBA-50	tomate	-			Mosaico ligero, abarquillado hacia abajo, algo necrosis	Balboa (BA)	sept,91	
107	ICC-1	pimiento	-			mosaico	Plasencia-Coria (CC)	juli-91	
108	ICC-2	pimiento	-			mosaico	Plasencia-Coria (CC)	juli-91	
109	ICC-3	pimiento	-			mosaico	Plasencia-Coria (CC)	juli-91	
110	ICS-1	pimiento	+		DTL	deformación hojas	Benicarló (CS)	juli-91	
111	ICS-2	pimiento	+		DTL	deformación hojas	Benicarló (CS)	juli-91	
112	ICO	15 muestras garbanzo	-			necrosis apical, mosaico, amarilleamiento	finca ETSIA (CO)	may,91	BWVY
113	ICO-1	tomate	++	++		necrosis	CO (enviada por A. Trapero)	ener-90	
114	IJU	4 muestras yero	-			mosaico, enrojecimiento en las hojas, clorosis	EI Encín, Ledanca (GU)	juni-90	
115	ILE	42 muestras judía	-			mosaico, enaciones, deformación foliar	ILE	juli-91	BCMV
116	ILE-1	pimiento	-			ligerísimo mosaico	Valle Oteros (LE)	juli-91	
117	ILE-2	tomate	-			mosaico	Valle Oteros (LE)	juli-91	

CMV 1:ELISA con policlonales Sanofi, CMV 2:ELISA con policlonales Agdia, CMV 3:ELISA con Monoclonales Sanofi; inv: Invernadero

MUESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
118	LE-J-55	Judía Canellini	+			Mosaico común, enaciones	Corbillas de los Oteros (LE)	juli-91	BCMV
119	LE-J-57	Judía Canellini	+			Deform foliar, enaciones, Mosaico común	Corbillas de los Oteros (LE)	juli-91	BCMV
120	LE-J-61	Judía AH-22	+			Borde rizado, arrugamiento uniforme	Sta. María del Páramo (LE)	juli-91	BCMV
121	LO-1	Pimiento Pico	++	+		Clorosis y enanismo	CRIA La Rioja	ago,90	PVY
122	LO-2	Pimiento Pico	-	-		Clorosis en hojas nuevas	CRIA La Rioja	ago,90	
123	LO-3	Pimiento Pico	-	-		Clorosis y mosaico	CRIA La Rioja	ago,90	
124	LO-4	Pimiento Pico	-	-		Mosaico	CRIA La Rioja	ago,90	
125	LO-5	Pimiento Pico	-	-		Mosaico y abullonamiento	CRIA La Rioja	ago,90	
126	LO-7	Pimiento Pico	-	-		Rizado de hoja y amarilleo	CRIA La Rioja	ago,90	
127	LO-8	Pimiento Pico	-	-		Brotos foliares transformados en hojas	CRIA La Rioja	ago,90	
128	LO-9	Pimiento Pico	-	-		Brotos foliares transformados en hojas	CRIA La Rioja	ago,90	
129	LO-11	Pimiento Cristal	-	-		Brotos quemados.Necrosis.(síntomas de hongos)	CRIA La Rioja	ago,90	
130	LO-12	Pimiento Cristal	-	-		Rizamiento y amarilleo	CRIA La Rioja	ago,90	
131	LO-13	Pimiento Cristal	-	-		Amarilleo y brotes quemados(posible Verticillium)	CRIA La Rioja	ago,90	
132	LO-15	Pimiento Cristal	-	-		Abarquillado y amarilleo	CRIA La Rioja	ago,90	
133	LO-16	Pimiento Najerano	-	-		Abarquillado y mosaico	CRIA La Rioja	ago,90	
134	LO-17	Pimiento Najerano	-	-		Clorosis de hoja y fruto negro(síntoma de frío)	CRIA La Rioja	ago,90	
135	LO-18	Pimiento Najerano	-	-		Clorosis y veing banding	CRIA La Rioja	ago,90	
136	LO-19	Pimiento Najerano	-	-		Frutos unidos y abarquillamiento	CRIA La Rioja	ago,90	
137	LO-20	Pimiento Najerano	-	-		Clorosis	CRIA La Rioja	ago,90	
138	LO-22	Pimiento Guindilla	-	-		Clorosis.Necrosis de fruto	Tirgo (LO)	ago,90	
139	LO-23	Pimiento Guindilla	+	-		Mosaico y grabado	Tirgo (LO)	ago,90	
140	LO-24	Pimiento Bilbao	-	-		Mosaico y grabado	Tirgo (LO)	ago,90	
141	LO-25	Pimiento Bilbao	-	-		Mosaico.Hoja abarquillada	Tirgo (LO)	ago,90	
142	LO-26	Pimiento Bilbao	-	-		Mosaico.Hoja abarquillada.Fruto deformado	Tirgo (LO)	ago,90	
143	LO-27	Pimiento Bilbao	++	-		Clorosis y mosaico.Fruto deformado	Tirgo (LO)	ago,90	
144	LO-28	Pimiento Bilbao	+	-		Clorosis y mosaico.Fruto deformado	Tirgo (LO)	ago,90	
145	LO-29	Pim. Cuernocabra	-	+		Mosaicos y arabescos.Frutos deformados	Tirgo (LO)	ago,90	
146	LO-30 a	Pim.Cuernocabra(hoja)	-	-		Mosaicos y arabescos.Frutos deformados	Tirgo (LO)	ago,90	
147	LO-30 b	Pim.Cuernocabra(fruto)	++	+		Mosaicos y arabescos.Frutos deformados	Tirgo (LO)	ago,90	
148	LO-31	Pim. Gilda(Guindilla)	+	-		Amarilleo y mosaico	Tirgo (LO)	ago,90	
149	LO-32	Pim. Morro vaca	-	-		Mosaico tipo TMV	Tirgo (LO)	ago,90	
150	LO-33	Pim. Morro vaca	-	-		Mosaico tipo TMV	Tirgo (LO)	ago,90	
151	LO-34	Pim. Morro vaca	-	-		Necrosis	Tirgo (LO)	ago,90	
152	LO-35	Pim. Guindilla	-	-		Mosaico	Tirgo (LO)	ago,90	
153	LO-36	Pim. Guindilla	-	-		Mosaico	Tirgo (LO)	ago,90	
154	LO-38	Pim. Guindilla	-	-		Mosaico	Tirgo (LO)	ago,90	
155	LO-39	Pim. Guindilla	-	-		Necrosis de vena y hojas sin turgencia	Tirgo (LO)	ago,90	
156	LO-40	Borraja "super"	+		ToRS	Filiforme,enanismo,mosaico leve	CRIA La Rioja	abri-91	

MUESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
157	LO-41	Borraja 144	-			amarilleo	CRIA La Rioja	abri-91	
158	LO-42	Borraja 133	-			mosaico	CRIA La Rioja	abri-91	
159	LO-43	Borraja 178	-			filiforme	CRIA La Rioja	abri-91	
160	LO-44	Borraja 188	-			mosaico suave	CRIA La Rioja	abri-91	
161	LO-45	Borraja 189	-			mosaico	CRIA La Rioja	abri-91	
162	LO-46	Pim Pico	-			Mosaico y arrugamiento de fruto	CRIA La Rioja	octu-91	
163	LO-47	Pim Pico	-			mosaico	CRIA La Rioja	octu-91	
164	LO-48	Pim Pico	-			filimorfismo, necrosis de vena	CRIA La Rioja	octu-91	
165	LO-49	Pim Pico	-			Mosaico suave	CRIA La Rioja	octu-91	
166	LO-50	Pim Pico	-			Filimorfismo, clorosis apical	CRIA La Rioja	octu-91	
167	LO-51	Pim Pico	-			Necrosis vena, clorosis apical	CRIA La Rioja	octu-91	
168	LO-52	Pim Pico	-			mosaico	CRIA La Rioja	octu-91	
169	LO-53	Pim Pico	-			clorosis y enanismo	CRIA La Rioja	octu-91	
170	LO-54	Pim Anga 100	++		ToRS	mosaico	CRIA La Rioja	octu-91	
171	LO-55	Pim Anga 104	+		ToRS	Arabesco	CRIA La Rioja	octu-91	
172	LO-56	Pim Anga 116	+		ToRS	mosaico	CRIA La Rioja	octu-91	
173	LO-57	Pim Anga 116	-			Enanismo	CRIA La Rioja	octu-91	
174	LO-58	Pim Santo Domingo	-			Deformación, Mosaico	CRIA La Rioja	octu-91	
175	LO-59	Pim Santo Domingo	+		ToRS	Planta enana	CRIA La Rioja	octu-91	
176	LO-60	Pim siembra directa	++			Mosaico ligero	CRIA La Rioja	octu-91	
177	LO-61	Pim Najerano	-			Deform hoja	CRIA La Rioja	octu-91	
178	LO-62	Pim Najerano	-			Filimorfismo	CRIA La Rioja	octu-91	
179	LO-63	Pim Najerano	-			Hojas abarquilladas, Clorosis	CRIA La Rioja	octu-91	
180	LO-64	Pim Najerano	-			Clorosis,deformación de hoja,Mosaico	CRIA La Rioja	octu-91	
181	LO-65	Pim Najerano	-			Clorosis,deformación de hoja,Mosaico	CRIA La Rioja	octu-91	
182	M-1	calabacín	+	-		Mosaico, enaciones, frutos deformes	Villa del Prado (M)	juli-90	
183	M-2	pimiento	+	-	DTL	Mosaico, arabescos	Villa del Prado (M)	juli-90	
184	M-3	pepino inv	-	-		Mosaico,abullonamiento, verrugas	Villa del Prado (M)	juli-90	
185	M-4	calabacín(inv)	-	-		hojas con manchas amarillas y necrosis	Villa del Prado (M)	juli-90	
186	M-5	tomate invernadero	-	-		Mosaico, algún punto necrótico	Villa del Prado (M)	juli-90	
187	M-6 a	pimiento inv	-	-		leve Mosaico, achaparramiento	Villa del Prado (M)	juli-90	
188	M-6 b	pimiento inv	-	-		hojas raras con 2 tonos de color	Villa del Prado (M)	juli-90	
189	M-7	pepino inv	-	+		hojas medias con nervios claros y abullon	Villa del Prado (M)	juli-90	
190	M-8	pimiento inv	-	-		hojas jóvenes abullonadas	Villa del Prado (M)	juli-90	
191	M-9	tomate	-	+		Mosaico verde-amarillo, necrosis	Villa del Prado (M)	juli-90	
192	M-10	patata	-	-		escarabajo, amarilleamiento	Villa del Prado (M)	juli-90	
193	M-11	calabacín(var nº5)	-	-		mosaico hojas jóvenes, hojas vueltas	Villa del Prado (M)	juli-90	
194	M-12	calabacín(var nº3)	-	-		mosaico hojas jóvenes, hojas vueltas	Villa del Prado (M)	juli-90	
195	M-13	calabacín(var nº1)	++	-		mosaico hojas jóvenes, hojas vueltas	Villa del Prado (M)	juli-90	

MUESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
196	M-14	calabacín(var nº4)	+	-		mosaico hojas jóvenes, hojas vueltas	Villa del Prado (M)	juli-90	
197	M-15	calabacín(var nº2)	+	+		mosaico hojas jóvenes, hojas vueltas	Villa del Prado (M)	juli-90	
198	M-16	tomate invernadero	-	-		Mosaico, algo de necrosis	Villa del Prado (M)	juli-90	
199	M-17	pepino inv 2ª cosecha	-	-		Mosaico verde claro-verde oscuro	Villa del Prado (M)	sept-90	
200	M-18	pepino inv	-	+		mosaico, abullonamiento	Villa del Prado (M)	sept-90	
201	M-19	acelga	+	-		Mosaico	Villa del Prado (M)	sept-90	
202	M-20	col aire libre	-			Amarilleamiento venas, hojas roble, Mosaico amarillo	Villa del Prado (M)	novi-90	
203	M-21	acelga inv.	-			Mosaico amarillo	Villa del Prado (M)	novi-90	
204	M-22	pimiento	-			mosaico	Aranjuez (M)	#####	
205	M-23	pimiento	+			mosaico	Aranjuez (M)	#####	
206	M-24	pimiento(hoja+fruto)	+			mosaico	Aranjuez (M)	#####	
207	M-25	pimiento(hoja+fruto)	+			mosaico	Aranjuez (M)	#####	
208	M-26	pimiento(hoja+fruto)	++			mosaico	Aranjuez (M)	#####	
209	M-27(58)	pimiento(hoja+fruto)	-			mosaico	Aranjuez (M)	#####	
210	M-28 a	pimiento hoja	-		DTL?	Mosaico, nervios encogidos, abullonamiento ligero	Aranjuez (M)	#####	
211	M-28 b	pimiento fruto	-			planta decaída, síntomas de hongos	Aranjuez (M)	#####	
212	M-29 a	pimiento hoja	+		DTL	Mosaico, nervios encogidos, arabescos	Aranjuez (M)	#####	
213	M-29 b	pimiento fruto	+			planta decaída, síntomas de hongos	Aranjuez (M)	#####	
214	M-30 a	pimiento hoja	-		DTL	Mosaico, nervios encogidos, arabescos, abullonamiento ligero	Aranjuez (M)	#####	
215	M-30 b	pimiento fruto	++			Mosaico, nervios encogidos, arabescos, abullonamiento ligero	Aranjuez (M)	#####	
216	M-31	melón	++		DTL	Mosaico, campo con clorosis y medio abandonado	Aranjuez (M)	#####	
217	M-J-10	Judía Garrafal oro	+	+		Mosaico, abullonamiento, clareamiento de venas, todo el campo infe	Villa del Prado (M)	sept-90	BYMV
218	M-J-11	Judía Garrafal oro	-	-		mosaico, abullonamiento	Villa del Prado (M)	sept-90	
219	M-J-12	Judía Garrafal oro	-	-		Mosaico, abullonamiento, clareamiento de venas, fruto no cuaja	Villa del Prado (M)	sept-90	
220	M-J-13	Judía Garrafal oro	-	-		Mosaico, bandeado de venas, hoja vuelta hacia dentro	Villa del Prado (M)	sept-90	
221	M-J-14	Judía Garrafal oro	+	+		Mosaico verde-amarillento, se acaba secando la planta	Villa del Prado (M)	sept-90	
222	M-J-15	Judía Garrafal oro	+	+		Mosaico, abullonamiento	Villa del Prado (M)	sept-90	
223	M-J-16	Judía Garrafal oro	-	-		amarilleamiento, mal estado general	Villa del Prado (M)	sept-90	
224	M-J-17	Judía Garrafal oro	-	-		ptos amarillos y ligero mosaico	Villa del Prado (M) inv	novi-90	
225	M-J-18	Judía Garrafal oro	++	+		Mosaico amarillo y mosaico suave	Villa del Prado (M) inv	novi-90	
226	M-J-19	Judía Garrafal oro	-			ptos amarillos mosaico verde y amarillo	Villa del Prado (M) inv	novi-90	
227	M-J-20	Judía Garrafal oro	++		DTL	planta y hojas en mal estado	Villa del Prado (M)	novi-90	
228	M-J-21	Judía Garrafal oro	++		DTL	planta y hojas en mal estado	Villa del Prado (M)	novi-90	
229	M-J-22	Judía Garrafal oro	-			Mosaico amarillo	Villa del Prado (M)	novi-90	
230	M-J-23	Judía Garrafal oro	-			Mosaico, puntos amarillos	Villa del Prado (M)	novi-90	
231	M-J-24	Judía Garrafal oro	-			Mosaico, amarilleamiento suave, abullonamiento en hoja	Villa del Prado (M)	novi-90	
232	MU-1	Pimiento CB-30	-			Manchas necróticas	T. Pacheco. C. Cartagena(MU)	sept-91	
233	MU-2	Pimiento CB-30	+			Manchas necróticas. Brotes necrosados.	T. Pacheco. C. Cartagena(MU)	sept-91	
234	MU-3	Pimiento CB-30	-			Manchas necróticas	T. Pacheco. C. Cartagena(MU)	sept-91	

MUESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
235	MU-4	Pimiento CB-30	-			Manchas necróticas			
236	MU-5	Pimiento 95-2	-			Manchas necróticas	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
237	MU-6	Pimiento 95-2	+			Manchas necróticas	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
238	MU-7	Pimiento Yolo Wonder	+			Brotos necrosados. Hojas pequeñas en mal estado	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
239	MU-8	Pimiento 95-2	-			Brotos necrosados. Hojas pequeñas en mal estado	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
240	MU-9	Pimiento 98-4	-			Más cuajado de frutos que el resto de las plantas	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
241	MU-10	Pimiento 98-4	+			Más cuajado de frutos que el resto de las plantas	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
242	MU-11	Pimiento 98-4	-			Más cuajado de frutos que el resto de las plantas	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
243	MU-12	Pimiento 82-1	-			Planta enana	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
244	MU-13	Pimiento 82-1	+		DTL	Planta necrosada	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
245	MU-14	Pimiento 82-1	-			Planta necrosada	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
246	MU-15	Pimiento 82-1	-			Planta necrosada	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
247	MU-16	Pimiento 82-1	-			Planta necrosada	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
248	MU-17	Pimiento CB-30	+			Aspecto general mejor que el resto	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
249	MU-18	Pimiento CB-30	-			Aspecto general mejor que el resto	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
250	MU-19	Pimiento CB-30	-			Aspecto general mejor que el resto	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
251	MU-20	Pimiento CB-30	+			Aspecto general mejor que el resto	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
252	MU-21	Pimiento 95-2	-			Planta necrosada.	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
253	MU-22	Pimiento 95-2	+			Planta necrosada.	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
254	MU-23	Pimiento 95-2	-			Mal estado general. Hojas cloróticas	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
255	MU-24	Pimiento 95-2	+			Hojas cloróticas	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
256	MU-25	Pimiento 82-1	-			Planta y brotes necrosados	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
257	MU-26	Pimiento 82-1	-			Planta y brotes necrosados	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
258	MU-27	Pimiento 82-1	+			Planta y brotes necrosados	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
259	MU-28	Pimiento 82-1	-			Planta y brotes necrosados	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
260	MU-29	Pimiento CB-30	+			Algo de clorosis	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
261	MU-30	Pimiento CB-30	+			Algo de clorosis	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
262	MU-31	Pimiento CB-30	+			Algo de clorosis	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
263	MU-32	Pimiento CB-30	+			Algo de clorosis	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
264	MU-33	Pimiento 82-1	+			Algo de clorosis	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
265	MU-34	Pimiento 82-1	-			Algo de clorosis	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
266	MU-35	Pimiento 82-1	-			Algo de clorosis	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
267	MU-36	Pimiento mulato	+			Mosaico, filimorfismo en hojas jóvenes	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
268	MU-37	Pimiento mulato	+			Mosaico, filimorfismo en hojas jóvenes	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
269	MU-38	Pimiento mulato	+			Mosaico, filimorfismo en hojas jóvenes	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
270	MU-39	Pimiento sete-1	-			Mosaico, filimorfismo en hojas jóvenes	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
271	MU-40	Pimiento sete-2	-			Mosaico, filimorfismo en hojas jóvenes	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
272	MU-41	Pimiento sete-3	+			Mosaico, filimorfismo en hojas jóvenes	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
273	MU-42	Pimiento M-2	-			Mosaico, filimorfismo en hojas jóvenes	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		

MUESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
274	MU-43	Pim AMA-8(híbrido)	+			Mosaico, filimorfismo en hojas jóvenes	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
275	MU-44	Pim P-53(inv)	-			mosaico, abullonamiento	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91 PVY		
276	MU-45	Pim P-53(inv)	-			mosaico, abullonamiento	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
277	MU-46	Pim P-43(inv)	+			mosaico, abullonamiento	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91 PVY		
278	MU-47	Pim P-41(inv)	-			mosaico, abullonamiento	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91 PVY		
279	MU-48	Pimiento (inv)	-			Necrosis de vena	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
280	MU-49	Pimiento (inv)	-			mosaico, abullonamiento	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
281	MU-50	Pimiento (inv)	-			mosaico, abullonamiento	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
282	MU-51	Pim tricolor (inv)	-			mosaico, abullonamiento	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
283	MU-52	Pimiento (inv)	-			mosaico, abullonamiento	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
284	MU-53	Pimiento (inv)	+			mosaico, abullonamiento	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91 PVY		
285	MU-54	Pim Negral	-			abullonado	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
286	MU-55	Pim Negral	+			clorosis y necrosis apical	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91 PVY		
287	MU-56	Pim Negral	-			filimorfismo, hoja mate	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
288	MU-57	Pim Negral	-			clareado de venas	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
289	MU-58	Pim Negral	+			necrosis apical	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
290	MU-59	Pim Americano	+			Mosaico	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
291	MU-60	Pim Americano	-			Mosaico	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
292	MU-61	Pim Americano	+			Mosaico	T. Pacheco. C. Cartagena(MU sept-91		
293	NA-1	Pim Alamo	-	-		Manchas amarillas (AMV)	Cadreita (NA)	octu-90	
294	NA-3	Pim Piquillo	-	-		Abarquillado	Cadreita (NA)	octu-90	
295	NA-5	Pim Piguano	-	-		Abarquillado	Cadreita (NA)	octu-90	
296	NA-6	Pim Yolo Wonder	-	-		Necrosis y mosaico	Cadreita (NA)	octu-90 PVY	
297	NA-7	Pim Yolo Wonder	-	-		AMV y necrosis	Cadreita (NA)	octu-90	
298	NA-8	Pim Yolo Wonder	-	-		Moteado	Cadreita (NA)	octu-90 PVY	
299	NA-9	California Wonder	-	+		AMV	Cadreita (NA)	octu-90	
300	NA-10	California Wonder	-	-		Moteado	Cadreita (NA)	octu-90	
301	NA-12	Pim Yolo Wonder	-	-		Mosaico	Cadreita (NA)	octu-90	
302	NA-13	Pim Yolo Wonder	-	-		Mosaico	Cadreita (NA)	octu-90	
303	NA-14	Pim Yolo Wonder	-	-		Moteado	Cadreita (NA)	octu-90	
304	NA-15	Pim Yolo Wonder	-	-		Necrosis de vena	Cadreita (NA)	octu-90	
305	NA-16	Pim Pico	-	-		mosaico, hojas mates	Cadreita (NA)	octu-90	
306	NA-17	Pim Cleopatra	-	-		Moteado,necrosis(posible quemadura sol)	Cadreita (NA)	octu-90	
307	NA-18	Pim Piquillo	-	-		Necrosis (posible quemadura sol)	Cadreita (NA)	octu-90	
308	NA-19	Pim Piquillo	-	-		Mosaico	Cadreita (NA)	octu-90	
309	NA-20	Pim Piquillo	++	-		Mosaico	Cadreita (NA)	octu-90	
310	NA-21	Pim Piquillo	-	-		¿AMV?	Cadreita (NA)	octu-90	
311	NA-22	Pim Morrón	-	-		Necrosis	Falces (NA)	octu-90	
312	NA-23	Pim Morrón	++	-		Necrosis	Falces (NA)	octu-90	

MUESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
313	NA-24	Pim Morrón	-	-		Necrosis y moteado	Falces (NA)	octu-90	
314	NA-25	Pim Morrón	-	-		Mosaico	Falces (NA)	octu-90	
315	NA-26	Pim Pico (Cucón)	-	-		mosaico, hojas mates	Falces (NA)	octu-90	
316	NA-27	Pim Cristal	+	-		Mosaico	Falces (NA)	octu-90	PVY
317	NA-28	Pim Cristal	-	-		Mosaico	Falces (NA)	octu-90	
318	NA-29	Pim Pico	-	-		Moteado	Falces (NA)	octu-90	
319	NA-30	Pim Morrón	-	-		Mosaico	Falces (NA)	octu-90	
320	NA-31	Pim Morrón	-	-		Mosaico	Falces (NA)	octu-90	
321	NA-33	Pim Morrón	-	-		Moteado y algo de necrosis	Falces (NA)	octu-90	
322	NA-34	Pim Pico	-	-		Veing banding y moteado	Falces (NA)	octu-90	
323	NA-35	Pim Pico	-	-		mosaico, hojas mates	Falces (NA)	octu-90	
324	NA-36	Pim Morrón	-	-		mosaico, hojas mates	Falces (NA)	octu-90	
325	NA-37	Pim Morrón	-	-		mosaico, hojas mates	Falces (NA)	octu-90	
326	NA-38	Pim Cristal	-	-		Hojas quemadas	Falces (NA)	octu-90	
327	NA-39 A	Pim Najerano	+		DTL	Clorosis general	Cadreita (NA)	octu-91	
328	NA-40 A	Pim Najerano	+		DTL	Moteado	Cadreita (NA)	octu-91	
329	NA-41 A	Pim Najerano	+			Moteado	Cadreita (NA)	octu-91	
330	NA-42 A	Pim E-3 Coral	+			Filimorfismo	Cadreita (NA)	octu-91	
331	NA-43 A	Pim Borde Morrón	+		DTL	mosaico	Cadreita (NA)	octu-91	
332	NA-44 A	Pim Borde Morrón	+		DTL	mosaico	Cadreita (NA)	octu-91	
333	NA-45 A	Pim Borde Morrón	+		DTL	Moteado	Cadreita (NA)	octu-91	
334	NA-46 A	Pim Borde Morrón	-			Moteado	Cadreita (NA)	octu-91	
335	NA-47 A	Pim	+			Moteado	Cadreita (NA)	octu-91	
336	NA-48 A	Pim Morrón Daniel	+			Mosaico, arrepollado	Cadreita (NA)	octu-91	
337	NA-49 A	Pim Morrón Daniel	++			Hojas plateadas	Cadreita (NA)	octu-91	
338	NA-50 A	Pim Piquillo	-			mosaico	Cadreita (NA)	octu-91	
339	NA-51 A	Pim Piquillo	-			mosaico	Cadreita (NA)	octu-91	
340	NA-52 A	Pim Piquillo	-			mosaico	Cadreita (NA)	octu-91	
341	NA-53 A	Pim Piquillo	+		DTL	mosaico	Cadreita (NA)	octu-91	
342	NA-54 B	Pim Piquillo Ca-17	+			Mosaico, arrepollado	Cadreita (NA)	octu-91	
343	NA-55 B	Pim Piquillo	++		DTL	Mosaico, filimorfismo	Cadreita (NA)	octu-91	
344	NA-56 B	Pim Piquillo	+			mosaico	Cadreita (NA)	octu-91	
345	NA-57 B	Pim Piquillo	+			Filimorfismo y abullonado	Cadreita (NA)	octu-91	
346	NA-58 B	Pim Pico	+		DTL	mosaico	Cadreita (NA)	octu-91	
347	NA-59 B	Pim Pico	++		DTL	Mosaico, filimorfismo	Cadreita (NA)	octu-91	
348	NA-60 B	Pim Pico	++			arabescos	Cadreita (NA)	octu-91	
349	NA-61 B	Pim Piquillo	+			Mosaico y moteado	Cadreita (NA)	octu-91	
350	NA-62 B	Pim Piquillo	+			Mosaico y moteado	Cadreita (NA)	octu-91	
351	NA-63 C	Pim de Bola	-			mosaico	Buñuel (NA)	octu-91	

MUESTRAS CAMPO

I	A	B	C	D	E	F	G	H	I
352	NA-64 C	Pim de Bola	++		DTL	mosaico	Buñuel (NA)	octu-91	
353	NA-65 C	Pim de Bola	-			hoja mate, mosaico	Buñuel (NA)	octu-91	
354	NA-66 C	Pim de Bola	-			hoja mate, mosaico	Buñuel (NA)	octu-91	
355	NA-67 C	Pim de Bola	-			hoja mate, mosaico	Buñuel (NA)	octu-91	
356	NA-68 C	Pim de Bola	+			hoja mate, mosaico	Buñuel (NA)	octu-91	
357	NA-69 C	Pim de Bola	-			hoja mate, mosaico	Buñuel (NA)	octu-91	
358	NA-70 D	Pim de Bola	-			mosaico y abullonado	Buñuel (NA)	octu-91	
359	NA-71 D	Pim de Bola	-			Hojas en odre	Buñuel (NA)	octu-91	
360	NA-72 D	Pim de Bola	-			Mosaico, filimorfismo	Buñuel (NA)	octu-91	
361	NA-73 D	Pim de Bola	++		DTL	Mosaico, filimorfismo	Buñuel (NA)	octu-91	
362	NA-74 D	Pim de Bola	+		DTL	Mosaico, filimorfismo	Buñuel (NA)	octu-91	
363	NA-75 D	Pim de Bola	++		DTL	Mosaico, filimorfismo	Buñuel (NA)	octu-91	
364	NA-76 D	Pim de Bola	-			Clorosis, mosaico	Buñuel (NA)	octu-91	
365	NA-77 D	Pim de Bola	-			Clorosis, mosaico	Buñuel (NA)	octu-91	
366	NA-78 D	Pim de Bola	++		DTL	Vein Banding	Buñuel (NA)	octu-91	
367	PA-J-68	judía	-			mosaico, abullonamiento	Palencia	juli-91	
368	PO-1 A	Tomate inv	+			mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	
369	PO-2 A	Tomate	+			Mosaico amarillo, abullonamiento, necrosis	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	
370	PO-3 B	Pimiento Padrón inv	-			mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
371	PO-4 B	Pimiento Padrón inv	-			mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
372	PO-5 B	Pimiento Padrón inv	-			mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
373	PO-6 B	Pim tipo Lamuyo	++		ToRS	Mosaico ligero	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
374	PO-7 B	Brassica berza	-			Mosaico ligero	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
375	PO-8 C	Pimiento Padrón inv	-			Mosaico amarillo fuerte, arabescos, ¿AMV?	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	
376	PO-9 C	Pimiento Padrón inv	-			mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	
377	PO-10 C	malva hierba	-			mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	
378	PO-11 C	Pimiento Padrón inv	-			seca y mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	
379	PO-12 C	Pimiento Padrón inv	++		ToRS	filodia	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	
380	PO-13 D	Pimiento Padrón inv	++		ToRS	Mosaico, moteado, filodia, leve abullonamiento	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
381	PO-14 D	Pimiento Padrón inv	-			moteado	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
382	PO-15 D	Pimiento Padrón inv	-			mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
383	PO-16 E	Tomate	-			mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
384	PO-17 E	Tomate	-			mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	
385	PO-18 E	Pim Padrón	++		ToRS	Mosaico, filodia, nervios arriba	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
386	PO-19 E	Pim Padrón	++		ToRS	Mosaico, brotes necrosados	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
387	PO-20 E	Pim Padrón	-			bordes hacia afuera, abarquillada	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
388	PO-21 E	Pim Padrón	++		ToRS	mosaico	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
389	PO-22 E	Pim Padrón	-			supermoteado	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
390	PO-23 F	Pim tipo Lamuyo	++			Mosaico, abarquillado, mate, abullonamiento	S.A.T. Hortal-Cambados (PO)	sept-91	PVY

MUESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1391	PO-24 F	Pim tipo Lamuyo	++		ToRS	Mosaico, abarquillado, mate, abullonamiento	S.A.T. Horsal-Cambados (PO)	sept-91	PVY
1392	PO-25 F	Pim tipo Lamuyo	++		ToRS	Necrosis vena y brote	S.A.T. Horsal-Cambados (PO)	sept-91	
1393	PO-26 F	Pim tipo Lamuyo	++		ToRS	necrosis	S.A.T. Horsal-Cambados (PO)	sept-91	
1394	PO-27 F	Brassica (nabiza)	-			leve mosaico	S.A.T. Horsal-Cambados (PO)	sept-91	
1395	PO-28 F	maíz	-			Mosaico hoja	S.A.T. Horsal-Cambados (PO)	sept-91	
1396	PO-J-78	judía V-2	++			Mosaico oscuro en vena, deformación foliar	Misión Biológica, CSIC (PO)	sept-91	BCMV
1397	PO	32 muestras de judía	-			Mosaico común, deformación foliar, enaciones	Misión Biológica, CSIC (PO)	sept-91	
1398	SE-G-48	garbanzo Fardón	-			necrosis apical	SE(autopista Sevilla-Córdoba)	ma-91	BLRV
1399	SE-G-49	garbanzo Fardón	-			planta amarilla	SE(autopista Sevilla-Córdoba)	ma-91	Luteo
1400	SE-G-50	garbanzo	+			sin síntomas	SE(autopista Sevilla-Córdoba)	ma-91	BWVY
1401	ISO-J-69	judía	-			Mosaico, abullonamiento	Quintanarrubias (SO)	juli-91	BCMV
1402	ISO-2	pimiento	-			2 colores hoja(variegación)	Quintanarrubias (SO)	sept-91	
1403	T-1	melón Rochet	+	+		enaciones, mosaico, clorosis, frutos deformes, muerte planta	Amposta (T)	juni-90	poty
1404	T-2	mala hierba	-	-		sin síntomas	Amposta (T)	juni-90	
1405	T-3	melón Rochet	-	-		mosaico	Amposta (T)	juni-90	poty
1406	T-4	mala hierba	-	-		leve mosaico	Amposta (T)	juni-90	
1407	T-5	sandía	-	-		mosaico	Amposta (T)	juni-90	
1408	T-6	melón(piel de sapo)	+	-		mosaico verde oscuro alrededor de nervios	Amposta (T)	juni-90	
1409	T-7	tomate	-	-		mosaico suave	Amposta (T)	juni-90	poty
1410	T-8	pimiento	+	-		mosaico suave, filodia, raquitismo	Amposta (T)	juni-90	
1411	T-9	tomate	-	-		mosaico suave	Amposta (T)	juni-90	
1412	T-10	tomate	-	-		necrosis apical, ptos necróticos, necrosis hoja	Amposta (T)	juni-90	
1413	T-11	melón	+	+		mosaico	Amposta (T)	juni-90	
1414	T-12	tomate	-	-		mosaico	Amposta (T)	juni-90	poty
1415	T-13	lechuga	-	-		mosaico severo, planta subida	Amposta (T)	juni-90	poty
1416	T-14	apio	-	-		mosaico	Amposta (T)	juni-90	
1417	V-1	tomate	+	-		necrosis generalizada, muerte	Foyos (V)	juni-90	poty
1418	V-2	pimiento	-	-		mosaico severo	Foyos (V)	juni-90	
1419	V-3	lechuga	-	-		mosaico, planta subida	Foyos (V)	juni-90	
1420	V-4	mala hierba-Ch. quinoa	-	-		¿mosaico?	Foyos (V)	juni-90	
1421	V-5	pepino	-	-		mosaico hoja de roble	Foyos (V)	juni-90	ZMV?
1422	V-6	calabacín	-	++		mosaico, arrugamiento de hoja	Foyos (V)	juni-90	
1423	V-7	tomate	+	+		principio necrosis tallo y hojas	Foyos (V)	juni-90	
1424	V-8	berenjena	-	-		mosaico severo, necrosis	Foyos (V)	juni-90	
1425	V-9	melón	+	+		mosaico, aspecto general bueno	Foyos (V)	juni-90	
1426	V-10	tomate caña	-	+		mosaico levísimo	Foyos (V)	juni-90	
1427	V-11	pimiento	-	-		abullonamiento hojas, no filodia	Almusafes (V)	juni-90	poty
1428	V-12	tomate	-	-		necrosis hojas adultas, fruto bien	Almusafes (V)	juni-90	poty
1429	V-13	lechuga	-	-		mosaico, planta subida	Benifalló (V)	juni-90	poty

MJESTRAS CAMPO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
430	V-14	pimiento	-	-		mosaico severo, filodia	Benifalló (V)	juni-90	
431	V-15	melón	+	+		mosaico	Benifalló (V)	juni-90	
432	V-16	sandía	-	-		asintomática	Benifalló (V)	juni-90	
433	V-17	patata	-	-		ptos. necróticos en las hojas	Benifalló (V)	juni-90	poty
434	V-19	pimiento(89-II)	+			Mosaico tipo TMV	Pueblo Nuevo (V)	sept-90	
435	V-20	pimiento	+		DTL	mosaico	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	
436	V-21	pimiento tipo Lamuyo	-			necrosis en los brotes	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	
437	V-22	pimiento tipo Lamuyo	-			necrosis de vena	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
438	V-23	pimiento tipo Lamuyo	-			necrosis de vena	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
439	V-24	pimiento tipo Lamuyo	-			necrosis en los brotes	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
440	V-25	pim dulce italiano	+			venas salientes, mosaico	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
441	V-26	pim dulce italiano	-			abullonado, mosaico	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
442	V-27	pim dulce italiano	-			brotes necróticos, clorosis	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
443	V-28	pim dulce italiano	-			abullonamiento, necrosis	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
444	V-29	pim dulce italiano	+			bandeado de venas, necrosis de vena	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
445	V-30	pim dulce italiano	+			abullonado, necrosis	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
446	V-31	pim tipo Lamuyo	-			mosaico	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
447	V-32	pim tipo Lamuyo	-			Mosaico acusado, brotes necróticos	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
448	V-33	pim tipo Lamuyo	-			abullonamiento, mosaico, bandeado de venas	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
449	V-34	pim tipo Lamuyo	-			abullonamiento, mosaico, bandeado de venas	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
450	V-35	pim tipo Lamuyo	-			planta enana y compacta	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
451	V-36	pim tipo Lamuyo	-			mosaico	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
452	V-37	pim tipo Lamuyo	-			necrosis de vena	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
453	V-38	pim tipo Lamuyo	-			necrosis de vena	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
454	V-39	pim tipo Lamuyo	-			necrosis de vena	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
455	V-40	pim dulce italiano	-			Mosaico, necrosis de brotes	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
456	V-41	pim dulce italiano	-			Mosaico, necrosis de brotes	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
457	V-42	pim dulce italiano	-			Mosaico, necrosis de brotes	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
458	V-43	pim dulce italiano	-			mosaico, abullonamiento	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
459	V-44	pim dulce italiano	-			moteado	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
460	V-45	pim dulce italiano	-		ToRS?	abullonamiento, mosaico muy acusado	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
461	V-46	pim dulce italiano	-			hojas en odre	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
462	V-47	pim dulce italiano	-			brotes y manchas necróticas	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
463	V-48	pim dulce italiano	-			moteado	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
464	V-49	pim dulce italiano	-			Mosaico y amarilleo	Pueblo Nuevo (V)	sept-91	PVY
465	Z-1 a	Pimiento Infantes(hoja)	-	-		Hoja mate,punteado,fruto maduración irregular	SIA-Zaragoza	octu-90	
466	Z-1 b	Pimiento Infantes(fruto)	+	-		Hoja mate,punteado,fruto maduración irregular	SIA-Zaragoza	octu-90	
467	Z-2 a	Pimiento Infantes(hoja)	-	-		Hoja mate,punteado,fruto maduración irregular	SIA-Zaragoza	octu-90	
468	Z-2 b	Pimiento Infantes(fruto)	++	+		Hoja mate,punteado,fruto maduración irregular	SIA-Zaragoza	octu-90	

CMV 1:ELISA con policlonales Sanofi, CMV 2:ELISA con policlonales Agría, CMV 3:ELISA con Monoclonales Sanofi; inv: invernadero

MUESTRAS CAMPO

A	B	C	D	E	F	G	H	I
469	Z-3	Pimiento de freir	-	-		Hoja mate,punteado,fruto maduración irregular	SIA-Zaragoza	octu-90
470	Z-4	Pimiento de freir	-	-		Hoja mate,punteado,fruto maduración irregular	SIA-Zaragoza	octu-90
471	Z-5	C.frutescens(c-126)	+	+		Sintomas de BBWV y moteado	SIA-Zaragoza	octu-90
472	Z-6	C.chinense(c-152)	++	+	DTL	Sintomas de BBWV y moteado	SIA-Zaragoza	octu-90
473	Z-7	Melón	-	-		Mosaico	SIA-Zaragoza	octu-90
474	Z-8	Melón	++	-		Mosaico	SIA-Zaragoza	octu-90
475	Z-9	Melón	-	-		Mosaico	SIA-Zaragoza	octu-90
476	Z-10	IPim 2056	++			Mosaico	Montañana (Z)	octu-91
477	Z-11	IPim E 40	-			Mosaico, bandeado de venas	Montañana (Z)	octu-91
478	Z-12	IPim E 33?	+		DTL	Mosaico	Montañana (Z)	octu-91
479	Z-13	Datura(mala hierba)	++		DTL	abullonado	Montañana (Z)	octu-91
480	Z-14	IPim de bola E 29	++		DTL	Mosaico severo	Montañana (Z)	octu-91

## ANEXO II

Línea	Especie	Procedencia	Germinación	Trasplante	Inoculación	Síntomas	ELISA	Tierra	Reinoculación	ELISA2
ING-019-2-1	C. frutescens	Perú-Molina	2-91	10 pl	17 pl	16+	NR			
ING-025-1-2	C. frutescens	Perú-Molina	4-91	10 pl	10 pl	15+	2+			
ING-025-1-4	C. frutescens	Perú-Molina	2-91	10 pl	10 pl	10+	1+			
ING-025-5	C. annuum	Perú-Molina	1-92	8 pl	5 pl	15-	15-/5	4 pl	5-92	NR
ING-025-5 2	C. annuum	Perú-Molina	2-90	6 pl	5 pl	15-	NR	15 pl	4-4-90	NR
ING-025-5 2 autofec	C. annuum	Perú-Molina	10-90	20 pl	5 pl	1+	1+/5	2 pl		
ING-025-5 2 autofec (R)	C. annuum	Perú-Molina	1-92	56 pl	34 pl	6 +	8+/34	5 pl	5-92	NR
ING-027-5-2	C. spp.	Perú-Molina	2-91	10 pl	9 pl	9+	NR			
ING-030-2-2	C. chinense	Perú-Molina	2-90	4 pl	4 pl	3+	NR			
ING-030-2 3	C. chinense	Perú-Molina	2-90	3 pl	3 pl	3+	NR			
ING-030-2-4		Perú-Molina	2-90	9 pl	9 pl	7+	NR			
ING-030-2-5	C. chinense	Perú-Molina	2-90	7 pl	5 pl	3+	NR			
ING-031-1-2	C. chinense	Perú-Molina	2-90	4 pl	4 pl	2+	NR			
ING-031-1-5	C. chinense	Perú-Molina	2-90	3 pl	3 pl	2+	NR			
ING-031-1-1	C. chinense	Perú-Molina	4-91	8 pl	3 pl	2?	NR	2 pl	14-7-91	
ING-031-1-1(R)	C. chinense	Perú-Molina	3-92	44 pl	40 pl	9+	2+/2			
ING-031-3-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	4 pl	4 pl	4+	NR			
ING-031-3-3	C. chinense	Perú-Molina	2-90	5 pl	3 pl	2+	NR			
ING-031-3-4	C. chinense	Perú-Molina	2-90	3 pl	3 pl	2+	NR			
ING-033-5-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	6 pl	3+	NR			
ING-035-9-1	C. frutescens	Perú-Molina	4-91	10 pl	7 pl	4+,3?	NR			
ING-035-9-2	C. frutescens	Perú-Molina	4-91	20 pl	9 pl	4+	3+			
ING-038-4 (2)A	C. chinense	Perú-Molina	2-90	8 pl	4 pl	1+	NR			
ING-040-1 1CH	C. chinense	Perú-Molina	2-90	1 pl	1 pl	1+	NR			
ING-043-1 2CH	C. chinense	Perú-Molina	2-90	4 pl	3 pl	2+	NR			
ING-043-5-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	5 pl	5 pl	15+	NR			
ING-043-5-2	C. chinense	Perú-Molina	2-90	1 pl	1 pl	1+	NR			
ING-043-5-3	C. chinense	Perú-Molina	2-90	5 pl	4 pl	2+	NR			
ING-043-9-2	C. frutescens	Perú-Molina	2-91	10 pl	10 pl	10+	1+			
ING-044-1-1	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	5 pl	5 pl	15+	NR			
ING-044-1-2	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	4 pl	4 pl	4+	NR			
ING-044-1-2	C. frutescens	Perú-Molina	1-90	4 pl	3 pl	2+	NR			
ING-044-1-3	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	6 pl	5 pl	3+	NR			
ING-044-1-5	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	2 pl	2 pl	1+	NR			
ING-044-5-1	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	6 pl	5 pl	15+	NR			
ING-044-5-2	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	2 pl	2 pl	1+	NR			
ING-044-5-2	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	5 pl	5 pl	15+	NR			
ING-044-5-3	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	1 pl	1 pl	1+	NR			

R: repetición

Línea	Especie	Procedencia	Germinación	Trasplante	Inoculación	Síntomas	ELISA	Tierra	Reinoculación	ELISA2
ING-044-5-4	C. frutescens	Perú-Molina	1-90	6 pl	5 pl	4+	NR	1 pl	4-4-90	NR,nosínto
ING-044-5-4 autofec	C. frutescens	Perú-Molina	10-90	54 pl	46 pl	20+	4+/8	3 pl		
ING-044-5-4 autofec (R)	C. frutescens	Perú-Molina	1-91	51 pl	41 pl	24	NR			
ING-045-1-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	5 pl	2+	NR			
ING-045-1-3	C. chinense	Perú-Molina	2-90	3 pl	3 pl	3+	NR			
ING-045-1-3	C. chinense	Perú-Molina	2-90	2 pl	2 pl	1+	NR			
ING-045-1-4	C. chinense	Perú-Molina	2-90	5 pl	5 pl	5+	NR			
ING-045-1-5	C. chinense	Perú-Molina	2-90	2 pl	2 pl	1+	NR			
ING-045-1-5	C. chinense	Perú-Molina	2-91	10 pl	1 pl	?	1+			
ING-045-10-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	5 pl	5+	NR			
ING-045-10-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	5 pl	5 pl	4+	NR			
ING-045-10-2	C. chinense	Perú-Molina	2-90	4 pl	4 pl	1+	NR			
ING-045-3-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	4 pl	4 pl	3+	NR			
ING-045-3-2	C. chinense	Perú-Molina	1-90	5 pl	4 pl	1+	NR			
ING-045-3-3	C. chinense	Perú-Molina	1-90	5 pl	5 pl	5+	NR			
ING-045-3-4	C. chinense	Perú-Molina	2-90	4 pl	4 pl	1+	NR			
ING-045-3-5	C. chinense	Perú-Molina	1-90	4 pl	4 pl	4+	NR			
ING-045-4-3	C. chinense	Perú-Molina	2-90	3 pl	3 pl	3+	NR			
ING-045-4-2	C. chinense	Perú-Molina	1-90	6 pl	5 pl	5+	NR			
ING-045-4-3	C. chinense	Perú-Molina	2-90	7 pl	7 pl	7+	NR			
ING-045-4-4	C. chinense	Perú-Molina	2-90	3 pl	3 pl	2+	NR			
ING-045-4-5	C. chinense	Perú-Molina	1-90	6 pl	5 pl	5+	NR			
ING-045-9-1	C. chinense	Perú-Molina	1-90	7 pl	5 pl	4+	NR			
ING-045-9-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	7 pl	7 pl	11+	NR			
ING-047-1	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	6 pl	6 pl	6+	NR			
ING-047-1-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	6 pl	5+	NR			
ING-047-1-2	C. chinense	Perú-Molina	1-90	5 pl	3 pl	3+	NR			
ING-047-1-3	C. chinense	Perú-Molina	2-90	3 pl	2 pl	1+	NR			
ING-047-1-4	C. chinense	Perú-Molina	1-90	5 pl	5 pl	3+	NR			
ING-047-1-5	C. chinense	Perú-Molina	1-90	7 pl	6 pl	11+	NR			
ING-047-1-5	C. chinense	Perú-Molina	2-90	7 pl	7 pl	3+	NR			
ING-047-2-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	6 pl	5+	NR			
ING-047-2-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	7 pl	7 pl	3+	NR			
ING-047-2-2	C. chinense	Perú-Molina	1-90	5 pl	4 pl	2+	NR			
ING-047-2-2	C. chinense	Perú-Molina	2-90	5 pl	5 pl	4+	NR			
ING-047-4-1	C. chinense	Perú-Molina	3-90	7 pl	6 pl	6+	NR			
ING-047-4-2	C. chinense	Perú-Molina	3-90	6 pl	2 pl	2+	NR			
ING-047-4-3	C. chinense	Perú-Molina	3-90	10 pl	7 pl	6+	NR			

R: repetición

Línea	Especie	Procedencia	Germínación	Trasplante	Inoculación	Síntomas	ELISA	Tierra	Reinoculación	ELISA2
ING-047-4-3	C. chinense	Perú-Molina	3-90	15 pl	12 pl	2+	NR			
ING-047-4-4	C. chinense	Perú-Molina	2-90	17 pl	17 pl	1+	NR			
ING-047-4-5	C. chinense	Perú-Molina	2-90	16 pl	15 pl	4+	NR			
ING-047-4-5	C. chinense	Perú-Molina	2-90	17 pl	17 pl	3+	NR			
ING-047-6-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	14 pl	14 pl	2+	NR			
ING-047-6-2	C. chinense	Perú-Molina	2-90	16 pl	14 pl	2+	NR			
ING-047-6-3	C. chinense	Perú-Molina	2-90	15 pl	15 pl	4+	NR			
ING-048-6-1	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	14 pl	14 pl	1+	NR			
ING-048-6-2	C. frutescens	Perú-Molina	3-90	16 pl	11 pl	1+	NR			
ING-048-6-2	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	110 pl	110 pl	7+	NR			
ING-048-6-3	C. frutescens	Perú-Molina	2-90	15 pl	14 pl	2+	NR			
ING-048-6-4	C. frutescens	Perú-Molina	3-90	15 pl	14 pl	3+	NR			
ING-048-6-4	C. frutescens	Perú-Molina	3-90	13 pl	13 pl	3+	NR			
ING-048-6-4	C. frutescens	Perú-Molina	3-90	13 pl	13 pl	1+	NR			
ING-048-6-5	C. frutescens	Perú-Molina	3-90	14 pl	13 pl	3+	NR			
ING-048-6-5	C. frutescens	Perú-Molina	3-90	110 pl	16 pl	2+	NR			
ING-049-9-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	18	12 pl	2+	NR			
ING-049-9-4	C. chinense	Perú-Molina	3-90	115 pl	110 pl	4+	NR			
ING-049-9-4	C. chinense	Perú-Molina	3-90	17 pl	13 pl	1+ / 3	NR			
ING-053-9-4	C. chinense	Perú-Molina	3-90	15 pl	15 pl	4+	NR			
ING-13975	C. baccatum	Costa Rica (Catie)	10-90	110 pl	110 pl	5+	3+			
ING-15385	C. annuum	Costa Rica (Catie)	4-91	110 pl	18 pl	4+	3+			
ING-15422	C. annuum	Costa Rica (Catie)	6-90	110 pl	14 pl	3+	NR			
ING-15426	C. spp.	Costa Rica (Catie)	6-90	110 pl	16 pl	5+	NR			
ING-15432	C. annuum	Costa Rica (Catie)	8-90	110 pl	19 pl	8+	NR			
ING-15433	C. annuum	Costa Rica (Catie)	10-90	110 pl	14 pl	1+	1+ / 4			
ING-15440	C. annuum	Costa Rica (Catie)	6-90	110 pl	14 pl	3+	NR			
ING-15441	C. annuum	Costa Rica (Catie)	10-90	110 pl	18 pl	1?	8- / 8	18 pl	24-2-91	
ING-15444	C. spp.	Costa Rica (Catie)	10-90	116 pl	113 pl	-	1+ / 3			
ING-15444 (R)	C. spp.	Costa Rica (Catie)	17-91	116 pl	116 pl	3+	NR			
ING-15644	C. annuum	Costa Rica (Catie)	8-90	118 pl	118 pl	1+	NR	16 pl	26-11-90	16- / 6
ING-15644 (R)	C. spp.	Costa Rica (Catie)	17-91	113 pl	113 pl	-	1+ / 1			
ING-15646	C. annuum	Costa Rica (Catie)	8-90	116 pl	117 pl	5+	NR			
ING-15648	C. spp.	Costa Rica (Catie)	8-90, 2-91	120 pl	114 pl	8+	1+			
ING-15665	C. annuum	Costa Rica (Catie)	8-90	111 pl	119 pl	6+	NR			
ING-15913	C. spp.	Costa Rica (Catie)	8-90	118 pl	114 pl	2+	NR			
ING-15913 (R)	C. spp.	Costa Rica (Catie)	4-91	110 pl	110 pl	3+	NR			
ING-15913 (R)	C. spp.	Costa Rica (Catie)	3-92	140 pl	135 pl	-	1+ / 2			

R: repetición

Línea	Especie	Procedencia	Germinación	Trasplante	Inoculación	Síntomas	ELISA	Tierra	Reinoculación	ELISA2
ING-15928	C. spp.	Costa Rica (Catie)	10-90	10 pl	1 pl	-	1-/-1	1 pl	24-2-91	1-/-1
ING-15928 (R)	C. spp.	Costa Rica (Catie)	1-92	28 pl	20 pl	15+	15+/5			
ING-15938	C. annuum	Costa Rica (Catie)	6-90	6 pl	3 pl	3+	NR			
ING-15973	C. annuum	Costa Rica (Catie)	6-90	10 pl	2 pl	2+	NR			
ING-15976	C. annuum	Costa Rica (Catie)	10-90	10 pl	4 pl	2+	4-/4	4 pl	24-2-91	1-/4
ING-15976 (R)	C. annuum	Costa Rica (Catie)	3-92	59 pl	54 pl	2+	3+/3			
ING-16277	C. frutescens	Costa Rica (Catie)	6-90	9 pl	7 pl	2+	NR			
ING-16280	C. spp.	Costa Rica (Catie)	6-90	10 pl	2 pl	1+	NR			
ING-16300	C. spp.	Costa Rica (Catie)	8-90	9 pl	4 pl	3+	3+/4			
ING-16309	C. spp.	Costa Rica (Catie)	8-90	9 pl	3 pl	3+	NR			
ING-16511	C. annuum	Costa Rica (Catie)	6-90	10 pl	4 pl	-	NR	4 pl	9-9-90	NR
ING-16511(R)	C. spp.	Costa Rica (Catie)	1-92	10 pl	8 pl	3+	1+/1			
ING-16513	C. frutescens	Costa Rica (Catie)	6-90	10 pl	5 pl	3+	NR			
ING-16514	C. frutescens	Costa Rica (Catie)	6-90	10 pl	6 pl	4+	NR			
ING-16515	C. spp.	Costa Rica (Catie)	8-90	12 pl	10 pl	6+	NR			
ING-16520	C. annuum	Costa Rica (Catie)	6-90	6 pl	5 pl	2+	NR			
ING-16524	C. spp.	Costa Rica (Catie)	8-90	9 pl	4 pl	2+	NR			
ING-17257	C. annuum	Costa Rica (Catie)	10-90	10 pl	7 pl	4+	2+/7			
ING-17265	C. annuum	Costa Rica (Catie)	8-90	6 pl	3 pl	3+	NR			
ING-208-3-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	8 pl	6 pl	1+	NR			
ING-208-3-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	5 pl	2+	NR			
ING-208-3-4	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	6 pl	3+	NR			
ING-212-2-1	C. chinense	Perú-Molina	3-90	6 pl	6 pl	6+	NR			
ING-212-2-1	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	6 pl	1+	NR			
ING-212-2-2	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	3 pl	1+	NR			
ING-212-2-3	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	6 pl	1+	NR			
ING-212-2-4	C. chinense	Perú-Molina	3-90	14 pl	6 pl	2+	2+			
ING-212-2-4	C. chinense	Perú-Molina	2-90	6 pl	6 pl	5+	NR			
ING-212-2-5	C. chinense	Perú-Molina	2-90	7 pl	7 pl	3+	NR			
ING-212-2-7	C. chinense	Perú-Molina	3-90	6 pl	6 pl	6+	NR			
ING-212-3-1	C. chinense	Perú-Molina	3-90	12 pl	10 pl	8+	NR			
ING-212-3-2	C. chinense	Perú-Molina	3-90	14 pl	11 pl	10+	NR			
ING-212-3-5	C. chinense	Perú-Molina	3-90	13 pl	10 pl	10+	NR			
ING-212-4-1	C. chinense	Perú-Molina	3-90	14 pl	11 pl	11+	NR			
ING-218-8-4	C. chinense	Perú-Molina	2-91	10 pl	4 pl	4-	4+	4 pl		
ING-218-8-4 (R)	C. chinense	Perú-Molina	7-91	22 pl	16 pl	4+	2+/2			
ING-218-8-4 (R)	C. chinense	Perú-Molina	3-92	36 pl	23 pl	-	1+/3			
ING-222(1)-1	C. baccatum	Perú-Molina	10-90	10 pl	10 pl	3+	4+			

R: repelición

Línea	Especie	Procedencia	Germinación	Trasplante	Inoculación	Síntomas	ELISA	Tierra	Reinoculación	ELISA2
ING-223-9-3	C. frutescens	Perú-Molina	7-91	10 pl	2 pl	2+	NR			
ING-5414-1	C. chinense	Perú-Molina	7-91	10 pl	7 pl	7+	NR			
ING-6134	C. annuum	Costa Rica (Catie)	10-90	10 pl	6 pl	2+	2+/6			
ING-7133-5	C. annuum	Costa Rica (Catie)	4-91	8 pl	1 pl	1+	NR			
ING-7204	C. chinense	Costa Rica (Catie)	7-91	10 pl	2 pl	2+	1+/1			
ING-7428	C. pubescens	Costa Rica (Catie)	10-90	16 pl	1 pl	-	1-/1	1 pl	24-2-91	1-/1
ING-7428 (R)	C. pubescens	Costa Rica (Catie)	7-91	2 pl	2 pl	1+	1+			
ING-7908-3	C. annuum	Costa Rica (Catie)	4-91	9 pl	9 pl	1+,3?	1+			
ING-8395	C. annuum	Costa Rica (Catie)	7-91	10 pl	8 pl	2+	1+/1			
ING-8990	C. pubescens	Costa Rica (Catie)	10-90	10 pl	2 pl	-	2-/2	2 pl	24-2-91	2-/2
ING-8990 (R)	C. pubescens	Costa Rica (Catie)	1-92	10 pl	7 pl	-	2+/4			
ING-8990 (R)	C. pubescens	Costa Rica (Catie)	7-91	6 pl	6 pl	-	6-/6			
ING-9053-3	C. frutescens	Costa Rica (Catie)	4-91	10 pl	10 pl	3+	2+			
ING-9053-4	C. frutescens	Costa Rica (Catie)	4-91	10 pl	8 pl	2+,4?	1+			
ING-CB-19	C. annuum	Costa Rica (Catie)	10-90	10 pl	10 pl	3+	2+			
ING-CB-21-1	C. annuum	Costa Rica (Catie)	7-91	10 pl	6 pl	5+	NR			
ING-CB-25-1	C. baccatum	Costa Rica (Catie)	7-91	6 pl	6 pl	3+	NR			
ING-CB-29-1	C. baccatum	Costa Rica (Catie)	4-91	10 pl	8 pl	1+,5?	3+			

R: repetición