

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Caracterización molecular y desarrollo de métodos de diagnóstico del género *Fabavirus*. Evaluación del BTH como método de control

TESIS DOCTORAL

ROSA MAR FERRER GUAL
Ingeniera Agrónoma
2008

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Caracterización molecular y desarrollo de métodos de diagnóstico del género *Fabavirus*. Evaluación del BTH como método de control

Memoria presentada por Rosa Mar Ferrer Gual

Para optar al grado de Doctora Ingeniera Agrónoma

Vº Bº de los directores

Director:

Dr. Luis Rubio Miguélez

Director:

Dr. José Guerri Sirera

Director:

Pedro Moreno Gómez

Valencia, 2008

Parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en:

- Ferrer, R.M., Guerri, J., Luis-Arteaga, M.S., Moreno, P., Rubio, L. (2005). The complete sequence of a Spanish isolate of *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1) reveals a high variability and conserved motifs in the genus *Fabavirus*. *Archives of Virology*, **150**, 2109-2116.
- Ferrer, R.M., Luis-Arteaga, M., Guerri, J., Moreno, P., Rubio, L. Detection and identification of species of the genus *Fabavirus* by RT-PCR with a single pair of primers. (2007). *Journal of Virological Methods*, **144**, 156-160.
- Ferrer, R.M., Escriu, F., Luis-Arteaga, M., Guerri, J., Moreno, P., Rubio, L. New molecular methods for identification of *Broad bean wilt virus 1*. Aceptado en *Molecular and Cellular Probes*.

Y presentados en los congresos científicos:

- Ferrer, R.M., Luis-Arteaga, M., Moreno, P., Guerri, J., Rubio, L. Secuencia nucleotídica del *virus del marchitamiento del haba-1* (BBWV-1). VIII Congreso Nacional de Virología. Barcelona. Octubre, 2003.
- Ferrer, R.M., Luis-Arteaga, M., Moreno, P., Guerri, J., Rubio, L. Detección de aislados virales del género *Fabavirus* mediante RT-PCR con iniciadores conservados. XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Lloret de Mar (Gerona). Septiembre, 2004.
- Ferrer, R.M., Luis-Arteaga, M., Moreno, P., Guerri, J., Rubio, L. High genetic variation in plant viruses of the genus *Fabavirus*. XIII International Congress of Virology. San Francisco, CA, (EEUU). Julio, 2005.
- Ferrer, R.M., Luis-Arteaga, M., Moreno, P., Guerri, J., Rubio, L. Detección y diferenciación de especies del género *Fabavirus* mediante RT-PCR con un único par de primers conservados. XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Murcia. Septiembre, 2006.
- Ferrer, R.M., Luis-Arteaga, M., Moreno, P., Guerri, J., Rubio, L. Genetic structure and variation of *Broad bean wilt virus 1* in Spain. Third European Congress of Virology. Nüremberg (Alemania). Septiembre, 2007.

A mis padres

Resumen

Caracterización molecular y desarrollo de métodos de diagnóstico del género *Fabavirus*. Evaluación de BTH como método de control.

El género *Fabavirus* pertenece a la familia *Comoviridae* e incluye tres especies: *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1), BBWV-2 y *Lamium mild mosaic virus* (LMMV), aunque recientemente se ha propuesto una nueva especie, *Gentian mosaic virus* (GeMV). Estos virus afectan a un gran número de especies hortícolas y ornamentales y son transmitidos de manera no persistente por unas veinte especies de pulgones. El genoma está formado por dos cadenas de RNA monocatenario de polaridad positiva que se encapsidan separadamente con dos proteínas de cápsida formando viriones isométricos. BBWV-1 y BBWV-2 están distribuidos por todo el mundo. En España se ha encontrado BBWV-1 en cultivos de pimiento de Aragón, Cataluña, Castilla León, C. Valenciana, Murcia, Navarra, País Vasco y La Rioja.

Los fabavirus son un grupo viral muy poco estudiado. Al comienzo de esta tesis, sólo se había determinado la secuencia nucleotídica del genoma completo de seis aislados de BBWV-2 procedentes de Extremo Oriente, mientras que no se disponía de ninguna secuencia completa de BBWV-1. Para desarrollar métodos rápidos, sensibles y específicos de detección, diferenciar aislados con secuencias divergentes y evaluar en su caso la efectividad de distintas estrategias de control se consideró necesario obtener la secuencia completa de al menos un aislado de BBWV-1 y secuencias parciales de aislados de distintos países. En esta tesis, se determinó la secuencia nucleotídica completa del genoma del aislado español 1S1 de BBWV-1 y se dedujo su organización genómica. El genoma está formado por dos moléculas de RNA monocatenario de polaridad positiva de 5814 y 3431 nt, respectivamente, con la organización genómica descrita para otros miembros de la familia *Comoviridae*. Al comparar esta secuencia con la única secuencia disponible de BBWV-1 correspondiente al aislado 1U2 de EEUU (publicado durante el desarrollo de esta tesis), se comprobó que los genomas de ambos aislados eran muy divergentes, presentando una identidad nucleotídica aproximada del 80% y aminoacídica del 92%.

El alineamiento de la secuencia nucleotídica completa de los dos aislados de BBWV-1, seis de BBWV-2 y uno de GeMV se utilizó para diseñar cuatro pares de iniciadores conservados que se usaron para obtener mediante retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) secuencias parciales de aislados de BBWV-1 y BBWV-2 de distintas procedencias. El análisis de estas secuencias y de otras obtenidas de la base de datos GenBank sirvió para estimar la variabilidad genética del género *Fabavirus*. Los resultados revelaron una elevada diversidad genética en BBWV-1 y BBWV-2 en comparación con otros virus vegetales. Se encontraron evidencias de eventos de recombinación, variaciones en la presión selectiva a lo largo del genoma y sucesos de migración a larga distancia.

Se desarrollaron nuevas técnicas de diagnóstico basadas en la hibridación molecular con extractos de RNA o improntas de tejido (formatos dot-blot y tissue-print, respectivamente) o

en RT-PCR y se evaluó su sensibilidad para la detección de BBWV-1 y BBWV-2 en distintos huéspedes y tejidos en comparación con ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

El análisis comparativo de secuencias nucleotídicas permitió diseñar: A) Un método para detectar BBWV-1, BBWV-2 y GeMV mediante RT-PCR usando un único par de iniciadores conservados; B) Un método para detectar todos los aislados de BBWV-1 o BBWV-2 mediante hibridación con sondas correspondientes a una zona genómica conservada y, C) Un método para diferenciar grupos de aislados de cada especie viral, mediante la hibridación molecular con sondas específicas correspondientes a una zona más variable.

Por último, en este trabajo se evaluó el efecto del S-metil benzo[1,2,3]tiadiazol-7-carbotioato (BTH) en el control de la enfermedad. La aplicación de este compuesto en plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con BBWV-1 indujo un retraso en la acumulación del virus (detectado mediante RT-PCR e hibridación molecular) y en la manifestación de los síntomas. Estos resultados parecen indicar que los tratamientos con BTH pueden ser eficaces para el control de BBWV-1. Este método es respetuoso con el medio ambiente y presenta un amplio espectro de acción, lo que resultaría apropiado para el control de fabavirus considerando su gran variabilidad genética.

Molecular characterization and development of new diagnostic methods for the genus *Fabavirus*. BTH evaluation as a control method.

The genus *Fabavirus* of the family *Comoviridae* includes three species: *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1), BBWV-2 and *Lamium mild mosaic virus* (LMMV), although recently a new species, *Gentian Mosaic Virus* (GeMV), has been proposed. These viruses infect a large number of economically important horticultural and ornamental species and are transmitted in a non-persistent mode by twenty different aphid species. The genome is composed of two single stranded positive-sense RNA molecules that are encapsidated separately by two coat proteins to form icosahedral virions. BBWV-1 and BBWV-2 are distributed worldwide. In Spain, BBWV-1 was found in pepper crops in Aragón, Cataluña, Castilla-León, C. Valenciana, Murcia, País Vasco and La Rioja.

Fabaviruses constitute a poorly characterized viral group. At the beginning of this work, the complete nucleotide sequences of only six BBWV-2 isolates from East Asia and partial sequences of a few BBWV-1 and BBWV-2 isolates were available. Therefore, obtaining the complete sequence of at least one BBWV-1 isolate and partial sequences of other isolates from different geographical origins was considered a necessary step to develop improved detection methods taking account of the genetic variability of the virus.

In this thesis, the complete RNA sequence of the BBWV-1 Spanish isolate 1S1 was determined. The genome is composed of two single-stranded and positive-sense RNA molecules of 5814 and 3431 nt, with the genomic organization characteristic of members of the family *Comoviridae*. Comparison with the complete sequence of the American isolate 1U2 of BBWV-1 (published during the progress of this work) showed high divergence along the genome, with nucleotide and amino acid identities around 80% and 93%, respectively.

Sequence alignment of the two BBWV-1 isolates, the six BBWV-2 isolates and one GeMV isolate were used to design four different conserved primer pairs that were used to reverse transcribe (RT) and PCR amplify partial sequences of BBWV-1, BBWV-2 and GeMV isolates collected worldwide. Analysis of these sequences and others available at GenBank revealed high genetic diversity of BBWV-1 and BBWV-2 in comparison with other plant viruses. Also, our analysis showed that recombination, selective pressure along the genome and long distance migration have played a role in the genetic structure and evolution of these viruses.

New detection methods based on molecular hybridization (dot-blot and tissue-print formats) or RT-PCR were developed and their sensitivity for virus detection in different hosts and plant tissues compared with ELISA. Thus, a pair of conserved primers were designed that enabled diagnosis of fabavirus infections in a single RT-PCR reaction and specific identification of GeMV, BBWV-1 and BBWV-2 even in mixed infections, based on the size of the amplification products. Also, we designed a method for universal detection of BBWV-1 or BBWV-2 by molecular hybridization with probes corresponding to a conserved genomic region, and discrimination of isolate groups or strains, using probes corresponding to a more variable genomic region.

Finally, benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) was evaluated as a potential control agent. Application of BTH in *Arabidopsis thaliana* plants previously inoculated with BBWV-1 induced a delay on virus accumulation (detected by RT-PCR and molecular hybridization) the and symptoms onset . BTH is environmentally respectful and it has a wide spectrum action, two characteristics that could make it appropriate for fabavirus control, considering the high variability of these viruses.

Caracterització molecular i desenvolupament de mètodes de diagnòstic del gènere *Fabavirus*. Avaluació de BTH com a mètode de control.

El gènere *Fabavirus* pertany a la família *Comoviridae* i està format per tres espècies: *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1), BBWV-2 i *Lamium mild mosaic virus* (LMMV), encara que recentment s'ha proposat una nova espècie, *Gentian mosaic virus* (GeMV). Aquests virus afecten a un gran nombre d'espècies hortícoles y ornamentals i són transmesos de manera no persistent per unes vint espècies de pulgons. El genoma està format per dos cadenes de ARN monocatenari de polaritat positiva que s'encapsiden separatament amb dos proteïnes de càpside formant virions isomètrics. BBWV-1 i BBWV-2 es troben distribuïts per tot el món. A Espanya s'ha trobat BBWV-1 en cultius de pebrot d'Aragó, Catalunya, Castella i Lleó, C. Valenciana, Múrcia, Navarra, País Basc y La Rioja.

Els fabavirus són un grup viral molt poc estudiat. A l'inici d'aquesta tesi, només s'havia determinat la seqüència nucleotídica del genoma complet de sis aïllats de BBWV-2 procedents d'Extrem Orient, mentre que no es disponia de cap seqüència completa de BBWV-1. Per a dissenyar mètodes ràpids, sensibles i específics de detecció, diferenciar aïllats amb seqüències divergents i avaluar la efectivitat de diferents estratègies de control es va considerar necessari, com a mínim, l'obtenció de la seqüència completa d'almenys un aïllat de BBWV-1, així com seqüències parcials d'un gran nombre d'aïllats de diferents països. En aquesta tesi, es va determinar la seqüència nucleotídica completa del genoma de l'aïllat espanyol 1S1 de BBWV-1 i es va deduir la seua organització genòmica. El genoma està format per dos cadenes de ARN monocatenari de polaritat positiva de 5814nt i 3431nt, respectivament, presentant la organització genòmica descrita per als membres de la família *Comoviridae*. Al comparar aquesta seqüència amb l'única seqüència disponible de BBWV-1 corresponent a l'aïllat 1U2 d'EEUU (publicat durant el desenvolupament d'aquesta tesi), es va comprobar que els genomes d'ambdós aïllats eren molt divergents, presentant una identitat nucleotídica aproximada del 80% i aminoacídica al voltant del 92%.

L'alineament de la seqüència nucleotídica completa de l'aïllat 1S1 de BBWV-1 junt amb les sis seqüències nucleotídiques disponibles de BBWV-2 i una de GeMV es van utilitzar per dissenyar quatre parells d'iniciadors conservats que es van utilitzar per obtenir, mitjançant retrotranscripció i reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR), la seqüència parcial d'aïllats de BBWV-1 i BBWV-2. L'anàlisi d'aquestes seqüències i d'altres obtingudes de la base de dades GenBank va servir per a realitzar l'estimació de la variabilitat genètica del gènere *Fabavirus*. Els resultats van revelar una elevada diversitat genètica en BBWV-1 i BBWV-2 en comparació amb altres virus vegetals. Es van trobar evidències de fenòmens de recombinació, variacions en la presió selectiva al llarg del genoma i events de migració a llarga distància.

Es van desenvolupar tècniques de diagnòstic basades en l'hibridació molecular amb extractes de RNA o improntes de teixit (dot-blot i tissue-print, respectivament) o en RT-PCR, i

es va avaluar la seva sensibilitat per a la detecció de BBWV-1 i BBWV-2 amb diferents hostes y teixits, en comparació amb l' ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

L'anàlisi de seqüències nucleotídiques van permetre dissenyar: A) Un mètode per detectar BBWV-1, BBWV-2 i GeMV per RT-PCR utilitzant només un parell d' iniciadors conservats; B) Un mètode per detectar tots els aïllats de BBWV-1 o BBWV-2 mitjançant hibridació amb sondes corresponents a una zona genòmica conservada i, C) Un mètode per diferenciar grups d'aïllats de cada espècie viral basant-nos en la seua identitat nucleotídica mitjançant l'hibridació molecular amb sondes corresponents a una zona més variable.

Per últim, en aquest treball es va avaluar l'aplicació del S-metil benzo[1,2,3]tiadiazol-7-carbotioato (BTH) pel control de la malaltia. L'aplicació d'aquest compost en plantes d'*Arabidopsis thaliana* inoculades amb BBWV-1 va induir un retràs de l'acumulació del virus (detectat per RT-PCR e hibridació molecular) i la manifestació dels símptomes. Els resultats obtinguts en aquest capítol semblen indicar que els tractaments amb BTH poden ser eficaços pel control de BBWV-1. Aquest mètode és respectuós amb el medi ambient i presenta un ampli ventall d'acció, el qual resultaria òptim pel control de fabavirus donat la gran variabilitat genètica que presenten.

Abreviaturas

ABREVIATURAS (por orden alfabético)

VIRUS

BaMMV: *Barley mild mosaic virus*
BaYMV: *Barley yellow mosaic virus*
BBWV 1: *Broad bean wilt virus 1*
BBWV 2: *Broad bean wilt virus 2*
BVQ: *Beet virus Q*
CLBV: *Citrus leaf blotch virus*
CABYV: *Cucurbit aphid-borne yellows virus*
CLSV: *Cucumber leaf spot virus*
CPMV: *Cowpea mosaic virus*
CPsV: *Citrus psoriasis virus*
CTV: *Citrus tristeza virus*
CVYV: *Cucumber vein yellowing virus*
CYSDV: *Cucurbit yellow stunting disorder virus*
EMDV: *Eggplant mottled dwarf virus*
FBNYV: *Faba bean necrotic yellow virus*
GeMV: *Gentian mosaic virus.*
IYSV: *Iris yellow spot virus*
LMMV: *Lamium mild mosaic virus*
MNSV: *Melon necrotic spot virus*
PCRVP: *Pelargonium chlorotic ring pattern virus*
PepMV: *Pepino mosaic virus*
PMLV: *Peach latent mosaic virus*
PMoV: *Parietaria mottle virus*
PZSV: *Pelargonium zonate spot virus*
RYMV: *Rice yellow mottle virus*
TICV: *Tomato infectious chlorosis virus*
TMV: *Tobacco mosaic virus*
ToCV: *Tomato chlorosis virus*
ToMV: *Tomato mosaic virus*
TSWV: *Tomato spotted wilt virus*
TuMV: *Turnip mosaic virus*
TYLCSV: *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*
TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*
SPCSV: *Sweet potato chlorotic stunt virus*
SPFMV: *Sweet potato feathery mottle virus*
WDV: *Wheat dwarf virus*
YMV: *Yellow mosaic virus*

OTRAS ABREVIATURAS

ATCC: Colección Americana de cultivos tipo
BTH: S-metil benzo[1,2,3]tiadiazol-7-carbotioato
ELISA: Inmunoensayo enzimático (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
DB: Hibridación molecular dot-blot
DSMZ: Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares
HEL: Helicasa
ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus
LCP: Proteína grande de la cápsida
MP: Proteína de movimiento
NCR: Región no codificante
NIAS: Instituto Nacional de Ciencias Agrobiológicas de Japón
NTPasa: Nucleotidil trifosfatasa
ORF: Pauta de lectura abierta
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
POL: RNA polimerasa RNA dependiente
PRO: Proteasa
PRO-CO: Cofactor de proteasa

RFLP: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
RT: Retrotranscripción
SCP: Proteína pequeña de la cápsida
SSCP: Polimorfismo de conformación del DNA monocatenario
TBIA: Inmunoensayo sobre improntas de tejido (Tissue blot immunoassay)
TP: Hibridación sobre improntas de tejido

Índice

1. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
1.1. LA AGRICULTURA EN ESPAÑA	3
1.2. VIROSIS EN CULTIVOS AGRÍCOLAS	3
1.3. CONTROL DE LAS VIROSIS.....	5
1.3.1. Métodos indirectos de control de virosis.....	5
1.3.1.1. Utilización de material propagativo libre de virus	5
1.3.1.2. Erradicación.....	5
1.3.1.3. Control de vectores	6
1.3.1.4. Prácticas agronómicas	7
1.3.2. Métodos directos de control de virosis.....	7
1.3.2.1. Protección cruzada o preinmunización	7
1.3.2.2. Mejora genética tradicional	7
1.3.2.3. Técnicas de ingeniería genética: obtención de plantas transgénicas.....	8
1.3.2.4. Adición de sustancias que estimulen el sistema defensivo vegetal.....	9
1.4. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS.....	9
1.4.1. Observación de síntomas.....	10
1.4.2. Observación al microscopio	10
1.4.3. Detección de proteínas virales.....	10
1.4.4. Detección de los ácidos nucleicos virales.....	10
1.4.4.1. Análisis electroforético.....	10
1.4.4.2. Hibridación molecular	11
1.4.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	11
1.4.5. Métodos de diferenciación	12
1.4.5.1. Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción del genoma (RFLP).....	13
1.4.5.2. Análisis del polimorfismo de conformación del DNA monocatenario.....	13
1.4.5.3. Análisis de la protección frente a RNAsas	13
1.4.6. Técnica de secuenciación	13
1.5. FABAVIRUS.....	13
1.5.1. Taxonomía, características generales y organización genómica	13
1.5.2. Características biológicas	16
1.5.3. Problemática, distribución, diagnóstico y control	17
1.6. OBJETIVOS.....	25
2. CAPÍTULO 2. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DE UN AISLADO ESPAÑOL DEL VIRUS DE LA MARCHITEZ DEL HABA 1 (BBWV-1) Y COMPARACIÓN CON OTROS AISLADOS DEL GÉNERO <i>FABAVIRUS</i>	29
2.1. ANTECEDENTES.....	29
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30

2.2.1. Origen del aislado viral.....	30
2.2.2. Purificación de ácidos nucleicos de BBWV-1	30
2.2.2.1. Extracción de RNA total	30
2.2.2.2. Extracción de RNA de doble cadena	31
2.2.3. Retrotranscripción y amplificación de DNAs complementarios (cDNAs) al RNA genómico del aislado 1S1 de BBWV-1	31
2.2.4. Análisis de las secuencias	33
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
2.3.1. Secuencia nucleotídica y organización genómica del RNA1 Y del RNA2 del aislado 1S1 de BBWV-1.....	35
CAPÍTULO 3. ESTIMACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO FABAVIRUS.....	43
3.1. ANTECEDENTES.....	43
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.2.1. Aislados virales	44
3.2.2. Determinación de las secuencias nucleotídicas	46
3.2.3. Análisis de secuencias	47
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.3.1. Relación filogenética del género <i>Fabavirus</i>	49
3.3.2. Variación genética del género <i>Fabavirus</i>	51
3.3.3. Estimación de la estructura y diversidad genética de la población viral en España	52
3.3.4. Epidemiología molecular. Flujo genético.	55
3.3.5. Presión de selección	58
3.3.6. Intercambio genético entre variantes divergentes.	60
CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO DEL GÉNERO FABAVIRUS.....	67
4.1. ANTECEDENTES.....	67
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	67
4.2.1. Aislados virales y material vegetal	67
4.2.2. ELISA	68
4.2.3. RT-PCR.....	68
4.2.4. Hibridación molecular.....	69
4.2.5. Análisis de secuencias	69
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
4.3.1. Puesta a punto y evaluación de las técnicas de detección	70
4.3.1.1. Evaluación de la de la sensibilidad	70
4.3.1.2. Selección del material vegetal más adecuado para la detección de BBWV-1 por métodos serológicos, RT-PCR e hibridación molecular	71

4.3.1.3. Detección comparativa en diferentes huéspedes	74
4.3.2. Detección e identificación de especies del género <i>Fabavirus</i> mediante RT-PCR.....	74
4.3.3. Detección de aislados de BBWV-1 y BBWV-2 mediante hibridación molecular .	78

CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE BTH PARA EL CONTROL DE LA INFECCIÓN VIRAL	83
5.1. ANTECEDENTES.....	83
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	85
5.2.1. Aislados virales y material vegetal	85
5.2.2. Aplicación de BTH.....	85
5.2.3. Detección del virus	85
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
CONCLUSIONES.....	91
BLIBIOGRAFÍA.....	95

Capítulo 1

Introducción y Objetivos

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. LA AGRICULTURA EN ESPAÑA

La agricultura ha sido tradicionalmente el soporte principal de la economía española. Actualmente, el sector agrario emplea alrededor del 5,2% de la población activa y la producción española constituye el 13% de la del conjunto de los Estados miembros de la UE (MAPA, 2005). La agricultura española presenta una gran diversidad productiva como consecuencia de las variadas condiciones climáticas, edáficas y orográficas, destacando la producción hortofrutícola, el viñedo, el olivar y el cereal (Figura 1.1). La producción hortofrutícola supone aproximadamente la mitad de la producción, gran parte de la cual es exportada, lo que constituye una fuente de divisas considerable. Al valor directo de la producción hay que añadir el de una fuerte actividad económica secundaria dependiente del cultivo (viveros, fertilizantes, procesamiento, etc.).

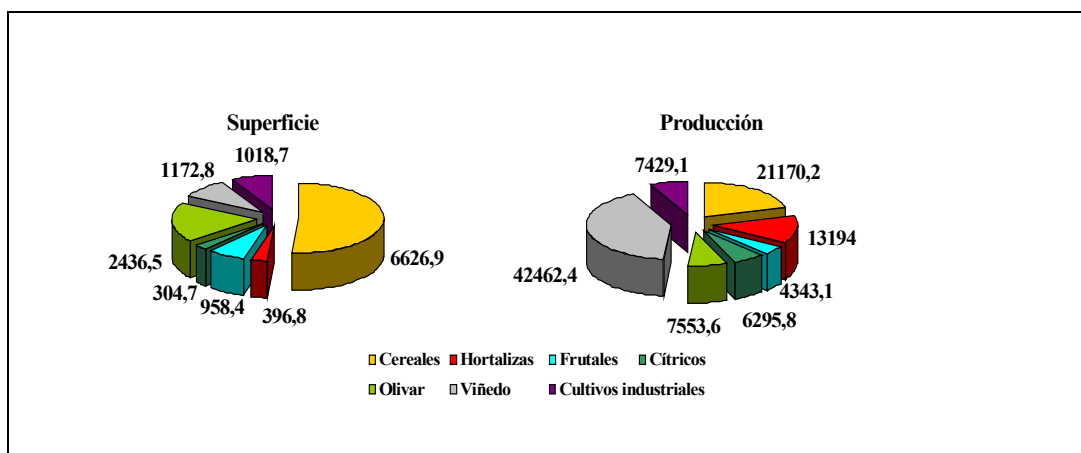


Figura 1.1. Superficie utilizada (miles de ha) y producción obtenida (miles de t) para los principales grupos de cultivos de la agricultura española (<http://www.mapa.es>).

1.2. VIROSIS EN CULTIVOS AGRÍCOLAS

Los cultivos agrícolas pueden verse afectados por un gran número de enfermedades causadas por diversos agentes: hongos, bacterias, fitoplasmas, virus y viroides, lo que conlleva graves pérdidas económicas. Los virus representan el segundo grupo de patógenos de plantas en cuanto a número de enfermedades que causan (alrededor del 30%) y su importancia económica (Hull, 2002). Se estima que cada año, a nivel mundial, los virus ocasionan unos 50 mil millones de euros de pérdidas debido a la disminución de la producción y mermas en la calidad.

En los últimos años, se ha observado un incremento considerable de las virosis. Éstas aparecen frecuentemente como epidemias con la destrucción casi completa de la cosecha, mientras que en algunos lugares ciertas virosis tienen un carácter endémico e

impiden el cultivo rentable de algunas especies. Este fenómeno se debe en gran parte a la actividad humana. En la naturaleza, los virus se encuentran en equilibrio con las plantas silvestres que infectan y raramente producen enfermedades graves, ya que el patógeno ha coexistido con el huésped durante largo tiempo posibilitando el desarrollo de mecanismos de defensa por parte de éste. Sin embargo, el intenso tráfico internacional de material vegetal (nuevas variedades o germoplasma para usar en mejora genética) provoca en muchas ocasiones la diseminación inadvertida de virus o vectores a cultivos no adaptados a los mismos. Otras veces son las nuevas variedades importadas las que se ven afectadas por los virus procedentes de la flora silvestre local. El tipo de agricultura que se lleva a cabo actualmente es también un factor importante para la proliferación de las virosis. Por una parte, la intensificación de la agricultura, con una producción continuada, permite la supervivencia de las poblaciones de virus y vectores a lo largo del año. Por otra parte, el empleo de cultivares obtenidos por mejora genética, seleccionados para obtener una productividad alta y uniforme así como resistencia a un reducido número de parásitos y patógenos hace que los cultivos sean más homogéneos genéticamente, y por tanto, más susceptibles a nuevas enfermedades.

En algunos casos, los virus ya existentes parecen emerger con una mayor virulencia y aparecen nuevos aislados virales capaces de infectar nuevos huéspedes o superar la resistencia genética introducida en algunas variedades como método de control (véase el siguiente apartado). La elevada tasa de replicación y mutación de los virus que les proporciona una gran capacidad de evolución y adaptación parece jugar un papel decisivo en ello.

En España, se han detectado al menos veinte virus en la última década: ToCV (Navas-Castillo *et al.*, 2000a), FBNYVV (Babin *et al.*, 2000), PZSV (Luis-Arteaga & Cambra, 2000), CVYV (Cuadrado *et al.*, 2001), CLSV (Segundo *et al.*, 2002), PMoV (Aramburu, 2001), PepMV (Jorda *et al.*, 2001), BBWV-1 (Rubio *et al.*, 2002), TICV (Font *et al.*, 2002), TuMV (Segundo *et al.*, 2003), BaMMV (Achón *et al.*, 2003), CABYV (Juárez *et al.*, 2004), SPCSV (Valverde *et al.*, 2004), SPFMV (Valverde *et al.*, 2004), BaYMV (Achón *et al.*, 2005), IYSV (Cordoba-Selles *et al.*, 2005), BVQ (Rubies Autonell *et al.*, 2006), WDV (Achón & Serrano, 2006), EMDV (Aramburu *et al.*, 2006), y PCRPV (Ruiz *et al.*, 2007). A éstos habría que sumar el descubrimiento de nuevos virus y aislados virales con nuevas características biológicas (Banks *et al.*, 2001; Lozano, 2007; Ruiz *et al.*, 2007). Uno de estos casos ha sido la recombinación de dos especies virales ya presentes en España: TYLCSV (Moriones *et al.*, 1993) y TYLCV (Navas-Castillo *et al.*, 1997; Navas-Castillo *et al.*, 2000b), que dió lugar a un nuevo virus con una gama de huéspedes más amplia que las de las especies parentales (Monci *et al.*, 2002). Así mismo, se han descrito casos en los que medidas de control, como el uso de variedades resistentes han dejado de ser eficaces al aparecer aislados virales capaces de infectarlas. Se han encontrado aislados de TSWV que superan la resistencia conferida por el gen *Sw-5* en tomate (Aramburu & Marti, 2003) y el gen *Tsw* en pimiento (Margaria *et al.*, 2004), aislados de ToMV que superan la resistencia

del gen *Tm-2* en tomate (Aramburu & Galipienso, 2005) y aislados de MNSV capaces de superar la resistencia del gen *nsv* en melón (Díaz *et al.*, 2002).

1.3. CONTROL DE LAS VIROSIS.

Actualmente no existe ningún método para curar una planta una vez que ésta ha sido infectada por un virus, sino que se utilizan una serie de medidas de control encaminadas a prevenir o disminuir la infección o la dispersión del virus. Dado que la mayoría de los métodos de control no son completamente eficaces, se recomienda llevar a cabo un programa de lucha integrada en el cual se apliquen varios de estos métodos de forma coordinada. Para el éxito de dicho programa es importante disponer de una legislación adecuada, así como la concienciación y educación de los agricultores. Elementos clave en el control de las virosis son la disponibilidad de métodos de diagnóstico específicos y fiables, así como un conocimiento profundo de la epidemiología del virus en cada zona y de su variabilidad genética y biológica.

Los métodos de control se clasifican en dos tipos: indirectos, encaminados a detener o dificultar la dispersión del virus y, directos, basados en la obtención de plantas resistentes a la infección viral.

1.3.1. Métodos indirectos de control de virosis.

1.3.1.1. Utilización de material propagativo libre de virus

La infección a través de material vegetal propagativo (semillas, estaquilla, injerto, bulbos, esquejes, estolones, etc.) tiene una gran trascendencia porque introduce al virus en los estadios tempranos del cultivo, permitiendo su expansión a otras plantas cuando éstas son aún muy jóvenes y susceptibles a las enfermedades. El tráfico de material propagativo es el mayor responsable de la dispersión de virus a larga distancia y de la aparición de nuevas virosis en determinadas áreas geográficas (van den Bosch *et al.*, 2007).

Para evitar o disminuir su impacto, el material de propagación debe ser obtenido a partir de plantas sanas y debe ser objeto de inspección, estableciendo programas de certificación y cuarentena (Navarro *et al.*, 1984). Si no se dispone de plantas sanas de una variedad o clon agrónomicamente interesante, en algunos casos se puede obtener material propagativo libre de virus mediante: termoterapia, quimioterapia y cultivo *in vitro* de meristemos (Walkey, 1991; Toussaint *et al.*, 1993; Faccioli & Marani, 1998). Para implementar un sistema de certificación es imprescindible disponer de métodos de diagnóstico que abarquen la mayor gama de virus posible y que presenten una gran sensibilidad y fiabilidad.

1.3.1.2. Erradicación

En zonas donde la incidencia del virus es baja, la destrucción de plantas infectadas puede ser una medida eficaz para evitar la dispersión del virus. En este caso, es importante

disponer de un método de diagnóstico rápido que permita analizar un gran número de muestras.

1.3.1.3. Control de vectores

El medio más común de dispersión de los virus de plantas es por medio de vectores: insectos, ácaros, nematodos y esporas de hongos. Los vectores más frecuentes son los insectos (sobre todo pulgones, mosca blanca y trips) que transmiten algunos de los virus de mayor importancia económica. El proceso de transmisión se caracteriza por una relación específica virus/vector en la que el virus está ligado a su vector por interacciones bioquímicas que determinan la adquisición, retención e inoculación posterior del mismo. Basándose en esta relación se distinguen dos modos principales de transmisión: no persistente, en las que el virus permanece en las piezas bucales del vector y puede ser inoculado inmediatamente después de la adquisición, aunque esta capacidad se pierde generalmente en pocos minutos, y persistente, en el cual el virus ha de cruzar la pared intestinal del vector y moverse por la hemolinfa hasta alcanzar las glándulas salivares, desde las cuales es inyectado en la planta. En este modo hay un periodo de latencia entre la adquisición y la inoculación, pero el periodo en que el vector es virulífero es más prolongado, especialmente cuando el virus se multiplica en el interior del insecto (transmisión circulativa propagativa) y éste se mantiene virulífero de por vida. En algunos casos de transmisión no persistente la capacidad de inoculación se mantiene hasta 24 horas y este modo de transmisión se conoce como semipersistente.

Desde el punto de vista epidemiológico es importante distinguir los virus transmitidos a través del suelo por hongos y nematodos y los virus transmitidos a través del aire por insectos y ácaros eriófididos. Los primeros tienen un desplazamiento limitado y pueden controlarse por desinfección del suelo con productos químicos, si bien este método requiere tratar volúmenes de suelo muy elevados, tiene efectos negativos sobre otros organismos beneficiosos para el cultivo y genera toxicidad. Una alternativa es la desinfección del suelo con vapor de agua o mediante solarización del terreno. Para el control de los vectores aéreos, se emplean insecticidas, que pueden reducir la incidencia de virus persistentes en el periodo de mayor riesgo de introducción del virus en el cultivo. Los tratamientos son generalmente ineficaces contra los virus no persistentes, puesto que el vector puede adquirir e inocular el virus antes de morir, e incluso puede favorecer su dispersión al propiciar la huida del insecto a otras plantas (Loebenstein & Reccah, 1980; Satapathy, 1998; Perring *et al.*, 1999). Así mismo, los insecticidas pueden tener un efecto negativo en las especies depredadoras o parásitos del vector, y pueden favorecer la aparición de poblaciones del vector resistentes, si bien el principal problema es la contaminación del medio ambiente (Pico *et al.*, 1996; Palumbo *et al.*, 2001). La aplicación de aceites minerales puede reducir la transmisión de virus no-persistentes pero es menos efectiva para los virus de transmisión persistente (Sastry, 1984). Otros métodos para el control de insectos vectores son: las trampas cromotrópicas, el uso de "plantas-cebo", el acolchado con materiales de plástico reflectante (Conti *et al.*, 2000) y la lucha biológica

(Smyrnioudis *et al.*, 2001; Stansly *et al.*, 2004) utilizando artrópodos parásitos y depredadores de insectos vectores.

1.3.1.4. Prácticas agronómicas

Existen prácticas agronómicas que permiten reducir la incidencia de las virosis (Conti *et al.*, 2000), si bien, la correcta aplicación de las mismas requiere un conocimiento detallado de la biología y epidemiología del virus. Las más importantes son: A) La eliminación de fuentes de infección dentro y en las proximidades del cultivo: malas hierbas perennes, plantas ornamentales, restos de cultivos precedentes de la misma especie, cultivos no relacionados con el actual que pueden actuar como reservorios de virus, etc.; B) La descontaminación de las manos, de las ropas y de los aperos de corte para prevenir la dispersión de los virus transmisibles por contacto; C) Dejar de cultivar ciertas especies durante un periodo de tiempo para romper el ciclo de transmisión del virus; D) Destrucción anticipada de la parte aérea del cultivo para evitar infecciones tardías a los órganos de multiplicación vegetativa; E) Cambios en la fecha de siembra o plantación para que las plantas jóvenes, que son generalmente más susceptibles, no coincida en el campo en los periodos de máxima actividad del vector; F) Protección de semilleros al aire libre con mallas antipulgón; y G) Utilización de cortavientos o de barreras vegetales formadas por plantas no susceptibles

1.3.2. Métodos directos de control de virosis.

1.3.2.1. Protección cruzada o preinmunización

La protección cruzada consiste en la inoculación de plantas con aislados poco agresivos del virus encontrados en la naturaleza u obtenidos artificialmente por mutagénesis, para proteger las plantas de una infección posterior por aislados agresivos (Urban *et al.*, 1990; Falk & Bruening, 1994; Lecoq, 1998). La similitud de secuencia requerida en los fenómenos de protección cruzada, superior al 95%, sugiere la posible implicación de mecanismos relacionados con el silenciamiento génico mediado por RNA. Este sistema natural de defensa de las plantas frente a infecciones virales se basa en el reconocimiento y degradación de RNAs virales (Voinnet, 2005).

La aplicación de la protección cruzada en campo se ve limitada por varios inconvenientes. En primer lugar, la virulencia de los aislados virales puede variar según el cultivo e incluso entre variedades de un mismo cultivo, de modo que, un aislado empleado para proteger un cultivo puede ser potencialmente peligroso para cultivos o variedades cercanos al protegido. También hay que tener en cuenta los posibles efectos sinérgicos del virus protector con otros virus o patógenos que afecten a la planta, así como la posibilidad de que recombine o evolucione dando lugar a un aislado con nuevas características biológicas y patogénicas (Gonsalves & Garnsey, 1989).

1.3.2.2. Mejora genética tradicional

La producción de plantas resistentes es uno de los métodos más prometedores para la lucha contra los virus (Hull, 2002). Tradicionalmente, la mejora genética ha utilizado

un tipo de resistencia hoy día definible como convencional, basada en la búsqueda en la naturaleza de germoplasma resistente a agentes específicos de las enfermedades e introducción de los genes de resistencia en especies de interés agronómico mediante cruzamientos y retrocruzamientos (Goulart *et al.*, 1993; Lewis, 2005; Dossall & Kott, 2006; Wang *et al.*, 2006). Cuando se desarrollan variedades vegetales resistentes se busca que la resistencia sea duradera, dada la dificultad, esfuerzo y tiempo que lleva localizar e incorporar una resistencia en una variedad de interés agronómico. Sin embargo, ocurre con cierta frecuencia que tras este costoso proceso, la resistencia es superada una vez que se enfrenta con las poblaciones del patógeno, bien porque en la población viral existen aislados con capacidad de superar la resistencia, o bien porque el virus evolucione (Kaniewski & Lawson, 1998; Tomassoli *et al.*, 1999). Por ello, para cada virus es clave estudiar la variabilidad genética de la población viral en una zona geográfica y los factores implicados en su evolución (Mc Donald & Linde, 2000), hecho que se ha ignorado en la mayoría de los programas de mejora genética dando lugar a que en ocasiones la resistencia se vea superada a los pocos años de haberse introducido las nuevas variedades en campo. Otro inconveniente de esta técnica es la falta de fuentes de resistencia a ciertos patógenos para determinados cultivos, bien porque son inexistentes en la naturaleza o no han sido identificados, o bien porque están integrados en genotipos no compatibles con la especie a mejorar.

1.3.2.3. Técnicas de ingeniería genética: obtención de plantas transgénicas

Mediante ingeniería genética se pueden introducir nuevos genes en una planta sin alterar el fondo genético de la misma, dando lugar a una planta transgénica con las mismas características de la planta madre pero con resistencia frente al patógeno deseado. Esta metodología tiene la ventaja sobre la mejora genética tradicional que permite superar las barreras genéticas entre especies vegetales e incorporar genes procedentes de especies sexualmente incompatibles.

En muchos casos la inserción de fragmentos del genoma del virus ha resultado en la protección de la planta contra dicho virus. Generalmente, se han utilizado genes que codifican proteínas virales como la proteína de la cápsida y proteína del movimiento (Powell Abel *et al.*, 1986; Kaniewski & Lawson, 1998; Tomassoli *et al.*, 1999). Se cree que la protección podría deberse a un desequilibrio entre los componentes virales que interferiría en la replicación, movimiento o encapsidación del virus. También se ha empleado con éxito la introducción de fragmentos de RNA antisentido o RNA bicatenario, cuyo mecanismo de actuación se basa en el silenciamiento génico postranscripcional. Existen también ejemplos en los que se ha ensayado la introducción de genes no virales, como el interferón humano, o de anticuerpos específicos contra el virus.

La resistencia de las plantas transgénicas es específica y al igual que ocurre con la resistencia convencional, existe el riesgo de aparición de nuevos aislados genéticamente divergentes que superen la resistencia (bien porque hayan sido introducidos de otras regiones o por evolución de la población viral local).

Las plantas transgénicas, al tratarse de organismos genéticamente modificados, deben de seguir la legislación europea con el fin de garantizar que no suponen un riesgo para la salud humana y el medio ambiente, por lo que antes de su empleo en campo hay que evaluar numerosos riesgos, entre ellos los que pueden tener un impacto ecológico inmediato: A) La resistencia obtenida en plantas cultivadas podría ser transmitida a plantas silvestres y malas hierbas relacionadas con el cultivo mediante polinización cruzada y hacer a éstas resistentes al virus, introduciendo un desequilibrio en la población vegetal (Fuchs & Gonsalves, 2007); y B) La infección de un virus en una planta transgénica podría dar lugar a nuevos genomas virales por recombinación genética (Falk & Bruening, 1994).

1.3.2.4. Adición de sustancias que estimulen el sistema defensivo vegetal

Actualmente se están investigando nuevas estrategias dirigidas a interferir con el proceso de infección viral, potenciando los mecanismos de defensa natural de las plantas. Uno de estos métodos se basa en activar el sistema de silenciamiento génico postranscripcional aplicando o inoculando el tejido foliar con RNAs bicatenarios correspondiente a secuencias virales que pueden producirse a bajo coste mediante su expresión en bacterias (Tenllado *et al.*, 2004). Otra aproximación interesante es la estimulación artificial de la resistencia sistémica adquirida (SAR) mediante tratamientos con inductores químicos tales como el ácido salicílico (SA), el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (ácido isonicotínico, INA) y el S-metil benzo[1,2,3]tiadiazol-7-carbotioato (BTH) (Vallad & Goodman, 2004). La principal ventaja, con respecto a la aproximación anterior, es su capacidad de actuar contra un amplio espectro de patógenos y parásitos: virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos herbívoros.

1.4. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS.

La detección y caracterización de los virus que producen las enfermedades constituye el punto de partida para adoptar medidas adecuadas de control, llevar a cabo estudios epidemiológicos o afrontar temas de investigación básica.

El diagnóstico de las enfermedades de origen viral se efectúa normalmente con una serie de técnicas que permiten identificar el virus a nivel de familia, género o especie (Robertson *et al.*, 1991; Xing *et al.*, 2006), y en ocasiones, permiten diferenciar entre distintos aislados o cepas de un mismo virus (Gillings *et al.*, 1993). A continuación se explican los métodos de detección más utilizados:

1.4.1. Observación de síntomas

La observación de los síntomas en campo proporciona la primera información sobre la identidad del virus, sin embargo, éstos no suelen ser suficientemente específicos ya que distintos virus pueden causar síntomas similares (amarilleo, mosaico, manchas cloróticas, necrosis, etc.) y distintos aislados de una especie viral pueden inducir distinta sintomatología. Tradicionalmente, para una identificación más precisa se realiza la

inoculación y observación de los síntomas en plantas indicadoras herbáceas cultivadas en invernadero (Luis-Arteaga, 1989). Sin embargo, este método es costoso y largo ya que requiere grandes espacios e instalaciones en invernadero. Aún así, es un paso necesario en el caso de nuevas virosis, para demostrar que se trata de un agente infeccioso (postulados de Koch) y para realizar una primera caracterización de la gama de huéspedes.

1.4.2. Observación al microscopio

Existen dos modalidades: A) La citopatología, que consiste en observar mediante microscopía (óptica o electrónica) las modificaciones en células de tejidos vegetales, resultado de un metabolismo alterado por la infección viral; y B) La observación de las partículas virales (viriones) mediante microscopía electrónica. La morfología y dimensiones de los viriones pueden permitir asignar el virus a un grupo viral. Este método es lento y poco específico, requiere un equipo costoso y personal experimentado.

1.4.3. Detección de proteínas virales

Actualmente, la técnica serológica ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) es la más utilizada para el diagnóstico rutinario de virus (Hu *et al.*, 1995; Martín *et al.*, 2004). Esta técnica se basa en la detección de la proteína viral inmovilizada sobre una fase sólida mediante anticuerpos conjugados con un enzima cuyo sustrato hidrolizado da lugar a un producto coloreado cuya acumulación puede ser medida espectrofotométricamente. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. En el primer caso, al inocular un purificado de partículas virales de la planta en un animal, los anticuerpos se obtienen al reaccionar frente a una multitud de epítomos simultáneamente, mientras que en el segundo caso los anticuerpos se obtienen *in vitro* hibridando linfocitos B (productores de anticuerpos) con células tumorales que crecen indefinidamente, de forma que, cada anticuerpo solo reacciona frente a un único epítomo y es más específico. El grado de especificidad puede variar dependiendo de si dicho epítomo se encuentra presente en distintas especies virales, en todos los aislados de un virus o en sólo algunos aislados (Cambra *et al.*, 1990). La técnica de ELISA presenta como ventajas que: es fiable, específica y sensible, emplea reactivos económicos, el procesamiento de las muestras es rápido y sencillo, permite analizar simultáneamente un gran número de muestras y realizar evaluaciones semicuantitativas del título viral. Para hacer ELISA más versátil y aplicable al diagnóstico de un gran número de muestras se han desarrollado otros ensayos sobre base sólida, tales como Dot-Blot y Tissue Blot. El formato Tissue Blot, que consiste en detectar el antígeno depositado al hacer improntas de un corte de brote u hoja infectada en una membrana tiene la ventaja añadida de ahorrarse el procesamiento de las muestras (Lin *et al.*, 1990; Garnsey *et al.*, 1993; Martín *et al.*, 2002).

1.4.4. Detección de los ácidos nucleicos virales

1.4.4.1. Análisis electroforético

La detección de RNA bicatenario (dsRNA) en extractos de plantas puede servir como indicador de una infección viral, puesto que ésta es la forma replicativa de los virus

con genoma de RNA (lo que ocurre en la mayoría de los virus vegetales) (Guerra *et al.*, 1991). Se trata de un método basado en la electroforesis del dsRNA purificado mediante una cromatografía en celulosa no iónica en presencia de etanol al 16%. También, se puede analizar el genoma viral purificado a partir de las partículas virales. En ambos casos, el número y tamaño de los segmentos genómicos observados nos puede dar una idea aproximada del grupo viral al que pertenece el virus, aunque para una identificación más precisa se requieren otros métodos adicionales.

1.4.4.2. Hibridación molecular

Esta técnica se basa en la capacidad de apareamiento específico entre dos cadenas sencillas de RNA, DNA o RNA – DNA que tengan secuencias complementarias formando una estructura de doble cadena más estable. La síntesis de una molécula de DNA o RNA monocatenario complementaria al genoma del virus (sonda) marcada con isótopos radioactivos (como el ^{32}P) o con marcajes no-radioactivos (como la digoxigenina o fluoróforos) y su posterior hibridación con ácidos nucleicos de la planta inmovilizados en un soporte sólido permite detectar la presencia del virus (Más *et al.*, 1993; Dietzgen *et al.*, 1994; Harper & Creamer, 1995; James *et al.*, 1999; Galipienso *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). La modalidad de hibridación más empleada es el dot-blot, que consiste en colocar gotas del extracto de ácidos nucleicos sobre la superficie de una membrana (Hu *et al.*, 1995). Este método tiene la ventaja de ser rápido, sencillo, semicuantitativo y con capacidad de analizar simultáneamente un gran número de muestras, presentando generalmente una mayor sensibilidad que la técnica ELISA. Otra ventaja adicional con respecto a las técnicas serológicas es su versatilidad, ya que se pueden obtener diferentes grados de especificidad modificando las condiciones de hibridación o bien sintetizando las sondas a partir de zonas distintas del genoma. Como en las técnicas serológicas, la hibridación se puede efectuar sobre improntas de material vegetal evitando así el procesamiento de muestras (Rubio *et al.*, 2003; Narvaez *et al.*, 2000).

Otro método utilizado para la detección de virus vegetales es la hibridación con chips de DNA (microarrays y macroarrays). Este método se basa en marcar con fluoróforos, extractos de ácidos nucleicos purificados de plantas infectadas e incubarlos con una serie de sondas de DNA (correspondientes a distintos virus) fijadas en un soporte sólido. De esta manera se pueden probar y detectar simultáneamente un gran número de virus y aislados virales en una sola reacción de hibridación. Los chips de DNA se emplean habitualmente para analizar los niveles de expresión de miles de genes de animales y plantas (Schena *et al.*, 1995) y se están desarrollando sistemas para el diagnóstico de virus (Bystricka *et al.*, 2005; Deyong *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Boonham *et al.*, 2007) aunque su principal inconveniente es la baja sensibilidad de la técnica, lo que ha limitado hasta ahora su aplicación.

1.4.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction), (Saiki *et al.*, 1988; Hull, 2002) es una técnica que permite amplificar *in vitro* un determinado

fragmento de DNA de modo selectivo en unas pocas horas. Una modalidad es la RT-PCR que permite detectar virus con genoma de RNA (Teycheney *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2007b).

La mayor ventaja de la PCR o RT-PCR es su gran sensibilidad, aunque esto también la hace propensa a la obtención de falsos positivos debidos a uniones inespecíficas de los iniciadores o a la contaminación del DNA. En algunos casos, también pueden producirse falsos negativos debido a inhibidores en los extractos vegetales (Singh *et al.*, 2002). Esta técnica presenta una gran versatilidad ya que permite el control del grado de especificidad mediante el diseño de iniciadores correspondientes a zonas genómicas más o menos conservadas (o variables). Así, se han diseñado desde iniciadores para diferenciar aislados de una especie viral (Candresse *et al.*, 1995; Hammond *et al.*, 1999; Nie & Singh, 2003; Jonson *et al.*, 2007) hasta iniciadores que permiten detectar a los miembros de un género o familia viral (Tian *et al.*, 1996; MacKenzie *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 2001).

Se han desarrollado diversas modalidades de PCR, entre las que destacan la PCR anidada, que permite una mayor sensibilidad y especificidad al realizar una segunda reacción con iniciadores internos (Helguera *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2001; Bertolini *et al.*, 2003). La PCR o RT-PCR multiplex que permiten detectar varios virus o aislados de un virus en una misma reacción utilizando simultáneamente distintos pares de iniciadores correspondientes a cada virus (Bariana *et al.*, 1994; Dovas *et al.*, 2002; Bertolini *et al.*, 2003). Y por último, la PCR en tiempo real, basada en la detección simultánea de la fluorescencia emitida por los fluorocromos que es directamente proporcional a la cantidad de DNA que se acumula durante el proceso de amplificación (Stewart *et al.*, 2007; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2007a; Ling *et al.*, 2007b). Esta técnica permite la cuantificación precisa del título viral (DNA o RNA), presenta una mayor sensibilidad que la PCR convencional y evita la manipulación de los productos de PCR disminuyendo el riesgo de contaminación. La principal desventaja es su elevado precio.

1.4.5. Métodos de diferenciación

Una vez detectada la infección viral mediante alguna de las técnicas anteriores puede resultar interesante o necesaria la diferenciación de aislados virales o especies muy próximas genéticamente. Los métodos más empleados en virus vegetales son:

1.4.5.1. Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción del genoma (RFLP)

El análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción del genoma (RFLPs: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) se basa en la capacidad de las endonucleasas de restricción de reconocer secuencias nucleotídicas específicas que varían entre individuos. Para este análisis, se amplifica por PCR una zona genómica del virus y se digiere el DNA sintetizado con enzimas de restricción capaces de generar fragmentos de diferente tamaño que son separados mediante electroforesis. Cada variante de secuencia da lugar a un patrón de bandas único. Este método es altamente específico,

sensible y sencillo y permite diferenciar variantes de secuencia dentro de un mismo aislado viral (Martinez-Culebras *et al.*, 2002; Font *et al.*, 2007).

1.4.5.2. Análisis del polimorfismo de conformación del DNA monocatenario (SSCP)

El análisis de los polimorfismos de conformación del DNA monocatenario (SSCP: *Single Strand Conformation Polymorphism*) consiste en la electroforesis en condiciones nativas de un producto de PCR desnaturalizado, de manera que cada una de las dos hebras del DNA adquiere una conformación (estructura autocomplementaria) que dependerá de su secuencia nucleotídica, y como consecuencia afectará a su migración en el gel. De esta manera productos de PCR con distinta secuencia nucleotídica presentarán un patrón de electroforesis distinto (Rubio *et al.*, 1996; Goszczyński & Jooste, 2002; Xing *et al.*, 2006). Las principales ventajas de esta técnica es su gran especificidad, ya que puede detectar diferencias de un solo nucleótido en fragmentos de unos 500 nt, así como su idoneidad para identificar un gran número de variantes dentro de un aislado. Sin embargo, no permite estimar la distancia genética entre variantes, por lo que se suele utilizar en combinación con la secuenciación de variantes seleccionadas tras el análisis de SSCP (Rubio *et al.*, 2001).

1.4.5.3. Análisis de la protección frente a RNAsas

En esta técnica el RNA viral se hibrida con una sonda complementaria y a continuación se somete a digestión con las ribonucleasas, RNasa T1 y RNasa A (que cortan en el extremo 3' de los residuos G no apareados). El patrón de fragmentos protegidos permite diferenciar variantes de secuencia del virus (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1989).

1.4.6. Técnica de secuenciación

La secuenciación es la técnica más precisa y específica, ya que la comparación de una secuencia nucleotídica determinada con aquellas depositadas en las bases de datos permite la asignación a un grupo viral así como estimar el grado de similitud con otros aislados virales.

1.5. FABAVIRUS

1.5.1. Taxonomía, características generales y organización genómica

El género *Fabavirus*, junto a los géneros *Comovirus* y *Nepovirus*, representa uno de los tres géneros que conforman la familia *Comoviridae*. El criterio para diferenciar estos tres géneros se ha basado en los vectores biológicos que los transmiten. Así, los comovirus son transmitidos por escarabajos, los fabavirus por áfidos y los nepovirus por nematodos (Fauquet *et al.*, 2005). Los miembros de la familia *Comoviridae* tienen en común la morfología de sus viriones y la organización genómica. Los viriones son isométricos, con un diámetro de 28-30 nm (Figura 1.2.A). El genoma está constituido por dos moléculas de RNA monocatenario de polaridad positiva, presentando cada una de ellas una pequeña

proteína (VPg) unida covalentemente a su extremo 5' y una cola poli(A) de tamaño variable en su extremo 3' (Figura 1.2.B). La expresión y función de las proteínas codificadas se ha estudiado con detalle en el comovirus *Cowpea mosaic virus* (CPMV) (Goldbach & Wellink, 1996). El RNA 1, de aproximadamente 6 kb, codifica para una poliproteína que es procesada por una proteasa codificada en el propio RNA 1 dando lugar a cinco proteínas: el cofactor de proteasa (PRO-CO), una posible helicasa (HEL), la VPg, la proteasa (PRO) y finalmente, una RNA polimerasa RNA dependiente (POL). HEL y POL están implicados en la replicación del RNA viral mientras que PRO-CO y PRO están implicadas en la expresión del genoma mediante el procesado de la poliproteína (escisión en varias proteínas funcionales). El RNA 2, de aproximadamente 3.5 kb, codifica para dos poliproteínas con el mismo extremo carboxiterminal como resultado de dos señales de inicio de traducción. El procesamiento proteolítico da como resultado las proteínas capsídicas, dos en fabavirus y comovirus (LCP y SCP) y una en la mayoría de los nepovirus (CP), la proteína de movimiento (MP) (resultante de la segunda señal de traducción) y una proteína posiblemente implicada en la replicación del RNA 2 (resultante de la primera señal de traducción). Las proteínas capsídicas además de proteger el genoma viral cuando está fuera de la célula (durante la transmisión) juegan un papel importante en el movimiento a corta distancia del virus. El virus se mueve en forma de viriones a través de una estructura tubular compuesta por la proteína de movimiento que atraviesa los plasmosdesmos (Figura 1.3) (van Regenmortel *et al.*, 2000).

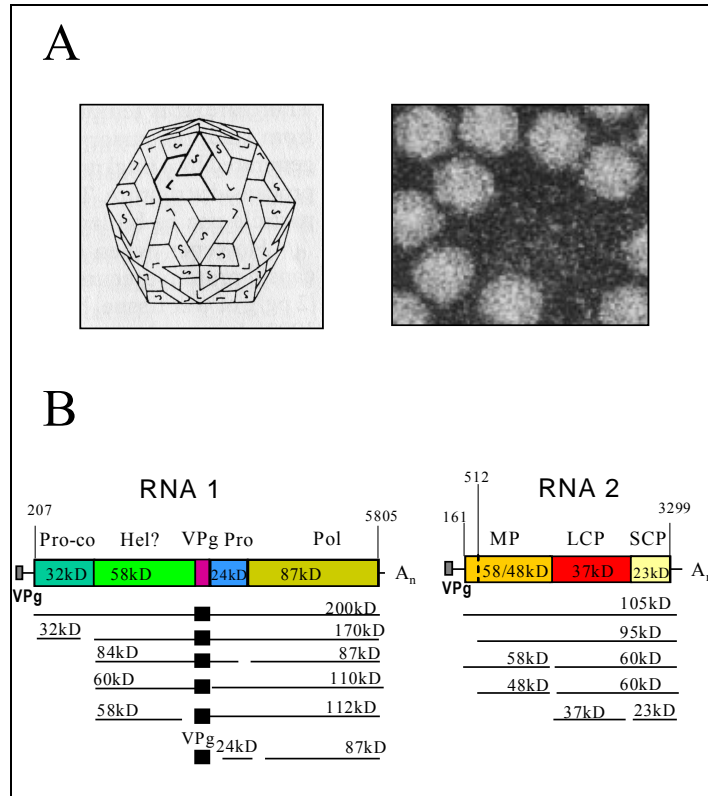


Figura 1.2. A) Estructura de las partículas virales (viriones) de CPMV. B) Organización y expresión genómica de CPMV. Las líneas inferiores indican como se procesan (cortan) las poliproteínas codificadas por los dos RNAs genómicos. Los cuadrados unidos a los extremos 5' del RNA 1 y RNA 2 representan a la proteína VPg, las líneas horizontales indican la secuencia no codificante, los rectángulos representan la poliproteína codificada a partir de la ORF y An indica la cola poliA. Las líneas verticales perpendiculares a los rectángulos indican los hipotéticos sitios de corte y las proteínas resultantes para el RNA 1 son: PRO-CO, cofactor de proteasa; HEL, helicasa; VPg, proteína unida al genoma viral; PRO, proteasa; POL, RNA polimerasa RNA dependiente; y para el RNA 2 son: MP, proteína de movimiento; LCP, proteína grande de la cápsida; SCP, proteína pequeña de la cápsida. Los números en negro situados en la parte superior de los rectángulos al principio y final de la poliproteína indican los sitios en que la poliproteína empieza y acaba (van Regenmortel *et al.*, 2000).

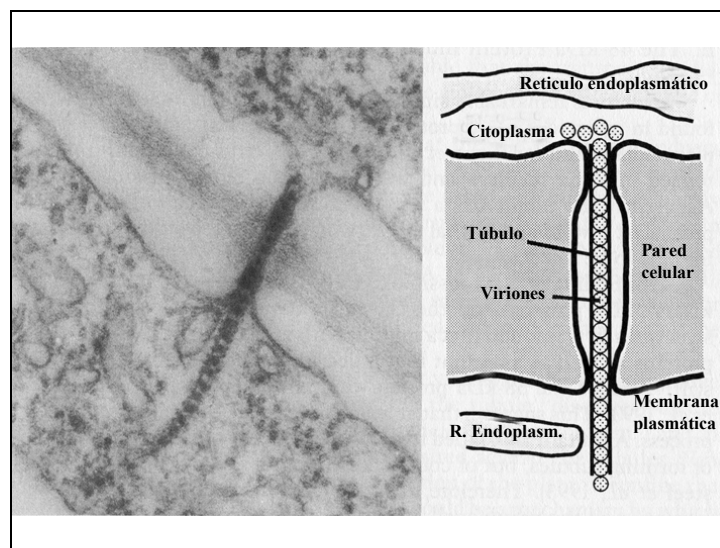


Figura 1.3. Micrografía e interpretación esquemática de las estructuras tubulares inducidas por CPMV e involucradas en el movimiento entre células (Goldbach & Wellink, 1996).

El género *Fabavirus* está compuesto por tres especies virales: *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1), BBWV-2 y *Lamium mild mosaic virus* (LMMV) (Fauquet *et al.*, 2005). La separación en especies se ha basado principalmente en diferencias serológicas (cada especie presenta un serotipo distinto) y en diferencias biológicas (gama de huéspedes y transmisibilidad por distintas especies de áfidos). Sin embargo, los estudios biológicos se realizaron hace mucho tiempo (entre 1947 y 1982), con muy pocos aislados y de manera poco sistemática (no se realizaron ensayos comparativos de varios aislados), por lo que no está claro si las diferencias biológicas observadas ocurrieron solamente en los aislados estudiados o si son atribuibles a especies distintas. Posteriormente, la determinación de la secuencia nucleotídica del genoma de algunos aislados confirmó que BBWV-1 y BBWV-2 son dos especies distintas (Kobayashi *et al.*, 1999) pero todavía no se dispone de ninguna secuencia nucleotídica de LMMV. Recientemente, se ha descubierto un nuevo serotipo al que se ha propuesto como una nueva especie, *Gentian mosaic virus* (GeMV), basándose en su secuencia nucleotídica (Kobayashi *et al.*, 2005).

La clasificación y nomenclatura de estos virus ha ido cambiando con el tiempo, lo que junto a la pobre caracterización de los aislados virales crea una cierta confusión sobre todo a la hora de consultar la bibliografía. Para aclarar esta situación, a continuación se hace una breve reseña histórica. La primera vez que se aisló un fabavirus fue en 1947 en cultivos de haba en Australia (Stubbs, 1947) y se le denominó virus del marchitamiento del haba (BBWV: *Broad bean wilt virus*). En otros países y huéspedes se encontraron virus con características similares a los que se les denominó: *Nasturtium ringspot virus* (NRSV) (Smith, 1950), *Lamium mild mosaic virus* (Smith, 1950; Lovisolo, 1957), *Petunia ringspot virus* (PeRSV) (Rubio-Huertos, 2007), *Pea streak virus* (PeSV) (Kim & Hagedorn, 1959) y *Parsley virus 3* (PV3) (Frowd & Tomlinson, 1970). Estudios comparativos demostraron que BBWV, NRSV, PeRSV y PeSV eran serológicamente idénticos y fueron considerados como aislados de la misma especie, denominada BBWV (Doel, 1975), mientras que LMMV se diferenciaba serológicamente y se consideró como una especie distinta (Lisa *et al.*, 1982). Una vez establecida la especie BBWV, se observó que sus aislados podían, a su vez, dividirse en dos serotipos: I y II (Uyemoto & Provvidenti, 1974) que posteriormente se designaron como especies distintas: BBWV-1 y BBWV-2 (Golbach *et al.*, 1995). La mayoría de los trabajos sobre estos virus son anteriores a la designación de BBWV-1 y BBWV-2 como especies distintas y en los mismos no suele especificarse de que especie se trata. Dada la poca importancia de LMMV (página 18), BBWV aparece frecuentemente como un sinónimo de fabavirus en la literatura.

1.5.2. Características biológicas

Los fabavirus tienen un amplio espectro de huéspedes naturales y hasta ahora se han identificado 430 especies pertenecientes a 43 familias botánicas (Apéndice 1), (Edwarson & Christie, 1991), incluyendo especies hortícolas cultivadas de importancia económica como alcachofa (*Cynara scolymus*), zanahoria (*Daucus carota*), lechuga (*Lactuca sativa*), pimiento (*Capsicum annuum*), patata (*Solanum tuberosum*), berenjena

(*Solanum melongena*), espinaca (*Spinacia oleracea*), guisante (*Pisum sativum*), judía (*Phaseolus vulgaris*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), calabaza (*Cucurbita maxima*), melón (*Cucumis melo*) o pepino (*Cucumis sativus*); y ornamentales como begonia (*Begonia semperflorens*), consuelda media (*Ajuga reptans*), buvardia (*Bouvardia longiflora*), delphinium (*Delphinium*), narciso (*Narcissus*), etc.

La infección puede ser sistémica o local y los síntomas que origina pueden ser muy variados dependiendo del huésped y del aislado viral. Los más comunes en plantas de pimiento, guisante y la mayoría de plantas indicadoras (*Nicotiana megalosiphon*, *Nicotiana rustica*, *Ocimum basilicum*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Vigna unguiculata*, etc.), consisten en mosaico foliar, originando en las hojas jóvenes manchas cloróticas con zonas anulares irregulares y disminución del desarrollo de la planta. En pimiento, se produce además el moteado de los frutos presentando decoloración y deformaciones que impiden su comercialización. En berenjena puede ocasionar necrosis de los nervios principales como infección sistémica o bien manchas locales necróticas circulares en las hojas (Figura 1.4). En cultivos de haba de Australia se observaron daños muy graves que producían el marchitamiento de la planta (Stubbs, 1947), mientras que los aislados europeos sólo inducen manchas cloróticas suaves. En cultivos de judía, se observó en Italia, mosaico foliar, deformaciones en el fruto y disminución del desarrollo de la planta (Lisa *et al.*, 1986). En alcachofa, en Francia, se observó reducción del vigor de las plantas así como producción de ramificaciones con pérdida significativa de frutos (Migliori, 1993). En guisante, en Egipto, se han observado lesiones necróticas locales (Kishtah *et al.*, 1978) y mosaicos severos en Sudáfrica (Jooste *et al.*, 2001). En cultivos de tomate, en Francia, se observó mosaico nervial amarillo y formación de anillos en los frutos (Migliori *et al.*, 1987). En espinaca, se observaron lesiones necróticas graves en el estado de Nueva York, (Schroeder & Provvidenti, 1970; Provvidenti *et al.*, 1984) que más tarde se observarían en China (Tian *et al.*, 1982), Alemania, (Weidemann *et al.*, 1975) e Inglaterra (Lisa & Boccardo, 1996).

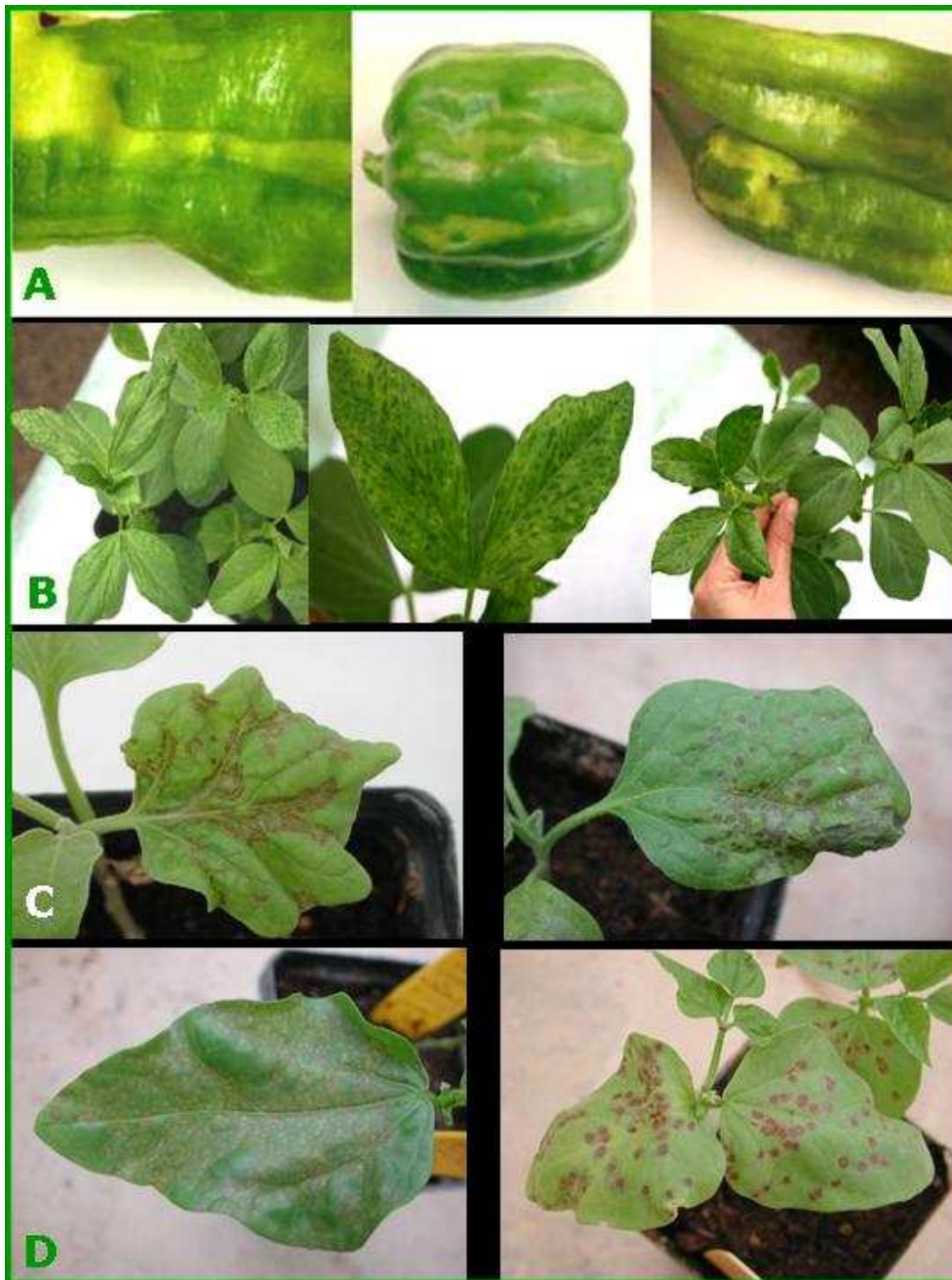


Figura 1.4. A) Sintomatología observada en campo en el fruto de pimiento infectado por un aislado de BBWV-1 obtenido en Benicarló, Castellón, en el 2002. B, C y D) Reacciones en huéspedes herbáceos al ser infectados por dicho aislado viral: haba (B), berenjena (C) y caupí (D).

Los fabavirus se transmiten de manera no persistente por unas veinte especies de pulgones (Tabla 1.1), (Stubbs, 1960; Karl *et al.*, 1972; Taylor & Stubbs, 1972; Boccardo & Conti, 1973). El virus es adquirido por el vector en un período que oscila entre 15 segundos y 10 minutos y es inoculado a plantas sanas susceptibles en un intervalo que varía entre 30 segundos y 24 horas (Stubbs, 1960; Frowd & Tomlinson, 1970; Taylor & Stubbs, 1972; Boccardo & Conti, 1973; Marrou *et al.*, 1976; Makkouk *et al.*, 1990). La transmisión mecánica también es posible, por lo que se pueden realizar ensayos biológicos usando

plantas indicadoras. Sin embargo, no se transmiten por cuscuta (Taylor & Stubbs, 1972), ni por semillas (Taylor & Stubbs, 1972; Boccardo & Conti, 1973; Provvidenti, 1983; Provvidenti & Hoch, 1985), aunque en una ocasión se observó la transmisión por semilla de un aislado sirio de BBWV-1 a una frecuencia muy baja (0,4-0,6%), (Makkouk *et al.*, 1990).

Nombre científico	Referencias
Acyrtosiphon onobrychis	Schemelzer, 1960
Acyrtosiphon pisum	Marrou <i>et al.</i> , 1976; Makkouk <i>et al.</i> , 1990
Aphis craccivora	Stubbs, 1960; Makkouk <i>et al.</i> , 1990
Aphis fabae	Smith, 1950; Rubio-Huertos, 1962; Makkouk <i>et al.</i> , 1990
Aphis frangulae gossypii	Schmidt, 1977
Aphis nasturtii	Boccardo & Conti, 1973
Aularcothum circumflexum	Schmidt, 1977
Aularcothum solani	Schmidt, 1977
Brachycaudus cardui	Schmidt, 1977
Brachycaudus helichrysi	Schmidt, 1977
Brevicoryne brassicae	Schmidt, 1977
Cavariella aegopodii	Schmidt, 1977
Dysaphis crategi	Schmidt, 1977
Hyperomyzus lactucae	Schmidt, 1977
Macrosiphon solanifolii	Schemelzer, 1960
Macrosiphoniella sanborni	Schmidt, 1977
Macrosiphum euphorbiae	Stubbs, 1960
Macrosiphum pisi Kalt	Kim & Hagedorn, 1959
Megoura viciae	Schmidt, 1977
Myzus cerasi	Schmidt, 1977
Myzus persicae	Smith, 1950; Makkouk <i>et al.</i> , 1990
Myzus pisi	Kim & Hagedorn, 1959
Phorodon cannabis	Schmidt, 1977
Phorodon humuli	Schmidt, 1977
Rhopalosiphum padi	Schmidt, 1977
Semiaphis dauci	Schmidt, 1977

Tabla 1.1. Especies de pulgones transmisores del género *Fabavirus*

1.5.3. Problemática, distribución, diagnóstico y control

Los fabavirus están ampliamente distribuidos por todo el mundo (Figura 1.5). Se han descrito un gran número de aislados de BBWV-1 y BBWV-2 en todos los continentes habitados: Oceanía (Stubbs, 1947; Shukla *et al.*, 1980; Ochoa-Corona *et al.*, 2007), Norteamérica (Stubbs, 1947; Kim & Hagedorn, 1959; Bruckart & Lorbeer, 1975; Shukla *et al.*, 1980; Lockhart & Betzold, 1982; Scott & Barnett, 1984; Rist & Lorbeer, 1989; Ochoa-Corona *et al.*, 2007), Sudamérica (Gracia & Feldman, 1976; Vega *et al.*, 1980; Gracia & Guterrez, 1982); Europa (Sahambi *et al.*, 76 A.D.; Frowd & Tomlinson, 1970; Juretic *et al.*, 1970; Schmelzer *et al.*, 1975; Conti & Masenga, 1977; Kyriakopoulou, 1995; Rubio *et al.*, 2002; Mumford *et al.*, 2006; Mehle *et al.*, 2007; Yankulova & Kaitazova, 1979; Chod & Jokes, 1986; Vaira *et al.*, 1992; Jooste *et al.*, 2001; Verhoeven *et al.*, 2002); Oriente Próximo, en el norte de Africa y en Africa Subsahariana (Castrovilli *et al.*, 1985; Makkouk *et al.*, 1990; Kenyon *et al.*, 2001) y por toda Asia (Mali *et al.*, 1977; Parvin & Izadpanah, 1978; Castrovilli *et al.*, 1985; Chang & Chung, 1987; Makkouk *et al.*, 1990; Akanda *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2000; Makkouk *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2005). En contraste, solo se han descrito tres aislados de LMMV:

uno en Gran Bretaña (Lovisol, 1957) y dos en Alemania (Lisa & Boccardo, 1996), mientras que GeMV ha sido descubierto recientemente en Japón (Kobayashi *et al.*, 2005).

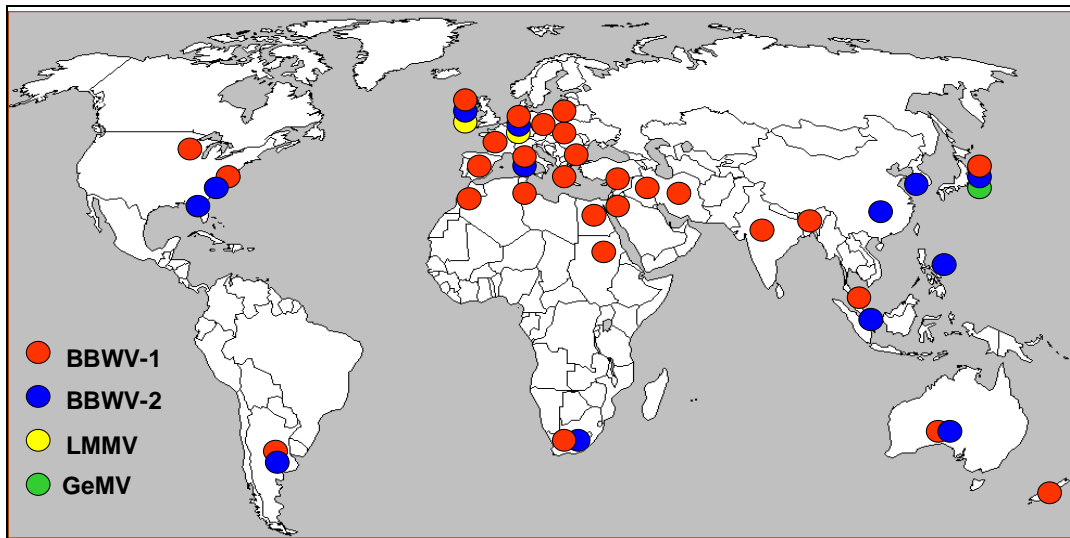


Figura 1.5. Distribución de las 4 especies virales del género Fabavirus: BBWV-1, BBWV-2, LMMV y GeMV

A pesar de la extensa área de distribución de los fabavirus, éstos presentan generalmente una baja incidencia y suelen estar asociados a otros virus (Conti *et al.*, 2000). No obstante, en algunas ocasiones han producido graves epidemias en diversos cultivos. En los años 60, se registraron en el estado de Nueva York graves necrosis en cultivos de espinaca y lechuga producidos por BBWV-1 (Schroeder & Provvidenti, 1970) que más tarde se observarían en Alemania (Weidemann *et al.*, 1975) y el sur de Francia (Weidemann *et al.*, 1975; Marrou *et al.*, 1976) causando la pérdida de la mayor parte de la producción. BBWV-2 es uno de los virus más comunes en cultivos de guisante, haba, colza y espinaca en el este de China (Tian *et al.*, 1982; Xu *et al.*, 1998). Se han encontrado cultivos de judía infectados con fabavirus en Estados Unidos, Italia, y China (Provvidenti, 1983; Lisa *et al.*, 1986). En Japón, se informó de los efectos severos del virus en cultivos de pepino dulce (*Solanum muricatum*), (Imoto, 1975). En varios países africanos y de Oriente Próximo, BBWV-1 ha causado pérdidas en haba que oscilan entre el 2 y el 25% de la cosecha (Makkouk *et al.*, 1990). En Francia, las pérdidas en alcachofa llegaron a ser del 20% (Migliori *et al.*, 1987). En la isla italiana de Linosa, se detectaron pérdidas de hasta un 80% en cultivos de haba (Rosciiglione & Cannizzaro, 1977). En España, se han registrado daños en cultivos de pimiento al aire libre en las provincias de Barcelona, Castellón, León, La Rioja, Murcia, Navarra, Valencia, Vizcaya y Zaragoza (Luis-Arteaga M., 1989, comunicación personal de los Drs. C. Jordá y J. M. Aramburu) en algunos casos con pérdidas considerables de cosecha.

El diagnóstico de los fabavirus se ha realizado tradicionalmente por medio de ensayos biológicos con una batería de plantas indicadoras y por observación de las partículas virales en el microscopio electrónico. Sin embargo, estos métodos son costosos

y no se pueden aplicar a gran escala. En la actualidad existen anticuerpos policlonales comerciales para BBWV-1 y BBWV-2, aunque estos últimos pueden presentar problemas de reacción cruzada con BBWV-1 (Comunicación personal del Dr. Lessemann).

El control de los fabavirus es complicado dado su amplio espectro de huéspedes naturales y su transmisibilidad no persistente por pulgones. Una investigación realizada en el estado de Nueva York demostró que la eliminación de una mala hierba, *Linaria vulgaris*, en una franja de 10 metros de anchura alrededor de parcelas comerciales de lechuga, reducía la incidencia BBWV-1 del 22 al 5 % (Rist & Lorbeer, 1989). En campos de haba de Australia, se ha recomendado el tratamiento de malas hierbas con herbicidas, el control de vectores con insecticidas y evitar sembrar en los períodos en que las plantas son más propensas a ser infectadas por pulgones (Fraser & Conroy, 1963). En Italia, se aconseja que en aquellas zonas donde se haya detectado la presencia del virus en cultivos de pimiento y haba, se evite el cultivo de éstas y otras especies hortícolas susceptibles en las cercanías del cultivo, además de eliminar las malas hierbas. En EEUU, se han obtenido variedades tolerantes de lechuga y variedades resistentes de espinaca y judía (Schroeder & Provvidenti, 1970; Provvidenti, 1983; Provvidenti *et al.*, 1984). Sin embargo, en estos trabajos no se ha especificado ni el aislado, ni la especie de fabavirus evaluado. Puesto que la resistencia y tolerancia suelen ser específicas, sería necesaria la caracterización genética de los aislados virales evaluados para poder determinar su validez en otros países.

Objetivos

1.6. OBJETIVOS

En el verano del 2001 se observaron en cultivos de pimiento de Benicarló, Castellón, síntomas de manchas cloróticas en los frutos que impedían su comercialización. Mediante la técnica ELISA se identificó la presencia de BBWV-1 del género *Fabavirus* en estas plantas. Este virus también se encontró en cultivos de pimiento de Barcelona, León, Logroño, Murcia, Pamplona, Valencia, Vizcaya y Zaragoza.

BBWV-1 pertenece al género *Fabavirus*, en el que se incluyen también BBWV-2, LMMV y se ha propuesto GeMV como nueva especie. Cada una de estas especies se puede diferenciar serológicamente. Se han descrito numerosos aislados de BBWV-1 y BBWV-2 (antes considerados la misma especie) por todo el mundo mientras que solo se han descrito tres aislados de LMMV (en Gran Bretaña y Alemania) y unos pocos aislados de GeMV en Japón. Los fabavirus son un grupo de virus muy poco estudiados a pesar de estar distribuidos por todo el mundo y afectar a cultivos económicamente importantes, tales como: lechuga, espinaca, legumbres (haba, judía, guisante, etc.), pimiento, tomate, cucurbitáceas (melón y pepino), etc. De hecho, se desconocen las diferencias biológicas (gama de huéspedes y vectores) y moleculares entre aislados de BBWV-1 y BBWV-2. Por ello, aunque en España sólo se ha detectado BBWV-1, en este trabajo se ha estudiado el conjunto de los fabavirus ya que es la única manera de abordar esta problemática. La información genética de los fabavirus disponible al comienzo de esta tesis consistía en la secuencia nucleotídica del genoma completo de 6 aislados de BBWV-2 y alrededor de un 30% del genoma de 3 aislados de BBWV-1, lo cual era insuficiente para tener una idea de la variabilidad genética de los fabavirus en el mundo. Al no disponer de ninguna información genética de los fabavirus en España, se consideró necesario la obtención de una secuencia completa de BBWV-1, así como secuencias parciales de un gran número de aislados (sobre todo españoles) para diseñar nuevos y mejores métodos de diagnóstico que tuviesen en cuenta la diversidad genética del virus y para poder evaluar la efectividad de las estrategias de control del virus, ya que ésta depende en gran medida de la diversidad genética del virus. Por otra parte, no se ha encontrado resistencia genética en la mayor parte de las especies cultivadas afectadas por los fabavirus y el control de los vectores usando prácticas agronómicas es complicado, por lo que resultaría interesante explorar nuevas estrategias de control.

Por todo ello, se abordaron los siguientes objetivos:

- Determinación de la secuencia completa de un aislado español de BBWV-1 y comparación con otros aislados del género *Fabavirus*.
- Estimación de la variabilidad genética del género *Fabavirus*.
- Desarrollo de nuevas técnicas moleculares de diagnóstico del género *Fabavirus*.
- Evaluación del efecto del BTH en el control de la infección viral.

Capítulo 2

Determinación de la secuencia completa de un aislado español del *virus de la marchitez del haba 1* (BBWV-1) y comparación con otros aislados del género *Fabavirus*

2.1. ANTECEDENTES

La determinación de la secuencia nucleotídica y la estrategia de expresión del genoma de un patógeno, es un paso fundamental para comprender numerosos aspectos de su biología, epidemiología y evolución, así como para el desarrollo de técnicas de detección y estrategias de control de la enfermedad.

Como ya se ha indicado en la introducción, el género *Fabavirus*, forma parte de la familia *Comoviridae* junto con los géneros *Comovirus* y *Nepovirus*. La organización genómica de estos virus presenta un patrón común. El genoma está constituido por dos moléculas de RNA monocatenario de polaridad positiva. El RNA 1 presenta una única pauta de lectura abierta (ORF) y codifica las proteínas que están implicadas en la replicación del RNA viral y en la expresión del genoma mediante el procesado de la poliproteína, mientras que el RNA 2 presenta dos ORFs y codifica las proteínas implicadas en la protección del genoma viral y su transporte, y una proteína posiblemente implicada en la replicación del RNA 2.

La poliproteína codificada en el RNA 1 se procesa y da lugar a 5 proteínas: el cofactor de proteasa (PRO-CO), una posible helicasa (HEL), la VPg, la proteasa (PRO) y finalmente, una RNA polimerasa RNA dependiente (POL), mientras que el procesamiento de la poliproteína expresada a partir del RNA 2 da como resultado las proteínas grande y pequeña de la cápsida (LCP y SCP), la proteína del movimiento (MP) (resultante de la segunda señal de traducción) y una proteína posiblemente implicada en la replicación del RNA 2 (resultante de la primera señal de traducción).

El género *Fabavirus* se encuentra formado por las especies BBWV-1, BBWV-2, LMMV y una posible nueva especie, GeMV. Antes de comenzar esta tesis no se disponía de la secuencia completa de ningún aislado de BBWV-1. Por aquel entonces, la información genética disponible de los fabavirus consistía en la secuencia nucleotídica del genoma completo de 6 aislados de BBWV-2: 2SG1 (Koh *et al.*, 2001), 2J2, 2J4, 2C2, 2Ph1 (Qi *et al.*, 2000a; Qi *et al.*, 2000b) y 2U1 (Ikegami *et al.*, 1998; Ikegami *et al.*, 2001); y la secuencia nucleotídica parcial del RNA2 del genoma de 3 aislados de BBWV-1: 1SG2, 1UK1 (Kobayashi *et al.*, 1999) y 1U2 (Kobayashi *et al.*, 1999) (Tabla 2.1). Más adelante, durante el desarrollo de esta tesis doctoral se publicó la secuencia completa del aislado 1U2 de BBWV-1 (Kobayashi *et al.*, 2003) y el aislado 3J12 de GeMV (Kobayashi *et al.*, 2005) (Tabla 2.1).

Por todo ello, se estableció como primer objetivo de este trabajo determinar la secuencia completa de un aislado español de BBWV-1 y compararla con otros aislados del género *Fabavirus*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Origen del aislado viral

El aislado viral caracterizado en este estudio, 1S1, se obtuvo en el año 2001 a partir de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) infectadas por BBWV-1 de manera natural en campos de Benicarló, provincia de Castellón. A partir de estas plantas se llevó a cabo la transmisión del virus en condiciones controladas en invernadero mediante inoculación mecánica a plantas de *Nicotiana megalosiphon* con el fin de disponer de material suficiente para la purificación de RNA total y de RNA de doble cadena (dsRNA) del virus.

Los aislados de fabavirus se renombraron utilizando la inicial del país del que proceden en lengua inglesa: España (S), Singapur (SG), Japón (J), Estados Unidos (U), Reino Unido (UK), China (C); y Filipinas (Ph); precedido de un número para indicar la especie a la que pertenecen: 1 para BBWV-1, 2 para BBWV-2, 3 para GeMV y 4 para LMMV, y seguido de un número para indicar los distintos aislados de un mismo país. Por ejemplo, el aislado 1S1 indicaría el aislado 1 obtenido en España de la especie BBWV-1 (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Aislados de Fabavirus analizados

Nombre asignado	Nombre original	Especie	Origen	Nº.Acceso GenBank
2SG1	ME	BBWV 2	Singapur	NC_003003, NC_003004
2J1	MB7	BBWV 2	Japón	AB013615, AB013616
2J2	IA	BBWV 2	Japón	AB051386, AB032403
2J4	IP	BBWV 2	Japón	AB023484, AB018698
2C2	B935	BBWV 2	China	AF149425, AJ132844
2Ph1	PMMV	BBWV 2	Filipinas	NC_003975, NC_003974
1U2	PV132	BBWV 1	EEUU	NC_005289, NC_005290
1UK1	PV176	BBWV1	Gran Bretaña	AB018703
1SG2	*	BBWV1	Singapur	AF225955

* nombre no especificado

2.2.2. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.2.2.1. Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó partiendo de 100 mg de material vegetal fresco (o 20 mg de material desecado) homogeneizándolo con 0.5ml de fenol/isotiocianato de guanidinio (TRIZOL®, Invitrogen) se mantuvo 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C para precipitar el material

insoluble. Al sobrenadante obtenido se le añadió 0.1 ml de cloroformo y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. El RNA presente en la fase acuosa se precipitó con 125 µl de isopropanol y 125 µl de 1,2 M NaCl. Tras incubar a temperatura ambiente 10 min como mínimo, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. El precipitado se lavó con 700 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min a 4°C. Finalmente, se resuspendió en 50 µl de H₂O tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) conservándose a -80°C hasta su utilización.

2.2.2.2. Extracción de RNA de doble cadena

El dsRNA, generado como intermediario replicativo del genoma viral, se purificó mediante cromatografía en columna de celulosa no iónica (CF-11, Whatman) en presencia de 16% de etanol (Moreno *et al.*, 1990). Para ello, se trituraron 10 g de hoja en nitrógeno líquido tras lo que se le añadieron 12 ml de STE 2X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM NaCl, 1 mM de etilendiaminotetracético, EDTA), 1.71 ml de dodecil sulfato sódico (SDS) 10% y 15.5 ml de fenol saturado con STE, se mezcló durante 20 min en un agitador orbital a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm a la misma temperatura. Se recogió la fase acuosa y se ajustó a una concentración final del 16% de etanol. Esta mezcla se pasó a través de prefiltros de fibra de vidrio de 0.22 µm (Millipore). El dsRNA se purificó mediante cromatografía utilizando columnas con 2.5 g de celulosa no iónica (CF-11, Whatman) estabilizada con STE 16% etanol. El dsRNA fijado en la celulosa se eluyó con 10 ml de STE que se precipitó con 0.5 ml de acetato sódico 3M pH 5.5 y 3 volúmenes de etanol absoluto incubándose durante 3 h a -20°C o 30 min a -80°C, tras lo que se centrifugó a 11000 rpm durante 30 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 400 µl de STE y se sometió a una segunda precipitación añadiendo 40 µl de acetato sódico 3M pH 5.5 y 1 ml de etanol absoluto. Se incubó durante 3 h a -20°C o 30 min a -80°C y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min a 4°C. Finalmente el precipitado se resuspendió en 20 µl de H₂O estéril.

2.2.3. Retrotranscripción y amplificación de DNAs complementarios (cDNAs) al RNA genómico del aislado 1S1 de BBWV-1

Se preparó una genoteca de cDNAs del genoma viral usando cebadores al azar (Froussard, 1992) y dsRNA. Para eliminar el DNA presente en la muestra, se tomaron 5 µl de dsRNA en un volumen total de 10 µl y se trataron con 0.3 µl de DNase (2 U/µl de Ambion), 2 µl de first strand buffer 5x (Invitrogen), 1 µl de 100 mM dithiothreitol (DTT) llevando la reacción a un volumen final de 20 µl de H₂O-DEPC. Se incubó durante 20 min a 37°C y posteriormente, para inactivar el enzima se incubó a 100°C durante 10 min. Los 10 µl se utilizaron directamente para llevar a cabo la síntesis de la primera hebra de cDNA mediante retrotranscripción a 42°C durante 50 min en un volumen final de 20 µl que contenía, 2 µl de first strand buffer 5x (Invitrogen), 1 µl de DTT (0,1M), 1.3 µl de dNTPs (10 mM), 0.5 µl de RNase OUTTM (40U/µl, Invitrogen), 0.5 µl de SuperscriptTM (200U/µl, Invitrogen) y 2 µl de un iniciador universal (0.1 µg/µl) que contenía un hexámero al azar en

su extremo 3' (PAN, 5' -GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNNNNNN - 3'). Para rellenar los huecos del cDNA amplificado y obtener la segunda hebra de cDNA, se trabajó en un volumen final de 50 µl, se tomaron 12.5 µl de la RT y se añadieron 2 µl de Klenow (4U/µl, Invitrogen), 5 µl de tampón Klenow 10X, 0.5 µl de RNase H (Invitrogen) y 30 µl de H₂O mili Q estéril. Tras 30 min de incubación a 37°C, la solución se purificó a través de una minicolumna GFX PCR DNA Purification Kit (Amershan) para eliminar el exceso de iniciador PAN y la muestra se eluyó en 30 µl de tampón de elución.

Finalmente, para la amplificación de los fragmentos de DNA sintetizados al azar se realizó una PCR utilizando un iniciador universal PA que presentaba la misma secuencia que el iniciador PAN pero al que se le había eliminado el hexámero, (PA, 5' - GCCGGAGCTCTGCAGAATTC - 3'). La reacción contenía 0.8 µl de iniciador PA (0.1 µg/µl), 2 µl de tampón 10X PCR High Fidelity, 0.6 µl de MgCl₂ (50mM), 0.4 µl de dNTPs (10mM), 0.1 µl de Taq polimerasa (5U/µl, Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación consistieron en: 1 ciclo a 94°C durante 5 min, 40 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min, 72°C durante 3 minutos y un último paso de 1 ciclo de 72°C durante 10 min. Una vez se realizó la PCR, se analizaron 5 µl de cada producto en un gel de agarosa al 2% (pv-1) utilizando tampón de electroforesis TAE 1X (40mM Tris-acetate pH 8.3, 1mM EDTA) a 100 V durante 25 min.

Los productos de PCR obtenidos se ligaron y clonaron en el vector pCR 2.1 (Invitrogen) según procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). La secuencia de los clones se determinó utilizando un secuenciador automático, ABI PRISM DNA Sequencer 377(PE Biosystems) y los iniciadores T7 (5' - ATTATGCTGAGTGATATCCC - 3') y SP6 (5' - TTCTATAGTGTCACCTAAAT - 3') presentes en el plásmido pCR 2.1, de manera que se obtuvieron las secuencias en ambos sentidos. La secuencia consenso se obtuvo a partir de al menos dos clones independientes de cDNA solapantes.

A partir de la secuencia de los clones de cDNA obtenidos anteriormente se diseñaron iniciadores específicos que se utilizaron para rellenar los huecos comprendidos entre dichos clones mediante RT-PCR y obtener la secuencia completa del genoma del virus. Para obtener los cDNAs, en cada una de las reacciones se desnaturalizó 1µl del RNA total durante 5min, y se retrotranscribió a 42°C durante 50 min en una mezcla de reacción que contenía 2 µl de 5X first strand buffer (Invitrogen), 1 µl de 1M DTT, 0.2 µl de cada dNTP (10mM), 0.2 µl de un iniciador oligo (dT)₁₇, (5'- CCGGATCCTCTAGAGCGGCCGC TTTTTTTTTTTTTTTTTT V -3') (10µM) donde la V puede ser una A, C o G, 0.1 µl de transcriptasa reversa Superscript™ (200 U/µl, Invitrogen) y 0.1 µl de RNase OUT™ (40U/µl, Invitrogen). El cDNA obtenido se amplificó mediante PCR utilizando iniciadores específicos diseñados a partir de las secuencias de los distintos clones de cDNA obtenidos anteriormente.

Como el genoma de todos los virus pertenecientes a la familia *Comoviridae* presentan el extremo 3' poliadeninado, para obtener la secuencia de los extremos 3' del RNA 1 y del RNA 2, se realizó una retrotranscripción para obtener los cDNAs utilizando un

iniciador oligo (dT)₁₇ y posteriormente una amplificación mediante PCR utilizando el mismo iniciador y otros internos específicos para cada uno de los RNAs.

Para la obtención de los extremos 5' del RNA1 y del RNA2 se utilizó la técnica 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen). Esta técnica consiste en la síntesis de una primera hebra de cDNA utilizando un iniciador interno específico próximo al extremo 5'. Una vez obtenido el cDNA, se degrada el RNAm utilizado como molde y se añade una cola homopolimérica dCTP al extremo 3' del cDNA amplificado. A ésta cola dCTP se le anilla un iniciador universal (suministrado por el kit) que junto a otro iniciador interno localizado dentro de la molécula de cDNA obtenida amplifican el cDNA mediante PCR (PCR anidada). Finalmente, se realiza una reamplificación del cDNA utilizando un tercer iniciador interno localizado dentro de la nueva molécula sintetizada y otro iniciador (también suministrado por el kit) que, a su vez, anilla con el iniciador universal.

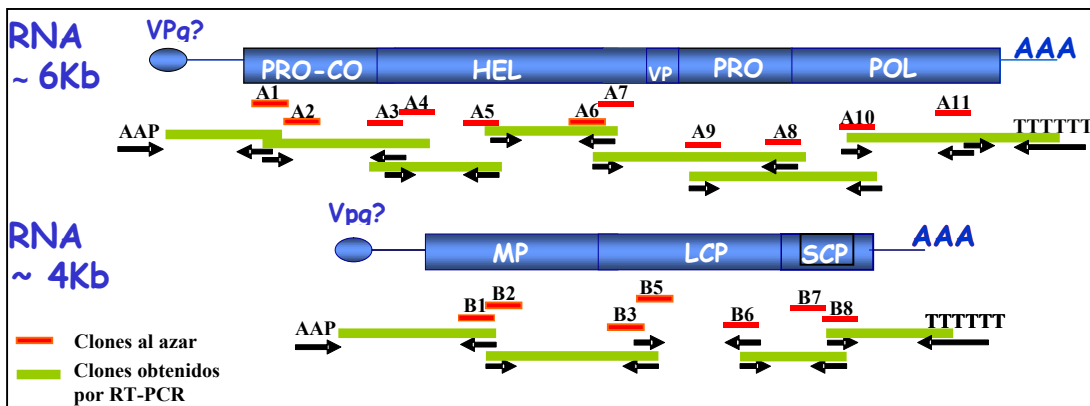


Figura 2.1. Representación esquemática de la estrategia utilizada para la secuenciación del genoma del aislado 1S1 de BBBW 1. Las flechas simbolizan los iniciadores empleados así como su orientación; las líneas horizontales (verde) representan los fragmentos amplificados; las líneas horizontales (naranja) representan los clones obtenidos a partir de la genoteca de clones al azar.

2.2.4. Análisis de las secuencias

La búsqueda de las hipotéticos ORFs se llevó a cabo utilizando el programa SIXPACK del paquete EMBOSS (<http://ngfnblast.gbfcde/EMBOSS/>).

Para realizar los alineamientos múltiples se empleó el programa CLUSTAL-W versión 1.83 con los parámetros por defecto (Thompson *et al.*, 1994).

El programa MEGA versión 3.1 (Kumar *et al.*, 2001), se utilizó para el cálculo de las distancias nucleotídicas y aminoacídicas según el modelo de Kimura 2-parámetros.

Para la obtención de las posibles conformaciones de estructura secundaria se utilizó el programa MANIFOLD (Zuker, 2003).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Secuencia nucleotídica y organización genómica del RNA1 y del RNA2 del aislado 1S1 de BBWV-1

La secuencia nucleotídica completa del RNA1 del aislado 1S1 de BBWV-1 (depositada en el GenBank con el número de acceso AY781172), consta de 5.815 nt excluyendo la cola poli A, 2 nt menos que la del aislado 1U2 de BBWV-1 como resultado de la deleción de 3 nt en la región 5' no codificante (5'NCR) y una inserción en la región 3' no codificante (3'NCR). La secuencia nucleotídica completa del RNA2 del aislado 1S1 de BBWV-1 depositada en el GenBank con el número de acceso AY78117, consta de 3.432 nt excluyendo la cola poli A, 14 nt más corta que la del RNA2 del aislado 1U2 de BBWV-1. El alineamiento de ambas secuencias muestra varias inserciones y deleciones en las zonas 5' y 3' NCR que abarcan de 1 a 8 nt, y una deleción de 3 nt en la zona codificante del aislado 1S1 que permite mantener la pauta de lectura y que dio como resultado un aminoácido menos que en el aislado 1U2. La identidad nucleotídica entre 1S1 y 1U2 fue baja (81.7 y 81.2% para RNA1 y RNA2, respectivamente).

El único marco de lectura abierto encontrado en el RNA1 del aislado 1S1 empieza con un codón AUG en la posición 197 (¹⁹⁷AUG) y termina con un codón de parada en la posición 5.723 (⁵⁷²³UAA). El alineamiento de las secuencias de BBWV-1 de los aislados 1S1 y 1U2 y de los 6 aislados de BBWV-2 secuenciados hasta el momento mostró una secuencia consenso flanqueando al codón de iniciación AUG (UAAAAUGGA) presente en todos los miembros del género *Fabavirus*. Este motivo es similar al encontrado en plantas superiores (AA(C/A)AAUGGC), el cual fue propuesto como un motivo de señal de iniciación de la traducción. La ORF del RNA2 empieza en la posición 219, (²¹⁹AUG) y termina en la posición 3.270 (³²⁷⁰UAG), aunque el AUG encontrado en la posición 489, muestra un contexto más parecido al de la señal de iniciación de la traducción en plantas superiores (Joshi *et al.*, 1997). Estos dos codones AUG fueron también encontrados en el aislado 1U2 de BBWV-1, en los seis aislados de BBWV-2, y en todos los comovirus (Goldbach & Wellink, 1996). En *Cowpea mosaic virus* (CPMV), se demostró que la traducción del RNA2 se inicia en los dos codones AUG obteniéndose dos polipéptidos que se solapan en su extremo C-terminal (Goldbach & Wellink, 1996).

El polipéptido potencialmente codificado por el RNA1 de BBWV-1 del aislado 1S1 consta de 1.842 aa, con una masa molecular estimada de 205.939 Da. La traducción *in vitro* demostró que el polipéptido codificado por el RNA1 de CPMV era proteolíticamente procesado y los sitios de corte fueron identificados mediante secuenciación aminoacídica (Goldbach & Wellink, 1996). La comparación con la secuencia de CPMV, permite predecir que los sitios de corte del polipéptido homólogo del aislado 1S1 de BBWV-1 se encontrarían en las posiciones aminoacídicas 317, 908, 934 y 1143, obteniéndose cinco proteínas de 35, 66, 3, 23 y 79 kDa, respectivamente (Figura 2.2). La proteína de 35 kDa

posee el motivo del cofactor de proteasa (PRO-CO), FX₂₇LX₂₁LX₁E (las letras representan los residuos conservados, la X representa cualquier residuo y los subíndices hacen referencia al número de residuos) característico de como y nepovirus, excepto que la F ha sido reemplazada por un residuo I en los aislados 1U2 y 1S1 y por un residuo M en los seis aislados de BBWV-2. Se cree que este motivo actúa como regulador durante el proceso proteolítico del polipéptido de CPMV (Vos *et al.*, 1998). La proteína de 66 kDa contiene tres motivos conservados de la superfamilia III de las helicasas (HEL): A (E/DPZX₃XGX₂GXGKS/T), B (QXZ₂UZDD), y C (KGX₂OXSXZUZXSTN) donde O, U y Z representan residuos aromáticos, residuos hidrofóbicos y residuos alifáticos, respectivamente, pero donde el primer residuo E del motivo A ha sido reemplazado por un residuo T en los dos aislados de BBWV-1 y por un residuo S en los seis aislados de BBWV-2. Esta proteína podría ser una NTPasa involucrada en el desenrollamiento de la doble hebra de RNA durante los procesos de replicación y traducción (Kadaré & Haenni, 1997). La proteína de 3 kDa presenta la secuencia consenso E/DX₃YX₃NX₄₋₅R de la proteína VPg que se encuentra unida al genoma de todos los miembros de la familia *Comoviridae* (Mayo & Fritsch, 1994). La proteína de 23 kDa contiene el motivo HX_nE/DX₂CGX_nGX_nGX_nHX_nG, (donde, X_n hace referencia a un número indeterminado de aa) característico de las cisteín-proteasas virales (PRO) utilizado en el procesamiento de la poliproteína (Koonin & Dolja, 1993). Finalmente, la proteína de 79 kDa contiene tres motivos: IV (DX₃ZD), V (T/SGX₃TX₃NT/SZXXZ) y VI (ZX₂GDDXZ), característicos de las RNA polimerasas RNA dependientes (POL) de los virus de RNA de polaridad positiva (Koonin & Dolja, 1993).

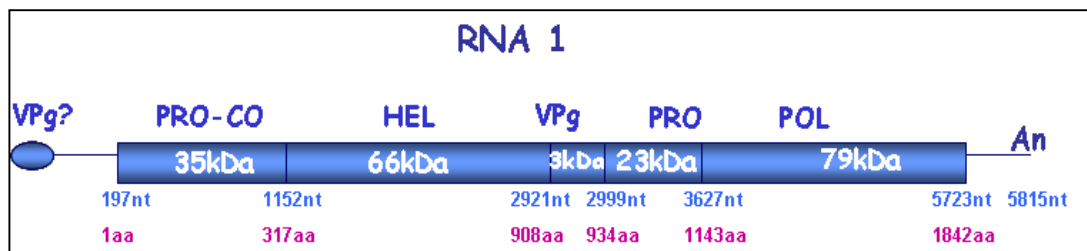


Figura 2.2. Organización genómica del RNA 1 del aislado 1S1 de BBWV-1. Las líneas horizontales indican la secuencia no codificante y los rectángulos representan la poliproteína codificada a partir de la ORF. Las líneas verticales perpendiculares a los rectángulos indican los hipotéticos sitios de corte y las proteínas resultantes son: PRO-CO, cofactor de proteasa; HEL, helicasa; VPg, proteína unida al genoma viral; PRO, proteasa; POL, RNA polimerasa RNA dependiente. An indica la cola poliA. Los números en color azul indican la posición nucleotídica de los sitios de corte y los sitios en que la poliproteína empieza y acaba. Los números en color rosa indican la posición aminoacídica de los sitios de corte y el principio y final de la poliproteína. 5815 es el número total de nt que presenta el RNA 1.

El polipéptido potencialmente codificado por el RNA2 consta de 1017aa y una masa estimada de 113.888 Da. Al igual que para el RNA1, por homología con CPMV, se predijo que los sitios de corte del mismo se encontraban en las posiciones aminoacídicas 418 y

820, dando lugar a tres proteínas de 47, 44 y 22 kDa, respectivamente (Figura 2.3). La proteína de 47 kDa contiene un motivo conservado LXD_X₅₀₋₇₀G propio de las proteínas virales de movimiento (MP) de la superfamilia '30K' (Melcher, 2000). Las proteínas de 44 y 22 kDa corresponderían a las proteínas grande (LCP) y pequeña (SCP) de la cápsida de los aislados 2Ph1 y 2J2 de BBWV-2, cuyas secuencias han sido parcialmente determinadas por secuenciación aminoacídica directa (Kobayashi *et al.*, 1999; Kuroda *et al.*, 2000; Ikegami *et al.*, 2001).

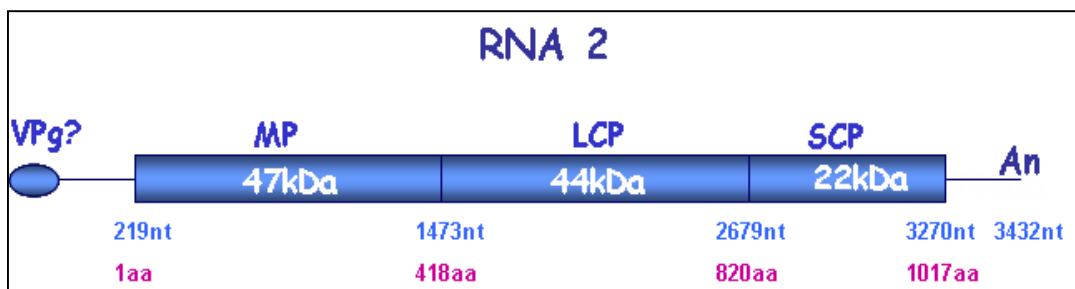


Figura 2.3. Organización genómica del RNA 2 del aislado 1S1 de BBWV-1. Las líneas horizontales indican la secuencia no codificante y los rectángulos representan la poliproteína codificada a partir de la ORF. Las líneas verticales perpendiculares a los rectángulos indican los hipotéticos sitios de corte y las proteínas resultantes son: MP, proteína de movimiento; LCP, proteína grande de la cápsida; SCP, proteína pequeña de la cápsida. An indica la cola poliA. Los números en azul indican la posición nucleotídica de los sitios de corte y los sitios en que la poliproteína empieza y acaba. Los números en rosa indican la posición aminoacídica de los sitios de corte y el principio y final de la poliproteína. 3432 es el número total de nt que presenta el RNA 2.

La identidad aminoacídica entre los polipéptidos completos codificados por el RNA1 y el RNA2 de los aislados 1S1 y 1U2 de BBWV-1 fue del 91.9% y del 93.53%, respectivamente, mientras que, las identidades aminoacídicas con respecto a los polipéptidos homólogos de los aislados de BBWV-2 oscilaron entre un 56.2% y un 61.6%, aunque la identidad varió para las diferentes proteínas resultantes de la proteólisis (Tabla 2.2). La identidad aminoacídica más baja se encontró en PRO-CO siendo de un 86.8% entre los aislados 1S1 y 1U2 de BBWV-1 y oscilando entre un 40.6 y 42.5% entre el aislado 1S1 y los diferentes aislados de BBWV-2. La VPg fue la proteína más conservada entre los aislados de BBWV-1, con tan solo la sustitución de un aminoácido, pero la identidad de la VPg del aislado 1S1 con la de los aislados de BBWV-2 fue baja oscilando entre el 48.0 y 52%. La mayor identidad aa entre BBWV-1 y BBWV-2 se dió en la región POL (67.1 - 67.5%).

Las regiones no codificantes (NCRs) del aislado 1S1 son ricas en A-U (alrededor de un 66%), los tamaños obtenidos para la región 5'NCR fueron de 196 y 218 nt para el RNA1 y el RNA2, respectivamente; y de 96 y 162 nt para el extremo 3'NCR. Se encontró una elevada identidad nucleotídica (74.6%) entre los 5'NCRs del RNA1 y del RNA2 del aislado 1S1 de BBWV-1, similar a la encontrada para el aislado 1U2 de BBWV-1 y para los diferentes aislados de BBWV-2. La identidad entre los 3'NCRs de los dos RNAs del aislado

1S1 (69.6%) fue menor que la encontrada para el aislado 1U2 de BBWV-1 (89%) y el aislado 2Sg1 de BBWV-2 (86.5%), pero mayor que la encontrada en otros aislados de BBWV-2 (oscilaron entre un 46.2 y un 51.4%). La comparación del aislado 1S1 de BBWV-1 con el aislado 1U2 de BBWV-1 y con los aislados de BBWV-2 (Tabla 2.3) mostró que: A) Las identidades nucleotídicas entre los 5'NCRs o 3'NCRs fueron mayores para el RNA1 que para el RNA2; B) Dentro de cada uno de los RNAs, los valores de identidad fueron mayores para el 5'NCR que para el 3'NCR; C) Las identidades entre 1S1 y 1U2 fueron mayores que las existentes entre 1S1 y los aislados de BBWV-2 para los 3'NCR de ambos RNAs y para el 5'NCR del RNA1, no siendo así para el 5'NCR del RNA2, donde los valores de identidad fueron similares tanto al compararse con 1U2 como con los aislados de BBWV-2.

Tabla 2.2. Identidad nucleotídica y aminoacídica del aislado 1S1 respecto a otros aislados del género *Fabavirus*.

Segmento	Region ^a	Seq ^b	BBWV-1			BBWV-2			
			1U2	2Ph1	2Sg1	2J2	2J1	2J4	2C2
RNA1	5' NCR	nt	89.8	80.2	78.1	79.7	80.2	78.7	79.7
	3' NCR	nt	95.6	61.2	55.4	61.2	60.0	59.5	60.0
	PRO-CO	aa	86.8	42.1	40.6	42.5	42.1	40.9	42.1
	HEL	aa	93.7	66.7	66.8	66.8	66.8	67.2	66.8
	VPg	aa	96.0	51.0	48.0	52.0	52.0	52.0	52.0
	PRO	aa	90.9	58.4	57.4	57.4	58.0	58.9	57.9
	POL	aa	93.3	67.1	67.2	67.1	67.2	67.2	67.5
RNA2	5' NCR	nt	72.0	71.4	72.2	72.6	71.4	71.2	69.3
	3' NCR	nt	76.4	54.5	41.6	55.2	55.3	51.0	54.6
	MP	aa	90.9	52.8	52.8	52.3	52.3	52.8	53.0
	LCP	aa	95.3	58.7	62.9	64.7	64.2	63.7	63.9
	SCP	aa	94.4	58.4	58.9	58.9	58.9	58.9	57.9

^a Regiones genómicas: regiones no codificantes 5' y 3' (NCR), cofactor de proteasa (PRO-CO), helicasa (HEL), proteína unida al genoma viral (VPg); proteasa (PRO), RNA polimerasa dependiente de RNA (POL), proteína de movimiento (MP); proteína grande de la cápsida (LCP), y proteína pequeña de la cápsida (SCP).

^b Seq, tipo de secuencia: nucleotídica (nt) o aminoacídica (aa)

La estructura secundaria de menor energía libre obtenida con el programa MANIFOLD (Zuker, 2003) mostró que los primeros 23 nt de ambos RNAs formaban un bucle que se mantenía en todos los aislados de BBWV-1 y BBWV-2 (Figura 2.5). Se sabe que un bucle similar conservado en todos los comovirus actúa como señal de replicación (Goldbach & Wellink, 1996).

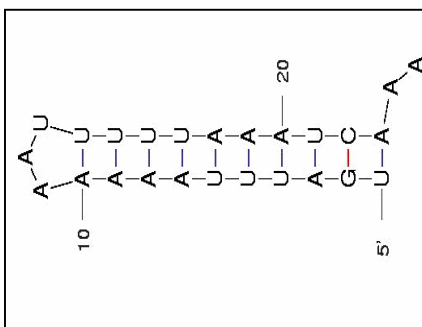


Figura 2.5. Estructura secundaria de menor energía libre obtenida para el extremo 5' del aislado 1S1 de BBWV-1.

El alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a la 5'NCR mostró pequeñas zonas altamente conservadas tanto en el RNA1 como en el RNA2 de los aislados de BBWV-1 y BBWV-2 (Figura 2.4). Éstas abarcan las posiciones 1-39, 45-55, 60-70 y 114-157 del RNA1 y las posiciones 1-39, 45-47, y 117-160 del RNA2 del aislado 1S1, y contiene el motivo AAACAGCUUUC repetido en las posiciones 23, 45, 61 y 79 del RNA1 y las posiciones 23, 45, 56 y 66 del RNA2. Además, al comparar la especie BBWV-1 con la especie BBWV-2, ésta última presentó una inserción de 15 nt en la posición 43 del RNA1, que se encontraba conservada en todos los aislados e incluía una copia del motivo AAACAGCUUUC (datos no mostrados). Las zonas de la secuencia que estaban conservadas incluyeron diferentes motivos que podrían unirse a factores celulares implicados en la transcripción como la familia Dof perteneciente a los factores de transcripción de plantas (Figura 2.4.) (Yanagisawa & Schmidt, 1999).

Estos resultados sugieren que las secuencias conservadas 5'NCR del aislado 1S1 pueden jugar un papel importante en la replicación del RNA viral (Lai, 1998). También existen evidencias de que diversos factores del huésped son usados en la replicación y transcripción de numerosos virus de RNA (Lai, 1998). El 3'NCR resultó estar menos conservado que el 5' NCR a nivel de género, sin embargo, también se observaron pequeñas zonas conservadas dentro de cada especie viral, algunas de las cuales contienen motivos conservados reconocidos por factores de transcripción. La señal de poliadenilación de los eucariotas AAUAAA (Nevins, 1983) se encontró en todos los aislados de BBWV-1 y BBWV-2, pero sólo en la región 3'NCR del RNA2. Los motivos conservados encontrados en los NCRs de los aislados de BBWV-1 y BBWV-2 de este trabajo podrían suministrar el primer mapa con las señales de replicación de los fabavirus y servir como guía para estudios de replicación e interacción proteína-RNA.

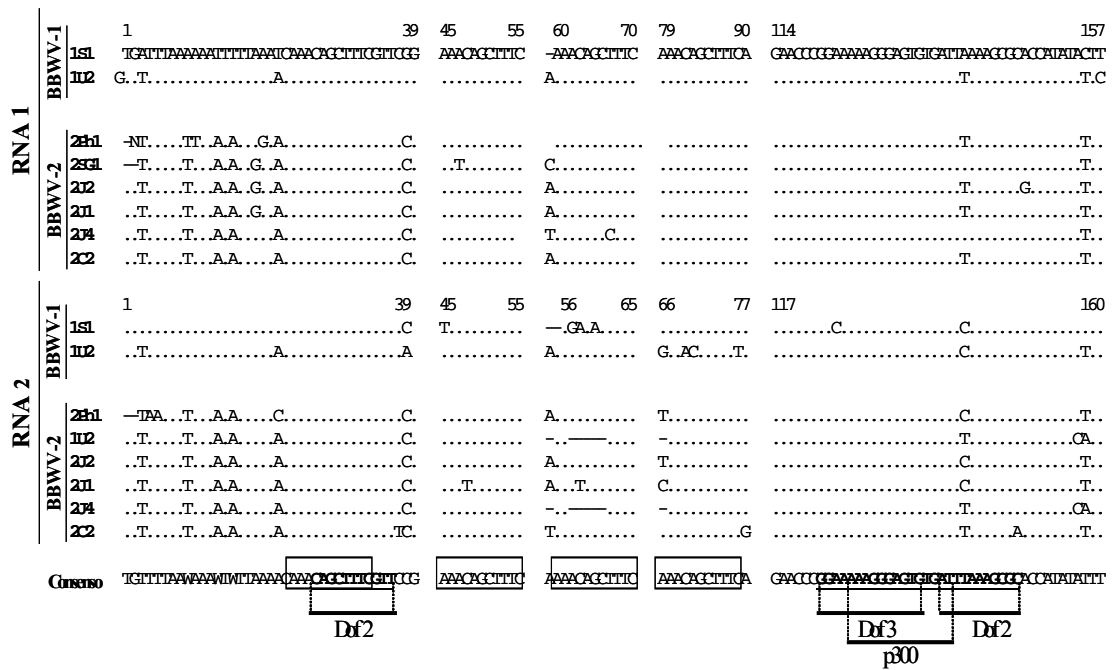


Figura 2.4. Alineamiento de la región 5' no codificante (NCRs) del RNA 1 y del RNA2 de los aislados 1S1 y 1U2 de BBWV-1 y de los aislados 2Ph1, 2Sg1, 2J2, 2J1, 2J4 y 2C2 de BBWV-2. Se muestran únicamente las regiones conservadas. Los números muestran la primera y la última posición nucleotídica de cada región, correspondiente al RNA 1 o RNA 2 del aislado 1S1 de BBWV-1. Los puntos indican identidad nucleotídica y los guiones indican huecos introducidos para optimizar el alineamiento. En la parte inferior se muestra la secuencia consenso. Los recuadros corresponden a los fragmentos de secuencia que se repiten en diferentes posiciones. Las secuencias reconocidas por los factores de transcripción (Dof 2, Dof 3 y p300) se representan en **negrita** y subrayados.

Capítulo 3

Estimación de la variabilidad genética del género *Fabavirus*

3.1. ANTECEDENTES

El estudio de la estructura poblacional y variación genética de los virus, así como los mecanismos evolutivos implicados es importante por diversas razones: A) Es necesario para el diseño de estrategias de control más eficaces y duraderas (Mc Donald & Linde, 2002). Por ejemplo, para evaluar variedades con genes de resistencia (incorporados por mejora genética o ingeniería genética) hemos de tener en cuenta la diversidad genética del virus para seleccionar aquellas que puedan ser efectivas con el mayor espectro de genotipos virales o muestren una mayor robustez genética (sea más difícil de ser superada por mutaciones del genoma viral) en la región en la que se va a introducir la variedad; B) Permite reconstruir la historia epidemiológica del virus, concretamente el origen y sus vías de dispersión, así como los factores que promueven la emergencia de nuevas virosis; C) Es un paso fundamental para obtener métodos que permitan la detección rápida y fiable de todos los aislados del virus, así como métodos que puedan discriminar aislados divergentes.

Los mecanismos que determinan la estructura y diversidad genética de las poblaciones de todos los organismos son: mutación, recombinación, selección, deriva genética y flujo genético. Los virus con genoma de RNA son capaces de generar una gran cantidad de variación genética y experimentar una rápida evolución debido a su rápida replicación, la generación de poblaciones de gran tamaño y la elevada tasa de mutación asociada a la replicación del RNA como consecuencia de la falta de actividad de corrección de las polimerasas de RNA (Holland *et al.*, 1982). En algunos virus, se pueden generar rápidamente nuevas variantes genómicas por intercambio genético (recombinación y reordenamiento de segmentos genómicos en virus multipartitos) entre variantes virales divergentes que coinfectan una planta. La distribución en las poblaciones virales de las variantes genéticas generadas por mutación o intercambio genético vendrán determinadas por la selección natural, deriva genética y flujo genético o migración (Moya *et al.*, 2004). La Selección es un proceso direccional por el que las variantes que se reproducen más eficazmente en un cierto ambiente incrementarán su frecuencia en la población (selección positiva) mientras que las menos eficaces disminuirán su frecuencia (selección negativa). La deriva genética es la variación aleatoria de la frecuencia de las variantes genéticas debido a que sólo una proporción de la población viral dará lugar a una progenie. El efecto de este proceso es muy importante en casos de reducción drástica de la población viral (cuellos de botella) que pueden estar asociados al movimiento del virus entre células de la planta o en la transmisión a nuevos huéspedes (Sacristán *et al.*, 2003; Li & Roossinck, 2004; Ali *et al.*, 2006; García-Arenal & Fraile, 2008). El flujo genético dentro y entre poblaciones virales uniformiza la distribución de la estructura genética, de manera que cuando la tasa de migración es baja se favorece la divergencia entre poblaciones. Éste depende de diversos factores como el modo de transmisión, gama de huéspedes, área de distribución, existencia de barreras físicas entre poblaciones, etc.

Aunque, en los últimos años ha aumentado el interés por esta temática (Roossinck, 1997;García-Arenal *et al.*, 2001b;Roossinck, 2003), todavía queda por estudiar la variabilidad de un gran número de virus vegetales, entre los que se incluye el género *Fabavirus*. Al comienzo de este trabajo, la información genética disponible de este género viral estaba formada por la secuencia nucleotídica del genoma completo de un aislado de BBWV-1 procedente de EEUU (Kobayashi *et al.*, 2003), de un aislado de BBWV-1 de España (Capítulo 2 de esta tesis); de seis aislados de BBWV-2 procedentes de China, Filipinas, Japón y Singapur; y de un aislado de Japón, que se ha propuesto como una nueva especie denominada GeMV (Kobayashi *et al.*, 2005); así como, la secuencia parcial de 3 aislados de BBWV-1 de Gran Bretaña, Japón y Singapur; 14 aislados de BBWV-2 de EEUU, China, Taiwán, Japón y Corea (Kobayashi *et al.*, 1999) y otro aislado japonés de GeMV (Tabla 3.1). Hasta la fecha, no se dispone de ninguna secuencia de LMMV, la otra especie reconocida del género *Fabavirus*. En este trabajo se ha determinado la secuencia nucleotídica de cuatro regiones genómicas de aislados de BBWV-1 y BBWV-2 procedentes de distintos países (Tabla 3.1) y se han comparado con las secuencias de los aislados antes mencionados para estimar la variación genética y estudiar los factores evolutivos implicados.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Aislados virales

Se analizó la secuencia nucleotídica de 63 aislados del género *Fabavirus* de diversa procedencia geográfica y de distintos huéspedes (Tabla 3.1). La secuencia de 25 aislados se obtuvo de la base de datos del GenBank (número de acceso indicado en la Tabla 3.1), mientras que el resto de los aislados se amplificaron por RT-PCR para determinar su secuencia. Se analizaron 30 aislados de BBWV-1 (14 procedentes de España); 28 aislados de BBWV-2; 3 de LMMV (los únicos encontrados hasta la fecha en el mundo); y 2 de GeMV. Todos los aislados se renombraron utilizando la inicial del país del que proceden en lengua inglesa: España (S), Singapur (SG), Japón (J), Alemania (G), Italia (I), Estados Unidos (U), Siria (SY), Sudáfrica (SA), Líbano (L), Israel (Is), República Checa (CR), Holanda (N), Reino Unido (UK), Corea (K) y Bulgaria (B); seguido de un número para indicar los distintos aislados de un mismo país, y precedido de un número para indicar la especie a la que pertenecen: 1 para BBWV-1, 2 para BBWV-2, 3 para GeMV y 4 para LMMV. El material vegetal infectado fue donado amablemente por distintos investigadores o comprado a las colecciones ATCC, DSMZ y NIAS.

Tabla 3.1. Aislados analizados en este trabajo

Especie	Nombre	Nombre original	Huésped original	Año	Origen geográfico	Proveedor / GenBank	
BBWV-1	1B1	B41/99	<i>Capsicum annuum</i>	2000	Bulgaria	Dra. Kostova	
	1B2	NBIMCC 2350	<i>Capsicum annuum</i>	2000	Bulgaria	Drs. Yordanova y Hristova	
	1CR3	480/4	<i>Capsicum chinense</i>	2004	Chequia	Dr. Cervená	
	1CR5	480/3	<i>Capsicum chinense</i>	2004	Chequia	Dr. Cervená	
	1G11	L2505	<i>Streptocarpus</i>	1999	Alemania	Dr. Lesseman	
	1G14	L2194	<i>Verbena</i>	1998	Alemania	Dr. Lesseman	
	1G15	L2567	<i>Calibrachoa</i>	2000	Alemania	Dr. Lesseman	
	1I6	NRSV		1996	Italia	Dr. Milne	
	1J14		<i>Delphinium</i>		Japón	AB110537	
	1L1	L627	<i>Vicia faba</i>	1988	Libano	Drs. Lesseman y Makkou	
	1N2	L2506	<i>Streptocarpus</i>	1999	Holanda	Dr. Lesseman	
	1NZ1	05/54	<i>Tropaeolum majus</i>	2004	Nueva Zelanda	Dr. Ochoa	
	1S1	Ben	<i>Capsicum annuum</i>	2001	España, Castellón	AY781172, AY781171	
	1S7	P19-03	<i>Capsicum annuum</i>	2003	España, León	Dra. Luis Arteaga	
	1S10	P35-02	<i>Capsicum annuum</i>	2002	España, León	Dra. Luis Arteaga	
	1S11	P41-02	<i>Capsicum annuum</i>	2003	España, Zaragoza	Dra. Luis Arteaga	
	1S13	P24-01	<i>Capsicum annuum</i>	2002	España, Zaragoza	Dra. Luis Arteaga	
	1S16	P20-02	<i>Capsicum annuum</i>	2003	España, Zaragoza	Dra. Luis Arteaga	
	1S20	P5-03	<i>Capsicum annuum</i>	2003	España, León	Dra. Luis Arteaga	
	1S27	P39-95	<i>Capsicum annuum</i>	1995	España, León	Dra. Luis Arteaga	
	1S28	P26-01	<i>Capsicum annuum</i>	2001	España, Navarra	Dra. Luis Arteaga	
	1S33	P5-02	<i>Capsicum annuum</i>	2001	España, Zaragoza	Dra. Luis Arteaga	
	1S39	S39	<i>Capsicum annuum</i>	2005	España, Barcelona	Dr. Aramburu	
	1S45	S45	<i>Capsicum annuum</i>	2005	España, Valencia	J. Serra	
	1S46	S46	<i>Capsicum annuum</i>	2005	España, Valencia	J. Serra	
	1S47	S47	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2007	España, Barcelona	Semillas Fitó, Dra. Luis Arteaga	
	1SG2	*			Singapur	AF225955	
	1SY1	PV0548, SV-3-88	<i>Vicia faba</i>		Siría	DSMZ	
	1U2	PV132	<i>Spinacea oleracea</i>	1972	EEUU, Nueva York	NC_005289, NC_005290	
	1UK1	PV176	<i>Tropaeolum majus</i>	1945	Gran Bretaña	ATTC	
	BBWV-2	2C1	PV0537			China	DSMZ
		2C2	B935			China	AF149425, AJ132844
		2C3	P158			China	AF228423
		2G1	PV0549			Alemania	DSMZ
		2I1	*	<i>Lithospermum officinale</i>	2000	Italia	Drs. Davino y Bellardi
		2I8	L1202	<i>Petunia hybrida</i>	1992	Italia	Dr. Lesseman
		2Is2	Is2			Israel	Dr. Gera
		2N1	L1926	<i>Verbena</i>	1998	Holanda	Dr. Lesseman
		2N3	L1927	<i>Petunia hybrida</i>	1998	Holanda	Dr. Lesseman
		2Ph1	PMMV	<i>Patchouli</i>		Filipinas	NC_003975, NC_003974
		2SA1	94/1996	<i>Pisum sativum</i>	1994	Sudáfrica	Dra. Jooste
		2U1	PV131	<i>Lactuca sativa</i>		EEUU, Nueva York	ATTC, DSMZ
		2J1	MB7			Japón	AB013615, AB013616
2J2		IA			Japón	AB051386, AB032403	
2J4		IP			Japón	AB023484, AB018698	
2J5		L			Japón	AB018700	
2J6		1-2			Japón	AB018701	
2J7		E			Japón	AB018699	
2J8		JP92V2			Japón	AB076671	
2J9		RS			Japón	AB261176	
2J10	Nagaimo			Japón	AB207244		
2J11	JK			Japón	AB161178		
2J15	SP			Japón	AB161179		

	2J16	3-10		Japón	AB161177
	2K1	*		Corea	AF104335
	2K2	*		Corea	AF31363
	2SG1	ME	<i>Megaskepasma erythrochlamys</i>	1991 Singapur	NC_003003, NC_003004
	2T1	*	<i>Salvia</i>	Taiwan	EF392660
GeMV	3J12	N-1	<i>Gentiana scabra</i>	Japón	AB084453, AB084452
	3J13	AFV1		Japón	AB076672
LMMV	4UK2	PV0454	<i>Lamium orvala</i>	Gran Bretaña	DSMZ
	4G12	L1931	<i>Lamium orvala</i>	1998 Alemania	Dr. Lesseman
	4G13	L1213	<i>Lamium orvala</i>	1993 Alemania	Dr. Lesseman

ATCC: American Type Culture Collection (Colección Americana de cultivos tipo); DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares), NIAS= National Institute of Agrobiological Sciences of Japan (Instituto Nacional de Ciencias Agrobiológicas de Japón).

* nombre no especificado

3.2.2. Determinación de las secuencias nucleotídicas

Para analizar cuatro zonas genómicas se diseñaron cuatro pares de iniciadores con secuencias conservadas para el género *Fabavirus* (Tabla 3.2 y Figura 3.1). Para ello, primero se alinearon con el programa CLUSTAL W todas las secuencias disponibles del genoma completo de aislados de fabavirus: dos aislados de BBWV-1 (1S1 y 1U2); seis aislados de BBWV-2 (2C2, 2J1, 2J2, 2J4, 2SG1, 2Ph1); y un aislado de GeMV (3J12), tal y como se describe en el capítulo anterior.

Tabla 3.2. Iniciadores diseñados para amplificar por RT-PCR cuatro regiones genómicas de aislados del género *Fabavirus*.

Iniciador	Secuencia nucleotídica	^a Posición	^b Zona	^c PCR
Fab5'R1F	5'-AAATATTTAAACAAACAGTCGTT-3'	RNA1 (11-36)	A	302pb
Fab5'R1R	5'-TTCAAATCTCGTGCCATNTYATTKGC-3'	RNA1 (339-364)		
Pol2F	5'-CGATGGTTGTTTAYGGIGAYGA-3'	RNA1 (4767-4789)	B	417pb
Pol2R	5'-ACGCACTCCATTCATYTYGTG-3'	RNA1 (5208-5228)		
MP4F	5'-AAGGCGTGAYTCIGAYTTYGAYGA-3'	RNA2 (1044-1067)	C	411pb
MP4R	5'-GACATCAGCACRTCYTCYCCAT-3'	RNA2 1(480-1501)		
SCPF	5'-TGCGAGTGTTCAGAAAYTYGTCNTGG-3'	RNA 2 (857-2883)	D	198pb
SCPR	5'-CCACGCACATTCCARCCCATNGA-3'	RNA2 (3082-3109)		

^a La posición de los iniciadores en el RNA 1 o RNA 2 genómico está indicada respecto al genoma del aislado 1S1.

^b Letra asignada a cada región genómica amplificada por los iniciadores (Figura 3.1)

^c tamaño de los productos de RT-PCR esperados (excluyendo los iniciadores).

^d Nucleótidos degenerados: N=A+C+G+T, Y= C+T, R=A+G, K=G+T, I=inosina

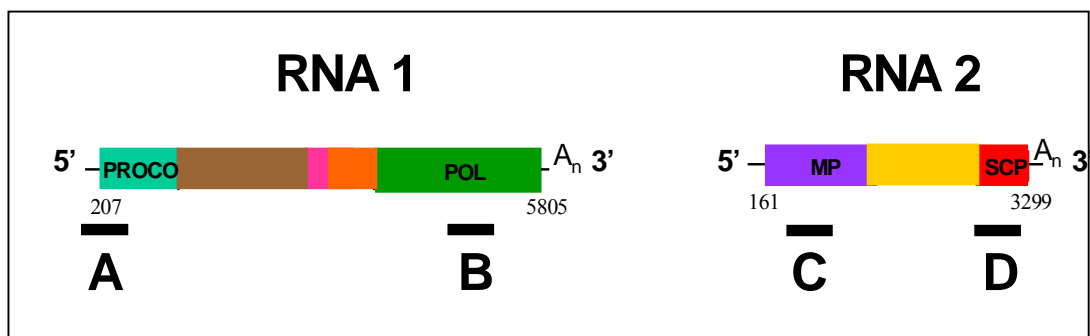


Figura 3.1. Localización de las 4 regiones genómicas analizadas en el genoma del aislado 1S1 de BBWV1: A, corresponde a parte de la 5'NCR y el comienzo de la zona codificante del cofactor de la proteasa (PRO-CO), B, está dentro de la polimerasa (POL), C esta dentro de la proteína del movimiento (MP), y D está dentro de la proteína pequeña de la cápsida (SCP).

A partir de extractos de RNA total (purificado como se indica en la sección 2.2.2., pág. 26) se sintetizaron cDNAs por RT con un oligo dT₁₇ (como se ha indicado en la sección 2.2.3, pág. 27) y se amplificaron los segmentos seleccionados mediante PCR con los iniciadores de la Tabla 3.2 siguiendo la metodología de la sección 2.2.3 (pág. 27), con 35 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 50 ó 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 20 segundos. Los productos de RT-PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y secuenciados con un ABI PRISM DNA Sequencer 377, PE Biosystems en ambas direcciones para obtener la secuencia consenso de cada región genómica en cada aislado.

3.2.3. Análisis de secuencias

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas se realizó con el programa CLUSTAL-W versión 1.83 con los parámetros por defecto (Thompson et al., 1994) y con el programa DAMBE versión 4.2.7 (Xia, 2000; Xia y Xie, 2001) para mantener la pauta de lectura en las secuencias alineadas. En algunos casos se realizó un ajuste manual para preservar los motivos y los sitios reconocidos por la proteasas en el procesamiento de las poliproteínas.

El programa MEGA versión 3.1, se utilizó para el cálculo de las distancias nucleotídicas (totales, sinónimas y no sinónimas) según el modelo de Kimura 2-parámetros y para la construcción de los árboles filogenéticos según el método del vecino más próximo (*Neighbour-joining*, NJ), con 1000 réplicas de *bootstrap* para estimar la fiabilidad de cada nodo.

Para analizar la distribución de las sustituciones sinónimas y no sinónimas a lo largo de las cuatro zonas genómicas analizadas se empleó el programa SNAP (<http://hiv-web.lanl.gov>), basado en el método de Nei and Gojobori (1986) and Ota and Nei (1994).

Para analizar el posible intercambio genético ocurrido durante la evolución de estos aislados, se compararon los árboles filogenéticos de las cuatro regiones (situadas en los extremos de los dos RNAs genómicos, Figura 3.1). Para buscar posibles eventos de recombinación dentro de cada una de estas regiones genómicas se utilizaron los programas PHYLPRO (Weiller, 1998) y GENECONV versión 1.81 (Sawyer, 1989).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron cuatro zonas del genoma (Figura 3.1) del virus puesto que la diversidad genética puede variar a lo largo del genoma y podrían darse fenómenos de recombinación entre genomas divergentes. Para ello, se diseñaron cuatro parejas de iniciadores conservados para el género *Fabavirus* (Tabla 3.2) a partir de las secuencias nucleotídicas alineadas de los aislados 1S1 y 1U2 de BBWV-1, los aislados 2C2, 2Ph1, 2J1, 2J2, 2J4 y 2SG1 de BBWV-2 y el aislado 3J12 de GeMV (Tabla 3.1), que son todas las secuencias del genoma completo disponibles en la actualidad. A partir de extractos de RNA de los aislados especificados en la Tabla 3.1 (aquellos que no tienen número de acceso del GenBank) se realizó la RT-PCR con estos iniciadores y se obtuvieron productos de PCR del tamaño esperado (Figura 3.2). Sin embargo, la RT-PCR realizada con estos y otros iniciadores conservados dió resultados negativos para LMMV (datos no mostrados). Actualmente, no se dispone de ninguna secuencia nucleotídica de este virus, por lo que sería interesante realizar una genoteca aleatoria y secuenciar su RNA genómico para confirmar si realmente debe considerarse miembro del género *Fabavirus*.

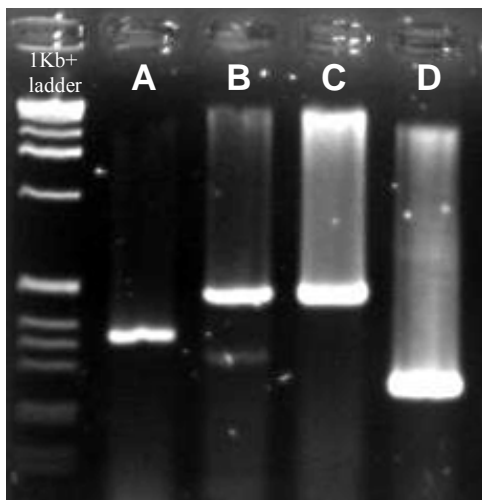


Figura 3.2. Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de RT-PCR amplificados utilizando los cuatro pares de iniciadores conservados diseñados en este estudio (Tabla 3.2). Las letras A, B, C y D corresponden a las regiones definidas en la Figura 3.1.

Con el fin de estimar la diversidad nucleotídica, inferir las relaciones filogenéticas entre aislados y comprender los factores evolutivos implicados, las secuencias correspondientes a estas cuatro zonas genómicas se compararon con las secuencias de

otros aislados depositadas en la base de datos del GenBank (Tabla 2.1). Este trabajo es el primer estudio que examina la variabilidad genética del género *Fabavirus*.

3.3.1. Relaciones filogenéticas del género *Fabavirus*

En las cuatro zonas genómicas analizadas, los aislados virales se distribuyeron en tres grupos principales que correspondieron a las tres especies del género *Fabavirus*: BBWV-1, BBWV-2 y GeMV (Figura 3.3). Estos resultados confirman la clasificación taxonómica actual (Kobayashi *et al.*, 2005; Le Gall *et al.*, 2005). También hubo una correspondencia total entre el serotipo de cada aislado y la especie viral a la que pertenece (Kobayashi *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2005) a excepción del aislado 2G1 de BBWV-2 que se localizó junto a los aislados de BBWV-1 en la región D y el aislado 1L1 de BBWV-1 que se localizó en el grupo correspondiente a BBWV-2 en la región B (Figura 3.3).

En la zona genómica A, los aislados de BBWV-1 formaron un grupo no resuelto que se dividió en 8 subgrupos y los aislados de BBWV-2 se dividieron en dos subgrupos: uno formado por los aislados 2J4 y 2SG1 y el otro por el resto de los aislados formando un subgrupo no resuelto debido a los bajos valores de *bootstrap*. En las demás zonas genómicas analizadas se encontraron valores mayores de *bootstrap*. La subdivisión de BBWV-2 en dos subgrupos observada en la región A se mantuvo en las otras tres regiones genómicas. En BBWV-1, aunque algunos aislados se localizaron en grupos distintos y hubo algunas diferencias en los agrupamientos según la zona genómica, en general se observaron 6 grupos: Grupo I, formado por casi todos los aislados españoles y algunos aislados extranjeros: 1SY1, 1L1 (en A, C y D), 1G15 (en C) y 1Ch3 y 1Ch5 (en D), que a su vez se dividía en dos subgrupos: IA y IB; Grupo II, formado por otros aislados españoles, cuyo representante sería el aislado 1S7, Grupo III, formado mayormente por los aislados 1UK1 y 1G14; Grupo IV, formado por los aislados 1NZ1, U2, 1N2, 1G11; Grupo V, formado por el aislado 1I6; y Grupo VI, formado por los aislados de Bulgaria y la República Checa. En BBWV-2, también se encontraron diferencias en el agrupamiento y posición de algunos aislados en el árbol filogenético según la zona genómica analizada, aunque en general se pudieron dividir en 4 grupos: Grupo I, formado por 2J4 y 2SG1; Grupo II, formado por 2C2, Grupo III, dividido en dos subgrupos: IIIA formado por 2U1, y IIIB formado por 2C1, 2Is2; Grupo IV, formado por 2N1, 2J2, 2Ph1, 2I8, 2I1, 2J1, 2N3, 2SA1 (en C y D), pudiéndose dividir en distintos subgrupos dependiendo de la región analizada (Figura 3.3).

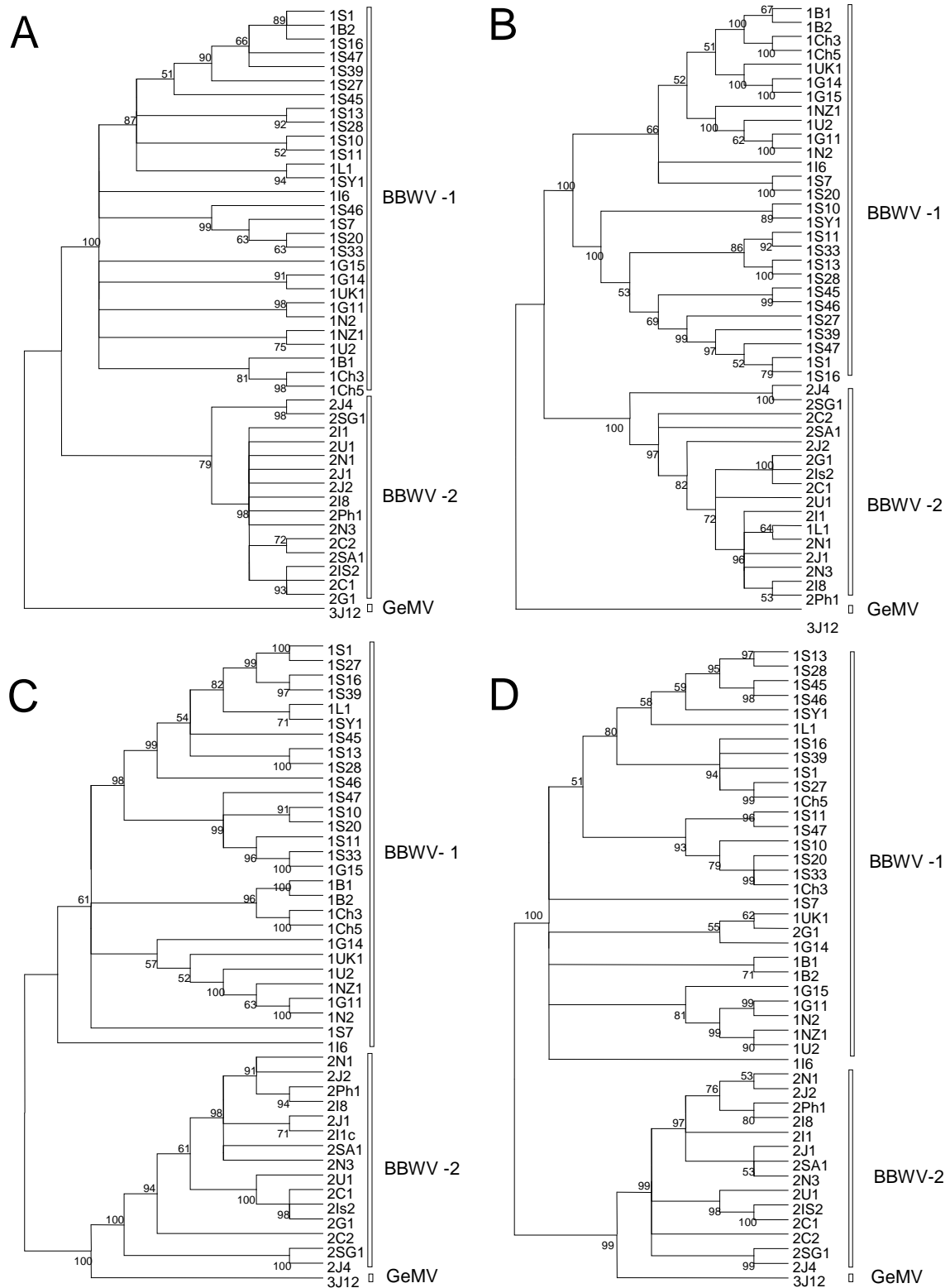


Figura 3.3. Árboles filogenéticos sin raíz de las zonas genómicas A, B, C y D (Figura. 3.1 y Tabla 3.2) de aislados de BBWV-1, BBWV-2 y GeMV (género *Fabavirus*) obtenidas mediante el método del vecino más próximo con 1000 réplicas de bootstrap. Se condensaron las ramas para valores de bootstrap menores del 50%.

3.3.2. Variación genética del género *Fabavirus*

Para estimar la variación genética se calculó la media de las distancias nucleotídicas y aminoacídicas entre aislados de una misma especie y entre aislados de distintas especies (Tabla 3.3). La región genómica A resultó ser la región más conservada de las cuatro estudiadas. Esta región forma parte de la 5'NCR y el comienzo de la zona codificante del RNA 1, por lo que podría tener algunas funciones a nivel interacción del RNA con proteínas implicadas en la replicación, expresión y su regulación. Además, como se indica en el capítulo 2, las secuencias correspondientes al extremo 5'NCR mostraron zonas altamente conservadas tanto en el RNA 1 como en el RNA 2 incluyendo distintos motivos conservados. La variación genética fue similar en B y D y ligeramente superior en C. En general, la variación genética obtenida para BBWV-2 fue similar o ligeramente menor que la de BBWV-1.

Tabla 3.3. Media de las distancias nucleotídicas y aminoacídicas dentro y entre las especies del género *Fabavirus*

	BBWV1	BBWV2	BBWV-1 BBWV2	BBWV-1 GeMV	BBWV-2 GeMV
A	0,080 (0,051)	0,079 (0,053)	0,509 (0,595)	0,919 (0,533)	0,747 (0,516)
B	0,183 (0,079)	0,110 (0,034)	0,495 (0,318)	0,565 (0,377)	0,516 (0,335)
C	0,222 (0,121)	0,149 (0,056)	0,642 (0,459)	0,661 (0,473)	0,559 (0,407)
D	0,174 (0,061)	0,166 (0,042)	0,515 (0,335)	0,559 (0,419)	0,522 (0,439)

Se analizaron cuatro zonas genómicas: A, B, C y D (Fig. 3.1 y Tabla 3.2)

Los valores entre paréntesis indican la distancia aminoacídica media.

Es muy difícil comparar la variación genética con la de otros virus, debido a las diferencias en el muestreo y el tipo de análisis realizado en cada trabajo. Además las publicaciones donde se ha estimado la distancia media entre aislados virales de todo el mundo o de zonas geográficas amplias son muy escasos. No obstante, la comparación de la distancia media nucleotídica de BBWV-1 y BBWV-2 con algunos virus parece indicar que ésta es elevada dentro de los virus vegetales (Figura 3.4).

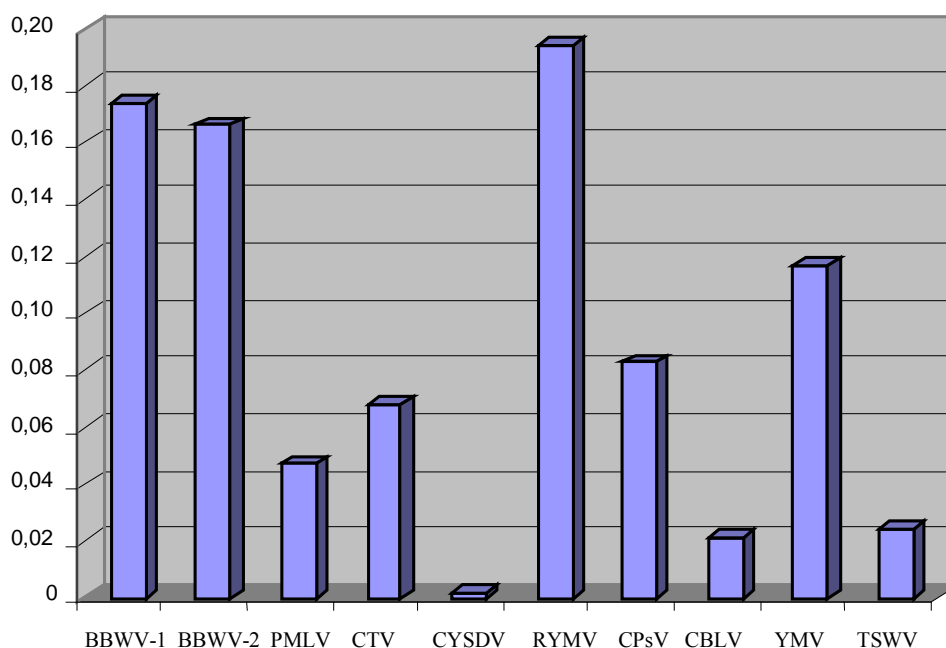


Figura 3.4. Distancia nucleotídica media de la zona genómica correspondiente a la proteína de la cápsida obtenida para aislados de diferentes especies virales de distintas áreas geográficas. El eje de las X corresponde al nombre de las especies virales, de izquierda a derecha: BBWV-1 y BBWV-2 (calculadas en este trabajo); PMLV, CPsV (Martín et al., 2006); CBLV (Vives et al., 2002); CTV (Rubio et al., 2001a); CYSDV (Rubio et al., 2001b); TSWV (Tsompana et al., 2005); PMLV, RYMV y YMV (García-Arenal et al., 2001). El eje de las Y indica la distancia nucleotídica media.

3.3.3. Estimación de la estructura y diversidad genética de la población viral en España

Para poder diseñar e implementar estrategias de control eficaces y duraderas es necesario estimar la diversidad genética de la población viral en cada región geográfica, puesto que ésta está correlacionada con la capacidad evolutiva del virus y por tanto de superar posibles resistencias genéticas utilizadas para su control.

En España, sólo se ha detectado BBWV-1 en cultivos de pimiento salvo en una ocasión en que se detectó en cultivo de judía (aislado 1S47, véase Tabla 3.1). Para caracterizar la población de BBWV-1 en España, se analizaron 14 aislados recogidos en las provincias de Barcelona, Castellón, León, Navarra, Valencia y Zaragoza (Tabla 3.1). La estructura poblacional puede visualizarse en los árboles filogenéticos de la Figura 3.5. En el RNA 1 (zonas genómicas A y B), los aislados españoles forman dos grupos (SI y SII). SII estaría formado por el aislado 1S7 junto al aislado 1S20 (en las zonas A y B) y los aislados 1S33 y 1S46 (en la zona A), mientras que el resto de los aislados forman el grupo SI. En el RNA 2 (zonas C y D) el grupo SI estaría constituido por todos los aislados españoles, excepto el aislado 1S7, que formaría el grupo SII. A su vez, el grupo SI del RNA 2 se puede

dividir en dos subgrupos: SIA, formado por 1S1, 1S16, 1S13, 1S27, 1S28, 1S39, 1S45, 1S46 y SIB por los aislados 1S10, 1S11, 1S20, 1S33 y S47. En la Tabla 3.4. se muestra la diversidad nucleotídica global de la población de BBWV-1 en España. También se ha estimado la diversidad dentro de y entre los distintos grupos y subgrupos encontrados en los árboles filogenéticos.

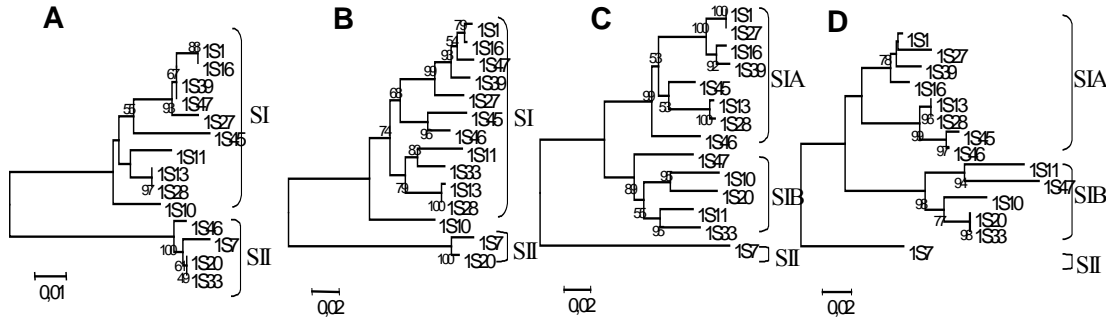


Figura 3.5. Relaciones filogenéticas de los aislados españoles de BBWV-1 inferidas por el método del vecino más próximo con 1000 réplicas de *bootstrap*. A, B, C y D indican las regiones genómicas empleadas en el estudio (Figura 3.1 y Tabla 3.2).I

Tabla 3.4. Diversidad nucleotídica de la población de BBWV-1 en España.

	Global	SI	SII	SI-SII	SIA	SIB	SIA-SIB
A	0,064	0,030	0,008	0,112	-	-	-
B	0,124	0,086	0,020	0,232	-	-	-
C	0,140	0,119	-	0,263	0,070	0,092	0,160
D	0,123	0,113	-	0,184	0,064	0,084	0,154

A, B, C y D indican las regiones genómicas empleadas en el estudio (Figura 3.1 y Tabla 3.2)

Al igual que al estudiar la diversidad nucleotídica del género *Fabavirus* (Tabla 3.3), los valores de diversidad nucleotídica obtenidos para región genómica A de los aislados españoles fue menor en todos los casos. Las relaciones filogenéticas y los elevados valores de diversidad genética obtenidos entre el grupo SI y SII y entre los subgrupos SIA y SIB dentro del grupo SI sugieren más de una posible introducción de BBWV-1 en España.

La diversidad nucleotídica (distancia media entre pares de secuencias) de BBWV-1 en España no se ha podido comparar con la de otros países debido al escaso número de aislados que se han podido obtener de cada país. Solamente en Japón se ha determinado la secuencia nucleotídica de la zona genómica D de un número suficiente de aislados de BBWV-2 para estimar la estructura y diversidad genética de la población viral. Los doce aislados japoneses analizados se pudieron dividir en 4 grupos basados en sus relaciones filogenéticas (Figura 3.6): Grupo JI (aislados 2J5 y 2J6), Grupo JII (aislados (2J4 y 2J11), Grupo JIII (aislados 2J1, 2J2, 2J7, 2J8 y 2J9) y Grupo JIV (aislados 2J14, 2J15 y

2J16). La diversidad nucleotídica global para la región genómica D fue 0,191 y la diversidad dentro y entre grupos se muestra en la Tabla 3.5. En la Tabla 3.6 se muestra la distancia nucleotídica media para distintos países, aunque solamente en el caso de BBWV-1 en España y BBWV-2 en Japón se analizaron un número suficiente de aislados virales. No obstante, se puede observar que dentro de un país existen aislados con una gran divergencia genética. De hecho, la diversidad global para cada especie solamente es ligeramente superior a la diversidad media de cada país, siendo el coeficiente de variación bajo (proporción de la diversidad genética entre países en comparación con la diversidad global) (Tabla 3.7), lo que indica que no es necesario considerar los virus de un país como una subpoblación y por tanto para comparar con otros virus podemos usar como datos los valores de la diversidad global.

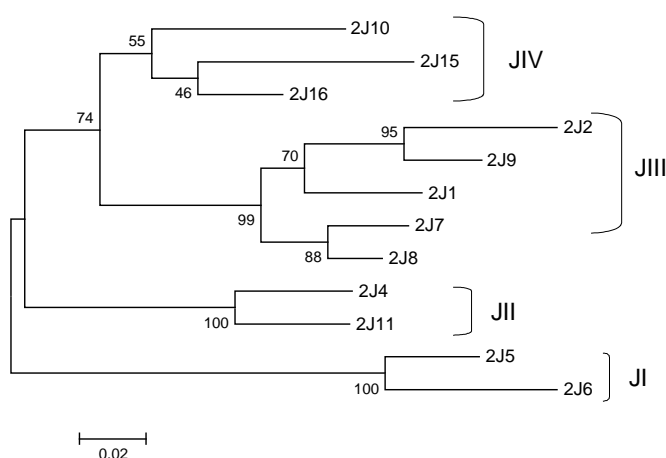


Figura 3.6. Relaciones filogenéticas de la zona genómica D de aislados japoneses de BBWV-2 inferidas por el método del vecino más próximo con 1000 réplicas de bootstrap

Tabla 3.5. Diversidad nucleotídica de la región genómica D dentro y entre grupos de los aislados japoneses de BBWV-2 determinados filogenéticamente

	JI	JII	JIII	JIV
JI	0,081			
JII		0,244		
JIII			0,209	
JIV				0,182
				0,113

Las diversidades dentro de grupos o subgrupos (JI, JII, JIII, JIV) están en las diagonales

Tabla 3.6. Diversidad nucleotídica de la zona genómica D entre aislados de cada país

	España	Bulgaria	Chequia	Alemania	China	Italia (2)	Japón	Corea	Holanda
BBWV-1	0,123 (14)	0,148 (2)	0,135 (2)	0,171 (3)					
BBWV-2					0,172 (3)	0,094 (2)	0,191 (12)	0,94 (2)	0,094 (2)
GeMV							0,341 (2)		

Entre paréntesis se indica el número de aislados analizados por cada país

Tabla 3.7. Diversidad global de cada especie viral y diversidad media dentro de cada país

	Diversidad global	Diversidad media dentro de países	Coefficiente de diferenciación
BBWV-1	0,177 (30)	0,144 (21)	0,111 (21)
BBWV-2	0,180 (28)	0,129 (23)	0,294 (23)
GeMV	0,341 (2)	0,341 (2)	-

Entre paréntesis se indica el número de aislados analizados para cada especie viral

Como en el apartado anterior, es muy difícil comparar la diversidad nucleotídica de BBWV-1 en España y BBWV-2 en Japón con la de otras poblaciones virales. No obstante, las diversidades nucleotídicas estimadas para algunos virus vegetales en España y en otros países (Figura 3.7) parecen indicar que las poblaciones de BBWV-1 y BBWV-2 analizadas son muy diversas dentro de los virus vegetales.

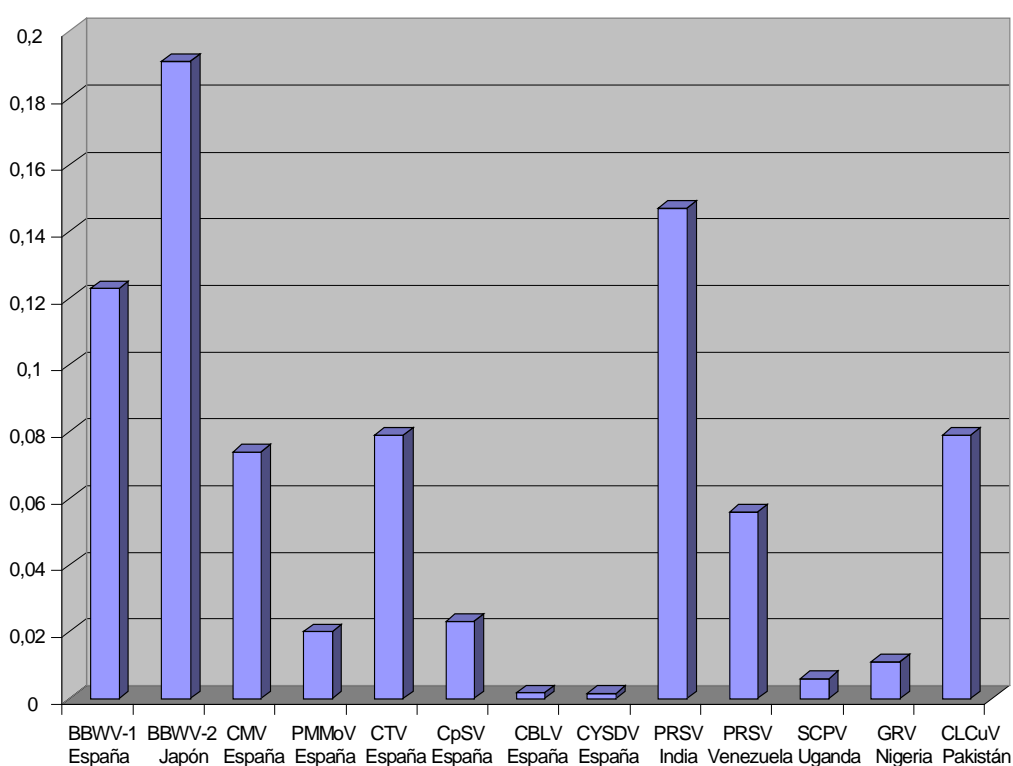


Figura 3.7. Diversidad nucleotídica de la zona genómica correspondiente a la zona de la cápsida de diferentes virus: BBWV-1 y BBWV-2 (estimado en este trabajo), CTV (Rubio *et al.*, 2001a), CYSDV (Rubio *et al.*, 2001b); PRSV (Fernandez-Rodriguez *et al.*, 2008), CPsV (Martín *et al.*, 2006), CBLV (Vives *et al.*, 2002), CMV, PMMoV, SCPV, GRV y CLCuV (García-Arenal *et al.*, 2001b)

3.3.4. Epidemiología molecular. Flujo genético.

El análisis de las relaciones genéticas puede darnos información sobre el origen geográfico y movimiento (migración) de cualquier organismo, que puede ser de interés a la hora de aplicar medidas de control como la certificación. La migración o flujo genético es uno de los cinco factores evolutivos que determinan la estructura genética de las

poblaciones virales. Para poder llevar a cabo este estudio se requiere analizar un gran número de aislados, lo que está fuera del alcance de la mayoría de los estudios de virus vegetales (Bateson *et al.*, 2002), aunque en algunos casos de introducción reciente del virus en una región geográfica puede inferirse la ruta de migración (Davino *et al.*, 2005). En este trabajo, se seleccionó la zona genómica D, localizada en la zona que codifica para la proteína pequeña de la cápsida (SCP) ya que es la zona de la que más secuencias nucleotídicas se dispone en la base de datos del GenBank y es idónea para compararla con otros virus o grupos virales. Se analizó la secuencia nucleotídica de 60 aislados de distintos países (30 de BBWV-1, 28 de BBWV-2 y 2 de GeMV) (Tabla 3.1), y si bien el número no es suficiente para deducir el origen y las principales rutas de migración se pudieron inferir algunos datos al respecto.

Aunque BBWV-1 y BBWV-2 se encuentran por todo el mundo, el primero suele predominar en Europa y la cuenca mediterránea y el segundo se ha detectado mayoritariamente en extremo oriente. Por otra parte, GeMV, detectado y caracterizado recientemente (Kobayashi *et al.*, 2005), sólo se ha encontrado en Japón y sólo tres aislados de LMMV han sido detectados en Gran Bretaña y Japón (Tabla 3.1). Podría especularse que en occidente tuvieron lugar una o varias introducciones tempranas de BBWV-1 dando lugar a la dispersión del virus y posteriormente hubo varias migraciones puntuales de BBWV-2 en plantas ornamentales (comunicación personal del Dr. Lesseman) que no han tenido mucha repercusión. En Japón se han encontrado tres especies de fabavirus: BBWV-1, BBWV-2 y GeMV, lo cual podría sugerir que este país es el origen del género *Fabavirus*. Sin embargo, podría cometerse un sesgo ya que la mayor parte de secuencias nucleotídicas, a excepción de las de este trabajo, han sido determinadas por grupos japoneses, habiendo una gran escasez de datos para otros países.

Al analizar las relaciones filogenéticas (Figura 3.8) se puede observar que no hay una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica. Algunos aislados procedentes de regiones geográficas muy distantes presentan una relación genética estrecha. Como ejemplo, en BBWV-1 aparecen 1NZ y 1U2 de Nueva Zelanda y EEUU, 1UK1 y 1SG2 de Gran Bretaña y Singapur y en BBWV-2, 2J9 y 2SA1 de Japón y Sudáfrica, y 2C1 y 2Is1 de China e Israel. Esto sugiere que podría haber varios eventos de migración a larga distancia. Dentro de España, tampoco se encontró una correlación clara entre localización geográfica y similitud genética, sugiriendo por tanto un cierto flujo genético a nivel nacional. En el árbol filogenético, los aislados 1L1 y 1SY1 de Oriente Medio (Figura 3.2 y Figura 3.8), los aislados checos 1CR3 y 1CR5 (en la zona D en Figura 3.8) y el aislado alemán 1G15 (zona genómica C en Figura 3.2) se situaron cerca de los aislados españoles sugiriendo flujo genético entre España y estos países. Lo mismo ocurre en España con otros virus como CMV que, como los fabavirus, presenta una elevada gama de huéspedes y es transmitido de manera no persistente por pulgones. CMV mostró una estructura genética sin correlación con localización, año de recolección y especie de huésped, lo que se consideró como una estructura de metapoblación, con extinciones

locales y recolonización aleatoria desde reservorios locales o distantes (García-Arenal *et al.*, 2000). Este modelo también se ha atribuido a TSWV, otro virus con amplia gama de huéspedes, transmitido por trips de manera persistente (Tsompana *et al.*, 2005).

La migración a larga distancia se ha observado en otros virus como CTV (Rubio *et al.*, 2001a). Posiblemente la tasa de migración es intermedia entre la observada en CTV en California y España formando una población viral indeferenciada (Rubio *et al.*, 2001a) y el rápido movimiento de algunos virus como CYSDV en el que la diversidad genética de los aislados es muy baja en amplias zonas geográficas (Rubio *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2001b; Marco & Aranda, 2005). En otros virus, se ha observado una estructuración geográfica que sugiere eventos de migración a larga distancia puntuales y la ausencia de migración entre ciertas zonas geográficas, como por ejemplo PRSV en occidente y oriente (Bateson *et al.*, 2002) y CPsV en Sudamérica con Norteamérica y Europa (Martín *et al.*, 2006). En el caso de RYMV, se observó una estructuración geográfica y una diversidad relativamente baja, sugiriendo que la dispersión a larga distancia no era efectiva (Fargette *et al.*, 2006)

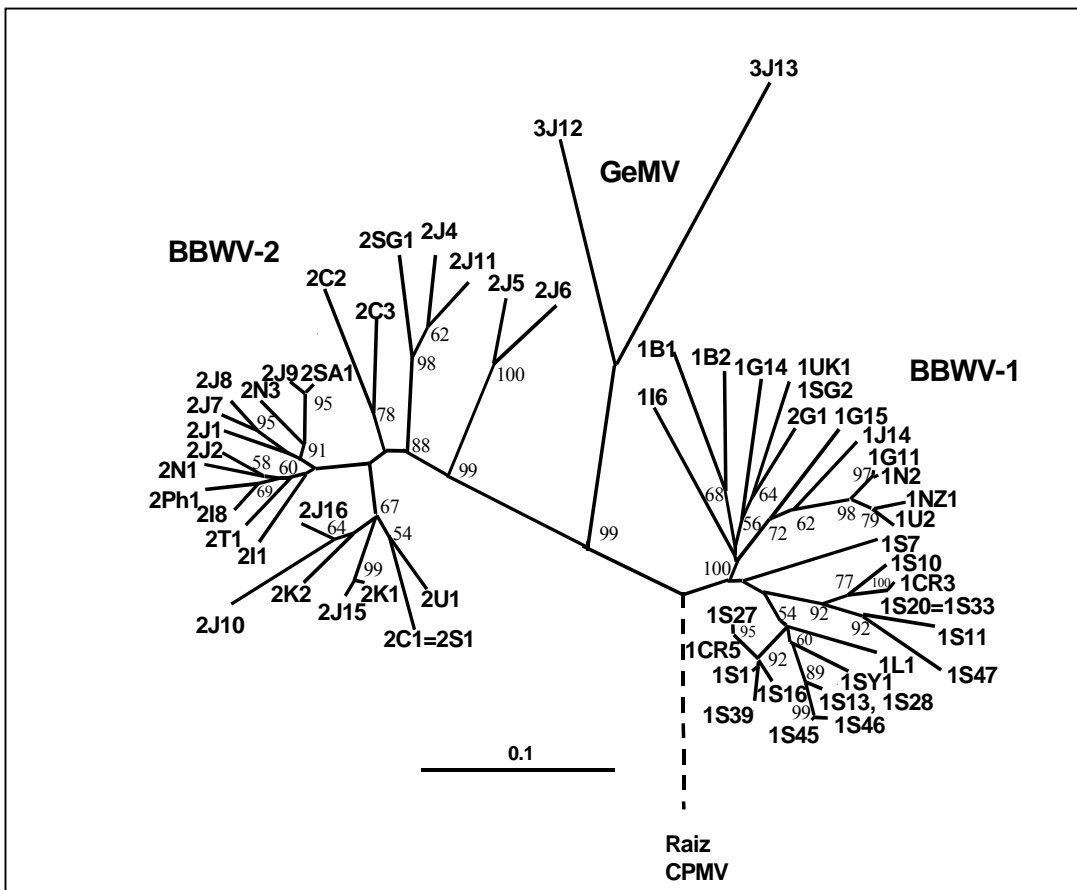


Figura 3.8. Árbol filogenético de la zona genómica D (Fig. 3.1 y Tabla 3.2) de aislados de las especies: BBWV-1, BBWV-2 y GeMV del género *Fabavirus*, familia *Comoviridae*, realizado por el método del vecino más próximo utilizando 1000 réplicas de *bootstrap*. La secuencia de CPMV del género *Comovirus*, familia *Comoviridae* se utilizó como *outgroup* para estimar la raíz. En los nodos se indica el porcentaje de *bootstrap* para valores superiores al 50%. La longitud de las ramas es proporcional a la distancia genética, excepto en la raíz (línea discontinua).

3.3.5. Selección natural

La variación genética generada por mutación puede estar constreñida por la necesidad del genoma viral y las proteínas que codifica para interactuar con el huésped y el vector y llevar a cabo las funciones necesarias para completar el ciclo viral. Se puede obtener información sobre la intensidad y la dirección de la selección a nivel molecular mediante la comparación entre sustituciones no sinónimas (producen cambio de aminoácido) y sinónimas (silenciosas, no producen cambio de aminoácido).

En nuestro análisis se observó un mayor número de sustituciones sinónimas (S) que no sinónimas (N), lo que indica una presión de selección negativa para las cuatro zonas genómicas analizadas (Tabla 3.8). Las sustituciones sinónimas fueron muy elevadas en las zonas A, C y D de BBWV-1 y D de BBWV-2, cercanas a la saturación, mientras que en las zona B de BBWV-1 y A, B y C de BBWV-2 fueron menores, lo cual podría indicar una selección a nivel de nucleótido debido a la necesidad de interaccionar el genoma con elementos reguladores, mantener una estructura secundaria o bien por una preferencia del uso de ciertos codones sinónimos. En las especies virales, BBWV-1 y BBWV-2, la zona A (que codifica el factor de la proteasa, PRO-CO) y D (que codifica la proteína pequeña de la cápsida, SCP) mostraron un cociente N/S menor que las zonas B (polimerasa, POL) y C (proteína del movimiento, MP) lo que sugiere una mayor presión de selección para las dos primeras para el cambio de aminoácido. La proteína de la cápsida pequeña además de las constricciones relacionadas con la estructura del virión, puede estar involucrada en otras funciones como el movimiento entre células (Taylor et al., 1999) e interacción con el vector durante la transmisión (Power, 2000). El cociente N/S para BBWV-1 y BBWV-2 está en el rango del observado en los virus vegetales (García-Arenal *et al.*, 2001a) y en los genes de los organismos celulares: animales, plantas y bacterias (Nei & Tajima, 1987).

Tabla 3.8. Sustituciones no sinónimas y sinónimas entre aislados de BBWV-1 y BBWV-2 en las regiones genómicas PRO-CO, POL, MP y SCP.

Regiones genómicas	BBWV-1			BBWV-2		
	N	S	N/S	N	S	N/S
A (PRO-CO)	0,047	0,892	0,048	0,022	0,551	0,049
B (POL)	0,037	0,400	0,102	0,057	0,533	0,096
C (MP)	0,083	0,933	0,097	0,061	0,593	0,100
D (SCP)	0,032	0,923	0,040	0,024	0,826	0,035

N = valor medio de las sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo

S = valor medio de las sustituciones sinónimas por sitio sinónimo

N/S = valor medio del cociente entre sustituciones no sinónimas y sinónimas

La Tabla 3.8 muestra la tendencia general de la selección en cada zona genómica. Sin embargo, dentro de cada zona codificante la selección puede actuar de forma diferente en distintas secciones de la secuencia. Para averiguar esto, se representó gráficamente los valores medios de las sustituciones sinónimas (S) y no sinónimas (N) a lo largo de la secuencia (utilizando ventanas deslizantes de 60 nt), de manera que, la

pendiente de las curvas nos puede informar de la dirección e intensidad de la selección en pequeños segmentos de la secuencia (Figura 3.9). El patrón de acumulación de las S y N fue parecido para BBWV-1 y BBWV-2. Las S se acumularon gradualmente en las zonas B, C y D sugiriendo que no hay restricciones (selección negativa) a nivel nucleotídico. En la zona A en los primeros nucleótidos prácticamente no se acumularon cambios sinónimos, lo que sugiere que el RNA a principio de la zona codificante posiblemente interactúe con elementos involucrados en la replicación o expresión del genoma y en este sentido sería una continuación de la función ejercida por la 5'NCR que la precede. Las curvas de N presentaron pendientes bajas y en algunos segmentos no se acumuló ninguna mutación, lo que sugiere una fuerte selección negativa para preservar motivos importantes para la función o estabilidad de la proteína codificada. En la zona C de BBWV-2 se encontró un segmento con una pendiente de N similar a la de S sugiriendo ausencia de selección, mientras que en las zonas A y C de BBWV-1 se encontraron regiones donde la pendiente de N era mayor que la de S sugiriendo selección positiva, que podría reflejar cambios requeridos para nuevas adaptaciones. Los segmentos que presentan una fuerte selección negativa o selección positiva pueden ser candidatos para un futuro estudio de los determinantes genéticos relacionados con el ciclo biológico del virus (replicación, movimiento, transmisión) o su patogenicidad.

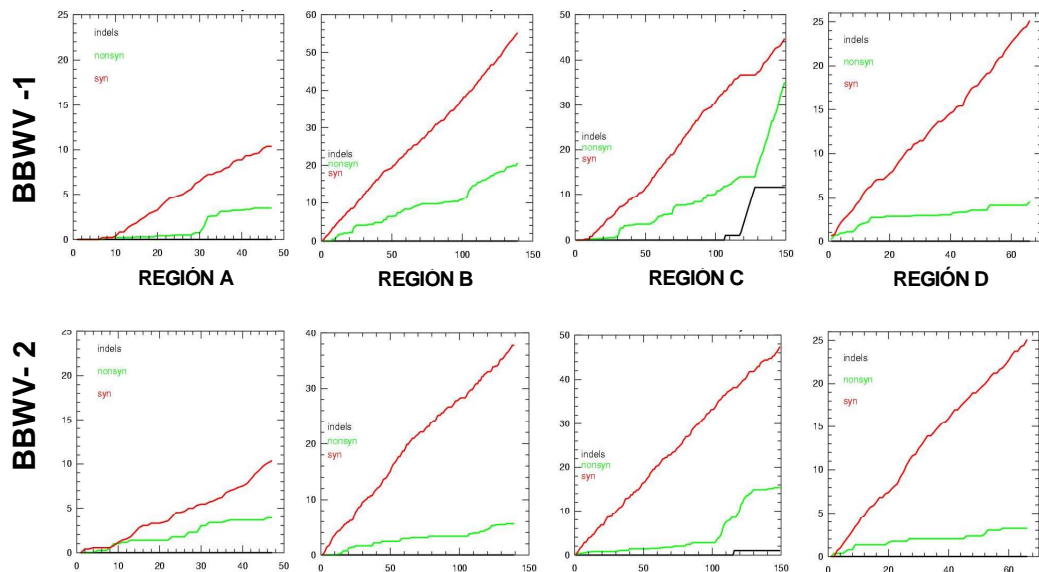


Figura 3.9. Distribución acumulativa de los valores de las sustituciones sinónimas (color rojo) y no sinónimas (color verde) calculada para ventanas de 60 nt a lo largo de las secuencias de cuatro zonas genómicas (A, B, C, D) especies BBWV-1 y BBWV-2 del género *Fabavirus*. El eje X representa la posición del codón y el eje Y representa la media del número acumulado de mutaciones sinónimas o no sinónimas estimadas.

Otra evidencia de una fuerte selección negativa, lo constituye el hecho de que aislados que difieren mucho en el año de recolección presenten una secuencia nucleotídica similar. En el género *Fabavirus* esto ocurre con el aislado estadounidense 1U2 obtenido en

1972 y 1NZ1 obtenido en Nueva Zelanda en 2004, o con 1UK1 recogido en Gran Bretaña en 1945 y 1SG2 aislado en Singapur después de 1990. Esto sugiere una gran una estabilidad genética, observada también en genotipos de otros virus como CTV (Albiach-Martí *et al.*, 2000) y RYMV (Fargette *et al.*, 2006). Es difícil explicar la gran estabilidad genética en algunos aislados y la gran divergencia en otros. Esto podría deberse a que el paisaje adaptativo (Wright, 1990) en los Fabavirus podría estar constituido por varios picos, algunos de los cuales permitirían muy pocas mutaciones (pico escarpado). Por deriva genética sería posible pasar a otros picos y una vez allí se seleccionarían nuevas mutaciones compensatorias. Por ejemplo, sustituciones aminoacídicas en la región de la cápsida podrían generar otras sustituciones en la proteína del movimiento ya que ambas tienen que interactuar para que se produzca el movimiento del virus (Codoñer *et al.*, 2006).

3.3.6. Intercambio genético entre variantes divergentes.

El análisis filogenético de cuatro zonas genómicas distintas (situadas en los extremos de los dos RNAs genómicos) permite el análisis de posibles eventos de intercambio genético bien por recombinación (dentro de un RNA genómico) o por pseudorecombinación o reordenamiento (intercambio de RNAs genómicos) cuando se ponen de manifiesto incongruencias en las relaciones genéticas entre las distintas zonas genómicas. Se encontraron posibles eventos de recombinación en algunos aislados que presentaron un cambio brusco en su relación con los demás aislados en los árboles filogenéticos inferidos para distintas zonas genómicas apoyados estadísticamente por valores altos de *bootstrap*. Se encontraron dos casos de recombinación entre BBWV-1 y BBWV-2: el aislado 1L1, que se agrupó con los aislados de BBWV-1 en todas las regiones genómicas, excepto en la región B; y el aislado 2G1, que se agrupó con BBWV-2 en las regiones A, B y C y con BBWV-1 en la región D (Figura 3.2). En BBWV-1, los aislados 1G15, 1CR3, 1CR5 mostraron recombinaciones con aislados españoles en el RNA genómico 2. El aislado 1G15 parece el resultado de varias recombinaciones ya que sus relaciones filogenéticas son distintas en cada zona genómica analizada. El aislado 1S7 parece ser el resultado de una pseudorecombinación, puesto que el RNA 1 (regiones A y B) está genéticamente relacionado con el de otros aislados españoles mientras que el RNA 2 está mucho más alejado formando un grupo distinto.

Para un análisis detallado, se analizaron las relaciones filogenéticas en ventanas de 60 nt que se desplazan a lo largo de la secuencia de cada zona genómica analizada mediante el programa PHYLPRO. La representación gráfica del perfil filogenético permite detectar incongruencias en las relaciones filogenéticas reveladas como zonas de bajo perfil filogenético. En general se obtuvo un patrón muy complejo, lo que sugiere múltiples recombinaciones oscurecidas por un gran número de mutaciones posteriores (Figura 3.10.A). Solamente en la región B de BBWV-2 el perfil filogenético parece no mostrar recombinaciones (Figura 3.10.B), no siendo así en el resto de regiones A, B y C para BBWV-2 ni en las regiones A, B, C y D para los aislados de BBWV-1. En algunos casos se pudo identificar posibles sitios de recombinación como, por ejemplo, en la región C de

BBWV-1 donde pudo detectarse entre otros el aislado 1B1 que mostró un posible sitio de recombinación en la posición 71 de la región C. Este aislado mostró su máxima identidad nucleotídica (85%) con el aislado 1S45 entre las posición 11-71nt y del 83% con el aislado 1S47 entre las posiciones 71-121nt (Figura 3.10.C).

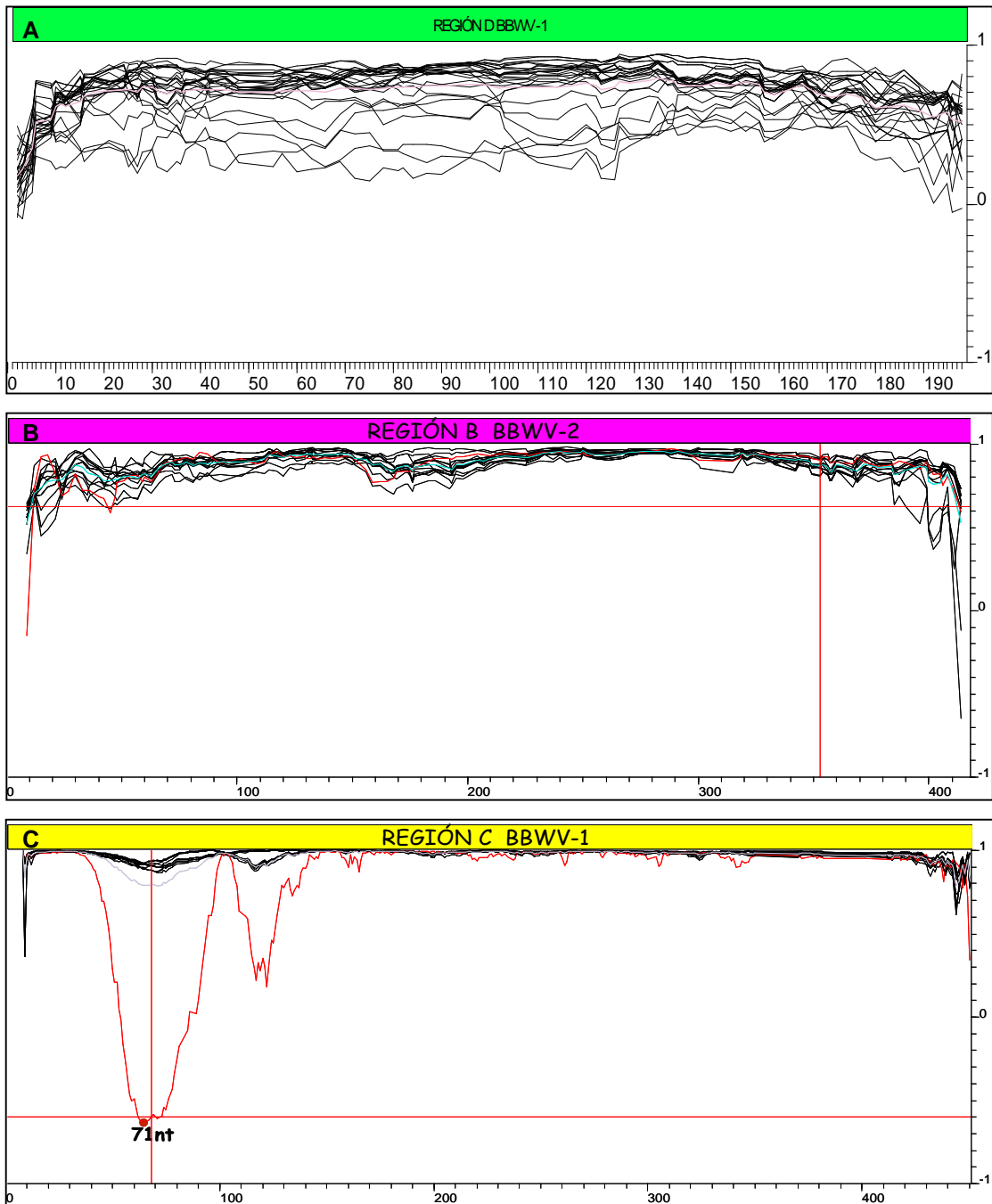


Figura 3.10. A) Congruencia filogenética de los aislados de BBWV-1 en la región D; B) Congruencia filogenética de los aislados de BBWV-2 en la región B; C) Congruencia filogenética de los aislados de BBWV-1 en la región C. La figura muestra un posible evento de recombinación del aislado 1B1 (línea roja) en la posición 71.

El análisis de conversión genética utilizando el programa GeneConv versión 1.81 para cada especie viral no dio ningún resultado coherente posiblemente dada la gran variación genética observada en estos virus.

Se han descrito casos de recombinación entre otros grupos de virus vegetales como Cucumovirus (Chen *et al.*, 2002; Bonnet *et al.*, 2005), Ilarvirus (Ge *et al.*, 1997); Closterovirus (Rubio *et al.*, 2001a; Vives *et al.*, 2005), Luteovirus (Guyader & Ducray, 2002; Hauser *et al.*, 2002), Nepovirus (Legall *et al.*, 1995; Vigne *et al.*, 2004; Vigne *et al.*, 2005), Ophiovirus (Martín *et al.*, 2006), Potyvirus (Bousalem *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2004; Desbiez & Lecoq, 2004; Tan *et al.*, 2004; Glasa *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005; Lorenzen *et al.*, 2006a; Lorenzen *et al.*, 2006b), Tobamovirus (Lartey *et al.*, 1996) y Tobravirus (Robinson, 1994; Swanson & MacFarlane, 1999). También se han detectado fenómenos de recombinación entre especies virales (White & Morris, 1995; Monci *et al.*, 2002; Lefeuvre *et al.*, 2007; García-Arenal & Fraile, 2008). Se ha propuesto que la recombinación podría ser ventajosa para los virus de RNA. Primero, como un mecanismo de reparación genómica, ya que la recombinación de genomas virales con mutaciones deletéreas puede regenerar genomas funcionales y permitiría que las poblaciones virales mantuvieran su eficacia biológica en episodios de cuello de botella, donde se produce una disminución brusca de su tamaño poblacional (Simon & Bujarski, 1994), que puede ocurrir en el movimiento del virus en la planta (Sacristán *et al.*, 2003; French & Stenger, 2003) y en la transmisión a otras plantas por insectos (Li & Roossinck, 2004; Ali *et al.*, 2006). Experimentalmente, se ha observado que la recombinación entre moléculas genéticamente similares es un fenómeno frecuente en los virus de RNA de plantas (Froissart *et al.*, 2005; Urbanowicz *et al.*, 2005). Segundo, como un medio de aumentar la diversidad genética y conseguir una mayor adaptabilidad a nuevos ambientes, mediante recombinación entre variantes genómicas muy divergentes, entre distintos virus o incluso con el genoma del huésped (Simon & Bujarski, 1994; Roossinck, 1997). Sin embargo, parece que este fenómeno es raro ya que las combinaciones genéticas heterogéneas son generalmente eliminadas por selección purificadora (Martin *et al.*, 2006; Escriu *et al.*, 2007) y solamente se establecen cuando ofrecen una ventaja respecto a los parentales, como por ejemplo, un aumento de la gama de huéspedes (Monci *et al.*, 2002).

El mecanismo de recombinación de los virus de RNA parece ser distinto al de recombinación de DNA. Se ha propuesto un modelo, en el cual la recombinación ocurre durante la replicación del RNA al producirse una traslocación accidental de la polimerasa con la cadena que está sintetizando desde la molécula molde a otra molécula o a otra parte de la molécula molde generando en este caso RNAs defectivos (Rubio *et al.*, 2000; Nagy & Pogany, 2008). Los RNAs defectivos, son RNAs que presentan una gran deleción interna y necesitan a los RNAs parentales para su replicación. Se han descrito RNAs defectivos en BBWV-2 (Lee *et al.*, 2000).

La constatación de recombinación entre los virus del género *Fabavirus* conlleva importantes implicaciones prácticas. Por una parte, en el diseño de métodos de control

como la protección cruzada o la resistencia transgénica hay que tener precaución en la introducción de variantes divergentes que pudieran recombinar y dar lugar a nuevos genotipos virales con diferentes propiedades biológicas (Falk & Bruening, 1994). Antes y después de aplicar estas estrategias de control se debería evaluar periódicamente la posible recombinación analizando distintas zonas genómicas. Por otra parte, en el diagnóstico y caracterización de aislados virales se debería considerar más de una zona genómica, puesto que las relaciones genéticas entre aislados puedan variar drásticamente en distintas zonas genómicas.

Capítulo 4

Desarrollo de nuevas técnicas moleculares de diagnóstico del género *Fabavirus*

4.1. ANTECEDENTES

La disposición de métodos fiables de detección e identificación de virus fitopatógenos es clave para su detección en nuevos huéspedes, estudios de transmisión y epidemiología y para el desarrollo y aplicación de medidas de control.

Tradicionalmente, la detección de los virus del género *Fabavirus* se ha realizado mediante ensayos biológicos con una batería de plantas indicadoras, observación de las partículas virales al microscopio electrónico y ELISA con anticuerpos policlonales. Los dos primeros métodos son lentos y costosos, limitando el número de muestras que pueden examinarse. El método de ELISA no presenta estas limitaciones y se puede aplicar a gran escala, lo que, junto a la disponibilidad comercial de anticuerpos policlonales específicos para BBWV-1 y BBWV-2, ha hecho que este sea el método más común para el diagnóstico rutinario de estos dos virus. Sin embargo, la fiabilidad de los anticuerpos policlonales es limitada puesto que distintas preparaciones de anticuerpos pueden diferir en su calidad, especificidad y afinidad. Además, los anticuerpos para detectar BBWV-2 pueden presentar reacción cruzada con BBWV-1. Por otra parte, sería interesante disponer de métodos para diferenciar aislados o cepas de BBWV-1 y BBWV-2, dada la gran variación genética observada en ambos virus (capítulo 3) y la repercusión que ello puede tener en su epidemiología y control.

En este trabajo, se ha utilizado el análisis de las secuencias nucleotídicas de aislados de BBWV-1, BBWV-2 y GeMV obtenidos previamente (Capítulos 2 y 3) para desarrollar métodos de detección basados en RT-PCR e hibridación molecular dot-blot (DBH, dot-blot hybridization) usando extractos de RNA e improntas de tejido (TP, tissue print). Se ha evaluado la sensibilidad y fiabilidad de estas técnicas en distintos huéspedes cultivados en invernadero o en campo en comparación con ELISA. Se ha desarrollado un método para la detección general de miembros del género *Fabavirus* y la identificación de las distintas especies del mismo mediante una única reacción de RT-PCR con un solo par de iniciadores. Por último, se han sintetizado sondas de DNA que permiten la detección universal de BBWV-1 o BBWV-2 por hibridación molecular, así como diferenciar cepas o grupos de aislados basándonos en sus relaciones genéticas.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Aislados virales y Material vegetal

Se analizaron aislados de tres especies del género *Fabavirus*, BBWV-1: 1S1, 1S7, 1S10; 1S11, 1S13, 1S16, 1S20, 1S27, 1S28, 1S33, 1S39, 1S45, 1S46, 1CR3, CR5, 1SY1, 1L1, 1N2, 1U2, 1I6, 1B1, 1B2, 1G14, 1G11 y 1G15; BBWV2: 2C1, 2G1, 2I1, 2I8, 2Is2, 2N1, 2N3, 2SA1 Y 2U1; y GeMV: 3J12. Los huéspedes originales, origen geográfico y año de obtención están indicados en la Tabla 3.1 (pág. 39).

El aislado 1S1 se inoculó mecánicamente o por áfidos en las siguientes especies: *N. rustica*, *N. megalosiphon*, *O. basilicum*, *V. unguiculata*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, alcachofa, zanahoria, lechuga, pimiento cultivares *Yolo Wonder*, *Doux des Landes* y pimiento dulce HíbridoDRP 4959 F1De, patata, berenjena, espinaca, guisante, judía y haba.

La inoculación mecánica del virus se realizó en el invernadero. Se homogeneizó 1 g de material vegetal infectado, fresco o congelado a -80° C, con 3 ml de tampón fosfato 0.03M, pH 7.0. Este extracto se depositó sobre varias hojas por planta, se frotó con carborundo y al cabo de unos minutos se lavaron las hojas para eliminar los restos de inóculo y carborundo.

En los ensayos de transmisión por pulgón se utilizaron individuos de las especies *Myzus persicae* y *Aphis gossypii*, procedentes de crías existentes en el IVIA sobre plantas de haba y algodón (*Gossypium hirsutum*), respectivamente, (amablemente cedidas por el Dr. A. Hermoso de Mendoza) que habían sido obtenidas a partir de pulgones capturados en la Comunidad Valenciana. Los pulgones se alimentaron en plantas infectadas de haba y al cabo de unos minutos se pasaron a plantas jóvenes sanas de distintas especies cubiertas con cilindros de plástico cerrados con malla en sus extremos. Tras 24 horas de alimentación, las plantas se destaparon y se pulverizaron con Pirimor (pirimicarb + endosulfan) para eliminar los pulgones.

4.2.2. ELISA

Se utilizaron anticuerpos policlonales comerciales anti-BBWV-1-IgG (DSMZ) obtenidos en conejo. Para preparar los extractos, se homogeneizaron 0.3 g de tejido vegetal en 1 ml de tampón de extracción PBS (8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM NaCl, pH 7.4), al que se añadió 3 mM Na₃N, 0.05% (v/v) Tween 20, 2% (p/v) polyvinyl pyrrolidone (PVP-10000) y 0.2% (p/v) seroalbúmina bovina (BSA), usando un politrón (Kinematica, Littau, Suiza). El tapizado, la incubación con los anticuerpos, los lavados y el revelado de las placas se realizó según las instrucciones descritas por el fabricante (DSMZ). La densidad óptica (OD) a 405 nm se midió utilizando un lector de microplacas Titertek Multiscan® Plus (Laboratory Systems, Helsinki, Finlandia) o un lector de microplacas BioRad 3550. Se consideraron como positivas aquellas muestras cuya lectura media era al menos tres veces superior a la lectura media del control negativo.

4.2.3. RT-PCR

Se seleccionaron los iniciadores Fab5'R1F/Fab5'R1R y MP4F/MP4R (Tabla 3.2, pág. 41) para desarrollar un método de detección basado en RT-PCR con extractos de RNA total (apartado 2.2.2., pág. 26). El protocolo utilizado y las condiciones de RT-PCR se describen en la sección 2.2.3 (pág. 27). Los productos de RT-PCR se analizaron por electroforesis a 100 V, en geles de agarosa al 2% o de poliacrilamida al 8% usando TAE1X (40 mM Tris-acetate pH 8.3, 1 mM EDTA) como tampón de electroforesis y se visualizaron mediante UV tras teñirlos con bromuro de etidio.

4.2.4. Hibridación molecular

Se prepararon sondas correspondientes a la región A (RNA 1, posiciones 11-563) mediante RT-PCR con los iniciadores Fab5'R1F/Fab5'R1R a partir del aislado 1S1 de BBWV-1 (sonda A_{1S1}) y del aislado 2C1 de BBWV-2 (sonda A_{2C1}), así como sondas de la región C (RNA 2, posiciones 1044-1503) a partir de los aislados 1S1 y 1U2 de BBWV-1 (sondas C_{1S1} y C_{1U2}). La amplificación se efectuó según las condiciones de PCR descritas en el apartado 3.2.2. (pág. 40) y los productos obtenidos se clonaron en el vector pGem-T (Promega) según procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Estos clones se utilizaron como molde para el marcaje de las sondas con digoxigenina mediante PCR utilizando las mismas condiciones pero añadiendo 70 µM DIG-UTP (Roche) a la mezcla de reacción.

Para realizar los ensayos de hibridación con RNAs virales, se depositó 1 µl de extracto de RNA total sobre membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) y se fijó mediante irradiación con luz ultravioleta (50 mJ) con un aparato UVC (Hoefer). Para la hibridación con improntas de tejido, se prepararon cortes transversales de peciolas u hojas enrolladas e inmediatamente se presionaron sobre las membranas de nylon. La prehibridación se realizó durante 1 h en presencia de la solución de hibridación (50% formamida, 0.2% SDS, 5% SSC 20X, 2% solución de bloqueo y 0.1% N-lauril sarcosina) y la hibridación, previa adición de 25 ng de la sonda, se realizó durante 16 h utilizando el tampón comercial Ultrahyb (Ambion). La hibridación se detectó utilizando el Kit DIG Nucleic Acid Detection (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante, pero introduciendo 2 lavados con tampón maleato con 0.3% de Tween 20 tras la incubación con el conjugado de anticuerpos anti-digoxigenina (Narváez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2003). La reacción se reveló utilizando el sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Roche), con exposición de las películas (Kodak) durante 15 min a 37° C o utilizando el equipo Luminiscent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm) con un tiempo de exposición variable entre 30 min y 2 h.

4.2.5. Análisis de secuencias

Para evaluar el nivel de especificidad de la detección por hibridación, se calculó la identidad nucleotídica entre las sondas y las zonas genómicas correspondientes de los aislados ensayados a partir de las distancias genéticas. Éstas se calcularon a partir de las secuencias alineadas en el capítulo 3 mediante el programa MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2004) pero sin utilizar ningún modelo evolutivo que estime las sustituciones superpuestas (opción p-distance).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Puesta a punto y evaluación de las técnicas de detección

4.3.1.1. Evaluación de la sensibilidad

Para comparar la sensibilidad de cada una de las técnicas se preparó una mezcla homogénea de hojas sintomáticas de plantas de *N. megalosiphon* infectadas con el aislado de BBWV-1, 1S1, y otra con hojas de plantas sanas. Una alícuota de esta muestra (equivalente a 300 mg) se homogeneizó en 1 ml de tampón ELISA, se clarificó mediante una breve centrifugación y se utilizó para hacer diluciones seriadas. Dado que en cada pocillo de la placa de ELISA se ponen 200 μ l del extracto, se analizó el equivalente a 60; 30; 15; 7.5; 6, 3, 1.5, 0,75, 0,6, 0,12, 0,06 y 0,006 mg de los dos extractos vegetales. Otra alícuota (equivalente a 100 mg) se utilizó para la obtención de 50 μ l de extracto de RNAs totales, del que también se prepararon diluciones seriadas que fueron analizadas mediante RT-PCR con los iniciadores MP4F/MP4R y por hibridación molecular con la sonda C_{1S1}. Puesto que en ambas técnicas se empleó 1 μ l del extracto en cada muestra, se analizó el equivalente a 0.4, 0.2, 0.1, 0.04, 0.02, 0.01, 0.004, 0.002, 0.001, 0.0004, 0.0002 y 0.0001 mg de tejido vegetal.

El virus se detectó mediante ELISA en extractos equivalentes ≥ 0.75 mg de tejido vegetal infectado, mientras que la detección del virus mediante RT-PCR e hibridación molecular dot-blot se obtuvo en extractos equivalentes ≥ 0.002 y ≥ 0.04 mg de tejido fresco, respectivamente (Figura 4.1). Los extractos de planta sana dieron reacción negativa con las tres técnicas utilizadas. Estos resultados en los que la técnica de RT-PCR es la más sensible, seguida de la hibridación, concuerdan con los obtenidos con otros virus utilizando dichas técnicas (Hu *et al.*, 1995; James *et al.*, 1999; Galipienso *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2004).

Curiosamente, la lectura de ELISA en el extracto diluido equivalente a 7.5 mg de tejido vegetal fue mayor que las de los extractos más concentrados, sugiriendo la presencia de algún inhibidor o una mejor accesibilidad del antígeno a los anticuerpos fijados en las muestras diluidas.

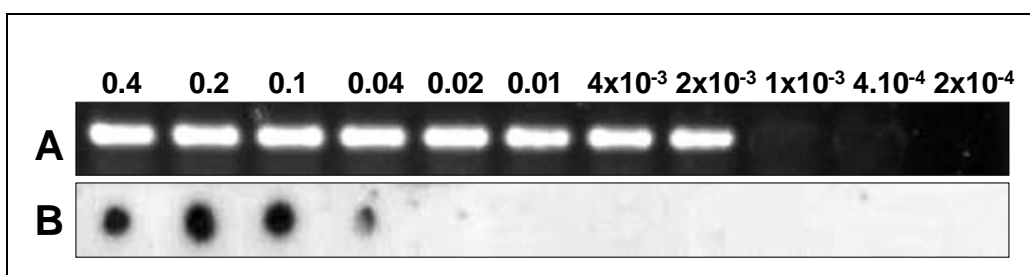


Figura 4.1. Evaluación de la sensibilidad de las técnicas de RT-PCR (A) e hibridación molecular dot-blot (B). Los números indican los equivalentes de material vegetal de extractos de RNA purificados a partir de plantas de *N. megalosiphon* infectadas con el aislado 1S1 de BBWV-1.

4.3.1.2. Selección del material vegetal más adecuado para la detección de BBWV-1 por métodos serológicos, RT-PCR e hibridación molecular

Para estudiar la distribución del virus en la planta y determinar cual era el mejor material de la planta para la detección, se inocularon mecánicamente dos plantas de haba y dos de pimiento con el aislado 1S1 de BBWV-1. Al cabo de dos meses se recogieron, siempre que fue posible, tres hojas sintomáticas y otras tres asintomáticas de la zona apical y otras tantas de las zonas intermedia y basal (Figura 4.2). También se recogieron hojas apicales, intermedias y basales de plantas no infectadas de la misma edad. Todas las muestras se analizaron mediante ELISA, inmunopresión-ELISA (TBIA, tissue blot immunoassay) (análisis efectuado por el Dr. F. Escriu, CIFA, Zaragoza, siguiendo el protocolo utilizado en otros virus) (Lin *et al.*, 1990; Martín *et al.*, 2002), RT-PCR con los iniciadores MP4F/MP4R e hibridación molecular dot-blot con extractos de RNA total y con improntas de tejido vegetal utilizando la sonda C_{1S1}. El análisis se efectuó dos meses después de la inoculación, cuando se produce una disminución del título viral (Stubbs 1947), para evaluar las técnicas en las condiciones menos favorables que pueden darse con muestras procedentes del campo.

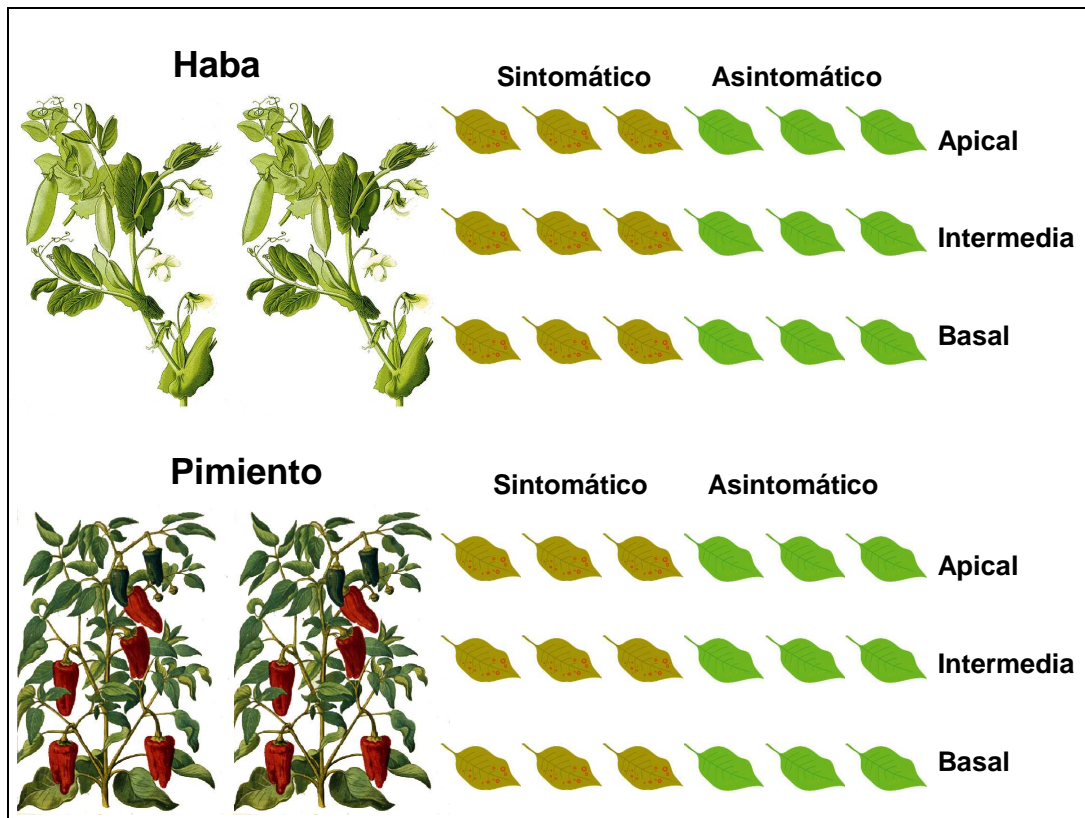


Figura 4.2. Esquema del experimento para evaluar el material vegetal para la detección de BBWV-1. Se analizaron tres hojas asintomáticas y otras tres sintomáticas de las zonas apical, basal e intermedia de dos plantas de haba y dos de pimiento infectadas con el aislado 1S1 de BBWV-1.

El aislado 1S1 de BBWV-1 se detectó en la mayoría de plantas de ambos huéspedes mediante ELISA (50 de 57), RT-PCR (56 de 57), e hibridación dot-blot (54 de 57), (Tabla 4.1.A.). En haba, el número de muestras positivas por los tres métodos fue mayor en hojas con síntomas que en las asintomáticas; mientras que todas las muestras de pimiento, tanto sintomáticas como asintomáticas, fueron positivas a excepción de dos hojas con síntomas que dieron negativo por ELISA (Tabla 4.1.B).

Tabla 4.1. Detección del aislado 1S1 de BBWV-1 en hojas de dos plantas de haba y dos plantas de pimiento:

A) Según la posición (edad) de la hojas en la planta.

	Posición en la planta	Nºde muestras	Serología		RT-PCR	Hibridación	
			ELISA	TBIA		Dot-Blot	Improntas
HABA	Apical	12	9	10	11	11	11
	Intermedia	12	11	12	12	11	11
	Basal	9	8	5	9	8	5
	Total muestras	33	28	27	32	30	27
PIMIENTO	Apical	6	5	0	6	6	1
	Intermedia	12	11	0	12	12	3
	Basal	6	6	1	6	6	2
	Total muestras	24	22	1	24	24	6
TOTAL		57	50	28	56	54	33

B) Según la presencia o ausencia de síntomas en las hojas.

	Posición en la planta	Nºde muestras	Serología		RT-PCR	Hibridación	
			ELISA	TBIA		Dot-Blot	Improntas
HABA	Asintomáticas	18	13	13	17	15	12
	Sintomáticas	15	15	14	15	15	15
PIMIENTO	Asintomáticas	12	12	1	12	12	3
	Sintomáticas	12	10	0	12	12	3
TOTAL	Asintomáticas	30	25	14	29	27	15
	Sintomáticas	27	25	14	27	27	18

La media de los valores de ELISA fue mayor en las hojas de las zonas apical e intermedia (2.13 y 2.34) que en la zona basal (1.93) y mayor en las hojas con síntomas (2.49) con respecto a las asintomáticas (1.85). Esto también ocurrió con la intensidad de la señal obtenida mediante hibridación dot-blot (Figura 4.3). Ello sugiere que, la acumulación del virus es algo superior en hojas jóvenes y con síntomas que en las viejas y asintomáticas.

El análisis de las improntas de tejido vegetal por hibridación y TBIA permitió detectar el aislado 1S1 de BBWV-1 en la mayoría de hojas de las zonas apical e intermedia de las dos plantas de haba y en alrededor de la mitad de las muestras de la zona basal.

Esto puede ser debido a una distribución irregular del virus en la planta o a una fijación menor del RNA total en la membrana a partir de las hojas basales que son menos succulentas, tal y como se ha descrito para otros virus de plantas (Martín *et al.*, 2004). En el caso de las plantas de pimiento, el elevado ruido de fondo dificultó la detección del virus en improntas de tejido (Figura 4.3), llegando a la conclusión de que estas técnicas no pueden utilizarse para la detección en plantas de pimiento.

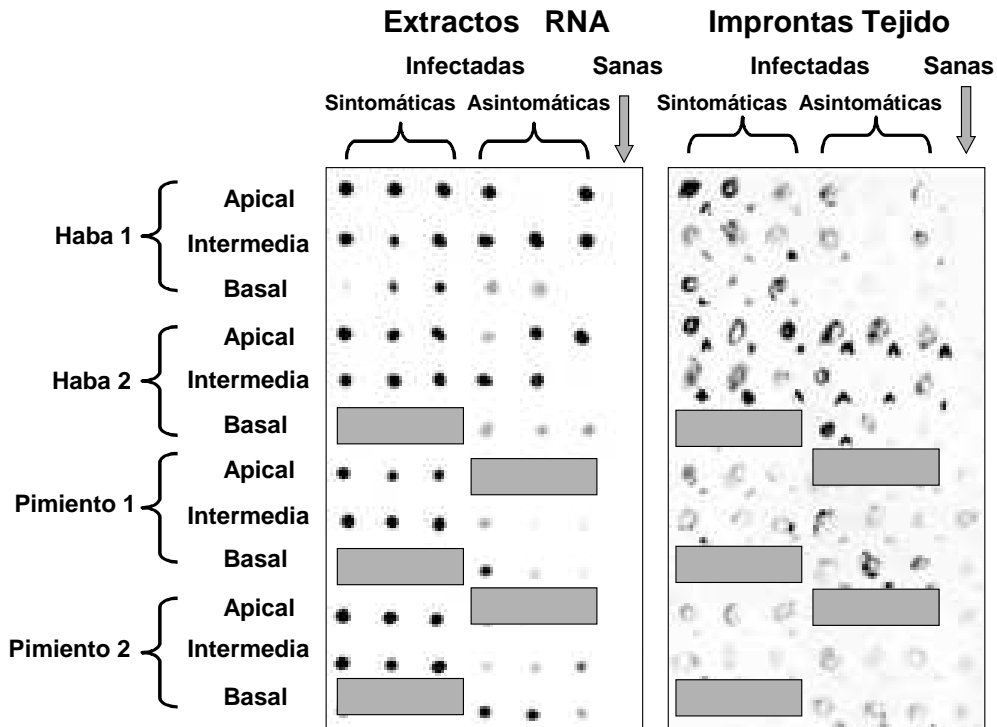


Figura 4.3. Hibridación con extractos de RNA (dot-blot) y con improntas de tejido (tissue print) utilizando la sonda C₁₅₁ en hojas asintomáticas y sintomáticas de las zonas basal, apical e intermedia de plantas de haba y pimiento. Los rectángulos en gris representan aquellas muestras no disponibles.

La fiabilidad de la detección puede ser mejorada analizando varias muestras por planta. Se estimó el número de muestras por planta tomadas al azar necesario para un diagnóstico fiable considerando una probabilidad binomial mayor o igual al 95% a partir de los datos de la Tabla 4.1. Según este criterio, se deberían analizar dos muestras por RT-PCR e hibridación dot-blot y tres mediante ELISA. Para la hibridación con improntas y TBIA, el cálculo se hizo por separado para las muestras de haba y de pimiento debido a la disparidad de los resultados obtenidos en cada huésped. Así, para el haba, el número mínimo estimado de muestras requeridas fue 3 para ambos métodos, y para pimiento fue 30 para la hibridación y 2772 para TBIA.

El análisis de improntas (hibridación y TBIA) suponen un ahorro considerable de trabajo y tiempo, puesto que se evita el procesado de las muestras. Las improntas se pueden preparar directamente en campo al realizar el muestreo, almacenar a temperatura ambiente y mandarlas por correo a cualquier laboratorio para su análisis. Sin embargo, los resultados obtenidos en plantas de pimiento parecen indicar que estas técnicas pueden no funcionar para algunas especies vegetales, por lo que es necesario realizar ensayos preliminares antes de su aplicación en campo.

4.3.1.3. Detección de BBWV-1 en diferentes huéspedes

Para determinar si BBWV-1 podía detectarse en diferentes huéspedes se inoculó mecánicamente el aislado 1S1 de BBWV-1 en tres plantas de las siguientes especies: *N. rustica*, *N. megalosiphon*, *O. basilicum*, *V. unguiculata*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *G. globosa*, alcachofa, zanahoria, lechuga, pimiento cultivares *Yolo Wonder*, *Doux des Landes* y pimiento dulce HíbridoDRP 4959 F1De, patata, berenjena, espinaca, guisante, judía y haba, dejando en todos los casos dos plantas de cada especie sin inocular como control negativo. Dos meses después de la inoculación, se analizaron hojas jóvenes mediante ELISA, RT-PCR con los iniciadores MP4F/MP4R e hibridación dot-blot con la sonda C_{1S1}. El aislado 1S1 se detectó en todos los huéspedes menos en alcachofa, zanahoria, lechuga, patata, espinaca y judía. Intentos de inoculación de estas especies con el mismo aislado mediante pulgones (*Myzus persicae* y *Aphis gossypii*) dieron resultado negativo, mientras que fue posible su transmisión a pimiento y haba. Esto sugiere que alcachofa, zanahoria, lechuga, patata, espinaca y judía no son huéspedes del aislado 1S1 de BBWV-1.

4.3.2. Detección e identificación de especies del género *Fabavirus* mediante RT-PCR

En los capítulos 2 y 3 se llevó a cabo el alineamiento de todas las secuencias disponibles del genoma completo de aislados del género *Fabavirus* (dos de BBWV-1, seis de BBWV-2 y una de GeMV), a partir de las cuales se diseñaron cuatro pares de iniciadores (Tabla 3.2, pag. 41) a partir de tramos de secuencia conservados, con el fin de poder amplificar por RT-PCR cualquier aislado viral perteneciente a este género. El par de iniciadores Fab5'F/Fab5'R se diseñó para amplificar la región no codificable del extremo 5' (5'NCR) del RNA 1 y el comienzo de la región codificante. Al alinear estas secuencias se observó que el tamaño de 5'NCR variaba para cada especie viral debido a la presencia de inserciones y deleciones en esta región (Figura 4.4). Así, el tamaño esperado de los productos de RT-PCR era de 354 y 356 pb para los dos aislados de BBWV-1, entre 386 y 391 pb para los seis aislados de BBWV-2 y 320 pb para el aislado de GeMV. La diferente movilidad electroforética de los productos de RT-PCR podría usarse para identificar estas especies de fabavirus.

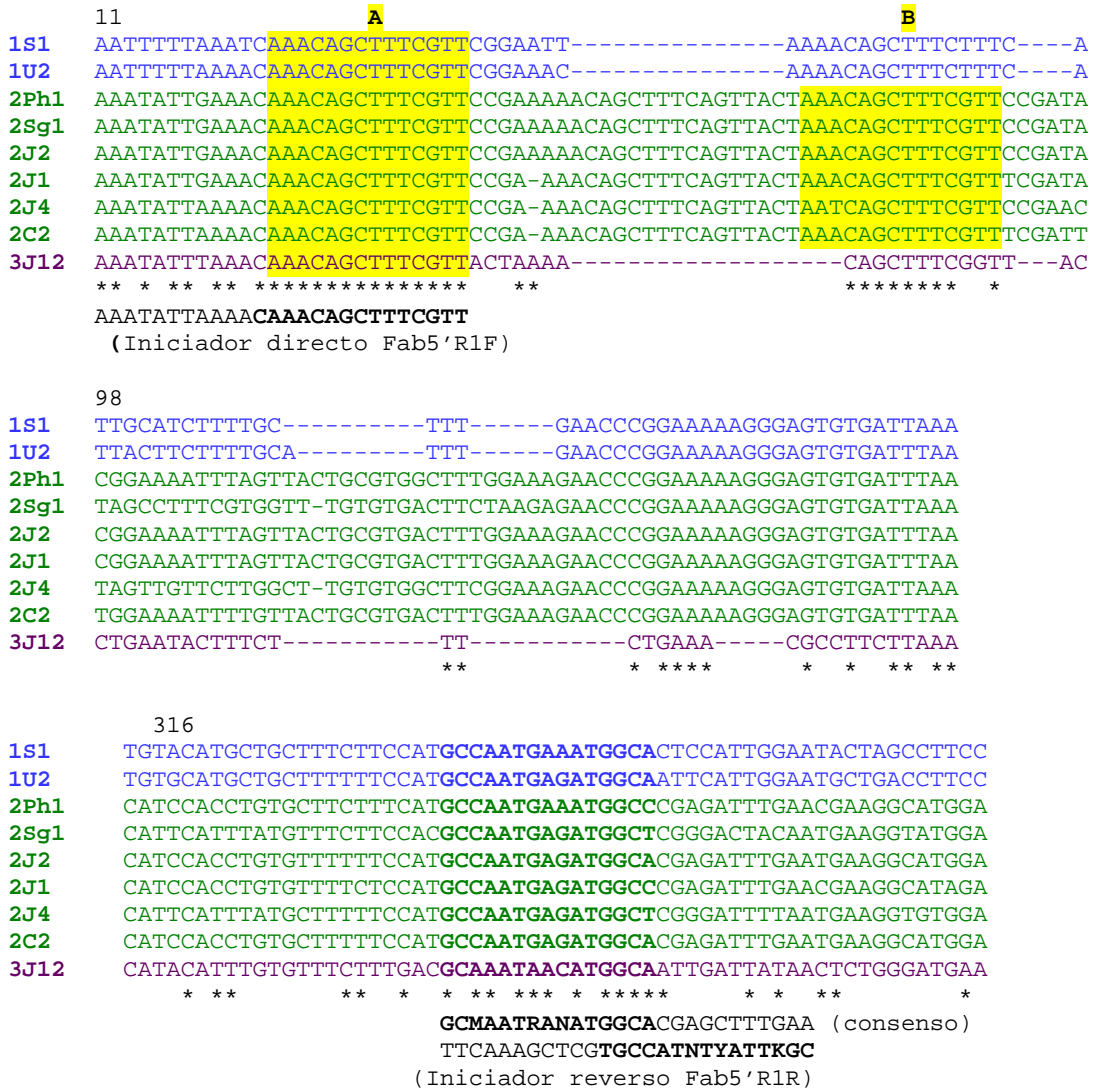


Figura 4.4. Alineamiento de las secuencias correspondientes al extremo 5' del RNA 1 de aislados de tres especies de fabavirus (BBWV-1 en azul, BBWV-2 en verde y GeMV en púrpura) utilizado para el diseño de los iniciadores Fab5'R1F y Fab5'R1R basados en secuencias conservadas. El alineamiento se muestra en tres bloques discontinuos que muestran la posición de los iniciadores y las inserciones o deleciones (indicadas por guiones) responsables de la diferencia de tamaño de la región no codificante (5'NCR) en las tres especies virales. Los números situados en la parte superior indican la posición nucleotídica respecto al aislado 1S1 y los asteriscos indican las posiciones conservadas para todas las secuencias. La zona sombreada amarilla A corresponde al tramo de 14 nt presente en el extremo 3' del iniciador Fab5'RF1 que se repite en otra posición en los aislados de BBWV-2 (zona sombreada B). Los nucleótidos conservados en los iniciadores están indicados en letra negrita. El iniciador Fab5'R1R es degenerado y los nucleótidos alternativos son: K (T + G); M (A + C); N (A+T+G+C); R (A + G) e Y (T + C).

Para confirmar esta hipótesis se amplificaron por RT-PCR con estos iniciadores extractos de RNA total de los aislados 1U2, 1UK1, 1N2, 1B1, 1S1 y 1SY1 de BBWV-1; 2U1, 2C1, 2Is2, 2N1, 2SA1 y 2I1 de BBWV-2; 3J12 de GeMV y 4UK1 de LMMV (Tabla 3.1, pág. 39) que fueron amplificados mediante RT-PCR. El DNA sintetizado se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% cuya resolución permite detectar las

diferencias de tamaño esperadas. Los seis aislados de BBWV-1, los seis de BBWV-2 y el de GeMV dieron en cada caso un producto de amplificación único. El de los seis aislados de BBWV-1 era de tamaño similar entre ellos, pero menor que los obtenidos a partir de los seis aislados de BBWV-2, que a su vez eran de tamaño similar entre ellos, y mayor que el obtenido a partir del aislado de GeMV (Figura 4.5). En ningún caso se obtuvo amplificación a partir de extractos de RNA de planta sana o de planta infectada con aislados de especies pertenecientes a otros géneros de la familia *Comoviridae* (*Tomato black ring virus* y *Broad bean true mosaic virus*). Tampoco se pudo amplificar el aislado de LMMV con estos y otros iniciadores basados en secuencias conservadas (datos no mostrados). Sería necesaria la obtención de una genoteca aleatoria y la secuenciación de LMMV (como se realizó en el capítulo 2 con BBWV-1) para averiguar porque los iniciadores diseñados no amplificaron este virus y confirmar si su clasificación dentro del género *Fabavirus* es adecuada.

Para averiguar si los iniciadores Fab5'F/Fab5'R podrían utilizarse para detectar infecciones mixtas de distintas especies de fabavirus, se amplificó por RT-PCR una mezcla equimolar de RNAs de los aislados 1S1 de BBWV-1, 2C1 de BBWV-2 y 3J12 de GeMV, utilizando extractos cuya concentración se había ajustado previamente mediante hibridación molecular de diluciones seriadas de los mismos. La electroforesis de este producto de RT-PCR mostró tres bandas de similar intensidad cuyo tamaño se correspondió al obtenido al amplificar sus RNAs por separado (Figura 4.5, carril 14), sugiriendo que los iniciadores no muestran preferencia por ninguno de estos aislados. Para analizar plantas con infecciones mixtas, se inocularon mecánicamente los aislados 1S1 y 2C1 por separado o conjuntamente en diferentes proporciones (5:1, 1:1 y 1:5) en plantas de haba (cinco plantas para cada aislado o combinación). La mayoría de las plantas que fueron doblemente inoculadas mostraron el fenotipo del aislado 2C1 (síntomas más severos) y la RT-PCR produjo un solo fragmento de cDNA cuyo tamaño correspondía al esperado para 2C1, lo que sugiere que este aislado presenta una mayor eficacia biológica (*fitness*) y probablemente desplazó al aislado 1S1. Sólo una planta (inoculada con 1S1 y 2C1 en proporción 5:1) presentó una doble infección (Figura 4.6, último carril). Ello demuestra que esta técnica es válida para detectar infecciones mixtas. Sin embargo, en algunos casos el iniciador Fab5'R1F puede unirse también a una región adyacente del genoma de BBWV-2 que presenta una repetición de 14 nt (Figura 4.4, zona sombreada B), de modo que la RT-PCR de un aislado de BBWV-2 puede dar lugar a un perfil electroforético compuesto de una banda intensa del tamaño esperado para BBWV-2 y una banda tenue de menor tamaño que puede ser confundida con la banda correspondiente a BBWV-1 en una infección mixta. No obstante, este problema se puede evitar fácilmente realizando la PCR con una temperatura de anillado de 55°C y evitando que la Taq DNA polimerasa actúe antes de haber desnaturalizado la muestra (*hot start PCR*).

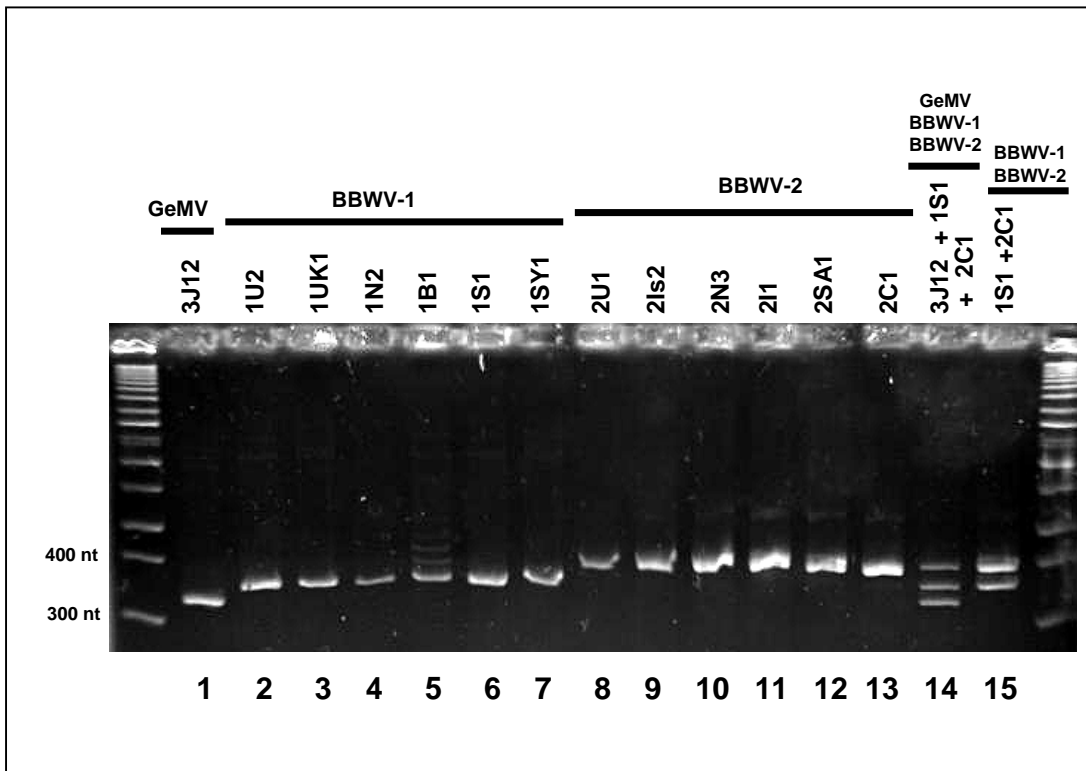


Figura 4.5. Análisis electroforético (gel de poliacrilamida al 8%) de los productos de RT-PCR obtenidos con los iniciadores Fab5'R1F y Fab5'R1R a partir de RNA extraído de plantas infectadas con distintos aislados de BBWV-1, BBWV-2 y GeMV del género *Fabavirus*. El carril 15 corresponde a una mezcla equimolar de RNAs de los aislados 3J12 (GeMV), 1S1 (BBWV-1) y 2C1 (BBWV-2) y el carril 16 a RNA extraído de una planta infectada por 1S1 y 2C1.

La detección universal mediante RT-PCR con iniciadores conservados ha sido desarrollada para varios grupos de virus vegetales (Robertson *et al.*, 1991; Tian *et al.*, 1996; Gibbs & Mackenzie, 1997). En algunos de estos casos, los productos de RT-PCR se digieren con uno o varios enzimas de restricción para realizar un análisis de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para la identificación individual de cada virus (Choi *et al.*, 1999). Sin embargo, la elevada variabilidad nucleotídica dentro de cada especie de fabavirus hace la técnica de RFLP inapropiada para discriminar entre especies, puesto que cada aislado presentaría un patrón de RFLP distinto. Otro método utilizado para la identificación simultánea de varios virus ha sido la RT-PCR multiplex usando iniciadores específicos de cada virus en una sola reacción (Bariana *et al.*, 1994; Dovas *et al.*, 2002; Bertolini *et al.*, 2003). El método desarrollado en este trabajo es poco común ya que permite detectar e identificar las tres especies del género *Fabavirus*: BBWV-1, BBWV-2 y GeMV en infecciones simples o mixtas con una sola reacción de RT-PCR usando un único par de iniciadores. Además, este sencillo método podría servir para descubrir nuevas especies de este género.

4.3.3. Detección y diferenciación de aislados de BBWV-1 y BBWV-2 mediante hibridación molecular

Los análisis de secuencia realizados en los capítulos 2 y 3 permitieron seleccionar dos regiones genómicas con distinto grado de variabilidad, para sintetizar sondas y conseguir distintos niveles de especificidad en la detección por hibridación.

Con el fin de detectar el mayor número de aislados se ensayó la hibridación con sondas correspondiente a la región más conservada, la zona genómica A (RNA 1, posiciones 11-563) en condiciones de baja astringencia (hibridación a 55°C). La sonda A_{1S1} obtenida del aislado 1S1 de BBWV-1 reaccionó positivamente con todos los aislados de BBWV-1 analizados pero no con los aislados de BBWV-2 o con extractos de planta sana, mientras que la sonda A_{2C1}, obtenida a partir del aislado C1 de BBWV-2, dió el resultado opuesto, es decir, reaccionó con todos los aislados de BBWV-2 pero no con los de BBWV-1 (Figura 4.6).

Para conseguir una mayor especificidad en la detección se emplearon sondas correspondientes a un región más variable, la zona genómica C (RNA 2, posiciones 1044-1503) y se realizó la hibridación a 60° C. La sonda C_{1S1} obtenida a partir del aislado 1S1 hibridó con los otros aislados españoles de BBWV-1 y con los aislados 1SY1 y 1L1 de BBWV-1, procedentes de Siria y Líbano, mientras que la sonda C_{1U2} obtenida a partir del aislado 1U2 de BBWV-1 procedente de EEUU reaccionó positivamente con el aislado homólogo y con los aislados 1N2 y 1G11, de Holanda y Alemania, respectivamente (Figura 4.6).

Para averiguar la mínima identidad nucleotídica necesaria para una hibridación detectable en las condiciones descritas, se calculó este valor para los aislados analizados en las dos regiones genómicas (Figura 4.6). Se observó hibridación con los aislados que presentaban unos valores de identidad nucleotídica superiores al 85% pero no con aquellos cuya identidad era inferior al 80%, lo que significa que se pueden discriminar grupos de aislados en base a su relación genética.

La hibridación molecular es un método adecuado para el diagnóstico rutinario a gran escala. El método desarrollado en este trabajo permite el diagnóstico de BBWV-1 y BBWV-2 (con sondas correspondiente a una zona conservada), así como discriminar cepas o grupos de aislados divergentes (con sondas correspondientes a una zona más variable). Disponer de un método rápido para detectar y diferenciar aislados puede ser una herramienta valiosa en estrategias de control como el uso de variedades resistentes obtenidas por mejora o transformación genética, puesto que la eficacia depende de la interacción específica entre los genotipos virales y los huéspedes. Así mismo, en España, las sondas sintetizadas pueden utilizarse para detectar una posible aparición de BBWV-2 o de aislados divergentes de BBWV-1.

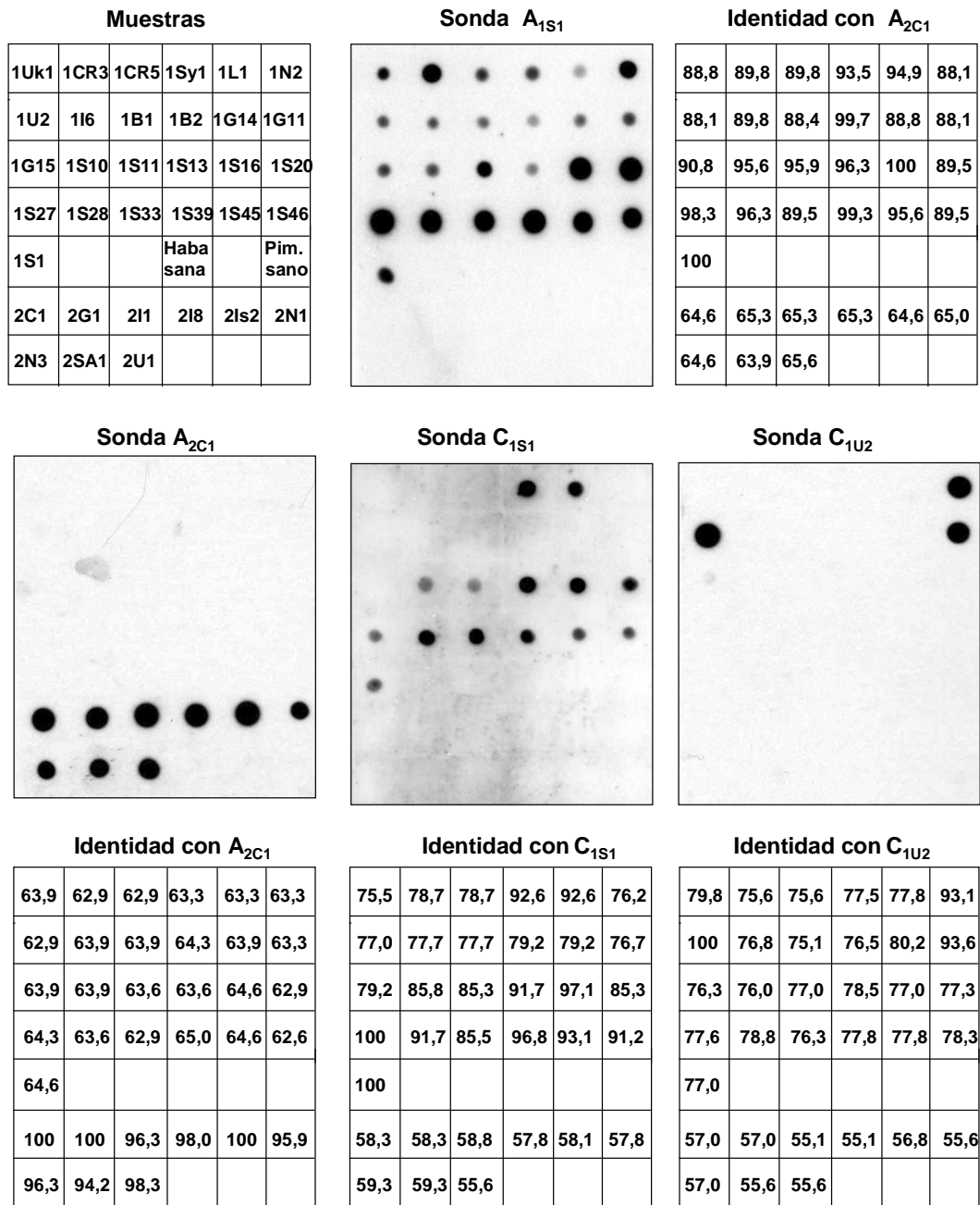


Figura 4.6. Detección de aislados de BBWV-1 y BBWV-2 mediante hibridación molecular con las sondas A_{1S1} (obtenida de la región genómica A del aislado 1S1), A_{2C1} (región A del aislado 2C1), C_{1S1} (región C del aislado 1S1), y C_{1U2} (región C del aislado 1U1). El primer número del código de cada aislado indica la especie a la que pertenece: 1 para BBWV-1 y 2 para BBWV-2. Los valores de identidad nucleotídica entre las sondas y las zonas genómicas correspondientes de las muestras están indicados como porcentaje de nucleótidos idénticos.

Capítulo 5

Evaluación del efecto del BTH en el control de la infección viral

5.1. ANTECEDENTES

La producción agrícola en los países desarrollados se enfrenta con el reto de cubrir las demandas crecientes en la producción de alimentos de calidad, pero con escasas posibilidades de incrementar la superficie cultivada y con una fuerte presión de la opinión pública para preservar el medio ambiente. Esta situación confiere una especial relevancia a la adopción de sistemas de control de plagas y enfermedades que sean económicamente viables, respetuosos con el entorno y compatibles con los principios del control integrado y de la agricultura sostenible. Los virus de plantas representan uno de los grupos de patógenos más importantes en la naturaleza, causando graves pérdidas económicas en muchas especies de interés agronómico (Hull, 2002). El control de las enfermedades virales presenta graves dificultades, ya que para la mayoría de los virus no se han obtenido variedades comerciales con resistencia duradera y estable por procedimientos de mejora genética. Por tanto, una parte de los esfuerzos que se realizan actualmente para el control de las virosis se centran en el estudio de la interacción virus-planta.

Entre los diferentes mecanismos de defensa que presentan las plantas frente a la invasión por patógenos, uno de ellos es la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), la cual se activa como respuesta de la planta frente a distintos factores adversos, incluyendo daños mecánicos o el ataque de insectos o patógenos (hongos, bacterias y virus). Una vez activado, el tejido afectado envía señales al resto de la planta para que la reacción SAR se active y proteja la planta frente a nuevas acciones del mismo u otros agentes.

La SAR se distingue de otros mecanismos de defensa de la planta por dos razones fundamentales, A) El amplio espectro de patógenos frente a los que se activa: nematodos, virus, bacterias y hongos (Rasmussen *et al.*, 1991; Uknes *et al.*, 1992; Vernooij *et al.*, 1995; Sticher *et al.*, 1997; Anfoka, 2000; Zhu *et al.*, 2002; Gozzo, 2003; Zhu *et al.*, 2007; Malamy *et al.*, 1990); y B) La inducción de genes específicos llamados genes SAR (Ryals *et al.*, 1996).

Hasta la fecha, se sabe que el ácido salicílico (SA) es el único compuesto producido por la planta que está implicado en la activación de la SAR. Se comprobó que la cantidad de SA en plantas de tabaco y pimiento aumentaba varios cientos de veces tras ser infectadas por un patógeno (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1991; Qiu *et al.*, 2004; Silverman *et al.*, 2005; Potlakayala *et al.*, 2007; McConchie *et al.*, 2007). Posteriormente, se han obtenido numerosas evidencias de que la concentración de SA está implicada en la resistencia de la planta frente a las enfermedades no sólo en plantas de pimiento y tabaco sino en muchas otras especies (White, 1979; Ward *et al.*, 1991; Vernooij *et al.*, 1995) y que la aplicación exógena de SA activa la respuesta SAR (Ward *et al.*, 1991; Uknes *et al.*, 1992) y la expresión de los genes SAR (Friedrich *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996a; Lawton *et al.*, 1996b).

En la ruta metabólica a partir de la que se sintetiza el SA participan proteínas y compuestos de defensa que incluyen proteínas enzimáticas de la vía de los

fenilpropanoides (fenilalanina amonio liasa, PAL; chalcona sintasa; CHS, peroxidasas, etc.), glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HyP), relacionadas con el reforzamiento de la pared celular, y glucanasas y quitinasas, que hidrolizan las paredes celulares de los hongos, entre otras (Reymond & Farmer, 1998), (Figura 5.1).

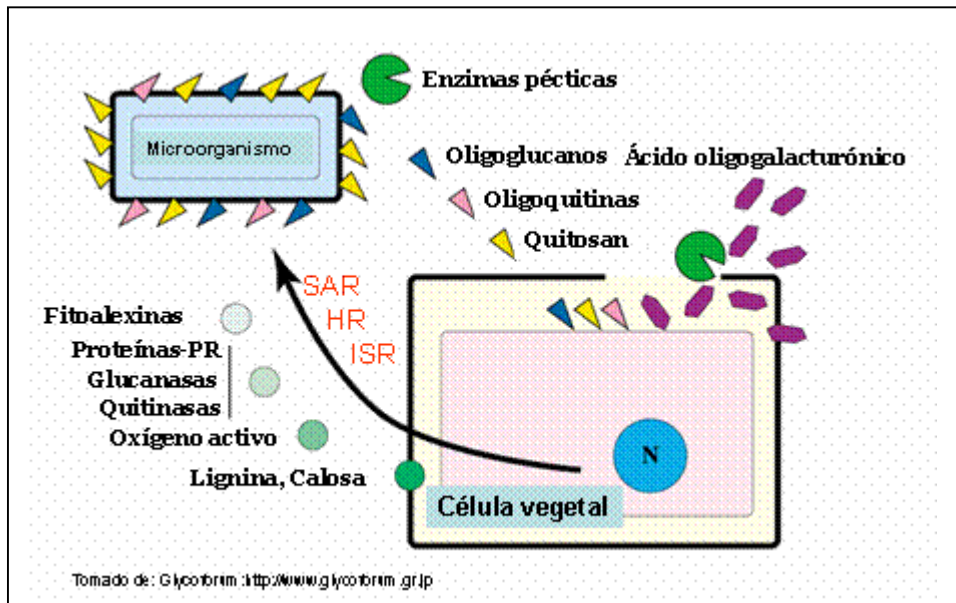


Figura 5.1. Respuesta de la célula vegetal frente al ataque de un patógeno. Los oligoglucanos, las oligoquitasas, los quitosanos y/o ácidos oligogalacturónicos actuarían como inductores biológicos de la respuesta.

Para el control de enfermedades se han obtenido productos químicos análogos al SA que inducen la SAR tales como, el ácido 2,6 – dicloroisocotínico y su metil éster, ambos denominados INA y el S-metil benzo[1,2,3]tiadiazol-7-carbotioato (BTH) (Zhu *et al.*, 2002;Pérez *et al.*, 2003;Zhu *et al.*, 2003;Pérez-de-Luque *et al.*, 2004;Serrano *et al.*, 2007;Zhu *et al.*, 2008), que suministra protección frente a diversas enfermedades en una amplia gama de cultivos (Colson-Hanks *et al.*, 2000;Colson-Hanks & Deverall, 2000;Maxson-Stein *et al.*, 2002;Agostini *et al.*, 2003) .

En este capítulo se ha pretendido evaluar la aplicación de BTH para el control de BBWV-1. Para ello, se aplicó BTH a plantas de *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia 0 infectadas con BBWV-1. Estos estudios preliminares indican que el BTH podría ser una herramienta alternativa al uso de pesticidas, respetuosa con el medio ambiente y económicamente rentable para el control de este virus.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Aislados virales y material vegetal

Para llevar a cabo este estudio se trabajó con un grupo de 40 plantas de *A. thaliana* cv. Columbia 0 cultivadas en cámara en condiciones controladas de 12 h en oscuridad a 17°C y 12 horas de luz a 21°C. Se inocularon mecánicamente 38 plantas con el aislado 1S1 de BBWV-1, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2.1. (pág. 61) y las dos restantes se dejaron sin inocular.

5.2.2. Aplicación de BTH

Dos horas después de la inoculación con el aislado 1S1 de BBWV-1, las plantas se pulverizaron con una solución de BTH 0.6 mM (Bion, Novartis Crop Protection). Unos minutos después de la aplicación las plantas se lavaron con agua miliQ para eliminar los restos de BTH.

5.2.3. Detección del virus

Para detectar el virus se extrajo RNA total siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.2. (pág. 26) y se analizó mediante RT-PCR e hibridación molecular. La RT-PCR se realizó utilizando los iniciadores conservados MP4F/MP4R (Tabla 3.2, pág. 41), el protocolo utilizado se describe en el apartado 2.2.3. (pág. 27).

La hibridación molecular se realizó según se describe en el protocolo del apartado 4.2.4. (pág. 63) utilizando en este caso la sonda C_{1S1} (ver apdo. 4.2.3., pág. 63).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para ensayar si BTH confiere resistencia frente a BBWV-1, de un total de 40 plantas de *A. thaliana*, 38 se inocularon con el aislado 1S1 de BBWV-1 dejando dos sin inocular como control negativo. Dos horas después de la inoculación, se realizó el tratamiento con BTH en 19 plantas y las 19 restantes se dejaron sin tratar.

A los 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días post-inoculación (dpi) se recogieron muestras de tres plantas tratadas con BTH y otras tres plantas sin tratar. Además, al 14 dpi se recogieron muestras de las dos plantas sanas (Figura 5.2). De todas ellas se extrajo el RNA total que se analizó mediante RT-PCR e hibridación molecular dot-blot.



Figura 5.2. Esquema del experimento diseñado para comprobar la eficiencia de la aplicación de BTH para el control de BBWV-1 en plantas de *A. thaliana* cultivar Col-0.

El virus no se detectó en las plantas analizadas a los 4, 6 y 8 dpi por ninguno de los dos métodos. Al 10 dpi se detectó el aislado 1S1 en una muestra de las tres procedentes de plantas tratadas con BTH y en dos muestras de las tres sin tratar. A partir del día 12 pi (post-inoculación) en todas las muestras sin tratar se detectó el virus mientras que sólo en una muestra (14dpi) tratada con BTH se obtuvo resultado positivo (Figura 5.3. A y B). En ninguna de las plantas sanas se detectó el virus.

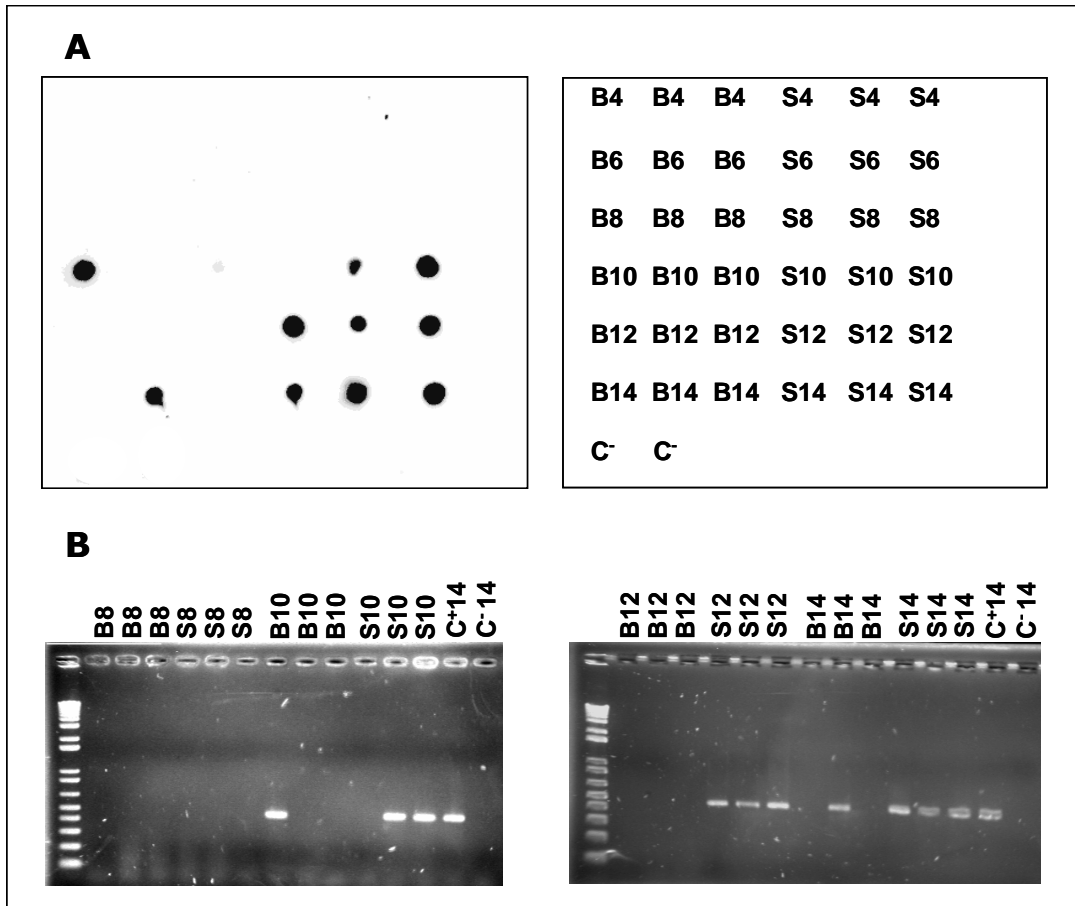


Figura 5.3. A) Resultados obtenidos mediante hibridación dot-blot utilizando la sonda C_{1S1}. La letra S indica las muestras procedentes de las plantas que no se trataron y la letra B indica las plantas que se trataron con BTH. El número que sigue a las letras indica el día en que se recolectaron las muestras tras la inoculación. El control negativo C⁻ hace referencia a planta de *A. thaliana* sana.

B) Resultados obtenidos mediante RT-PCR utilizando los iniciadores MP4F/MP4R. Sólo se muestran los productos de RT-PCR obtenidos a partir del día 8 tras la inoculación. El C⁺ 14 hace referencia al control positivo de PCR y el control negativo C⁻ hace referencia a las planta de *A. thaliana* sana.

Los resultados obtenidos en este estudio parecen indicar que el BTH inhibe o retrasa la infección producida por el aislado 1S1 de BBWV-1 al activar el sistema SAR de defensa de la planta.

Son numerosos los estudios realizados en una gran variedad de cultivos que muestran que BTH resulta efectivo frente a distintos patógenos, pero también se sabe que hay que tener en cuenta muchos aspectos que varían en función del tipo de cultivo, el número de tratamientos a efectuar, el momento de aplicación de los mismos, la cantidad de producto en cada aplicación y la combinación con otros productos como pesticidas. Por ejemplo, en cultivos de monocotiledóneas como trigo (Gorlach *et al.*, 1996; Stadnik & Buchenauer, 1999a; Stadnik & Buchenauer, 1999b) se ha demostrado que la aplicación de BTH crea resistencia frente a mildiu si se aplica una sola vez al final de la formación del tallo (Morris *et al.*, 1998), mientras que en cultivos de dicotiledóneas como pimiento y

tomate para crear resistencia frente a manchas bacterianas causadas por *Pseudomonas syringae* pv. tomato y *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria deben realizarse aplicaciones cada 7-10 días (Louws *et al.*, 2001). También se han realizado ensayos en otras solanáceas como tomate y tabaco (Csinos *et al.*, 2001;Perez *et al.*, 2003), leguminosas como haba o soja (Dann & Deverall, 1995;Dann & Deverall, 1996) y frutales como manzanos y perales (Ishii *et al.*, 1999;Maxson-Stein *et al.*, 2002). Sin embargo, como todas las técnicas, existen ventajas y desventajas que deben de ser tenidas en cuenta (Kuc, 2001).

Entre los factores positivos relacionados con el empleo de este tipo de compuestos, se podrían destacar que: A) Evitan los problemas relacionados con la aparición de resistencias a los patógenos inducidas por los pesticidas clásicos; B) Pueden sustituir a los numerosos pesticidas que actualmente son de retirada obligatoria, al no ser compatibles medioambientalmente; C) Reducen los riesgos para la salud que pueden presentar los pesticidas químicos; D) Pueden ser efectivos contra enfermedades producidas por virus y patógenos de suelo frente a los cuales los tratamientos químicos no son eficaces; E) No hay necesidad de introducir genes foráneos en las plantas, y por tanto, se evita el rechazo social que provocan las plantas transgénicas.

Sin embargo, este tipo de estrategia también tiene sus inconvenientes. Así, la resistencia sistémica inducida depende de la expresión de genes en la planta y su efectividad está sujeta a influencias fisiológicas y medioambientales, por lo que su efectividad puede ser muy variable. Además, es difícil y costoso desarrollar técnicas que permitan predecir su efecto en la planta de una forma rápida y fiable.

Los resultados obtenidos en este capítulo indican que el tratamiento con BTH ofrece posibilidades como método de control de BBWV-1 y otros fabavirus. Es respetuoso con el medio ambiente y su amplio espectro de acción representa una ventaja sobre otros métodos potenciales de control basados en el uso de resistencia genética, dada la gran variabilidad que presentan estos virus. No obstante, antes de su aplicación en campo sería necesario realizar ensayos en diferentes especies de interés agronómico y con distintas condiciones de cultivo.

Conclusiones

Las principales conclusiones obtenidas en los estudios realizados en esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Se determinó la secuencia nucleotídica del genoma completo de un aislado español del virus de la marchitez del haba -1 (BBWV-1). La comparación de esta secuencia con la del aislado 1U2 de BBWV-1 procedente de EEUU mostró una elevada divergencia entre ambas presentando una identidad nucleotídica cercana al 80% y aminoacídica del 92%.
2. Se localizaron motivos conservados tanto en las proteínas codificadas por el virus como en las zonas no traducibles que podrían tener un papel importante en la replicación y expresión viral.
3. Se analizó la diversidad genética y la estructura poblacional de 48 aislados pertenecientes a BBWV-1, BBWV-2 y GeMV mediante el análisis de cuatro zonas genómicas del virus. El análisis filogenético de los aislados virales confirmó la clasificación taxonómica actual del género *Fabavirus*. El estudio de diversidad genética demostró que las diversidades genéticas de BBWV-1 y BBWV-2 son de las más elevadas dentro de los virus vegetales. El análisis de las secuencias puso de manifiesto el papel del flujo genético, la selección natural y la recombinación en la estructura genética y evolución de los virus del género *Fabavirus*.
5. Se desarrollaron métodos de detección basados en RT-PCR e hibridación molecular con extractos de RNA (*dot-blot*) o improntas de tejido vegetal (*tissue-print*) y se evaluó su sensibilidad y fiabilidad con distintos huéspedes cultivados en invernadero o en campo en comparación con la técnica ELISA.
6. Se diseñó un método para la detección universal de los miembros del género *Fabavirus* y/o para la identificación de las distintas especies mediante RT-PCR utilizando un solo par de iniciadores conservados.
7. Se desarrolló un método de hibridación que permite la detección universal de BBWV-1 o BBWV-2 y la diferenciación de cepas o grupos de aislados basándose en su similitud genética.
8. Se evaluó la aplicación del S-metil benzo[1,2,3]tiadiazol-7-carbotioato (BTH) para el control de BBWV-1. Los resultados obtenidos parecen indicar que el BTH inhibe o retrasa la infección producida por el aislado 1S1 de BBWV-1 al activar el sistema SAR de defensa de la planta.

Bibliografía

ACHÓN, M. A., MARSINACH, M., RATTI, C., and RUBIES-AUTONELL, C. (2005). First report of Barley yellow mosaic virus in barley in Spain. *Plant Disease*, **89**, 105-105.

ACHÓN, M. A., RATTI, C., and RUBIES-AUTONELL, C. (2003). Occurrence of Barley mild mosaic virus in barley in Spain. *Plant Disease*, **87**, 1004-1004.

ACHÓN, M. A. and SERRANO, L. (2006). First detection of Wheat dwarf virus in barley in Spain associated with an outbreak of Barley yellow dwarf. *Plant Disease*, **90**, 970-970.

AGOSTINI, J. P., BUSHONG, P. M., and TIMMER, L. W. (2003). Greenhouse evaluation of products that induce host resistance for control of scab, melanose, and Alternaria brown spot of citrus. *Plant Disease*, **87**, 69-74.

AKANDA, A. M., TSUNO, K., and WAKIMOTO, S. (1991). Serodiagnosis of viruses infecting some crops of Bangladesh. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, **35**, 121-129.

ALBIACH-MARTÍ, M. R., MAWASSI, M., GOWDA, S., SATYANARAYANA, T., HILF, M. E., SHANKER, S., ALMIRA, E. C., VIVES, M. C., LOPEZ, C., GUERRI, J., FLORES, R., MORENO, P., GARNSEY, S. M., and DAWSON, W. O. (2000). Sequences of Citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology*, **74**, 6856-6865.

ALI, A., LI, H. Y., SCHNEIDER, W. L., SHERMAN, D. J., GRAY, S., SMITH, D., and ROOSSINCK, M. J. (2006). Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of Cucumber mosaic virus. *Journal of Virology*, **80**, 8345-8350.

ANFOKA, G. H. (2000). Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Mill cv. Vollendung) to Cucumber mosaic virus. *Crop Protection*, **19**, 401-405.

ARAMBURU, J. (2001). First Report of parietaria mottle virus on Tomato in Spain. *Plant Disease*, **85**, 1210-1210.

ARAMBURU, J. and GALIPIENSO, L. (2005). First report in Spain of a variant of Tomato mosaic virus (ToMV) overcoming the Tm-2 resistance gene in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Pathology*, **52**, 407-407.

ARAMBURU, J., GALIPIENSO, L., TORNOS, T., and MATAS, M. (2006). First report of Eggplant mottled dwarf virus in mainland Spain. *Plant Pathology*, **55**, 565-565.

ARAMBURU, J. and MARTI, M. (2003). The occurrence in north-east Spain of a variant of Tomato spotted wilt virus (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *Plant Pathology*, **52**, 407-407.

Avance de superficies y producciones de cultivos. (2005). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

BABIN, M., ORTÍZ, V., CASTRO, S., and ROMERO, J. (2000). First Detection of Faba bean necrotic yellow virus in Spain. *Plant Disease*, **84**, 707-707.

BANKS, G. K., BEDFORD, I. D., BEITIA, F. J., RODRIGUEZ-CEREZO, E., and MARKHAM, P. G. (2001). A novel Geminivirus of *Ipomoea indica* (Convolvulaceae) from Southern Spain. *Plant Disease*, **83**, 486-486.

BARIANA, H. S., SHANNON, A. L., CHU, P. W. G., and WATERHOUSE, P. M. (1994). Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. *Phytopathology*, **84**, 1201-1205.

BATESON, M. F., LINES, R. E., REVILL, P., CHALEEPROM, W., HA, C. V., GIBBS, A. J., and DALE, J. L. (2002). On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus Papaya ringspot virus. *Journal of General Virology*, **83**, 2575-2585.

BERTOLINI, H. S., OLMOS, A., LÓPEZ, M. M., and CAMBRA, M. (2003). Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olives trees. *Phytopathology*, **93**, 286-292.

BOCCARDO, G. and CONTI, M. (1973). Purification and properties of *Nasturtium* ringspot virus. *Phytopathologische Zeitschrift*, **78**, 14-24.

BONNET, J., FRAILE, A., SACRISTAN, S., MALPICA, J. M., and GARCIA-ARENAL, F. (2005). Role of recombination in the evolution of natural populations of Cucumber mosaic virus, a tripartite RNA plant virus. *Virology*, **332**, 359-368.

BOONHAM, N., TOMLINSON, J., and MUMFORD, R. (2007). Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, **45**, 307-328.

BOUSALEM, M., DOUZERY, E. J. P., and FARGETTE, D. (2000). High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of Yam mosaic virus: a contribution to understanding potyvirus evolution. *Journal of General Virology*, **81**, 243-255.

- BRUCKART, W. L. and LORBEER, J. L. (1975). Recent occurrence of Cucumber mosaic, Lettuce mosaic and Broad bean wilt viruses in lettuce and celery fields in New York. *Plant Disease Reporter*, **59**, 206-206.
- BYSTRICKA, D., LENZ, O., MRAZ, I., PILTEROVA, L., KMOCH, S., and SIP, M. (2005). Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, **128**, 176-182.
- CAMBRA, M., GARNSEY, S. M., PERMAR, T. A., HENDRESON, C. T., GUMPF, D. J., and VELA, C. (1990). Detection of Citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology*, **80**, 103-103.
- CANDRESSE, T., MACQUAIRE, G., LANNEAU, M., BOUSALEM, M., QUIOT-DOUINE, L., QUIOT, J. B., and DUNEZ, J. (1995). Analysis of Plum pox potyvirus variability and development of strain-specific PCR assays. *Acta Horticulture*, **386**, 357-369.
- CASTROVILLI, S., SAVINO, V., CASTELLANO, A. M., and ENGELBRECHT, D. J. (1985). Characterization of a grapevine isolate of Broad bean wilt virus. *Phytopathology Mediterranean*, **24**, 35-40.
- CHANG, M. U. and CHUNG, J. D. (1987). Studies of viruses isolated from *Lilium* spp. in Korea. *Korean Journal of Plant Pathology*, **3**, 223-235.
- CHEN, Y. K., GOLDBACH, R., and PRINS, M. (2002). Inter- and intramolecular recombinations in the Cucumber mosaic virus genome related to adaptation to alstroemeria. *Journal of Virology*, **76**, 4119-4124.
- CHOD, J. and JOKES, M. (1986). Incidence of broad bean wilt virus on carrot (*Dacus carota*) in Czechoslovakia. *Sbornik UVTIZ Ochrana Rostlin*, **22**, 241-248.
- CHOI, S. K., CHOI, J. K., PARK, W. M., and RYU, K. H. (1999). RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. *Journal of Virological Methods*, **83**, 67-73.
- CHU, F. H., CHAO, C. H., PENG, Y. C., LIN, S. S., CHEN, C. C., and YEH, S. D. (2001). Serological and molecular characterization of Peanut chlorotic fan-spot virus, a new species of the genus *Tospovirus*. *Phytopathology*, **91**, 856-863.
- CODOÑER, F. M., FARES, M. A., and ELENA, S. F. (2006). Adaptive covariation between the coat and movement proteins of prunus necrotic ringspot virus. *Journal of Virology*, **80**, 5833-5840.

COLSON-HANKS, E. S., ALLEN, S. J., and DEVERALL, B. J. (2000). Effect of 2,6-dichloroisonicotinic acid or benzothiadiazole on *Alternaria* leaf spot, bacterial blight and *Verticillium* wilt in cotton under field conditions. *Australasian Plant Pathology*, **29**, 170-177.

COLSON-HANKS, E. S. and DEVERALL, B. J. (2000). Effect of 2,6-dichloroisonicotinic acid, its formulation materials and benzothiadiazole on systemic resistance to *alternaria* leaf spot in cotton. *Plant Pathology*, **49**, 171-178.

CONTI, M., GALLITELLI, D., LISA, V., LOVISOLO, O., MARTELLI, G. P., RAGOZZINO, A., RANA, G. L., and VOVLAS, C. (2000). Principales virus de las plantas hortícolas. *BAYER, Mundi-Prensa*.

CONTI, M. and BOCCARDO, G. (1973). Investigations on two aphid borne viruses of pepper. *Comptes rendus des troisièmes journées de Phytatrie et de Phytopharmacie Circum-Méditerranées, Sassari*. **1971**, 21-26.

CONTI, M. and MASENGA, V. (1977). Identification and prevalence of pepper viruses in Northwest Italy. *Phytopathologische Zeitschrift*, **90**, 212-222.

CÓRDOBA-SELLES, C., MARTÍNEZ-PRIEGO, L., MUÑOZ-GÓMEZ, R., and JORDÁ-GUTIÉRREZ, C. (2005). Iris yellow spot virus: A new onion disease in Spain. *Plant Disease*, **89**, 1243-1243.

CSINOS, A. S., PAPPU, H. R., MCPHERSON, R. M., and STEPHENSON, M. G. (2001). Management of Tomato spotted wilt virus in flue-cured tobacco with acibenzolar-S-methyl and imidacloprid. *Plant Disease*, **85**, 292-296.

CUADRADO, I. M., JANSSEN, D., VELASCO, L., RUIZ, L., and SEGUNDO, E. (2001). First report of Cucumber vein yellowing virus in Spain. *Plant Disease*, **85**, 336.

DANN, E. K. and DEVERALL, B. J. (1995). Effectiveness of systemic resistance in bean against foliar and soilborne pathogens as induced by biological and chemical means. *Plant Pathology*, **44**, 458-466.

DANN, E. K. and DEVERALL, B. J. (1996). 2,6-dichloro-isonicotinic acid (INA) induces resistance in green beans to the rust pathogen, *Uromyces appendiculatus*, under field conditions. *Australasian Plant Pathology*, **25**, 199-204.

DAVINO, S., RUBIO, L., and DAVINO, M. (2005). Molecular analysis suggests that recent Citrus tristeza virus outbreaks in Italy were originated by at least two independent introductions. *European Journal of Plant Pathology*, **111**, 289-293.

DESBIEZ, C. and LECOQ, H. (2004). The nucleotide sequence of Watermelon mosaic virus (WMV, Potyvirus) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 5' part of the genome. *Archives of Virology*, **149**, 1619-1632.

DEYONG, Z., WILLINGMANN, P., HEINZE, C., ADAM, G., PFUNDER, M., FREY, B., and FREY, J. E. (2005). Differentiation of Cucumber mosaic virus isolates by hybridization to oligonucleotides in a microarray format. *Journal of Virological Methods*, **123**, 101-108.

DÍAZ, J. A., NIETO, C., MORIONES, E., and ARANDA, M. A. (2002). Spanish melon necrotic spot virus isolates overcome the resistance conferred by the recessive nsv gene of melon. *Plant Disease*, **86**, 694.

DIETZGEN, R. G., XU, Z., and TEYCHENEY, P. Y. (1994). Digoxigenin-labelled cRNA probes for the detection of two potyviruses infecting peanut (*Arachis hypogea*). *Plant Disease*, **78**, 708-711.

DOEL, T. R. (1975). Comparative properties of type, Nasturtium ringspot and Petunia ringspot virus strains of broad bean wilt virus. *Journal of General Virology*, **26**, 95-108.

DOSDALL, L. M. and KOTT, L. S. (2006). Introgression of resistance to cabbage seedpod weevil to canola from yellow mustard. *Crop Science*, **46**, 2437-2445.

DOVAS, C. I., KATIS, N. I., and AVGELIS, A. D. (2002). Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Disease*, **86**, 1345-1349.

EDWARSON, J. R. & CHRISTIE, R. G. (1991). *Fabaviruses*. In EDWARSON, J. R. & CHRISTIE, R. G. (Eds.), *CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 263-274.

ESCRIU, F., FRAILE, A., and GARCIA-ARENAL, F. (2007). Constraints to genetic exchange support gene coadaptation in a tripartite RNA virus. *PLoS Pathogens*, **3**, 67-74.

FACCIOLI, G. & MARANI, F. (1998). *Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. Breeding for resistance to plant viruses*. In HADIDI, A., KHETARPAL, R. K., & KOGANEZAWA, H. (Eds.), *Plant Virus Disease Control*, APS Press, St. Paul, MN, pp. 346-380.

FALK, B. W. and BRUENING, G. (1994). Will transgenic crops generate new viruses and new diseases. *Science*, **263**, 1395-1396.

FARGETTE, D., KONATE, G., FAUQUET, C., MULLER, E., PETERSCHMITT, M., and THRESH, J. M. (2006). Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 235-260.

FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., DESSELBERGER, U., and BALL, L. A. Virus Taxonomy. VIII Report of the ICTV. (2005). Elsevier/Academic Press, London.

FERNANDEZ-RODRIGUEZ, T., RUBIO, L., CARBALLO, O., and MARYS, E. (2008). Genetic variation of papaya ringspot virus in Venezuela. *Archives of Virology*, **153**, 343-349.

FONT, I., MARTINEZ-CULEBRAS, P., JORDA, C., LOURO, D., VAIRA, A. M., and ACCOTTO, G. P. (2002). First Report of Tomato infectious chlorosis virus in Spain. *Plant Disease*, **86**, 696-696.

FRASER, L. and CONROY, R. J. (1963). Vascular wilt disease of broad beans and other plants. *Agricultural Plant Disease Report*, **10**, 734-737.

FRENCH, R. and STENGER, D. C. (2003). Evolution of wheat streak mosaic virus: Dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annual Review of Phytopathology*, **41**, 199-214.

FRIEDRICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N., RELLA, M. G., MEIER, B., DINCHER, S., STAUB, T., UKNES, S., METRAUX, J. P., KESSMANN, H., and RYALS, J. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal*, **10**, 61-70.

FROISSART, R., ROZE, D., UZEST, M., GALIBERT, L., BLANC, S., and MICHALAKIS, Y. (2005). Recombination every day: Abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. *PLoS Biology*, **3**, 389-395.

FROUSSARD, P. (1992). A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. *Nucleic Acids Research*, **20**, 2900-2902.

FROWD, J. A. and TOMLINSON, J. A. (1970). Nasturtium ringspot virus in parsley crops in Britain. *Plant Disease Report*, **54**, 734-735.

FUCHS, M. and GONSALVES, D. (2007). Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: Lessons from realistic field risk assessment studies. *Annual Review of Phytopathology*, **45**, 173-202.

GALIPIENSO, L., VIVES, M. C., NAVARRO, L., MORENO, P., and GUERRI, J. (2004). Detection of Citrus leaf blotch virus using digoxigenin-labelled probes and RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, **110**, 175-181.

GARCÍA-ARENAL, F., ESCRIU, F., ARANDA, M. A., ALONSO-PRADOS, J. L., MALPICA, J. M., and FRAILE, A. (2000). Molecular epidemiology of Cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *Virus Research*, **71**, 1-8.

GARCÍA-ARENAL, F. & FRAILE, A. (2008). *Questions and concepts in plant virus evolution: a historical perspective*. In ROOSSINCK, M. J. (Ed.), *Plant Virus Evolution*, . Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, pp. 1-14.

GARCÍA-ARENAL, F., FRAILE, A., and MALPICA, J. M. (2001a). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, **39**, 157-186.

GARNSEY, S. M., PERMAR, T. A., CAMBRA, M., & HENDERSON, C. T. (1993). *Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV)*. MORENO, P., DA GRAÇA, J. V., & TIMMER, L. W. (Eds.), Proc. 12th Conf. IOCV. Riverside, CA, USA, pp. 39-50.

GE, X., SCOTT, S. W., and ZIMMERMAN, M. T. (1997). The complete sequence of the genomic RNAs of spinach latent virus. *Archives of Virology*, **142**, 1213-1226.

GIBBS, A. and MACKENZIE, A. (1997). A primer pair ofr amplifying part of the genome of all potyvirus by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, **63**, 9-16.

GILLINGS, M., BROADBENT, P., INDSTO, J., and LEE, R. F. (1993). Characterization of strains of citrus tristeza virus by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology*, **80**, 692-698.

GLASA, M., PAUNOVIC, S., JEVREMOVIC, D., MYRTA, A., PITTNEROVA, S., and CANDRESSE, T. (2005). Analysis of recombinant Plum pox virus (PPV) isolates from Serbia confirms genetic homogeneity and supports a regional origin for the PPV-Rec subgroup. *Archives of Virology*, **150**, 2051-2060.

GOLBACH, R., MARTELLI, G. P., & MILNE, R. G. (1995). *Family Comoviridae*. In MURPHY, F. A., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., GHABRIAL, S. A., JARVIS, A. W., MARTELLI, G. P., & MAYO, M. A. (Eds.), *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, . Summers MD, Springer, New York, pp. 341-347.

GOLDBACH, R. W. & WELLINK, J. (1996). *Comoviruses: molecular biology and replication. Polyhedral virions and bipartite RNA genomes*. In HARRISON, B. H. & MURANT, A. F. (Eds.), *The Plant Viruses*, Plenum Press, New York, pp. 35-76.

GONSALVES, D. and GARNSEY, S. M. (1989). Cross-protection techniques for control of plant virus diseases in the tropics. *Plant Disease*, **73**, 592-597.

GORLACH, J., VOLRATH, S., KNAUFBEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K. H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H., and RYALS, J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, **8**, 629-643.

GOSZCZYNSKI, D. E. and JOOSTE, A. E. C. (2002). The application of single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for the analysis of molecular heterogeneity of grapevine virus A. *VITIS*, **41**, 77-82.

GOULART, L. R., MACKENZIE, S. A., OHM, H. W., and LISTER, R. M. (1993). Barley Yellow Dwarf Virus-Resistance in A Wheat X Wheatgrass Population. *Crop Science*, **33**, 595-599.

GOZZO, F. (2003). Systemic acquired resistance in crop protection: From nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 4487-4503.

GRACIA, O. and FELDMAN, J. M. (1976). Studies of weed plants as sources of viruses. IV. Broad bean wilt virus in *Symbrium irio* and *Plantago lanceolata* in Argentina. *Phytopathology Z*, **85**, 227-229.

GRACIA, O. and GUITERREZ, L. S. (1982). Broad bean wilt virus in pepper crops in Argentina. *Phytopathology Mediterranean*, **21**, 107-109.

GUERRI, J., MORENO, P., MUNOZ, N., and MARTINEZ, M. E. (1991). Variability Among Spanish Citrus Tristeza Virus Isolates Revealed by Double-Stranded-Rna Analysis. *Plant Pathology*, **40**, 38-44.

GUYADER, S. and DUCRAY, D. G. (2002). Sequence analysis of Potato leafroll virus isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *Journal of General Virology*, **83**, 1799-1807.

HAMMOND, R. W., CROSSLIN, J. M., PASINI, R., HOWELL, W. E., and MINK, G. I. (1999). Differentiation of closely related but biologically distinct cherry isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* by polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, **80**, 203-212.

HARPER, K. and CREAMER, R. (1995). Hybridization detection of insect-transmitted plant viruses with digoxigenin-labelled probes. *Plant Disease*, **79**, 563-567.

HAUSER, S., STEVENS, M., BEUVE, M., and LEMAIRE, O. (2002). Biological properties and molecular characterization of beet chlorosis virus (BChV). *Archives of Virology*, **147**, 745-762.

HELGUERA, P. R., TABORDA, R., DOCAMPO, D. M., and DUCASSE, D. A. (2001). Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of *Prunus necrotic ring spot virus* in the peach. *Journal of Virological Methods*, **95**, 93-100.

HOLLAND, J., SPINDLER, K., HORODYSKI, F., GRABAU, E., NICHOL, S., and VANDEPOL, S. (1982). Rapid Evolution of Rna Genomes. *Science*, **215**, 1577-1585.

HU, J. S., LI, H. P., BARRY, K., WANG, M., and JORDAN, R. (1995). Comparison of dot-blot, ELISA and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Disease*, **79**, 902-906.

HULL, R. (2002). *Pathogen-Derived Resistance*. Matthews' Plant Virology, . Academic Press, San Diego, CA, pp. 713-728.

IKEGAMI, M., KAWASHIMA, H., NATSUAKI, T., and SUGIMURA, N. (1998). Complete nucleotide sequence of the genome organization of RNA2 of patchouli mild mosaic virus, a new fabavirus. *Archives of Virology*, **143**, 2431-2434.

IKEGAMI, M., ONOBORI, Y., SUGIMURA, N., and NATSUAKI, T. (2001). Complete nucleotide sequence and the genome organization of Patchouli mild mosaic virus RNA1. *Intervirology*, **44**, 355-358.

IMOTO, M. (1975). Studies on mosaic disease of sweet pepper (*Capsicum frutescens*). 2. Occurrence of mosaic disease of sweet pepper and kinds of its causal viruses in Hiroshima prefecture. *Hiroshima Prefectural Agriculture, Exp Stn*, 57.

ISHII, H., TOMITA, Y., HORIO, T., NARUSAKA, Y., NAKAZAWA, Y., NISHIMURA, K., and IWAMOTO, S. (1999). Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases. *European Journal of Plant Pathology*, **105**, 77-85.

JAMES, D., JELKMANN, W., and UPTON, C. (1999). Specific detection of cherry mottle leaf virus using digoxigenin-labeled cDNA probes and RT-PCR. *Plant Disease*, **83**, 235-239.

JONSON, G. B., PARK, J., KIM, M., HYUN, J., and KIM, J. (2007). Differentiation of Barley mild mosaic virus strains by RT-PCR analysis in Korea. *Phytopathology*, **97**, S53-S53.

JOOSTE, A. E. C., PIETERSEN, G., KASDORF, G. G. F., and GOSZCZYNSKI, D. E. (2001). Identification of three viruses from *Pisum sativum* in South Africa. *African Plant Protection*, **7**, 59-65.

JORDA, C., LAZARO-PEREZ, A., MARTINEZ-CULEBRAS, P., ABAD, P., LACASA, A., and GUERRERO, M. M. (2001). First Report of Pepino mosaic virus on Tomato in Spain. *Plant Disease*, **85**, 1292-1292.

JOSHI, C. P., ZHOU, H., HUANG, X., and CHIANG, V. L. (1997). Context sequence of translation initiation codon in plants. *Plant Molecular Biology*, **35**, 993-1001.

JUÁREZ, M., TRUNIGER, V., and ARANDA, M. A. (2004). First Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Spain. *Plant Disease*, **88**, 907-907.

JURETIC, N., MILICIC, D., and SCHMELZER, K. (1970). Zur Kenntnis des Ringmosaik-Virus der Kapuzinerkresse (*nasturtium ringspot virus*) durch Blattlausarten. *Acta Botanica Croatica*, **29**, 17-17.

KADARÉ, G. and HAENNI, A. (1997). Virus-encoded helicases. *Journal of Virology*, **71**, 2583-2590.

KANIEWSKI, W. & LAWSON, C. (1998). *Coat protein and replicase-mediated resistance to plant viruses*. In HADIDI, A., KHETARPAL, R. K., & KOGANEZAWA, H. (Eds.), *Plant Virus Disease Control*, APS Press, St. Paul, MN, pp. 65-78.

KARL, E., SCHMELZER, K., and WOLF, P. (1972). Untersuchungen zur Übertragbarkeit des Ringmosaik-Virus der Kapuzinerkresse (*nasturtium ringspot virus*) durch Blattlausarten. *Archives Pflanzenschutz*, **8**, 269-272.

KENYON, L., SHOYINKA, S. A., HUGHES, J. D'A., ODU, B. O. (2001) An overview of viruses infecting *Dioscorea* yams in Sub-Saharan Africa. In *Plant Virology in Sub-Saharan Africa*, pp. 432–439. Eds J.d'A. Hughes and B.O. Odu. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria

- KIM, K. J., LIM, J. H., LEE, S., KIM, Y. J., CHOI, S. B., LEE, M. K., CHOI, D., and PAEK, K. H. (2007). Functional study of *Capsicum annuum* fatty acid desaturase 1 cDNA clone induced by Tobacco mosaic virus via microarray and virus-induced gene silencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **362**, 554-561.
- KIM, W. S. and HAGEDORN, D. J. (1959). Streak-inciting viruses of canning pea. *Phytopathology*, **49**, 656-664.
- KISHTAH, A. A., RUSSO, M., TOLBA, M. A., and MARTELLI, G. P. (1978). A strain of broad bean wilt virus isolated from pea in Egypt. *Phytopathology Mediterranean*, **17**, 157.
- KOBAYASHI, Y. O., KOBAYASHI, A., HAGIWARA, K., UGA, H., MIKOSHIBA, Y., NAITO, T., HONDA, Y., and OMURA, T. (2005). Gentian mosaic virus: A new species in the genus Fabavirus. *Phytopathology*, **95**, 192-197.
- KOBAYASHI, Y. O., KOBAYASHI, A., NAKANO, M., HAGIWARA, K., HONDA, Y., and OMURA, T. (2003). Analysis of genetic relations between Broad bean wilt virus 1 and Broad bean wilt virus 2. *Journal of General Plant Pathology*, **69**, 320-326.
- KOBAYASHI, Y. O., NAKANO, M., KASHIWAZAKI, S., NAITO, T., MIKOSHIBA, Y., SHIOTA, A., KAMEYA-IWAKI, M., and HONDA, Y. (1999). Sequence analysis of RNA-2 of different isolates of broad bean wilt virus confirms the existence of two distinct species - Brief report. *Archives of Virology*, **144**, 1429-1438.
- KOH, L. H., COOPER, J. I., and WONG, S. M. (2001). Complete sequences and phylogenetic analyses of a Singapore isolate of broad bean wilt fabavirus. *Archives of Virology*, **146**, 135-147.
- KOONIN, E. V. and DOLJA, V. V. (1993). Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemical Molecular Biology*, **28**, 375-430.
- KUC, J. (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 7-12.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBEN, I. B., and NEI, M. (2001). MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, **17**, 1244-1245.
- KUMAR, S., TAMURA, K., and NEI, M. (2004). MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**, 150-163.

KURODA, T., OKUMURA, A., TAKEDA, I., MIURA, Y., and SUZUKI, K. (2000). Nucleotide sequence and synthesis of infectious RNA from cloned cDNA of broad bean wilt virus 2 RNA 2. *Archives of Virology*, **145**, 787-793.

KYRIAKOPOULOU, P. E. (1995). Artichoke Italian latent virus causes artichoke patchy chlorotic stunting disease. *Annals of Applied Biology*, **127**, 489-497.

LAI, M. M. C. (1998). Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology*, **244**, 1-12.

LARTEY, R. T., VOSS, T. C., and MELCHER, U. (1996). Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 1327-1338.

LAWTON, K., WEYMANN, K., FRIEDRICH, L., HUNT, M., NEUENSCHWANDER, U., STEINER, H. Y., MALECK, K., UKNES, S., RYALS, J., and KESSMANN, H. (1996a). Systemic acquired resistance signal transduction. *Brighton Crop Protection Conference: Pests & Diseases - 1996*, **Vols 1-3**, 967-972.

LAWTON, K. A., FRIEDRICH, L., HUNT, M., WEYMANN, K., DELANEY, T., KESSMANN, H., STAUB, T., and RYALS, J. (1996b). Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal*, **10**, 71-82.

LE GALL, O., IWANAMI, T., KARASEV, A. V., JONES, T., LEHTO, K., SANFACON, H., WELLINK, J., WETZEL, T., & YOSHIKAWA, N. (2005). *Family Comoviridae*. In FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., & BALL, L. A. (Eds.), *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, . Academic Press, London, pp. 807-818.

LECOQ, H. (1998). *Control of plant virus diseases by cross protection*. In HADIDI, A., KHETARPAL, R. K., and KOGANEZAWA, H. (Eds.), *Plant Virus Disease Control*, . APS Press, St. Paul. MN, pp. 33-40.

LEE, U., HONG, J. S., CHOI, J. K., KIM, K. C., KIM, Y. S., CURTIS, I. S., NAM, H. G., and LIM, P. O. (2000). Broad bean wilt virus causes necrotic symptoms and generates defective RNAs in Capsicum annuum. *Phytopathology*, **90**, 1390-1395.

LEFEUVRE, P., MARTIN, D. P., HOAREAU, M., NAZE, F., DELATTE, H., THIERRY, M., VARSANI, A., BECKER, N., REYNAUD, B., and LETT, J. M. (2007). Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *Journal of General Virology*, **88**, 3458-3468.

LEGALL, O., LANNEAU, M., CANDRESSE, T., and DUNEZ, J. (1995). The Nucleotide-Sequence of the RNA-2 of an isolate of the English serotype of Tomato black ring virus – RNA. Recombination in the history of Nepoviruses. *Journal of General Virology*, **76**, 1279-1283.

LEWIS, R. S. (2005). Transfer of resistance to potato virus Y (PVY) from *Nicotiana africana* to *Nicotiana tabacum*: possible influence of tissue culture on the rate of introgression. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**, 678-687.

LI, H. Y. and ROOSSINCK, M. J. (2004). Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *Journal of Virology*, **78**, 10582-10587.

LIN, N. S., HSU, H. Y., and HSU, H. T. (1990). Immunological detection of plant viruses and a micoplasm-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology*, **80**, 828-834.

LING, K. S., WECHTER, W. P., and JORDAN, R. (2007). Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of Pepino mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, **144**, 65-72.

LISA, V. & BOCCARDO, G. (1996). Fabaviruses: Broad bean wilt virus and allied viruses. Polyhedral virions and bipartite RNA genomes. In HARRISON, B. H. & MURANT, A. F. (Eds.), *The Plant Viruses*. Plenum Press, New York, pp. 229-250.

LISA, V., DELLAVALLE, G., and PERESSINI, S. (1986). Broad bean wilt virus in *Phaseolus vulgaris* in Friuli-Venezia Giulia. *Inf. Fitopatologia*, **36**, 31-31.

LISA, V., ÑIOSPMO.E-, BOCCARDO, G., MILNE, R. G., and LOVISOLO, O. (1982). *Lamium* mild mosaic virus: a virus distantly related to broad bean wilt. *Annual Applied Biology*, **100**, 467-476.

LIU, Y., SUN, B., WANG, X. F., ZHENG, C. L., and ZHOU, G. H. (2007). Three digoxigenin-labeled cDNA probes for specific detection of the natural population of Barley yellow dwarf viruses in China by dot-blot hybridization. *Journal of Virological Methods*, **145**, 22-29.

LOCKHART, B. E. L. and BETZOLD, J. A. (1982). Broad bean wilt virus in begonia in Minnesota. *Plant Disease*, **66**, 72-73.

LOEBENSTEIN, G. and RECCA, B. (1980). Control of non-persistently transmitted aphid-borne viruses. *Phytoparasitica*, **10**, 49-62.

LORENZEN, J. H., MEACHAM, T., BERGER, P. H., SHIEL, P. J., CROSSLIN, J. M., HAMM, P. B., and KOPP, H. (2006a). Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. *Archives of Virology*, **151**, 1055-1074.

LORENZEN, J. H., PICHE, L. M., GUDMESTAD, N. C., MEACHAM, T., and SHIEL, P. (2006b). A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. *Plant Disease*, **90**, 935-940.

LOUWS, F. J., WILSON, M., CAMPBELL, H. L., CUPPELS, D. A., JONES, J. B., SHOEMAKER, P. B., SAHIN, F., and MILLER, S. A. (2001). Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, **85**, 481-488.

LOVISOLO, O. (1957). Virus e piante spontanee I. "Mosaico lieve del Lamium", nuovo virus di tipo maculatura anulare. **15**, 89-96.

LOZANO, G. (2007). Caracterización molecular y diversidad genética de virus transmitidos por mosca blanca asociados a los amarillos de tomate y batata. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga.

LUIS-ARTEAGA, M. (1989). Virosis y micoplasmosis del pimiento cultivado al aire libre en España - Identificación de virus y caracterización de cepa. Tesis doctoral, E T S I A, Universidad Politécnica de Madrid.

LUIS-ARTEAGA, M. and CAMBRA, M. A. (2000). First report of natural infection of greenhouse-grown tomato and weed species by Pelargonium zonate spot virus in Spain. *Plant Disease*, **84**, 807-807.

MACKENZIE, D. J., MCLEAN, M. A., MUKERJI, S., and GREEN, M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, **81**, 222-226.

MAKKOUK, K. M., EL-MUADHIDI, M. A., and KUMARI, S. G. (2001). First record of Beet western yellows virus, Chickpea chlorotic dwarf virus and Faba bean necrotic yellows virus affecting faba bean (*Vicia faba*) crops in Iraq. *Plant Pathology*, **50**, 793-793.

MAKKOUK, K. M., KUMARI, S. G., and BOS, L. (1990). Broad bean wilt virus: Host range, purification, serology, transmission characteristics, and occurrence in faba bean in West Asia and North Africa. *Netherlands Journal Plant Pathology*, **96**, 291-300.

MALAMY, J., CARR, J. P., KLESSIG, D. F., and RASKIN, I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, **250**, 1002-1004.

MALI, V. R., VYANJANE, N. T., and EKBOTE, A. V. (1977). Petunia ringspot virus disease- A new record for India. *Current Science India*, **46**, 567-568.

MARCO, C. F. and ARANDA, M. A. (2005). Genetic diversity of a natural population of Cucurbit yellow stunting disorder virus. *Journal of General Virology*, **86**, 815-822.

MARGARIA, P., CIUFFO, M., and TURINA, M. (2004). Resistance breaking strain of Tomato spotted wilt virus (Tospovirus; Bunyaviridae) on resistant pepper cultivars in Almería, Spain. *Plant Pathology*, **53**, 795-795.

MARROU, J., DUTEIL, M., LECLANT, F., CADILHAC, B., and ESVAN, C. (1976). Mise en évidence du virus du flétrissement de la fève Broad bean wilt (*BBWV*), dans des laitues présentant des symptômes de marbrure. *Annual Phytopathology*, **45**, 461-467.

MARTÍN, S., ALIOTO, D., MILNE, R. G., GARNSEY, S. M., GARCÍA, M. L., GRAU, O., GUERRI, J., and MORENO, P. (2004). Detection of Citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. *Journal of Plant Pathology*, **110**, 747-757.

MARTÍN, S., ALIOTO, D., MILNE, R. G., GUERRI, J., and MORENO, P. (2002). Detection of Citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. *Plant Pathology*, **51**, 134-141.

MARTÍN, S., GARCIA, M. L., TROISI, A., RUBIO, L., LEGARRETA, G., GRAU, O., ALIOTO, D., MORENO, P., and GUERRI, J. (2006). Genetic variation of populations of Citrus psorosis virus. *Journal of General Virology*, **87**, 3097-3102.

MARTIN, S., LOPEZ, C., GARCIA, M. L., NAUM-ONGANIA, G., GRAU, O., FLORES, R., MORENO, P., and GUERRI, J. (2005). The complete nucleotide sequence of a Spanish isolate of Citrus psorosis virus: comparative analysis with other ophioviruses. *Archives of Virology*, **150**, 167-176.

MARTINEZ-CULEBRAS, P. V., LAZARO, A., CAMPOS, P. A., and JORDA, C. (2002). A RT-PCR assay combined with RFLP analysis for detection and differentiation of isolates of Pepino mosaic virus (PepMV) from tomato. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 887-892.

MÁS, P., SÁNCHEZ-PINA, M. A., and PALLÁS, V. (1993). Chemiluminiscent and chromogenic detection of cherry leaf roll virus with digoxigenin-labelled RNA. *Journal of Virological Methods*, **45**, 93-102.

MAXSON-STEIN, K., HE, S. Y., HAMMERSCHMIDT, R., and JONES, A. L. (2002). Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. *Plant Disease*, **86**, 785-790.

MAYO, M. A. and FRITSCH, C. (1994). A possible consensus sequence for VPg of viruses in the family Comoviridae. *FEBS Letters*, **354**, 129-130.

MCCONCHIE, R., MCDONALD, K., ANWARAL, B., and MORRIS, S. C. (2007). Systemic acquired resistance as a strategy for disease management in rockmelon (*Cucumis melo* var. *reticulatus*). *Proceedings of the third International Symposium on Cucurbits*, 205-210.

MEHLE, N., TUSEK ZNIDARIC, M., TORNOS, T., and RAVNIKAR, M. (2007). First report of Broad bean wilt virus 1 in Slovenia. *New Disease Report*, **15**, 25-25.

MELCHER, U. (2000). The '30K superfamily' of viral movement proteins. *Journal of General Virology*, **81**, 257-266.

MÉTRAUX, J. P., SIGNER, H., RYALS, J., WARD, E., WYSS-BENZ, M., GAUDIN, J., RASCHDRF, K., SCHMID, E., BLUM, W., and INVERARDI, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, **250**, 1004-1006.

MIGLIORI, A. (1993). Artichoke French latent virus (AFLV): A new fabavirus transmitted by *Capitophorus horni*. *Petria*, **3**, 59-60.

MIGLIORI, A., LOT, H. P. P., DUTEIL, M., and ROUZÉ-JOUAN, J. (1987). Mise en évidence de trois virus dans les cultures françaises d'artichaut en Bretagne. *Pépinieristes-Horticulteurs-Maraîchers, Rev. Horticulture*, **274**, 29.

MONCI, F., SANCHEZ-CAMPOS, S., NAVAS-CASTILLO, J., and MORIONES, E. (2002). A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, **303**, 317-326.

MORENO, I. M., MALPICA, J. M., AZ-PENDON, J. A., MORIONES, E., FRAILE, A., and GARCIA-ARENAL, F. (2004). Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology*, **318**, 451-460.

MORIONES, E., ARNO, J., ACCOTTO, G. P., NORIS, E., and CAVALLARIN, L. (1993). First report of Tomato yellow leaf curl virus in Spain. *Plant Disease*, **77**, 953-953.

MORRIS, J., CLOVER, G. R. G., HARJU, V. A., HUGO, S. A., and HENRY, C. M. (2001). Development of highly sensitive nested RT-PCR method for Beet necrotic yellow vein virus detection. *Journal of Virological*, **95**, 163-169.

MORRIS, S. W., VERNOOIJ, B., TITATARN, S., STARRETT, M., THOMAS, S., WILTSE, C. C., FREDERIKSEN, R. A., BHANDHUFALCK, A., HULBERT, S., and UKNES, S. (1998). Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**, 643-658.

MOYA, A., HOLMES, E. C., and GONZALEZ-CANDELAS, F. (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 279-288.

MUMFORD, R. A., JARVIS, B., HARJU, V., BOONHAM, N., and SKELTON, A. (2006). The first report of *Broad bean wilt virus 2* in the UK: findings in foxglove and salvia. *New Disease Report*, **13**, 21-21.

NAGY, P. D. and POGANY, J. (2008). Multiple roles of viral replication proteins in plant RNA virus replication. *Methods Molecular Biology*, **451**, 55-68.

NARVAEZ, G., SKANDER, B. S., AYLLON, M. A., RUBIO, L., GUERRI, J., and MORENO, P. (2000). A new procedure to differentiate citrus tristeza virus isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods*, **85**, 83-92.

NAVAS-CASTILLO, J., CAMERO, R., BUENO, M., and MORIONES, E. (2000a). Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of Tomato chlorosis virus. *Plant Disease*, **84**, 835-837.

NAVAS-CASTILLO, J., SANCHEZ CAMPOS, S., DIAZ, J. A., SAEZ ALONSO, E., and MORIONES, E. (1997). First report of tomato yellow leaf curl virus is in Spain: Coexistence

of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. *Plant Disease*, **81**, 1461-1461.

NAVAS-CASTILLO, J., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., NORIS, E., LOURO, D., ACCOTTO, G. P., and MORIONES, E. (2000b). Natural recombination between Tomato yellow leaf curl viurs-Is and Tomato leaf curl virus. *Journal of General Virology*, **81**, 2797-2801.

NEI, M. and TAJIMA, F. (1987). Problems arising in phylogenetic inference from restriction-site data. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 320-323.

NEVINS, J. R. (1983). The pathway of eukaryotic messenger-RNA formation. *Annual Review of Biochemistry*, **52**, 441-466.

NIE, X. Z. and SINGH, R. P. (2003). Specific differentiation of recombinant PVY^{N:O} and PVY^{NTN} isolates by multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, **113**, 69-77.

OCHOA-CORONA, F. M., LEBAS, B. S. M., ELLIOT, D. R., TANG, J. Z., and ALEZANDER, B. J. R. (2007). New host records and new host family range for Turnip mosaic virus in New Zeland. *Australian Plant Disease*, **2**, 130-130.

PALUMBO, J. C., HOROWITZ, A. R., and PRABHAKER, N. (2001). Insecticidal control and resistance management for Bemisia tabaci. *Crop Protection*, **20**, 739-765.

PARVIN, S. and IZADPANA, K. (1978). Broad bean wilt virus - identification, host range and distribution in the Fars province of Iran. *Iranian Journal of Agricultural Research*, **6**, 81-90.

PEREZ, L., RODRIGUEZ, M. E., RODRIGUEZ, F., and ROSON, C. (2003). Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by Peronospora hyoscyami f. sp. tabacina. *Crop Protection*, **22**, 405-413.

PEREZ-DE-LUQUE, A., JORRIN, J. V., and RUBIALES, D. (2004). Crenate broomrape control in pea by foliar application of benzothiadiazole (BTH). *Phytoparasitica*, **32**, 21-29.

PERRING, T. M., GRUENHAGEN, N. M., and FARRAR, C. A. (1999). Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annual Review of Entomology*, **44**, 457-481.

PICO, J. M., MENAUT, C. P., JIMENEZ, E., LEGIDO, J. L., FERNANDEZ, J., and ANDRADE, M. I. P. (1996). Measurements and analysis of excess volumes of some alkan-

2-one-1-chloroalkane mixtures using Nitta-Chao and Prigogine-Flory-Patterson models. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, **92**, 4453-4461.

POTLAKAYALA, S. D., REED, D. W., COVELLO, P. S., and FOBERT, P. R. (2007). Systemic acquired resistance in canola is linked with pathogenesis-related gene expression and requires salicylic acid. *Phytopathology*, **97**, 794-802.

POWELL ABEL, P., NELSON, R. S., DE, B., HOFFMANN, N., ROGERS, S. G., FRALEY, R. T., and BEACHY, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, **232**, 738-743.

POWER, A. G. (2000). Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 336-340.

PROVVIDENTI, R. (1983). Reaction of bean cultivars to broad bean wilt virus. *Bean Improvement Cooperative*, **26**, 69-70.

PROVVIDENTI, R. and HOCH, H. C. (1985). Foliar ringspot disease of *Thunbergia alata* caused by broad bean wilt virus. *Plant Disease*, **69**, 726-726.

PROVVIDENTI, R., ROBINSON, R. W., and SHAIL, J. W. (1984). Incidence of broad bean wilt virus in lettuce in New York State and sources of resistance. *Horticultural Science*, 569-569.

QI, Y. J., ZHOU, X. P., and LI, D. B. (2000a). Complete nucleotide sequence and infectious cDNA clone of the RNA1 of a Chinese isolate of Broad bean wilt virus 2. *Virus Genes*, **20**, 201-207.

QI, Y. J., ZHOU, X. P., XUE, C. Y., and LI, D. B. (2000b). Nucleotide sequence of RNA2 and polyprotein processing sites of a Chinese isolate of Broad bean wilt virus 2. *Progress in Natural Science*, **10**, 680-686.

QIU, X. H., GUAN, P. Z., WANG, M. L., MOORE, P. H., ZHU, Y. J., HU, J., BORTH, W., and ALBERT, H. H. (2004). Identification and expression analysis of BTH induced genes in papaya. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **65**, 21-30.

RASMUSSEN, J. B., HAMMERSCHMIDT, R., and ZOOK, M. N. (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiology*, **97**, 1342-1347.

REYMOND, P. and FARMER, E. E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**, 404-411.

RIST, D. L. and LORBEER, J. W. (1989). Occurrence and overwintering of cucumber mosaic virus and broad bean wilt virus in weeds growing near commercial lettuce fields in New York. *Phytopathology*, **79**, 65-69.

ROBERTSON, N. L., FRENCH, R., and GRAY, S. M. (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. (1994). Sequences at the ends of RNA-2 of I6, a recombinant tobnavirus. *Archives of Virology*, **9**, 245-251.

RODRÍGUEZ-CEREZO, E., MOYA, A., and GARCÍA-ARENAL, F. (1989). Variability and evolution of the plant RNA virus pepper mild mottle virus. *Journal of Virology*, **63**, 2198-2203.

ROOSSINCK, M. J. (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology*, **35**, 191-209.

ROOSSINCK, M. J. (2003). Plant RNA virus evolution. *Current Opinion in Microbiology*, **6**, 406-409.

ROSCIGLIONE, B. and CANNIZZARO, G. (1977). Reperimento del virus dell'avvizzimento della fava nell'isola di Linosa. *Phytopathology Mediterranean*, **16**, 140-142.

RUBIES AUTONELL, C., RATTI, C., RESCA, R., DE BIAGGI, M., and AYALA GARCÍA, J. (2006). First Report of Beet virus Q in Spain. *Plant Disease*, **90**, 110-110.

RUBIO, L., AYLLÓN, M. A., GUERRI, J., PAPPU, H., NIBLETT, C. L., and MORENO, P. (1996). Differentiation of Citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Annals of Applied Biology*, **129**, 479-489.

RUBIO, L., AYLLON, M. A., KONG, P., FERNANDEZ, A., POLEK, M., GUERRI, J., MORENO, P., and FALK, B. W. (2001a). Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology*, **75**, 8054-8062.

RUBIO, L., BOU-JAWDAH, Y., LIN, H. X., and FALK, B. W. (2001b). Geographically distant isolates of the Crinivirus. Cucurbit yellow stunting disorder virus show very low genetic diversity in the coat protein gene. *Journal of General Virology*, **82**, 929-933.

RUBIO, L., JANSSEN, D., CUADRADO, I. M., MORENO, P., and GUERRI, J. (2003). Rapid detection of cucumber vein yellowing virus by tissue-print hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods*, **114**, 105-107.

RUBIO, L., LUIS-ARTEAGA, M., CAMBRA, M., SERRA, J., MORENO, P., and GUERRI, J. (2002). First Report of Broad bean wilt virus 1 in Spain. *Plant Disease*, **86**, 698-698.

RUBIO, L., SOONG, J., KAO, J., and FALK, B. W. (1999). Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: Lettuce infectious yellows virus, Cucurbit yellow stunting disorder virus, and Beet pseudo-yellows virus. *Phytopathology*, **89**, 707-711.

RUBIO, L., YEH, H. H., TIAN, T. Y., and FALK, B. W. (2000). A heterogeneous population of defective RNAs is associated with Lettuce infectious yellows virus. *Virology*, **271**, 205-212.

RUBIO-HUERTOS, M. (2007). Nota previa sobre un virus de tipo "ringspot" encontrado en *Petunia hybrida* Vilm. *Microbiología Española*, **12**, 325-325.

RUIZ, L., CASTAÑO, A., BORJA, M., and HERNÁNDEZ, C. (2007). Pelargonium chlorotic ring pattern virus: first report in Spain. *New Disease Reports*, **15**, 176-176.

RUIZ-RUIZ, S., MORENO, P., GUERRI, J., and AMBRÓS, S. (2007). A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of Citrus tristeza virus in different plant tissues. *Journal of Virological Methods*, **145**, 96-105.

SACRISTÁN, S., MALPICA, J. M., FRAILE, A., and GARCÍA-ARENAL, F. (2003). Estimation of population bottlenecks during systemic movement of Tobacco mosaic virus in tobacco plants. *Journal of Virology*, **77**, 9906-9911.

SAHAMBI, H. S., MILNE, R. G., COOK, S. M., GIBBS, A. J., and WOODS, R. D. (76 A.D.). Broad bean wilt and nasturtium ringspot viruses are related. *Phytopathologische Zeitschrift*, **76**, 158-165.

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., and ERLICH, H. A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., AND MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SASTRY, K. S. (1984). Management of plant virus disease by oil spray. In A.MISTRA & H.POLASA (Eds.). Virus Ecology. South Asia, New Delhi, pp. 31-57.

SATAPATHY, M. K. (1998). Chemical control of insect and nematode vectors of plant viruses. In HADIDI, A., KHETARPAL, R. K., & KOGANEZAWA, H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 158-195.

SAWYER, S. (1989). Statistical tests for detecting gene conversion. *Molecular Biology and Evolution*, **6**, 526-538.

SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W., and BROWN, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene-expression patterns with a complementary-DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.

SCHMELZER, K., GIPPERT, R., WEISENFELS, M., and BECZNER, I. (1975). Spontane wirtspflanzen des acherbohnenwelke-virus (Broad bean wilt virus). *Zbl Bakt*, **130**, 696-696.

SCHROEDER, W. T. and PROVVIDENTI, R. (1970). A destructive blight of *Spinacia oleracea* incited by a strain of the broad bean wilt virus. *Phytopathology*, **60**, 1405-1406.

SCOTT, S. W. and BARNETT, O. W. (1984). Some properties of an isolate of Broad bean wilt virus from dogwood (*Cornus florida*). *Plant Disease*, **68**, 983-985.

SEGUNDO, E., JANSSEN, D., VELASCO, L., RUIZ, L., and CUADRADO, I. M. (2002). First Report of Cucumber leaf spot virus in Spain. *Plant Disease*, **85**, 1123-1123.

SEGUNDO, E., MARTÍN-BRETONES, G. R.-B. L., VELASCO, L., JANSSEN, D., and CUADRADO, I. M. (2003). First report of Turnip mosaic virus in pismus sativum in Spain. *Plant Disease*, **87**, 103-103.

SERRANO, A. R., DEL CASTILLO, J. L., NOVO, J. J., OCANA, A. F., and RODRIGUEZ, M. V. G. (2007). Chitinase and peroxidase activities in sunflower hypocotyls: effects of BTH and inoculation with *Plasmopara halstedii*. *Biologia Plantarum*, **51**, 149-152.

SHUKLA, L. L., TEAKLE, D. S., and GOUGH, K. H. (1980). Periwinkle, a latent host for broad bean wilt and cucumber mosaic viruses in Australia. *Plant Disease*, **64**, 802-803.

SILVERMAN, F. P., PETRACEK, P. D., FLEDDERMAN, C. M., JU, Z. G., HEIMAN, D. F., and WARRIOR, P. (2005). Salicylate activity. 1. Protection of plants from paraquat injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 9764-9768.

SIMON, A. E. and BUJARSKI, J. J. (1994). RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **32**, 337-362.

SINGH, R. P., NIE, X., XINGH, M., COFFIN, R., and DUPLESIS, P. (2002). Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acids extraction for virus detection by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, **99**, 123-131.

SMITH, K. M. (1950). Some virus diseases of ornamental plants. *Journal Royal Horticultural Society*, **75**, 350-353.

SMYRNIODIS, I. N., HARRINGTON, R., CLARK, S. J., and KATIS, N. (2001). The effect of natural enemies on the spread of barley yellow dwarf virus (BYDV) by *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, **91**, 301-306.

STADNIK, M. J. and BUCHENAUER, H. (1999a). Effects of benzothiadiazole, kinetin and urea on the severity of powdery mildew and yield of winter wheat. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*, **106**, 476-489.

STADNIK, M. J. and BUCHENAUER, H. (1999b). Control of wheat diseases by a benzothiadiazole-derivative and modern fungicides. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*, **106**, 466-475.

STANSLY, PA., SÁNCHEZ, P. A., RODRÍGUEZ, J. M., CAÑIZARES, F., NIETO, A., LÓPEZ, M. J., FAJARDO, M., SUÁREZ, V., and URBANEJA, A. (2004). Prospects for biological control of *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae) in greenhouse tomatoes of southern Spain. *Crop Protection*, **23**, 701-712.

STEWART, E. L., QU, X. S., OVERTON, B. E., GILDOW, F. E., WENNER, N. G., and GROVE, D. S. (2007). Development of a real-time RT-PCR SYBR green assay for Tomato ring spot virus in grape. *Plant Disease*, **91**, 1083-1088.

STICHER, L., MAUCHMANI, B., and METRAUX, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **35**, 235-270.

STUBBS, L. L. (1947). A destructive vascular wilt virus disease of Broad bean (*Vicia faba* L.) in Victoria. *Journal Department of Agriculture Vietnam*, **45**, 323-332.

STUBBS, L. L. (1960). Aphid transmission of broad bean wilt virus and comparative transmission efficiency of three vector species. *Australian Journal of Agricultural Research*, **11**, 734-741.

SWANSON, M. M. and MACFARLANE, S. A. (1999). The E116 isolate of Dutch Pea early-browning virus is a recombinant virus. *Virus Research*, **60**, 87-94.

TAN, Z. Y., WADA, Y., CHEN, J. S., and OHSHIMA, K. (2004). Inter- and intralineage recombinants are common in natural populations of Turnip mosaic virus. *Journal of General Virology*, **85**, 2683-2696.

TAYLOR, R. H. & STUBBS, L. L. (1972). *Broad bean wilt virus*. In GIBBS, M. J., HARRISON B.D., & MURANT, A. F. (Eds.). Springer Netherlands, England. Vol. 81.

TENLLADO, F., LLAVE, C., and AZ-RUIZ, J. R. (2004). RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research*, **102**, 85-96.

TEYCHENEY, P. Y., ACINA, I., LOCKHART, B. E. L., and CANDRESSE, T. (2007). Detection of Banana mild mosaic virus and Banana virus X by polyvalent degenerate oligonucleotide RT-PCR (PDO-RT-PCR). *Journal of Virological Methods*, **142**, 41-49.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., and GIBSON, T. J. (1994). Clustal-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through equence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.

TIAN, R. H., WANG, X. F., PEI, M. Y., and XIE, D. Z. (1982). Studies on stunt mosaic disease of spinach. *Acta Phytopylacica Sinica*, **9**, 153-156.

TIAN, T., KLAASSEN, V. A., SOONG, J., WISLER, G., DUFFUS, J. E., and FALK, B. W. (1996). Generation of cDNAs specific to lettuce infectious yellows closterovirus and other whitefly-transmitted viruses by RT-PCR and degenerate oligonucleotide primers corresponding to the closterovirus gene encoding the heat shock protein 70 homolog. *Phytopathology*, **86**, 1167-1173.

TOMASSOLI, L., ILARDI, V., BARBA, M., and KANIEWSKI, W. (1999). Resistance of transgenic tomato to cucumber mosaic cucumovirus under field conditions. *Molecular Breeding*, **5**, 121-130.

TOUSSAINT, A., KUMMERT, J., MAROQUIN, C., LEBRUN, A., and ROGGEMANS, J. (1993). Use of virazole to eradicate odontoglossu, ringspot virus from *in vitro* cultures of Cymbidium Sw. *Plant Cell Tissue Organization Cultures*, **32**, 303-309.

TSOMPANA, M., ABAD, J., PURUGGANAN, M., and MOYER, J. W. (2005). The molecular population genetics of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) genome. *Molecular Ecology*, **14**, 53-66.

UKNES, S., MAUCHMANI, B., MOYER, M., POTTER, S., WILLIAMS, S., DINCHER, S., CHANDLER, D., SLUSARENKO, A., WARD, E., and RYALS, J. (1992). Acquired-Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, **4**, 645-656.

URBAN, L. A., SHERWOOD, J. L., REZENDE, J. A. M., & MELCHER, U. (1990). *Examination of mechanisms of cross protection in non-transgenic plants*. In FRASER, R. S. S. (Ed.). Recognition and Response in Plant-Virus Interactions. Springer, Berlin, pp. 415-426.

URBANOWICZ, A., ALEJSKA, M., FORMANOWICZ, P., BLAZEWICZ, J., FIGLEROWICZ, M., and BUJARSKI, J. J. (2005). Homologous crossovers among molecules of brome mosaic bromovirus RNA1 or RNA2 segments in vivo. *Journal of Virology*, **79**, 5732-5742.

UYEMOTO, J. K. and PROVVIDENTI, R. (1974). Isolation and differentiation of two serotypes of broad bean wilt virus. *Phytopathology*, **64**, 1547-1548.

VAIRA, A. M., LISA, V., and LUISONI, E. (1992). Diffusione di due ceppi di tomato spotted wilt virus in Liguria. *Informatore Fitopatologico*, **42**, 59-63.

VALLAD, G. E. and GOODMAN, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, **44**, 1920-1934.

VALVERDE, R. A., LOZANO, G., NAVAS-CASTILLO, J., RAMOS, A., and VALDÉS F. (2004). First Report of Sweet potato chlorotic stunt virus and Sweet potato feathery mottle virus Infecting Sweet Potato in Spain. *Plant Disease*, **4**, 428-428.

VAN DEN BOSCH, F., JEGER, M. J., and GILLIGAN, C. A. (2007). Disease control and its selection for damaging plant virus strains in vegetatively propagated staple food crops; a theoretical assessment. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **274**, 11-18.

VAN REGENMORTEL, M. H. V., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., ESTES, M. K., LEMON, S. M., MANILOFF, J., MAYO, M. A., MC GEOCH, D. J., PRINGLE, C. R., & WICKNER, R. B. (2000). *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press, New York, pp. 691-695.

VEGA, J., GRACIA, O., and FELDMAN, J. M. (1980). Characteristics of argentine broad bean wilt virus: Cytopathological aspects. *Phytopathologische Zeitschrift*, **99**, 242-250.

VERHOEVEN, J. T. H. J., DING, Y. M., LESSEMANN, D., VAN DER VLUGT, R. A. A., and ROENHORST, J. W. (2002). Virus infections in *Gentiana* species. *Acta Horticulture (ISHS)*, **568**, 61-67.

VERNOOIJ, B., FRIEDRICH, L., GOY, P. A., STAUB, T., KESSMANN, H., and RYALS, J. (1995). 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic-acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **8**, 228-234.

VIGNE, E., BERGDOLL, M., GUYADER, S., and FUCHS, M. (2004). Population structure and genetic variability within isolates of Grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology*, **85**, 2435-2445.

VIGNE, E., DEMANGEAT, G., KOMAR, V., and FUCHS, M. (2005). Characterization of a naturally occurring recombinant isolate of Grapevine fanleaf virus. *Archives of Virology*, **150**, 2241-2255.

VIVES, M. C., RUBIO, L., GALIPIENSO, L., NAVARRO, L., MORENO, P., and GUERRI, J. (2002). Low genetic variation between isolates of Citrus leaf blotch virus from different host species and of different geographical origins. *Journal of General Virology*, **83**, 2587-2591.

Esta cita de Vives, creo que se hace en referencia a la recombinación y no se sería correcta. Habría que usar esta otra:

VIVES, M.C., RUBIO, L., SAMBADE, A., MIRKOV, T.E., MORENO, P., GUERRI, J. 2005. Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus tristeza virus* isolate. *Virology* 331: 232-237.

VOINNET, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics*, **6**, 206-211.

VOS, P., JAEGLE, M., WELLINK, J., VAN KAMMEN, A., and GOLDBACH, R. (1998). Two viral proteins involved in the proteolytic processing of the *Cowpea mosaic virus* polyproteins. *Nucleic Acids Research*, **16**, 1967-1985.

WALKEY, D. G. A. (1991). *Applied Plant Virology*. Chapman&Hall, London. Santafé de Bogotá, pp. 338.

- WANG, Y. M., JI, J., WANG, D. W., ZHANG, Z. B., and ZHANG, A. M. (2006). Creating wheat germplasm for high quality breeding by monosomic backcrossing. *Journal of Integrative Plant Biology*, **48**, 1210-1215.
- WARD, E. R., UKNES, S. J., WILLIAMS, S. C., DINCHER, S. S., WIEDERHOLD, D. L., ALEXANDER, D. C., AHLGOY, P., METRAUX, J. P., and RYALS, J. A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **3**, 1085-1094.
- WEIDEMANN, H. L., LESSEMANN, D., PAUL, H. L., and KOENIG, R. (1975). Das Broad bean wil virus als ursache für eine neue vergilbungs-krankheit des spinats in Deutschland. *Journal of Phytopathology*, **84**, 215-221.
- WEILLER, G. F. (1998). Phylogenetic profiles: A graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 326-335.
- WHITE, K. A. and MORRIS, T. J. (1995). RNA determinants of junction site selection in RNA virus recombinants and defective interfering RNAs. *A Publication of the RNA Society*, **1**, 1029-1040.
- WHITE, R. F. (1979). Acetylsalicylic-Acid (Aspirin) Induces Resistance to Tobacco Mosaic-Virus in Tobacco. *Virology*, **99**, 410-412.
- WRIGHT, F. (1990). The effective number of codons used in a gene. *Gene*, **87**, 23-29.
- XING, W., HONG, N., KUN, J., and PING, G. (2006). Improving the sensitivity of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to study the variability of PLMVd. *Journal of Virological Methods*, **135**, 276-280.
- XU, Z. G., COCKBAIN, A. J., WOODS, R. D., and GOVIER, D. A. (1998). The serological relationships and some other properties of isolates of broad bean wilt virus from faba bean and pea in China. *Annual Applied Biology*, **113**, 287-296.
- YAMASHITA, K., FUKUI, Y., and FUJI, S. (2000). Broad bean wilt virus 1 isolate from Delphinium. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **67**, 174-174.
- YANAGISAWA, S. and SCHMIDT, R. J. (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant Journal*, **17**, 209-214.
- YANKULOVA, M. and KAITAZOVA, P. (1979). Broad bean wilt virus - a new virus attacking pepper in Bulgaria. *Horticultural and Viticultural Science*, **16**, 48-57.

ZHONG, Y. W., GUO, A. Y., LI, C. B., ZHUANG, B. Q., LAI, M., WEI, C. H., LUO, J. C., and LI, Y. (2005). Identification of a naturally occurring recombinant isolate of Sugarcane mosaic virus causing maize dwarf mosaic disease. *Virus Genes*, **30**, 75-83.

ZHU, X., CAO, J., WANG, Q., and JIANG, W. (2008). Postharvest infiltration of BTH reduces infection of mango fruits (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) by *Colletotrichum gloeosporioides* and enhances resistance inducing compounds. *Journal of Phytopathology*, **156**, 68-74.

ZHU, Y. J., AGBAYANI, R., NISHIJIMA, W., and MOORE, P. (2007). Characterization of disease resistance of *Carica papaya* to *Phytophthora*. *Proceedings of the First International Symposium on Papaya*, 265-269.

ZHU, Y. J., FERREIRA, S., FITCH, M. M. M., and MOORE, P. H. (2002). Benzothiadiazole (BTH) activates systemic acquired resistance (SAR) responses in papaya to reduce disease symptoms of seedlings inoculated with *Phytophthora palmivora*. *Proceedings of the International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits, Vols 1 and 2*, 475-481.

ZHU, Y. J., QIU, X. H., MOORE, P. H., BORTH, W., HU, J., FERREIRA, S., and ALBERT, H. H. (2003). Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **63**, 237-248.

ZUKER, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3406-3415.

Agradecimientos

Quiero agradecer a tanta gente el que me haya ayudado de algún modo u otro durante el tiempo en que he estado haciendo esta tesis que no sé ni por donde empezar, así que paciencia, esto va a ser largo.

En primer lugar a mis directores por darme la oportunidad de hacer esta tesis y haberme apoyado en todo momento. A Luís Rubio por haber estado ahí durante todos estos años ayudándome tanto en la bancada como en la escritura de esta tesis. Desde luego, paciencia ha tenido y mucha porque yo tengo sangre aragonesa y hago honor a ella.

A Pepe y a Pedro, por sus consejos e ideas y por ayudarme y guiarme en la redacción de esta tesis.

A mis compañeras de laboratorio: M^a Carmen, Susana y Mónica por su apoyo y ayuda durante este tiempo y por supuesto a Maruja, nuestra técnico, por ayudarme siempre, y sobretodo por ese carácter que me hace reír tanto, eres genial Maru.

También quiero dar las gracias a Gema que me ha ayudado mucho en este último año, y aunque siempre se queja de que no le hago caso, espero que sepa que la quiero mucho y que le agradezco que confiara en mí. Menuda rubia!!

A Patrick y a Fred, que son encantadores y ciegos, o debería decir, “se han hecho los ciegos” cuando alguna mañanas, más que microsátélites he estado histérica delante de este ordenador intentando acabar esta tesis. Además, a Fred también por acompañarme en mis cantos y bailes mientras trabajamos y por crear una nueva lengua que nos vuelve locos a todos!!

A M^a Eugenia, que me ha ayudado mucho con sus consejos sobre esas malditas manchas llamadas dot-blot (porque hay días en que para mi sólo eran manchas) que hay en mis membranas de hibridación (si no es por ella, aún estoy mirándolas).

A Jose, porque se va a Malta y porque es el único con el que puedo competir en cuanto a quien parece más cansado y dormido por las mañanas.

A Pablo, el informático del IVIA, porque le he llorado mil veces: “Pablo, por favor, a mi ordenador le pasa esto o aquello”, y él siempre con su bueno humor y su sonrisa me lo soluciona.

A todos mis amigos del IVIA con los que he compartido estos cinco años y medio y con los que sé que voy a seguir compartiendo. A Martita, por empezar esto conmigo en Wageningen, por apoyarme siempre y ser tan buena amiga, por sus gritos y caras de sorpresa que me gustan tanto; A Jorge, nuestro asturiano, por su buen carácter y su forma

práctica y sencilla de ver las cosas; A Maria que sólo con verla ya te alegra la mañana con su sonrisa, con esa mirada que dice tanto, porque a mi modo de ver es un ejemplo de fortaleza; A Giovanni, por hacer cambiar mi opinión sobre los italianinis, por ser uno de mis mejores amigos, parco en palabras, eso sí, pero siempre ahí, sin hablar, pero a mi lado; A Agueda que desde que llegó ha sido un gran apoyo para mi, que me ha aguantado todo, lo que está relacionado con la tesis y lo que no, lo bueno, lo malo (esto parece un matrimonio), por la mañana, por la noche, a mediodía. Porque es genial tener una amiga así, de esas con las que no tengo ni que hablar, una miradita y no hace falta más. Y como no, a mi Luchila, con la que empecé el camino en el 95 y de la que he tenido la suerte de no separarme en todo este tiempo. Con ella he viajado, he estudiado, he discutido sobre ciencia, he salido de fiesta... Creo que acabaría antes si digo lo que no he compartido con ella que si lo digo. Me he reído con ella hasta llorar y le he llorado hasta reír, siempre está ahí, no se puede pedir más de una amiga.

También a Vero, nuestra chica "bio" de las comidas; a Alida, nuestra primera super mamá; a Nubia que es un solete con un estomago peleón; a Ana por su dulzura; a Elsa por ese buen humor que tiene; a Nuria que parece tímida pero cuando menos te lo esperas te sorprende con su acento andalú; a Jesús que llegó más tarde y conozco menos pero promete; a Inma que es un trozo de pan y me deja siempre todo lo que le pido; y a Andrés por enfrentarse conmigo y ganarle la batalla (espero) a nuestro nuevo "juguetito" del laboratorio.

A mis compis de piso, Juliette y Kevin. A Kevin, por que friega todos los días los platos de mi cena (odio fregar) mientras yo estoy tirada en el sofá echa polvo; y a Juliette, mi chica responsable favorita, porque es un solete y porque como le decía esta mañana, me hacer reír un montón.

A mis amigos de Estrasburgo: Ana de Luis, Guille, Ana Luna, Santi, Phil, Mouad, George, Audrey y Manu, por lo bien que lo pasamos el tiempo que estuve allí y mejor todavía después!! También a los que he conocido gracias a ellos Javi y Kasia que son geniales.

A mis super agrónomas: Raque, Vi, la Fi, Ele, Belén, Lucia (otra vez) y Begoña, que son más que buenas amigas y me han ayudado y apoyado siempre. A Ele por llamarme todos los días durante un año entero (eso no se olvida guapa). A Oña, que la quiero tanto como ella sabe y con la que voy a jugar a las palas en la playa este verano con una pelotita de 1cm (ella me entiende). Ahh!! Se me olvidaba, y por su gran y variada escala de grises!!

A Amparo, Carolo y Manolo (sé que esto te va a encantar Manu) con las que voy desde que vivo en Valencia, con las que me he criado y han estado siempre presentes en todo lo que he hecho incluida esta tesis y lo que nos queda por recorrer chicas. A Martita

que tiene ritmo hasta con los saltos de página continúa y siguiente y a M^a Tere, alias “la rubia”, por acogerme en su casa y a cualquier hora durante estos años. A Josema, por esas cenas en las que arreglamos el mundo de una manera tan parecida (bueno, Josema siempre lo arregla más que yo, que barbaridad!).

A mi hermana, porque cuando le endosé esta tesis para que la leyese y la corrigiera me llamó y me dijo: “Como no me pongas en los agradecimientos te vas a enterar, menudo tostón, no entiendo nada!!”. Ella se queja pero siempre me ayuda.

A mi madrina Rosa, a Rafa y Jose Luis que son junto a mis padres y hermana “mi pequeña familia”.

A mis padres, si no llega a ser por ellos y su apoyo, yo creo que no dormiría desde hace mucho. Por inculcarme que lo que se empieza debe acabarse y hacerse bien aunque cueste (yo lo he intentando). Desde luego, que suerte tengo de que sean mis padres y eso que... ejem, ejem, Papá, mira que te gusta gruñir!! Espero que con esta frase te rías.

MUCHÍSIMAS GRACIAS A TODOS, incluyendo a los que seguro sé, he olvidado.