

18 493

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



\* 5 3 0 9 5 5 8 7 5 4 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**EL VIRUS DEL MOSAICO COMUN DE LA JUDIA.  
CARACTERIZACION BIOLÓGICA, SEROLÓGICA Y  
MOLECULAR DE AISLADOS ESPAÑOLES.**

Memoria presentada por  
Margarita Sáiz Zalabardo para  
optar al grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas

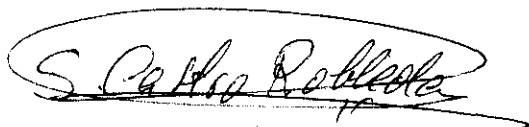
Madrid, diciembre de 1993

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA


El virus del mosaico común de la judía. Caracterización biológica,  
serológica y molecular de aislados españoles.

Directores

Dra. Serafina Castro Robleda



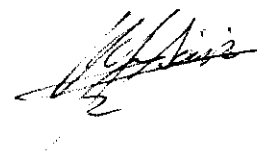
Dr. Javier Romero Cano



Investigadores del CIT-INIA

Autora

Margarita Sáiz Zalabardo



Memoria presentada por  
Margarita Sáiz Zalabardo  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias  
Biológicas

Madrid, diciembre de 1993

## AGRADECIMIENTOS

Resulta difícil recoger en unas pocas páginas a todos aquellos que han contribuido, de manera directa o indirecta, a que este trabajo saliera adelante. Empezaré por los agradecimientos de carácter más puramente científico, aunque me resulte difícil en algunos casos separarlos de los personales, en los que entraré más adelante.

En primer lugar, quiero agradecer al INIA la concesión de una beca predoctoral, que me permitió subsistir durante la mayor parte de la duración de este trabajo.

A mis directores de Tesis, Javier Romero y Serafina Castro, por asesorarme y soportarme todo este tiempo. Muy especialmente, le agradezco a Fina sus constantes desvelos y su apoyo incondicional en los momentos más duros.

Quiero mencionar a continuación a los distintos investigadores que nos cedieron desinteresadamente material científico, en algunos casos fundamental en el desarrollo de esta Tesis:

Al Dr. H.J. Vetten por los anticuerpos frente a BCMV y sus secuencias antes de publicación. Al Dr. G. Mink por sus anticuerpos contra BCMV. Al Dr. F.J. Morales por los aislados de BCMV y las semillas libres de virus. A la Dra. V. Lisa por los aislados de BCMV, WMV 2, BYMV y ClYVV. Al Dr. D. Berra por los lotes de semillas del País Vasco. Al Dr. R. Ortiz, que nos proporcionó semillas de los cultivares indicadores en cantidades suficientes para realizar nuestros ensayos, y nos acompañó, inagotable, en muchos muestreos.

Quiero recordar también a Javier Alonso Ponga, que nos guió en el muestreo de León, y con el que mi desconocimiento acerca de *Phaseolus vulgaris* disminuyó considerablemente, y a M.A. Marcotegui, que me ayudó en mis pinitos en microscopía electrónica.

Dedico un agradecimiento muy especial a la Dra. Flora Sánchez, de cuya mano experta me introduje en el mundo de la biología molecular.

El análisis filogenético de BCMV se realizó en colaboración con el Dr. J. Dopazo, cuya competente y objetiva visión del tema contribuyó en gran medida a enriquecer este trabajo.

Agradezco también al Dr. J. Fresno su gran ayuda con las fotografías. A Gerardo Carazo, su apoyo moral. A la Dra. C. De Blas, cuya Tesis me sirvió de inspiración y fuente de algunas figuras. Al Dr. F. Ponz por su apoyo implícito y sus constructivas críticas y sugerencias. Al Dr. V. Torres, porque fui su 'becaria favorita'. Al Dr. J.M. Malpica, sin cuya afectuosa y férrea presión esta Tesis habría empezado a escribirse mucho más tarde.

He de nombrar, por supuesto al Dr. J.M. Martínez-Zapater, a pesar del cual, conseguí escribir esta Tesis, dada su irracional obsesión por el ordenador, y que disfrutó mucho metiéndose conmigo, aunque con sus bromas me hizo más llevadera la escritura.

A Adela Redondo le agradezco toda su ayuda, especialmente en el procesamiento de muestras, para el que siempre estuvo dispuesta, rodillo en mano.

*Muy personales:*

*Incluyo aquí a todos mis compañeros del Área de Virología Vegetal y Biología Molecular, a los que sería interminable nombrar, y hago mención a los que no me perdonaría omitir:*

*A M<sup>a</sup> José Soto, que durante mucho tiempo fue mi compañera, a la que no perdonaré si no escribe la Tesis. Con ella compartí infinidad de divertidísimos y desastrosos experimentos, y muchos buenos y malos ratos que no olvidaré.*

*A David Martínez, para el que me sería muy difícil encontrar calificativos, sin incrementar su desarrollada faceta narcisista. Quiero agradecerle el ser un excelente compañero, y estar allí para echar una mano siempre que fuera necesario, y fuera la hora que fuese. Los estupendos momentos que compartimos, son algo que nos ha unido inevitablemente. David siempre será mi azafato favorito.*

*A Isabel Aguilar, la "sufridora" más entrañable del laboratorio, que para mí, siempre será "la peque".*

*A Nieves Sánchez, cuya particular visión de La Ciencia, nos hizo pasar buenos ratos juntas.*

*A José Antonio Jarillo, que sembrará la alegría con su encanto personal allí donde vaya.*

*A Marta Roldán, que me escuchó y animó con su chispeante personalidad.*

*A Ximo, al que fustigué sin piedad con mi ignorancia, y que siempre estuvo dispuesto a dedicarme un rato cuando fue preciso, haciendo de nuestro trabajo en común, con su peculiar manera de ser, una experiencia muy agradable a todos los niveles.*

*Por último, le agradezco a Julio, al que dedico también esta Tesis, el haber sabido aguantar estoicamente todos los efectos secundarios que "ella" me originó a nivel personal, y por el apoyo que supuso saber que, a pesar de todo, él siempre estaba ahí.*

*A mi padre, por haber sabido llevar con afecto todos mis momentos de cansancio y mal humor en casa.*

## INDICE

### I. INTRODUCCION

1. <i>Phaseolus vulgaris</i>	1
1.1. Características generales	1
1.2. Descripción botánica	2
1.3. Plántula	2
1.4. Semilla	4
1.5. Variabilidad	4
2. Problemática actual del cultivo en España	5
2.1. Ausencia de variedades comerciales	6
2.2. Enfermedades	6
3. Los virus vegetales	7
4. Enfermedades virales en judía	11
4.1. Potyvirus	12
4.1.1. Características generales	12
4.1.2. Organización y expresión del genoma	13
4.1.3. Taxonomía de potyvirus	16
4.1.3.1. Parámetros clásicos	17
4.1.3.2. Parámetros moleculares	19
5. El virus del mosaico común de la judía (BCMV)	20
5.1. Propiedades biológicas	20
5.2. Fuentes de resistencia a BCMV	23
5.3. Clasificación de cepas de BCMV	24
5.4. Serología	24
5.5. Situación taxonómica actual dentro del grupo de los potyvirus	26
6. Resistencia a virus en plantas	27
6.1. Control de BCMV	29

### II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

30

### III. MATERIALES Y METODOS

1. Material vegetal	31
1.1. Recogida de muestras	31
1.2. Conservación de aislados	31
1.3. Inoculación del virus	31
1.4. Cultivares de <i>Phaseolus vulgaris</i> utilizados	32
1.4.1. Transmisión y purificación	32
1.4.2. Caracterización de cepas de BCMV	32
2. Microscopía electrónica	32
2.1. Tinción negativa	32
2.2. Secciones ultrafinas	33
3. Ensayos inmunológicos	33
3.1. Anticuerpos utilizados	33
3.1.1. Monoclonales	33
3.1.2. Policlonales	34
3.2. ELISA	34
3.2.1. Extractos vegetales	34
3.2.2. Conjugados	35
3.2.3. Sustrato	35
3.3. Inmunomicroscopía electrónica	35
4. Purificación de BCMV y extracción del RNA viral	35
4.1. Purificación del virus	35
4.2. Extracción del RNA viral	36
5. Síntesis de c-DNA viral	36
6. Clonación y manipulación de DNA	37
6.1. Vectores	37
6.2. Tratamiento con CIP	38
6.3. Reacciones de ligación	38
6.4. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	39
6.5. Transformación y selección de clones recombinantes	39
6.6. Preparación de DNA plasmídico	39
7. Hibridaciones de ácidos nucleicos	40

7.1.	Transferencia a membranas	40
7.1.1.	Transferencia tipo "Southern"	40
7.1.2.	Transferencia a partir de colonias	40
7.1.3.	"Dot blot" de extractos vegetales	41
7.2.	Marcaje de las sondas	41
7.2.1.	Marcaje con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP	41
7.2.2.	Marcaje con digoxigenina	41
7.3.	Condiciones de hibridación	41
7.3.1.	Hibridación con sondas radiactivas	41
7.3.2.	Hibridación con sondas marcadas con digoxigenina	42
8.	Secuenciación	42
8.1.	Reacciones y estrategia	42
8.2.	Geles de secuenciación	43
9.	Técnicas electroforéticas	43
9.1.	Electroforesis en geles de agarosa	43
9.1.1.	Extracción de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	44
9.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida	44
9.2.1.	Extracción de fragmentos de DNA a partir de geles de poliacrilamida	44
10.	Análisis filogenético	45
10.1.	Aplicación del test de tasa de evolución desigual	45
10.2.	Derivación de árboles filogenéticos	45
11.	Amplificación enzimática de BCMV	46
11.1.	RT-PCR a partir de extracto vegetal	47
11.2.	RT-PCR previa adsorción del virus a placas de microtitulación mediante anticuerpos específicos (PCR-INIA)	47
11.3.	Detección de los productos de amplificación	48
11.4.	Aislados utilizados	48

#### IV. RESULTADOS

1.	Estimación de las virosis en el cultivo de judía	50
----	--------------------------------------------------	----

2. Caracterización de aislados de BCMV	53
2.1. Caracterización serológica	53
2.1.1. Perfiles serológicos de los aislados	56
2.2. Caracterización biológica de aislados	61
3. Clonación y secuenciación de los genes de la proteína de la cápsida y región 3' no codificante de dos aislados de BCMV	61
3.1. Estrategia de clonación	62
3.2. Secuenciación del gen de la proteína de la cápsida del aislado J-8 de serotipo B	62
3.3. Secuenciación del gen de la proteína de la cápsida del aislado J-56 de serotipo A	65
4. Análisis de las proteínas de la cápsida deducidas para los aislados de BCMV secuenciados	68
5. Análisis de las regiones 3' no codificantes de los aislados de BCMV secuenciados	72
6. Comparación con las proteínas de la cápsida de otros potyvirus estrechamente relacionados	72
7. Comparación con las regiones 3' no codificantes de otros potyvirus estrechamente relacionados	72
8. Análisis filogenético de BCMV	79
8.1. Aplicación del test de tasa de evolución desigual	79
8.2. Derivación de árboles filogenéticos	81
9. Detección de BCMV mediante transcripción inversa y amplificación enzimática	86
9.1. Diseño de cebadores específicos	87
9.2. Amplificación de aislados de serotipo A y B de BCMV	90
9.3. Especificidad de los productos de amplificación	93
9.4. Sensibilidad de los ensayos	96

## V. DISCUSION

1. Estudio epidemiológico de BCMV	104
-----------------------------------	-----



2. Secuenciación del gen de la cápsida y región 3' no codificante de dos aislados de distinto serotipo de BCMV	107
3. Análisis filogenético de BCMV	110
4. Detección de BCMV mediante transcripción inversa y amplificación enzimática	113
<b>ANEXO A LA DISCUSION</b>	<b>117</b>
<b>VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES</b>	<b>121</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>124</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>142</b>

## ABREVIATURAS

- AzMV: "azuki bean mosaic virus", virus del *Phaseolus radiatus*.
- BCMV: "bean common mosaic virus", virus del mosaico común de la judía.
- BGMV: "bean golden mosaic virus", virus del mosaico dorado de la judía.
- BICMV: "blackeye cowpea mosaic virus", virus del mosaico de la semilla del chícharo.
- BrEt: bromuro de etidio.
- BYMV: "bean yellow mosaic virus", virus del mosaico amarillo de la judía.
- CABMV: "cowpea aphid-borne mosaic virus", virus del mosaico del chícharo transmitido por áfidos.
- CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- CIP: fosfatasa alcalina de ternera.
- CIYVV: "clover yellow vein virus", virus del amarilleo de las venas del trébol.
- CMV: "cucumber mosaic virus", virus del mosaico del pepino.
- cv: cultivar.
- DEPC: dietil pirocarbonato.
- dig-UTP: desoxi-uridín trifosfato-11-digoxigenina.
- dNTP: desoxi-nucleótido trifosfato.
- EDTA: ácido etilendiamino tetraacético.
- ELISA: "enzyme-linked immunosorbent assay".
- GFLV: "grapevine fanleaf virus", virus del entrenudo corto infeccioso de la vid.
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.
- HPRI: inhibidor de ribonucleasas de placenta humana.
- M-MLV: transcriptasa inversa del virus Moloney de la leucemia murina.
- MDMV: "maize dwarf mosaic virus", virus del mosaico enanizante del maíz.
- MOPS: ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico.
- NCR: "non-coding region", región no codificante.
- nt: nucleótido.

p/v: peso/volumen.  
pb: pares de bases.  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.  
PEG: polietilenglicol.  
PLRV: "potato leaf roll virus", virus del enrollado de la patata.  
PSbMV: "pea seed-borne mosaic virus", virus del mosaico del guisante transmitido por la semilla.  
PStV: "peanut stripe virus", virus del estriado del cacahuete.  
PVP: polivinil pirrolidona.  
PVX: "potato virus X", virus X de la patata.  
PVY: "potato virus Y", virus Y de la patata.  
PWV: "passionfruit woodiness virus", virus del amaderamiento de la pasionaria.  
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con un paso previo de transcripción inversa.  
SAPV: "South African passiflora virus", virus de la pasionaria sudafricana.  
SbMV: "soybean mosaic virus", virus del mosaico de la soja.  
SCMV: "sugarcane mosaic virus", virus del mosaico de la caña de azúcar.  
SDS: dodecilsulfato sódico.  
TGMV: "tomato golden mosaic virus", virus del mosaico dorado del tomate.  
TMV: "tobacco mosaic virus", virus del mosaico del tabaco.  
TRV: "tobacco rattle virus", virus del cascabeleo del tabaco.  
TSWV: "tomato spotted wilt virus", virus del bronceado del tomate.  
TVMV: "tobacco vein mottling virus", virus del moteado de los nervios del tabaco.  
u: unidad.  
v: volumen.  
WMV-2: "watermelon mosaic virus", virus del mosaico de la sandía, estirpe 2.  
ZYMV: "zucchini yellow mosaic virus", virus del mosaico amarillo del calabacín.

# *INTRODUCCION*

## **I. INTRODUCCION**

### **1. PHASEOLUS VULGARIS**

Dentro del grupo de las leguminosas de consumo humano, la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) se puede considerar una de las más importantes, debido a su amplia distribución en los cinco continentes, y por ser un complemento nutricional indispensable como aporte de proteínas (alrededor del 22% de su peso seco como semilla) en la dieta alimenticia de muchos pueblos.

El cultivo de judía es considerado de los más antiguos, habiéndose encontrado en Perú restos arqueológicos de 8000 años de antigüedad (Voyses, 1983). Su origen americano es aceptado actualmente sin ninguna controversia, siendo evidencia del mismo la enorme diversidad genética que presenta en dicho continente. La diseminación al resto del mundo se produjo tras el descubrimiento de América, y se ha demostrado que proviene de una planta silvestre conocida como "frijol ratón", que produce unas semillas grises muy pequeñas, y que todavía crece espontáneamente en algunas regiones de Perú (Debouck, 1987). Actualmente se acepta Méjico como posible centro de diversificación primaria (Debouck e Hidalgo, 1987).

La superficie a nivel mundial dedicada al cultivo de judía grano en 1990 fue de  $26,4 \times 10^6$  Ha, de las cuales un 91% se localizan en países en vía de desarrollo, con una producción de  $16,3 \times 10^6$  Tm. En cuanto a judía de verdeo, la superficie y producción totales en 1990 fueron de  $5 \times 10^6$  Ha y  $3,1 \times 10^6$  Tm respectivamente (FAO, 1990), correspondiendo el 50% de la producción a los países desarrollados, especialmente, europeos.

#### **1.1. Características generales**

La judía es una planta anual, herbácea y termófila, que no soporta las heladas. Debido a estas características, se cultiva principalmente en el trópico y también en la zona templada de los hemisferios norte y sur. Es una especie diploide con 22 cromosomas,

que normalmente se autopoliniza, con sólo un pequeño porcentaje de polinización externa dependiendo de la población de abejas durante la época de floración.

## 1.2. Descripción botánica

Desde el punto de vista taxonómico, esta especie es el prototipo del género *Phaseolus*, y su nombre científico fue asignado por Linneo en 1753. Pertenece a la tribu Phaseolae, de la subfamilia Papilionoideae y familia Leguminosae, dentro del Orden Rosales.

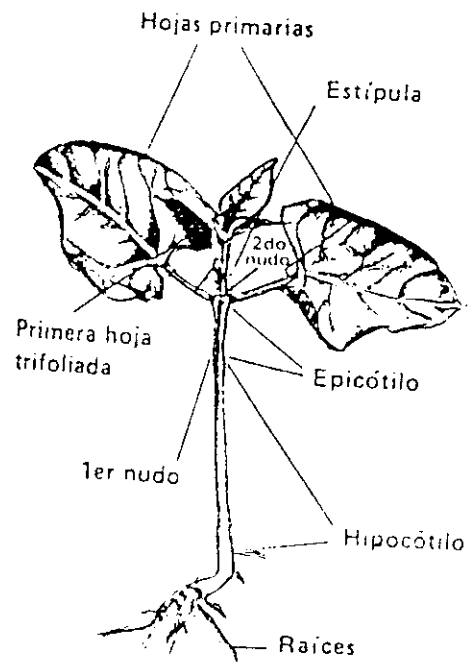
Este género agrupa, aproximadamente, 35 especies de las que sólo cuatro se cultivan, *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L. y *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freenman, y de éstas, la más importante y parece que la más evolucionada, es *P. vulgaris* L.

Muchas de las restantes especies son silvestres y han sido recolectadas y mantenidas en bancos de germoplasma por su interés como posibles fuentes de resistencia a plagas y enfermedades.

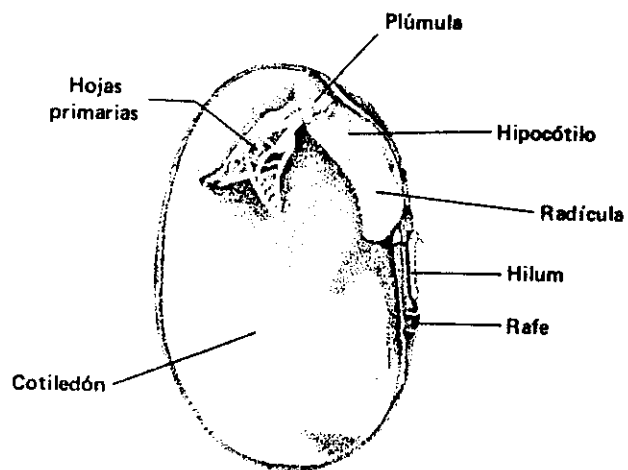
## 1.3. Plántula

En orden ascendente, el primer nudo es el de los cotiledones, en dos inserciones opuestas. El hipocótilo (primera parte del tallo comprendida entre la inserción de las raíces y el primer nudo) tiene una longitud apreciable porque la judía es de germinación epigea. Los cotiledones permanecen adheridos al tallo durante las primeras etapas de desarrollo, cayendo después de unas dos semanas. El siguiente nudo es el de las hojas primarias, que son unifoliadas y opuestas. Entre el nudo de los cotiledones y el de las hojas primarias se encuentra un entrenudo real llamado epicótilo. Los dos primeros nudos, el de los cotiledones y el de las hojas primarias son formados durante la embriogénesis, por lo que existen ya en la semilla. En el tallo, a nivel de cada nudo se encuentran los demás órganos, como las hojas trifoliadas, las ramas, las vainas, los racimos y las flores y una estípula (figura 1).

La flor es una típica flor papilionácea, y su morfología favorece el mecanismo de autopolinización: las anteras están al



**Figura 1.** Plántula de judía. (Tomado de "Frijol: Investigación y Producción" CIAT, 1985).



**Figura 2.** Composición interna de la semilla de judía. (Tomado de "Frijol: Investigación y Producción" CIAT, 1985).

mismo nivel que el estigma, y ambos órganos están envueltos completamente por la quilla. Cuando se produce la dehiscencia en las anteras (antesis) el polen cae directamente sobre el estigma. (Debouck e Hidalgo, 1985).

#### **1.4. Semilla**

La semilla de judía es exalbuminosa, y sus reservas nutritivas se concentran en los cotiledones. Se origina de un óvulo campilótropo, dispuesto transversalmente respecto al funículo.

Las partes externas principales de la semilla son: i) la testa o cubierta seminal, que corresponde a la capa secundina del óvulo; ii) el hilum, que conecta la semilla con la placenta, y es la cicatriz dejada por el funículo; iii) el micrópilo, que es una hendidura en la corteza, cerca del hilum, a través de la cual se realiza principalmente la absorción de agua, y, iv) el rafe, que procede de la soldadura del funículo con los tegumentos externos del óvulo campilótropo.

Internamente la semilla está compuesta exclusivamente por el *embrión*, que, a su vez está formado por la plúmula, las dos hojas primarias, el hipocótilo, los dos cotiledones y la radícula. El complejo plúmula-radícula está situado entre los cotiledones, en la parte ventral del grano de manera que la radícula está en contacto con el micropilo. (Debouck e Hidalgo, 1985) (figura 2).

#### **1.5. Variabilidad**

El polimorfismo en judía es enorme. La semilla tiene una amplia variación de forma (cilíndrica, esférica, arriñonada, etc.), de color (blanco, rojo, negro, amarillo, café, etc.) y de brillo. La combinación de colores también es muy frecuente. Esta gran variabilidad de los caracteres externos de la semilla se tiene en cuenta para la clasificación de variedades como consecuencia de la gran diversidad genética existente en esta especie.

Las variedades de judía se clasifican según diversos criterios. Si se considera el tipo de consumo, existen variedades para consumo como grano seco (alubia), y como vaina (judía verde).



Desde un punto de vista agronómico, se habla de variedades precoces y tardías, según la duración del período vegetativo. La reacción a ciertos factores limitantes de la producción, tanto abióticos (heladas, estrés hídrico, etc.) como bióticos (plagas y enfermedades), divide a las variedades en al menos dos grandes categorías, resistentes y susceptibles. Una de las características agronómicas más importantes para clasificar variedades es el hábito de crecimiento, determinado (variedades enanas en las que cesa el crecimiento con la floración) o indeterminado (variedades con crecimiento continuo).

## **2. PROBLEMATICA ACTUAL DEL CULTIVO EN ESPAÑA**

En España actualmente, la judía es la leguminosa de grano de mayor producción y valor de cosecha. Durante 1988 la superficie dedicada al cultivo de la judía grano fue de 95169 Ha, y la producción de 61212 Tm (MAPA, 1988), concentrada en el noroeste de España, siendo León (15952 Tm), La Coruña (12064 Tm) y Pontevedra (6244 Tm) las provincias de mayor producción. El cultivo se extiende además por la mayor parte de las zonas agrícolas del país, con un interés preferentemente local. Sin embargo, la superficie de cultivo en las últimas décadas ha descendido notablemente junto con la producción, aunque el rendimiento ha experimentado un pequeño ascenso, todavía insuficiente para rentabilizar su explotación (Asensio *et al.*, 1990).

La judía verde es el cultivo más importante entre las leguminosas hortícolas, y supone en la actualidad una superficie de 27.000 Ha y una producción de 258.000 Tm (M.A.P.A., 1988), de las que 28.000 Tm se destinan a la industria, estando principalmente el cultivo protegido bajo invernadero. Las principales zonas productoras se encuentran en Andalucía Oriental, Comunidad Valenciana y Cataluña.

## **2.1. Ausencia de variedades comerciales**

En España, en cada región, provincia, e incluso en cada término, se pueden encontrar diversas "variedades", muchas de ellas parecidas, mezcladas la mayoría, y sin garantía alguna de pureza.

La primera limitación técnica para su producción viene dada por la falta de variedades comerciales, ya que el Registro de Variedades Comerciales de judía seca en el Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero no se abrió hasta 1986, lo que implica la ausencia de semilla con las características adecuadas para asegurar una producción de calidad. La selección del grano se realiza por caracteres fenotípicos (color, tamaño, forma), que no aseguran la homogeneidad genética, haciéndose necesaria la tipificación de las "variedades" en uso mediante descripción varietal de caracteres botánicos, agronómicos, etc.

Actualmente la semilla que utilizan los agricultores procede, en su mayoría, del autoconsumo, del intercambio con otros agricultores de la zona o de otras zonas tradicionalmente productoras, o bien de los envasadores de judía. En el caso de la judía verde, la mayor parte del material vegetal utilizado es extranjero, y en las zonas de cultivo intensivo se aprecia un claro desplazamiento de los cultivares tradicionales como Garrafal Oro por otros más productivos (Maroto, 1991).

## **2.2. Enfermedades**

Una de las grandes limitaciones que tiene el cultivo de judía, no sólo en España, sino en todo el mundo, es la gran cantidad de enfermedades y plagas a las que se muestra susceptible. Se han estimado en un 10% las pérdidas a nivel mundial en la cosecha debidas a enfermedades (Hall, 1991). Se han descrito cientos de agentes causantes de enfermedad en judía, pero no todos tienen una distribución geográfica, prevalencia o importancia económica equivalente. Las enfermedades más importantes son las causadas por hongos, bacterias y virus.

En España no se ha realizado de forma sistemática un estudio del espectro fitopatológico de los cultivos. En el caso de las infecciones virales que afectan a leguminosas, sólo se encontró una referencia de Vela (1971), haciendo mención a un aislado del virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV), procedente de Málaga.

### 3. LOS VIRUS VEGETALES

Entre los agentes causantes de enfermedad en plantas, se considera a los virus los segundos en importancia, después de los hongos, como responsables de pérdidas económicas en los cultivos agrícolas.

La primera cita acerca de virus asociados a plantas data de 1886, y supuso el descubrimiento de una nueva forma de vida, cuando Mayer describió la enfermedad del mosaico del tabaco, que era transmitida mediante inoculación de extractos de plantas enfermas. Actualmente, se conocen unos 700 virus vegetales, la mayoría de los cuales tienen un genoma constituido por RNA de cadena sencilla y sentido positivo (77%), aunque también puede ser RNA de sentido negativo (13%), de doble cadena (4%), o bien DNA monocatenario (4%) o bicatenario (2%) (Zaitlin y Hull, 1987).

La partícula viral consta del ácido nucleico y de una cápsida, compuesta generalmente de una sola especie proteica. Algunos virus más complejos presentan además una envuelta lipoproteica externa a la cápsida.

En cuanto a tamaño y forma de las partículas virales, existe una gran variabilidad, que queda reflejada en la figura 3 (Matthews, 1991). Actualmente hay definidos 35 grupos de virus de plantas, establecidos por el ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), (Brown, 1989). Entre los productos de expresión de los genomas virales hay proteínas estructurales, como la proteína de la cápsida, y no estructurales, como proteasas, replicasas (RNA polimerasas RNA dependientes), helicasas, y proteínas implicadas en el movimiento y en la transmisión.

La primera limitación para un virus cuyo genoma ha de expresarse en un sistema de traducción eucariota, es la adaptación a

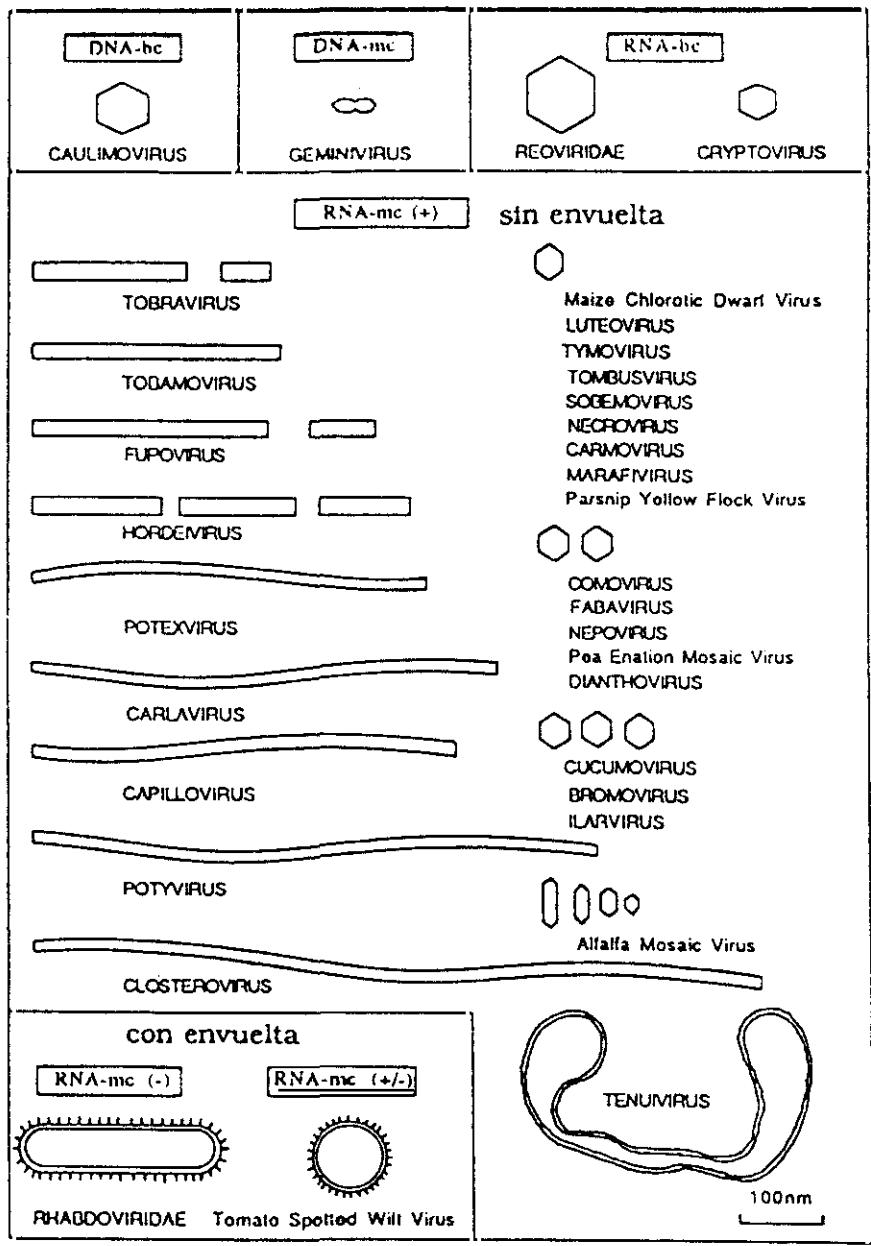


Figura 3. Características generales de los principales grupos de virus vegetales (Matthews, 1991).

la expresión de RNAs mensajeros monocistrónicos, lo que supondría para el virus la traducción de exclusivamente las fases de lectura abiertas ("open reading frames", ORFs) situadas en el extremo 5' del genoma. Los virus han adoptado distintas estrategias, esquematizadas en la figura 4, para asegurar la expresión de todos sus genes (Matthews, 1991):

1. Síntesis de RNAs subgenómicos, que permite la traducción de la ORF de su extremo 5'.

2. Genomas multipartitos. Se traduce el gen situado en el extremo 5' de cada segmento de RNA.

3. Poliproteínas. Un RNA codifica para más de una proteína, incluso para todos los productos genómicos a través de una única ORF, que es traducida y procesada posteriormente en puntos específicos por proteasas codificadas por el virus, para rendir los productos finales.

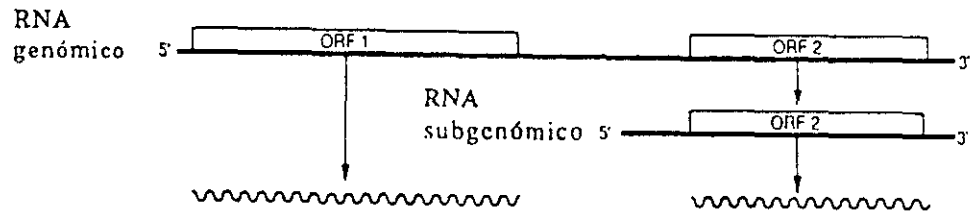
4. Codones de terminación del gen en el extremo 5' que en una determinada proporción permiten a los ribosomas continuar la traducción hasta el siguiente codón de terminación, rindiendo un segundo polipéptido de mayor tamaño.

5. Un cambio en la fase de lectura cerca del codón de terminación del gen en el extremo 5' permite la síntesis de una segunda proteína mayor, parcialmente solapada a la primera.

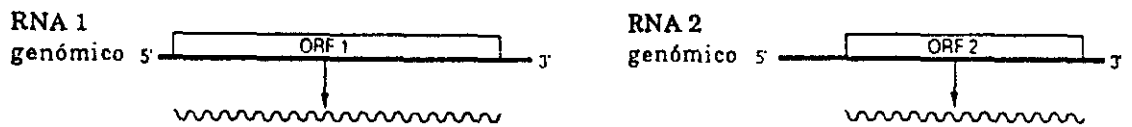
La interacción virus-planta comienza con la penetración del virus en la célula vegetal, a través de la barrera que supone la presencia de la pared celular, para lo cual el virus se sirve de otros organismos, generalmente insectos o nemátodos, que producen lesiones en los tejidos vegetales como consecuencia de sus hábitos alimenticios, y los introducen en las células. La transmisión por vectores invertebrados es, en general, un fenómeno complejo en el que juegan un papel el virus, el vector, la planta, y las condiciones ambientales. Algunos virus son transmitidos también a través del polen y/o de la semilla.

En cuanto a la reacción de la planta ante la infección viral, existen varios tipos de respuesta (Zaitlin y Hull, 1987), (Dawson y Hilf, 1992): i) la inmunidad total, en la que el virus no se replica en absoluto, ni siquiera en las células de entrada; ii) infección subliminal, en la que el virus se replica sólo en las células

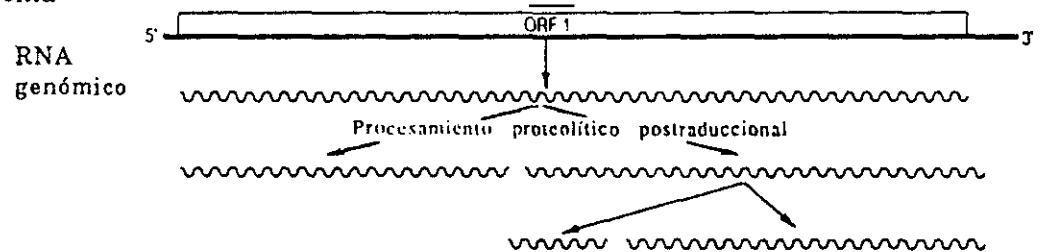
1. RNAs subgenómicos



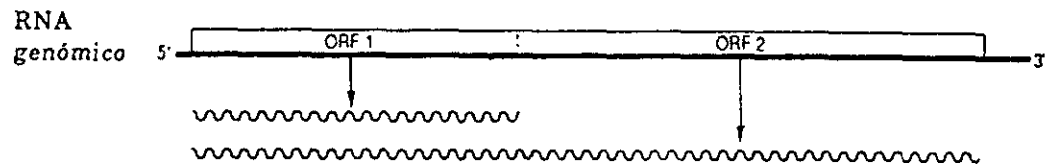
2. Genoma dividido en varios segmentos



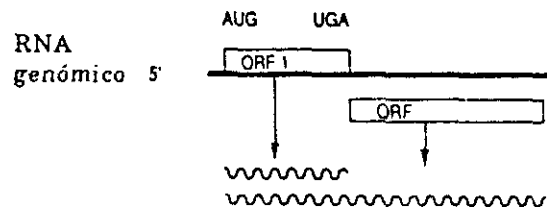
3. Poliproteína



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



5. Genes solapados en fases de lectura distintas.



**Figura 4.** Estrategias utilizadas por los virus vegetales para la síntesis de sus proteínas en un sistema de traducción eucariótico.

inicialmente infectadas, pero no se dispersa; iii) respuesta hipersensible, en la que la susceptibilidad limitada del huésped restringe al virus a unas pocas células próximas al punto de infección, dando lugar a lesiones localizadas, generalmente necróticas; esta respuesta puede manifestarse de forma sistémica, produciendo necrosis vascular; iv) susceptibilidad total, en la que el virus invade toda la planta; se habla entonces de infección sistémica.

La replicación del virus puede afectar a la planta huésped, aunque no parece ser la principal causa de la sintomatología viral. Se conoce que una de las principales consecuencias es un efecto de supresión de la síntesis de RNA ribosómico y de proteínas a nivel de cloroplastos (Hirai y Wildman, 1969), (Mohamed y Randles, 1972).

La sintomatología viral es muy variada, y ha sido revisada por Bos (1970) y Goodman *et al.*, (1986). Entre las alteraciones más comunes se encuentran las de color de hojas, tales como mosaico, clorosis, bandeo de venas, o las deformaciones foliares, enaciones (abullonamientos), así como una apariencia de mal estado general, enanismo y decaimiento.

Los nombres de los virus vegetales, generalmente, hacen referencia a los síntomas producidos en el huésped donde se describió por primera vez la enfermedad.

#### **4. ENFERMEDADES VIRALES EN JUDIA**

Las pérdidas en el cultivo de judía debidas a infecciones virales fueron descritas ya en 1917 por Stewart y Reddick, y se conocen al menos 34 virus distintos capaces de infectar judía de forma natural (Lana *et al.*, 1988).

Entre las enfermedades de origen viral más importantes a nivel mundial destacan tres: el mosaico común, el mosaico amarillo, y el mosaico dorado de la judía.

Las dos primeras son producidas por virus pertenecientes al grupo de los potyvirus: virus del mosaico común de la judía (BCMV) y virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV) respectivamente. La tercera es debida a la infección por un virus del grupo de los

geminivirus, el virus del mosaico dorado de la judía (BGMV), y está muy extendida en las zonas tropicales y subtropicales de América, África y Asia, no habiendo sido descrita en España hasta la actualidad.

#### **4.1. Potyvirus**

##### **4.1.1. Características generales**

Este grupo de virus vegetales debe su nombre al miembro tipo, "potato virus Y" (virus Y de la patata, PVY), y es el primero en importancia numérica, ya que comprende casi al 40% de los virus de plantas, y económica, pues las pérdidas de cosecha atribuidas a potyvirus son muy importantes en todo el mundo (Hollings y Brunt, 1981; Milne, 1988). Edwarson (1974) describió que eran capaces de infectar 1112 especies de 369 géneros entre 53 familias de plantas.

El grupo de los potyvirus fue uno de los seis grupos de virus vegetales inicialmente establecidos según la forma y dimensiones de las partículas (Brandes y Wetter, 1959), y contenía 16 virus interrelacionados serológicamente, con partículas filamentosas de unos 750 nm. Durante las tres décadas transcurridas desde el establecimiento del grupo, el número de miembros ha ido aumentando progresivamente, aunque el tamaño actual es incierto, ya que nuevos miembros son descritos frecuentemente; otros, tradicionalmente considerados como virus distintos son reconocidos como cepas del mismo virus, o a la inversa, y la clasificación de algunos virus está siendo muy debatida.

En 1991 el total de miembros ascendía a 157, entre posibles (72) y definitivos (73) (Francki *et al.*, 1991).

Sus miembros comparten características comunes: son virus de partícula única, alargada y flexuosa, de unos 680-900 nm con simetría helicoidal y cuyas partículas contienen aproximadamente un 5% de ácido nucleico y un 95% de proteína. El ácido nucleico, generalmente, es una única molécula de RNA de cadena sencilla y sentido positivo de unas 10 Kb. La cápsida viral está formada por más de 2000 subunidades de una única proteína de peso molecular  $32-36 \times 10^3$  Da.



Se transmiten en la naturaleza generalmente mediante áfidos de manera no persistente (Murant *et al.*, 1988), algunos de ellos por ácaros, mosca blanca u hongos (Barnett, 1993), y experimentalmente por inoculación mecánica de savia. Algunos potyvirus, especialmente los que infectan leguminosas, son transmitidos en proporción variable por semilla.

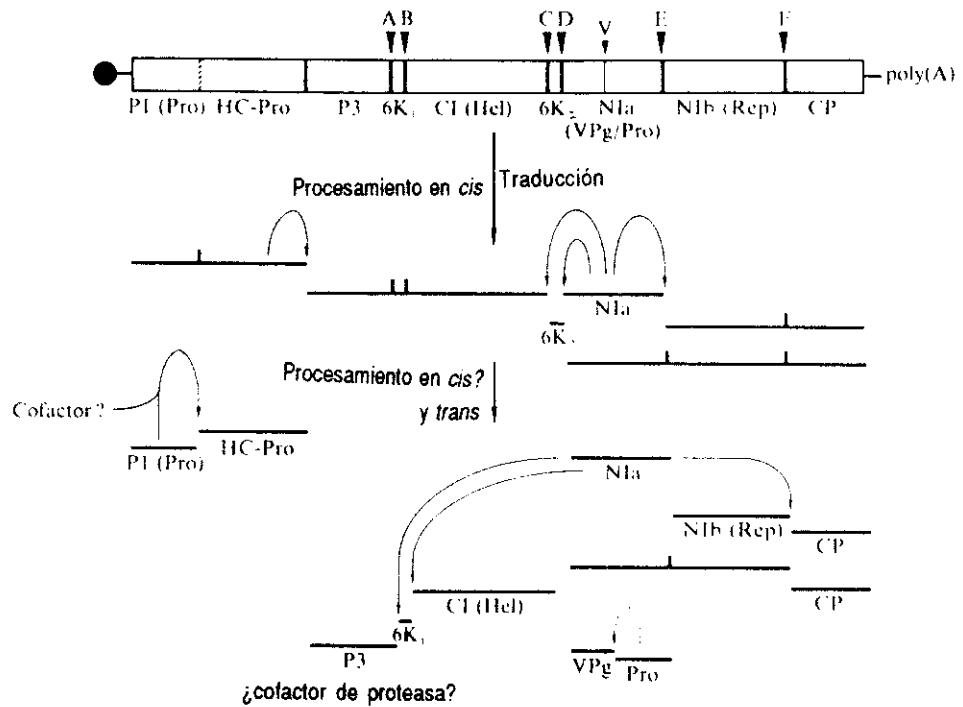
En su mayoría tienen una gama de huéspedes restringida; esta especificidad de huésped evita la competencia interespecífica entre potyvirus, y ha generado un elevado número de variantes especializadas, difíciles de distinguir bioquímica o serológicamente, pero que existen como patotipos reconocibles.

Una de las principales características del grupo es la formación de cuerpos de inclusión citoplásmicos ("pinwheels" o inclusiones cilíndricas) en las plantas infectadas. Estas formaciones aparecen a las 48 h posteriores a la infección y tienen un aspecto característico cuando se observan al microscopio óptico o electrónico, habiéndose establecido cuatro subdivisiones en relación al tipo de inclusiones inducidas (Christie y Edwardson, 1977; Edwardson y Christie, 1984; Edwardson, 1992). La infección por algunos potyvirus induce la formación de otros tipos de cuerpos de inclusión, como inclusiones nucleares y/o inclusiones citoplásmicas amorfas (Dougherty *et al.*, 1988).

#### **4.1.2. Organización y expresión del genoma**

El genoma potyviral es una única molécula de RNA de cadena sencilla de unos 10000 nucleótidos y sentido mensajero, cuyo extremo 5' está unido covalentemente a una proteína (VPg, "viral genome-linked protein") (Siaw *et al.*, 1985) y su extremo 3' está poliadenilado (Hari *et al.*, 1979). Contiene una única fase de lectura abierta que se traduce como una poliproteína (entre 340 y 368 KDa), que es procesada mediante la actividad de tres proteasas virales. La estructura genómica y la dinámica de procesamiento se muestran en la figura 5.

Los diferentes productos génicos obtenidos tras el procesamiento de la poliproteína potyviral son, desde el extremo N al C-terminal los siguientes: la proteína P1 (proteasa), el



**Figura 5.** Representación esquemática del procesamiento de la poliproteína potyviral (Riechmann *et al.*,1992). Pro: proteasa; Hel: helicasa; Rep: replicasa. En la parte superior se muestra un mapa cistrónico del RNA genómico.

<b>Producto génico</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Función</b>
P1	28-34 KDa	procesamiento proteolítico (proteasa) ¿movimiento célula-célula? (Domier <i>et al.</i> , 1987)
HC-Pro	50-56 KDa	procesamiento proteolítico (proteasa) transmisión por áfidos (Pirone, 1983) formación de cuerpos de inclusión amorfos.
P3	29-42 KDa	¿cofactor en el procesamiento proteolítico? (Vos <i>et al.</i> , 1988) ¿replicación? (Rodríguez Cerezo <i>et al.</i> , 1993)
6K <sub>1</sub>	6 KDa	¿replicación? (Laín <i>et al.</i> , 1989)
CI	68-70 KDa	RNA helicasa (Laín <i>et al.</i> , 1990) ¿replicación? formación de cuerpos de inclusión citoplásmicos
6K <sub>2</sub>	6 KDa	¿replicación? (Laín <i>et al.</i> , 1989)
NIa	49-52 KDa	procesamiento proteolítico (proteasa) ¿replicación? (VPg) (Riechmann <i>et al.</i> , 1992) formación de cuerpos de inclusión nucleares
NIb	54-58 KDa	¿replicación? (RNA polimerasa RNA-dependiente) formación de cuerpos de inclusión nucleares
CP (cápsida)	29-37 KDa	encapsidación del RNA transmisión por áfidos (Maiss <i>et al.</i> , 1989)

**Tabla 1.** Principales características de los productos génicos del RNA potyviral.

componente "helper"/proteasa (HC-Pro), la proteína P3, un péptido de 6KDa (6K<sub>1</sub>), la proteína del cuerpo de inclusión citoplásmico (CI, con actividad helicasa), un segundo péptido de 6KDa (6K<sub>2</sub>), la proteína de inclusión nuclear "a" (NIa, VPg y proteasa), la proteína de inclusión nuclear "b" (NIb, la presunta RNA polimerasa), y la proteína de la cápsida. Las funciones demostradas o hipotéticas de estos productos génicos se resume en la tabla 1.

El procesamiento co- y post-traducciona l de la poliproteína está mediado por dos proteasas codificadas por el virus, NIa (García *et al.*, 1989) y HC-Pro (Carrington *et al.* 1989), y, recientemente se ha identificado una tercera actividad proteolítica requerida para el procesamiento completo, que reside en la proteína P1 (Verchot *et al.*, 1991).

La proteasa NIa es responsable de los cortes en las dos terceras partes del extremo C-terminal de la poliproteína (sitios A-F y V), mientras que HC-Pro y P1 actúan sobre sus extremos C-terminales respectivamente (Riechmann *et al.*, 1992).

La maduración proteolítica mediada por NIa es un proceso regulado que implica cortes en *cis* (intramolecularmente, la proteasa se autoescinde por cortes en los sitios D y E (figura 5) en un suceso temprano, quizá cotraducciona l), y en *trans*, intermolecularmente, en sitios que son reconocidos y cortados con diferentes eficiencias. Los sitios A-F están definidos por secuencias de siete aminoácidos (Dougherty y Parks, 1989; García *et al.*, 1989). El sitio A es probablemente un punto de corte subóptimo, sólo parcialmente procesado. El sitio V difiere considerablemente en secuencia de los otros seis sitios de corte, y parece ser un sitio subóptimo de corte con implicación en el proceso de replicación viral (Dougherty y Parks, 1991).

#### **4.1.3. Taxonomía de potyvirus**

La identificación y clasificación de potyvirus ha sido tradicionalmente problemática e insatisfactoria, debido al gran tamaño del grupo, la enorme variación existente entre sus miembros y la falta de parámetros taxonómicos satisfactorios para distinguir entre virus distintos y cepas del mismo virus. En el

pasado, el uso de criterios clásicos como gama de huéspedes, sintomatología, protección cruzada, morfología de las inclusiones citoplásmicas y serología, permitió la distinción entre potyvirus. Actualmente, la imposibilidad de compatibilizar todos estos criterios ha llevado al grupo a una situación de caos taxonómico (Bos, 1992) en el que la aplicación de parámetros moleculares está abriendo nuevas y sólidas posibilidades de clasificación.

#### **4.1.3.1. Parámetros clásicos**

La sintomatología y la gama de huéspedes todavía hoy juegan un importante papel en la clasificación de potyvirus, siendo los criterios principales para el reconocimiento de cepas. Dado que la mayoría de los potyvirus tienen una gama de huéspedes restringida, pueden ser a menudo distinguidos en función de los síntomas característicos que producen en ciertos huéspedes. Sin embargo, el apoyo en estos criterios ha creado mucha confusión en la identificación de potyvirus que infectan leguminosas (Lana *et al.*, 1988; Tsuchizaki y Omura, 1987) y gramíneas (Shukla, *et al.*, 1989), ya que distintos virus producen síntomas similares en los mismos huéspedes dependiendo de las condiciones climáticas, y que distintos cultivares o líneas genéticas de la misma especie vegetal pueden tener distintas reacciones en cuanto a la susceptibilidad a la infección y síntomas.

En general, se acepta que entre cepas del mismo virus existe un fenómeno de protección cruzada, es decir, la infección por una cepa previene de la infección por otras cepas relacionadas, mientras que este fenómeno no se produce entre virus distintos. Este tipo de análisis tuvo bastante peso inicialmente para discernir entre cepas relacionadas o no, en éste y en otros grupos de virus, pero, en el caso de los potyvirus, posteriormente surgió el conflicto sobre el valor de estos datos cuando no existía correlación con otros parámetros taxonómicos. De hecho, existen fenómenos de protección cruzada entre virus distintos, como BCMV y BYMV (Quantz, 1961), y casos donde falla la protección cruzada entre cepas estrechamente relacionadas de otros virus (Wilkins y Catherall, 1974).

La morfología de los cuerpos de inclusión citoplásmicos ("pinwheels") puede ayudar en la identificación de algunos potyvirus. En base a ello, Edwardson (1974) dividió a los potyvirus en cuatro subgrupos: los virus del subgrupo I producen inclusiones tubulares y en roseta ("scrolls"); las del subgrupo II son agregados laminares; los virus del subgrupo III producen inclusiones en roseta y agregados laminares, y los del IV rosetas y agregados laminares curvos. Ya que en ocasiones distintas cepas del mismo virus caen en distintos subgrupos, y virus distintos producen exactamente el mismo tipo de inclusiones, este criterio ha sido también muy discutido (Francki *et al.*, 1985), aunque para algunos potyvirus está en perfecta correlación con su clasificación taxonómica.

Las relaciones serológicas entre potyvirus son extremadamente complejas, y a menudo no correlacionan con las propiedades biológicas. Los principales problemas asociados a la serología de potyvirus son tres: las reacciones cruzadas entre antisueros, relaciones inconsistentes e inesperadas entre distintos potyvirus, y la falta de reacciones cruzadas entre cepas (Shukla *et al.*, 1992). Estas dificultades parecen no estar asociadas a las técnicas serológicas, sino a la complejidad estructural de la proteína de la cápsida y de la partícula potyviral.

Shukla *et al.* (1988b) demostraron que la mayoría de los epítomos específicos de virus mapean en el extremo N-terminal de la proteína de la cápsida (30-69 aminoácidos), que, junto con el extremo C-terminal son las regiones de la proteína más expuestas en la superficie de las partículas virales, mientras que los epítomos específicos de grupo se encuentran en el núcleo central de la proteína ("core") (216-218 aminoácidos). Los epítomos más expuestos son, por tanto los más susceptibles a degradación en los procesos de purificación de virus, por lo que hay que extremar las precauciones en las preparaciones para inmunización.

La tecnología de los anticuerpos monoclonales ha supuesto un gran avance al delimitar la especificidad en las reacciones serológicas. Se han generado así anticuerpos que sólo reconocen los virus homólogos y sus cepas, y otros que reaccionan con dos, tres, cuatro, y hasta con la mayoría de los potyvirus (Jordan y Hammond, 1991).

Los datos serológicos requieren, por tanto, una interpretación minuciosa para no incurrir en errores al trazar relaciones entre potyvirus.

#### 4.1.3.2. Parámetros moleculares

La aplicación de nuevas técnicas de biología molecular ha proporcionado criterios más objetivos para la identificación y clasificación de potyvirus, frente a consideraciones meramente biológicas y fenotípicas. Entre ellas, destacan dos: los perfiles de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y la secuenciación de ácidos nucleicos.

El establecimiento y comparación de perfiles de los péptidos derivados de la digestión de la proteína de la cápsida con tripsina (u otra proteasa) ha sido de gran utilidad para asignar diferencias y parentescos entre un buen número de cepas y aislados de muchos potyvirus (Mckern *et al.*, 1989, 1990). El grado de similitud existente entre estos perfiles es una indicación fiable de su relación a nivel de secuencia (Shukla *et al.*, 1988a). Actualmente, está siendo aplicado a potyvirus que infectan leguminosas (McKern *et al.*, 1992).

La secuenciación de genomas potyvirales ha confirmado que sus miembros comparten una organización genómica común, y que las distancias genéticas existentes entre sus proteínas de la cápsida están de acuerdo con propiedades observadas previamente (protección cruzada, relaciones serológicas), pudiéndose diferenciar de forma bastante clara potyvirus y sus cepas.

Shukla y Ward (1988), comparando las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápsida de 17 cepas de 8 potyvirus distintos, observaron que la homología de secuencia se ajustaba a una distribución bimodal, en la que distintos potyvirus mostraban una homología de secuencia comprendida entre el 38-71%, con la mayor variabilidad en la longitud y secuencia de sus extremos N-terminales, y alta homología en la mitad C-terminal de la proteína, y cepas distintas del mismo potyvirus presentan un 90-99% de homología, con extremos N-terminales muy similares. Estos resultados, así como estudios posteriores (Ward y Shukla, 1991;

Ward *et al.*, 1992) mostraron que la homología de secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápsida puede servir como una base sólida para la identificación y clasificación de potyvirus.

La filogenia de la proteína de la cápsida y su aplicación en la taxonomía de los potyvirus ha sido recientemente analizada por Rybicki y Shukla (1992).

Otra zona del genoma potyviral que ha sido considerada para establecer relaciones taxonómicas es la región 3' no codificante (3' NCR); Frenkel *et al.*, (1989) comparando las secuencias de 13 cepas de 7 potyvirus observaron que existía una homología del 83-99% entre cepas y de un 39-53% entre virus distintos a nivel de sus 3' NCRs. Esta región ha sido utilizada como sonda en experimentos de hibridación para la diferenciación de cepas (Frenkel *et al.*, 1991), y se han establecido subgrupos por la presencia de secuencias consenso (Uyeda, 1992). Sin embargo, se ha considerado esta región de escasa utilidad para revelar parentescos entre potyvirus distintos (Frenkel *et al.*, 1991; Rybicki y Shukla, 1992).

## **5. EL VIRUS DEL MOSAICO COMUN DE LA JUDIA (BCMV)**

### **5.1. Propiedades biológicas**

El mosaico común de la judía fue descrito por primera vez como enfermedad viral por Stewart y Reddick (1917) en Estados Unidos, y al agente causal se le denominó virus del mosaico de la judía. El epíteto "común" fue añadido más tarde para diferenciarlo del virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV).

La distribución del virus abarca los cinco continentes, y es considerado como uno de los patógenos más comunes e importantes económicamente de judía, habiéndose citado como el segundo en importancia económica en cultivos hortícolas de climas templados, en Italia y Portugal, el tercero en Suecia y el cuarto en China (Tomlinson, 1987). Las pérdidas económicas se deben a la reducción del rendimiento (hasta de un 80%) y a la baja calidad del producto cosechado.

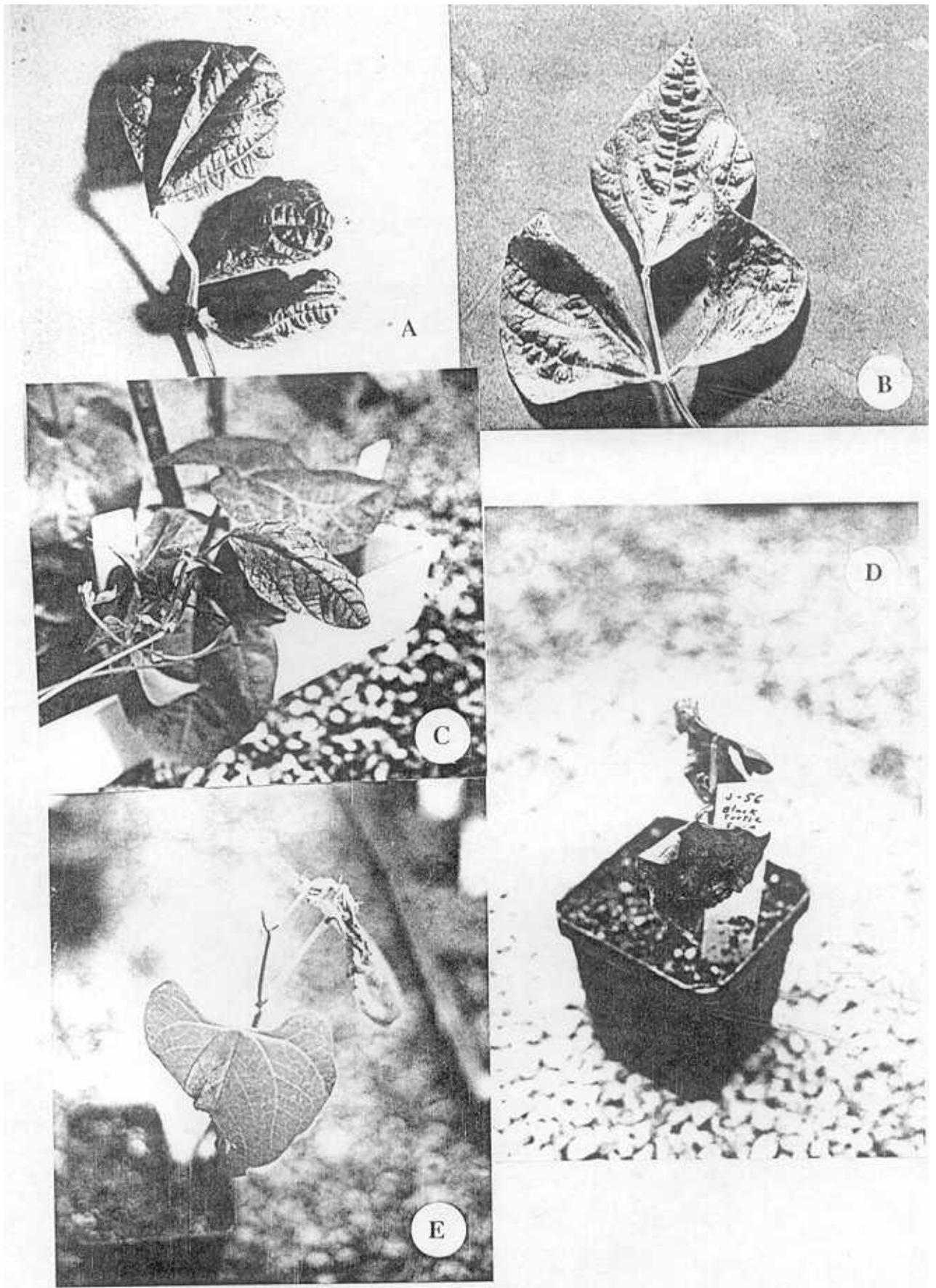


Su gama de huéspedes es limitada. En la naturaleza se encuentra principalmente en especies del género *Phaseolus*, sobre todo *P. vulgaris*, y, ocasionalmente, en *Lupinus luteus* y en leguminosas silvestres como *Rhynchosia minima*. Se mencionan también en la literatura otros huéspedes experimentales, incluyendo algunas no leguminosas (Morales y Bos, 1988).

La naturaleza y gravedad de los síntomas producidos dependen de la cepa del virus, del genotipo del huésped, del momento de infección, y de las condiciones ambientales. En judía puede producir principalmente dos tipos de síntomas (figura 6): el mosaico común, acompañado generalmente de deformación foliar, enrollamiento y abullonamiento de hojas y bandeo de venas, y la necrosis sistémica o "raíz negra", que es el resultado de una reacción de hipersensibilidad con la que los cultivares con el tipo de resistencia dominante (gen *I*), derivada inicialmente del cv Corbett Refugee (Zaumeier, 1969), responden a la infección por algunas cepas del virus. La necrosis sistémica se caracteriza por el deterioro rápido del sistema vascular de las hojas trifoliadas más jóvenes, extendiéndose luego al sistema vascular de toda la planta, produciendo generalmente la muerte cuando la necrosis alcanza el ápice.

Como miembro del grupo de los potyvirus, BCMV es transmitido por áfidos de forma no persistente. Entre las especies transmisoras del virus destacan *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae* y *Myzus persicae*. Se transmite además por polen, por inoculación mecánica, y, en un elevado porcentaje por semilla, lo que constituye una de sus principales características epidemiológicas, siendo probablemente un factor primordial en la infección inicial del cultivo y en su amplia distribución geográfica.

El porcentaje de transmisión por semilla varía en función del genotipo de judía y de la cepa del virus (Morales y Castaño, 1987), siendo en algunos casos superior al 83% (Morales y Bos, 1988). El porcentaje de semilla infectada en la mayoría de los cultivares analizados en el CIAT, Colombia (Morales, 1983) oscila entre el 15 y el 50%. Se ha descrito su permanencia en semilla durante períodos de almacenamiento de más de 30 años (Pierce y Hungerford, 1929).



**Figura 6.** Síntomas producidos por BCMV en judía. A y B: mosaico, deformación foliar y enaciones. C: bandeo de venas. D y E: necrosis sistémica.

La distribución del antígeno viral en la semilla es errática, no siendo clara la relación entre antígeno detectable en semilla e infección de la plántula resultante (Wang *et al.*, 1985). El antígeno es detectable en testa, cotiledones y embrión, pudiendo estar presente sólo en una de las tres partes, en dos o en todas. La infección exclusivamente del eje primario no ha sido observada hasta ahora en otro sistema virus-huésped (Klein *et al.*, 1992). La capacidad de transmisión al embrión parece residir en la habilidad del virus para invadir tejido embrionario, penetrando en los gametos en fases tempranas del desarrollo (Rubies-Autonell y Faccioli, 1985).

## 5.2. Fuentes de resistencia a BCMV

La resistencia a BCMV en *Phaseolus vulgaris* está determinada, por: i) el gen *I*, inespecífico de cepa, que determina la respuesta de necrosis sistémica a ciertas cepas del virus; ii) un sistema de resistencia recesivo, que ha sido calificado como uno de los más complejos elucidados para interacciones virus-planta (Fraser, 1986 y 1990), en el que la resistencia, medida como inhibición de síntomas de mosaico, depende de la cooperación de un gen, *bc-u*, con uno o más genes de un grupo denominado *bc-x*. Los genes *bc-x* se localizan en tres *loci*, denominados *bc-1*, *bc-2*, y *bc-3*, existiendo series alélicas en los *loci* *bc-1* y *bc-2*.

El gen *bc-u* es inespecífico de cepa y sólo es efectivo en combinación con uno de los genes *bc-x*, siendo necesario para la total expresión de estos últimos, excepto en los cultivares de genotipo *II*.

Según la teoría de Person (1959) de una relación huésped-parásito "gen a gen", se han definido cuatro genes de patogenicidad o virulencia, de modo que un gen de resistencia en el huésped confiere resistencia a todas las cepas que carecen del gen correspondiente de patogenicidad (tabla 2). Hasta ahora no se ha encontrado un gen de virulencia correspondiente a *bc-3*.

### 5.3. Clasificación de cepas de BCMV

La clasificación de cepas de BCMV se estableció en función de su patogenicidad sobre 11 grupos de cultivares de judía con distintos genotipos de resistencia (Drijfhout, 1978), y se han definido 10 cepas distintas, cuyas interacciones con los cultivares diferenciales se muestran en la tabla 2.

Según los síntomas producidos en dichos cultivares de judía, las cepas de BCMV se dividen en tres grupos: i) cepas que inducen mosaico y nunca necrosis: NL1/US1, NL7, US5 (Fla), US2 (NY15), y NL4/US6; ii) cepas que inducen necrosis sistémica en algunos cultivares de genotipo *II* dependiendo de la temperatura (cepas necróticas dependientes de temperatura): NL2 y NL6/US3/US4; iii) cepas que inducen necrosis sistémica a cualquier temperatura en los genotipos *II* susceptibles a la cepa en cuestión (cepas necróticas independientes de temperatura): NL3, NL5 y NL8. Algunos autores (Mink y Silbernagel, 1992) consideran al aislado tanzano TN-1 (Silbernagel *et al.*, 1986), que induce síntomas muy similares a NL5 en los cultivares indicadores, como una cepa más de este tercer grupo.

### 5.4. Serología

Las cepas de BCMV pueden dividirse en dos grupos serológicos distintos (Wang, 1983): el serotipo A, que incluye a las cepas NL3, NL5 y NL8, es decir, las cepas necróticas independientes de temperatura, y el serotipo B, que engloba al resto de las cepas (no necróticas y necróticas dependientes de temperatura). Los miembros de cada serotipo presentan estrechas relaciones serológicas entre ellos, y ninguna o muy distante con los miembros del otro serotipo.

Se han descrito relaciones serológicas entre BCMV y otros 17 potyvirus (Morales, 1988); muchas de estas relaciones son distantes y no correlacionan con las propiedades biológicas. Un parentesco serológico más relevante existe entre BCMV y otros potyvirus que infectan leguminosas, como BYMV, el virus del mosaico de la semilla del chícharo (BICMV), el virus del mosaico de la soja (SbMV), el

virus del mosaico del chícharo transmitido por áfidos (CABMV), el virus del mosaico del *Phaseolus radiatus* (AzMV), y el virus del estriado del cacahuete (PStV). El virus del mosaico de la sandía, estirpe 2 (WMV-2), pese a tener una gama de huéspedes muy distinta a BCMV, está serológicamente relacionado con muchas cepas del virus. Se han descrito también relaciones entre ciertos aislados potyvirales de leguminosas brasileños, BCMV y el virus del amaderamiento de la pasionaria (PWV) (Lovisolo y Kitajima, 1992).

Recientemente, Mink y Silbernagel (1992) han realizado un estudio serológico comparando 18 aislados de BCMV, 5 de BICMV, 4 de CABMV, uno de AzMV y uno de PStV mediante ELISA indirecto con una batería de 13 anticuerpos monoclonales distintos producidos contra BCMV, BICMV, CABMV y PStV. Sorprendentemente, 4 de los monoclonales detectaban todos los aislados virales, uno detectaba todos excepto los de CABMV, 3 resultaron específicos de los aislados de serotipo A de BCMV, y 4 detectaban todos los aislados de serotipo B más todos los de BICMV, AzMV y PStV, no siendo ninguno de los 4 monoclonales capaz de reaccionar individualmente de forma diferencial entre ellos.

Los aislados del serotipo A parecen tener, por tanto, una entidad serológica muy diferenciada, mientras que los del serotipo B presentan múltiples reacciones cruzadas con otros aislados potyvirales relacionados, siendo precisa su diferenciación mediante ensayos biológicos.

### **5.5. Situación taxonómica actual dentro del grupo de los potyvirus**

Estudios recientes han revelado una gran complejidad en las relaciones entre las cepas de BCMV y otros potyvirus de leguminosas. Vetten *et al.* (1992), comparando las secuencias aminoacídicas de las proteínas de la cápsida de dos aislados de las cepas NL4 y NL8, de distinto serotipo de BCMV, encontraron una homología del 78%, y de un 62% a nivel de nucleótido entre sus 3' NCRs. Estos valores, intermedios entre los propuestos para la clasificación como cepas o como virus distintos, fueron suficientes

para proponer la consideración de los dos serotipos como dos virus distintos.

Dijkstra y Khan (1992), comparando 3 cepas de BCMV (NL1, NY15 y NL3), 4 de BICMV y un aislado de CABMV en base a su gama de huéspedes, propiedades antigénicas y perfiles de HPLC observaron una semejanza importante entre las cepas de serotipo B de BCMV y 3 de BICMV, mientras que NL3, una cepa de BICMV y el aislado de CABMV mostraban una entidad propia, pudiendo ser considerados como tres virus diferentes. Sin embargo, ya que comparten propiedades biológicas, serológicas y físico-químicas comunes, propusieron la creación de un subgrupo de BCMV incluyéndolos a todos.

Por otro lado, McKern *et al.* (1992) compararon los perfiles de HPLC de las digestiones de las proteínas de la cápsida de las cepas NL3 y NY15 de BCMV con los de dos cepas de BICMV y una de PStV. Sus resultados sugieren que BCMV NL3 y NY15 son distintos potyvirus, y no cepas del mismo virus, y que NY15 es una cepa del mismo potyvirus que incluye BICMV, PStV, AzMV y tres aislados potyvirales de soja (PM, PN, 74).

La posición taxonómica de BCMV está, por tanto, actualmente en discusión, y la aplicación de parámetros moleculares para el establecimiento de parentescos está aportando nuevos datos que revelan relaciones que no eran claras usando exclusivamente criterios biológicos y serológicos; por el contrario, determinados agrupamientos clásicos de cepas parecen guardar escasa relación a nivel molecular.

## **6. RESISTENCIA A VIRUS EN PLANTAS**

La manera clásica de producir plantas resistentes a patógenos ha sido mediante la introducción de genes de resistencia naturales en los cultivos mediante programas de mejora, que conllevan un largo proceso de cruzamientos y selección de las líneas resultantes.

En los últimos diez años el creciente desarrollo de la Biotecnología Vegetal ha brindado la posibilidad de transformar plantas genéticamente de manera estable. El tema de plantas

transgénicas resistentes a virus ha sido recientemente revisado (Ponz, 1993; Wilson, 1993).

Uno de los métodos para conseguir protección frente a virus es la resistencia mediada por la proteína de la cápsida, debido a la expresión de dicho gen en plantas transgénicas. Para un número creciente de virus vegetales de importancia económica, la acumulación de la proteína de la cápsida en plantas transgénicas confiere resistencia a la infección y/o al desarrollo de enfermedad por el virus del que deriva el gen y virus relacionados (Beachy *et al.*, 1990; Nejidat *et al.*, 1990). En el caso de los potyvirus, este tipo de resistencia también ha sido desarrollada, dando lugar al concepto de "protección de amplio espectro" (Stark y Beachy, 1989; Lawson *et al.*, 1990; Ling *et al.*, 1991). Se ha conseguido incluso protección frente a potyvirus en plantas transformadas con cápsidas de virus no patógenos para ellas (Stark y Beachy, 1989).

Recientemente, se ha descrito que la protección frente a PVYN en plantas transgénicas transformadas con el cistron de la proteína de la cápsida viral está mediada por el RNA de sentido positivo más que por la acumulación de la proteína (Van der Vlugt *et al.*, 1992).

En otros sistemas se ha conseguido generar también resistencia mediante la expresión de genes virales no estructurales, como es el caso de componentes de la replicasa viral. Algunos ejemplos de este tipo de estrategia son la expresión de la secuencia codificante para la presunta proteína de 54KDa de TMV, produciéndose una reducción drástica de la replicación viral en los tabacos transgénicos inoculados (Golemboski *et al.*, 1990; Carr y Zaitlin, 1991) y la resistencia frente al virus X de la patata (PVX) expresando la proteína de 160 KDa o versiones truncadas de la misma (Brawn y Hemenway, 1992).

La resistencia a virus mediada por RNA de sentido negativo del gen de la proteína de la cápsida ha sido descrita para el virus X de la patata (PVX) (Hemenway *et al.*, 1988) y el virus del mosaico del pepino (CMV) (Cuozzo *et al.*, 1988), pero sólo se observó protección a bajos niveles de inóculo viral. En el caso del virus del enrollado de la patata (PLRV) (Kawchuk *et al.*, 1991) se vió que construcciones de sentido positivo y negativo del gen de la proteína de la cápsida eran igualmente efectivas mediando la resistencia al

virus. Los mejores resultados con este tipo de estrategia han sido obtenidos para el grupo de los geminivirus: la expresión en antisentido de la proteína All (imprescindible para la replicación) del virus del mosaico dorado del tomate (TGMV) produce un alto nivel de resistencia (Day *et al.*, 1991).

### 6.1. Control de BCMV

Entre los métodos de control de BCMV, además del ejercido sobre los áfidos transmisores, están el uso semilla libre de virus y de cultivares resistentes.

Mediante proyectos de mejora es posible conseguir combinaciones de genes efectivas. El gen *bc-u* más alguno de los genes *bc-1*, *bc-1<sup>2</sup>*, *bc-2* o *bc-2<sup>2</sup>* confiere resistencia recesiva específica de cepa, pero, como *bc-1* y *bc-1<sup>2</sup>* o *bc-2* y *bc-2<sup>2</sup>* son pares alélicos, no es posible con estos genes conseguir resistencia a todas las cepas del virus en un único genotipo de planta.

La combinación de *bc-u* y *bc-3* confiere resistencia recesiva a todas las cepas conocidas de BCMV. Asimismo, el gen dominante *I* inhibe a todas las cepas del virus, pero puede ser vencido por ciertas cepas inductoras de necrosis a menos que la planta esté protegida con los genes *bc-u* y *bc-2<sup>2</sup>*, en cuyo caso sólo se producen lesiones locales necróticas restringidas. Otro problema con el gen *I* es su efecto de oscurecimiento en las semillas rojas y amarillas, que afecta negativamente a la calidad del grano (Temple y Morales, 1986). Estas últimas combinaciones pueden perder su efectividad si en el futuro surgen mutantes capaces de vencer a *bc-3* o *bc-2<sup>2</sup>*. La combinación de los genes *bc-u*, *bc-2<sup>2</sup>*, *bc-3* e *I* confiere una doble resistencia a todas las cepas, posiblemente estable durante largos períodos de tiempo, aunque supondría un trabajo largo y arduo de mejora.

La generación de resistencia a BCMV mediante judías transgénicas que expresaran secuencias virales es una posibilidad cada vez más cercana, gracias al creciente avance en la caracterización molecular de aislados, clonación y secuenciación de genes de la proteína de la cápsida, y de la mejora en la eficiencia de los sistemas de transformación y regeneración disponibles.



## *JUSTIFICACION Y OBJETIVOS*

## II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

El virus del mosaico común de la judía ha demostrado ser uno de los patógenos más universales y destructivos de judía, y a su vez, un gran desconocido a nivel molecular, en un marco de confusas relaciones entre sus aislados, cepas y otros potyvirus relacionados.

En estudios preliminares de detección de virus de leguminosas en España, BCMV fue uno de los virus más frecuentemente encontrados infectando judía. Dada la falta de información existente sobre la incidencia del virus en nuestro país, así como de las características tanto biológicas como moleculares de los aislados presentes, se plantearon los siguientes objetivos para este trabajo:

1. Estudio epidemiológico de BCMV en España.
2. Caracterización biológica y serológica de las cepas presentes.
3. Caracterización molecular de un aislado representativo de cada serotipo mediante:
  - 3.1. Clonación y secuenciación de la región 3' del RNA viral.
  - 3.2. Análisis filogenético.

## *MATERIALES Y METODOS*

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **1. MATERIAL VEGETAL**

##### **1.1. Recogida de muestras**

Durante los años 1989, 90, 91, 92 y 93 se recogieron muestras de hojas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes variedades, cultivares y sistemas de cultivo en zonas productoras españolas.

La toma de muestras se realizó de forma individual, eligiendo plantas que presentaban síntomas de mosaico, enaciones o bandeamiento de venas y una muestra asintomática, usando bolsas de plástico y guantes para evitar contaminaciones, y transportándolas en una nevera portátil con hielo hasta su análisis.

##### **1.2. Conservación de aislados**

Los aislados virales se conservaron desecados, en cajas de plástico con gel de sílice a 4°C.

La desecación del material infectado se realizó troceándolo en finas tiras (aproximadamente 2 mm) que eran introducidas en bolsas de papel de filtro, y éstas a su vez en gel de sílice, manteniéndolas en ambiente seco y fresco; el gel hidratado era reemplazado por otro nuevo.

##### **1.3. Inoculación del virus**

La transmisión del virus a partir de muestras infectadas se realizó mediante inoculación mecánica de las hojas primarias de plantas de judía sanas, previamente analizadas por ELISA, para descartar infecciones procedentes de semilla, usando como abrasivo carborundo de 600 mesh. A continuación, se frotaron las hojas con un homogeneizado de planta infectada (hoja fresca o desecada) en tampón fosfato 0,01 M, pH 7,5 a una dilución 1/10 (p/v). Las plantas fueron mantenidas en invernadero con luz natural entre 25-35°C, o bien en cámara de cultivo con una intensidad lumínica

de 25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

#### **1.4. Cultivares de *Phaseolus vulgaris* utilizados**

##### **1.4.1. Transmisión y purificación**

La transmisión de los aislados se realizó sobre el cultivar Bountiful, homocigótico recesivo para el gen *I* de necrosis, y susceptible a la infección por todas las cepas descritas del virus. Las semillas libres de virus de este cultivar fueron cedidas por el Dr. F. Morales (CIAT, Colombia).

Como fuente de material infectado para la purificación del virus, se utilizaron plantas inoculadas del cv Garrafal Oro en el caso del aislado caracterizado del serogrupo B, y del cv Bountiful en el caso del aislado del serogrupo A.

##### **1.4.2. Caracterización de cepas de BCMV**

La caracterización de cepas de BCMV presentes en los aislados de campo españoles se realizó inoculando todos los cultivares indicadores propuestos por Drijfhout (1978) (tabla 2).

## **2. MICROSCOPIA ELECTRONICA**

### **2.1. Tinción negativa**

La observación de las partículas virales presentes en los extractos de plantas infectadas y en las suspensiones procedentes de las purificaciones se realizó por microscopía electrónica mediante tinción negativa (Hitchborn y Hills, 1965), usando ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% y pH 7,0 como agente de tinción.

Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico Jeol 100-B.

## **2.2. Secciones ultrafinas**

El tejido vegetal infectado fue embebido en Durcupan ACM (Fluka) (Rubio-Huertos *et al.*, 1968), sometiéndolo previamente a fijación con glutaraldehído al 5%, postfijación con tetraóxido de osmio al 2%, y deshidratación en soluciones de acetona del 30 al 100%. Tras el pase por acetona al 70%, se hizo otro en una solución al 2% de acetato de uranilo en acetona del 70% para dar un mayor contraste. Se realizaron dos pases por acetona saturada en  $\text{CuSO}_4$  después de la acetona al 100%. Con un ultramicrotomo LKB 8800 se realizaron secciones de 40-60 nm de grosor, y se tiñeron con citrato de plomo.

## **3. ENSAYOS INMUNOLOGICOS**

### **3.1. Anticuerpos utilizados**

En los ensayos inmunológicos de detección de BCMV se emplearon los siguientes anticuerpos:

#### **3.1.1. Monoclonales**

- Anti-PTY (Agdia Inc.). Reacciona frente a un epítipo común a todos los potyvirus.

- bc-197 (Wang *et al.*, 1984). Cedido por el Dr. Mink (Washington, USA). Detecta todas las cepas conocidas de BCMV.

- I-2. Cedido por el Dr. Mink (Washington, USA). Reacciona específicamente con aislados del serogrupo A de BCMV.

- 15E5 (Vetten *et al.*, 1992). Donado por el Dr. Vetten (Braunschweig, Alemania). Líquido ascítico conteniendo anticuerpos específicos frente a los aislados de BCMV de serogrupo B.

- I-3 (Wang, 1985). Donado por el Dr. Vetten (Braunschweig, Alemania). Reacciona específicamente frente a los aislados del serogrupo A.

### **3.1.2. Policlonales**

- Anti-BYMV (ATCC, PV368). Reconoce los aislados del virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV).

- Anti-BCMV NY15 (Vetten, 1992). Donado por el Dr. Vetten (Braunschweig, Alemania). Antisuero obtenido de animales inmunizados con la cepa NY15 de BCMV, y que presenta reactividad específica frente al serogrupo B.

- Anti-BCMV NL5 (Vetten, 1992). Donado por el Dr. Vetten (Braunschweig, Alemania). Antisuero obtenido de animales inmunizados con la cepa NL5 de BCMV, y que presenta reactividad específica frente al serogrupo A.

### **3.2. ELISA**

El protocolo seguido para el análisis de las muestras fue el de ELISA indirecto (Koenig, 1981). El volumen de trabajo utilizado en todos los pasos fue de 100  $\mu$ l. Los anticuerpos se usaron a una concentración de 0,1  $\mu$ g/ml. Entre las distintas etapas de incubación, se realizaron tres lavados de tres min cada uno con PBS-Tween (tampón fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 3 mM, NaN<sub>3</sub> 3 mM, Tween-20 al 0,05%).

#### **3.2.1. Extractos vegetales**

Como tampón de extracción para las muestras de hoja, se usó un tampón carbonato 0,05 M, 1% de PVP-40, pH 9,6, a una dilución final de 1/10 (p/v).

Las muestras de semilla se trituraron en seco en mortero, y la harina resultante se resuspendió en tampón carbonato 0,05 M, 2% de PVP-40, 0,2% de seroalbúmina en una relación 1/50 (p/v).

### **3.2.2. Conjugados**

Con los anticuerpos monoclonales, el conjugado utilizado fue un anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co.). La dilución de trabajo fue 1/2000.

En los ensayos con antisueros policlonales se empleó proteína-A conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co.), (Yolken y Leister, 1981). La dilución empleada fue 1/2000.

### **3.2.3. Sustrato**

Como sustrato de la fosfatasa alcalina se utilizó el p-nitrofenil fosfato (Sigma Chemical Co.) a la concentración de 1 mg/ml. Las lecturas se realizaron a los 30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h tras la adición del sustrato en un espectrofotómetro de placas (Titertek Multiskan plus MK II) a 405 nm. Las reacciones fueron consideradas positivas cuando las lecturas superaron el doble del valor de los controles sanos.

### **3.3. Inmunomicroscopía electrónica**

Se siguió el método descrito para ISEM ("immunosorbent electron microscopy") por Roberts, (1986). El agente de tinción fue ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% y pH 7,0. La dilución de anticuerpo empleada para el ensayo fue de 1/1000.

## **4. PURIFICACION DE BCMV Y EXTRACCION DEL RNA VIRAL**

### **4.1. Purificación del virus**

El virus fue purificado a partir de 100-200 g de hojas de judía sistémicamente infectadas, procedentes de plantas inoculadas cuatro semanas antes y que reaccionaron positivamente en ELISA con anticuerpos específicos a las tres semanas después de la inoculación.



El protocolo de purificación seguido fue el descrito por Moghal y Francki (1976) para BCMV y SCMV (virus del mosaico de la caña de azúcar), que consiste en una extracción inicial con dos volúmenes (p/v) de tampón borato 0,5 M, pH 8,0 y 0,15% de ácido tioglicólico, más 0,5 v de tetracloruro de carbono y 0,5 v de cloroformo. Se clarifica por centrifugación a 8000 g durante 10 min, se añade Triton X-100 hasta una concentración final del 5%, y después se agita durante 30 min a 4°C. Tras otra clarificación, el virus se aísla mediante tres ciclos de centrifugación diferencial seguidos de centrifugación en un gradiente de sacarosa del 10-40%. La zona del gradiente correspondiente a la de bandeo del virus se determinó midiendo  $A_{254\text{ nm}}$ . El virus se recuperó dializando las fracciones seleccionadas durante una noche a 4°C frente a tampón borato 0,05 M pH 8,0, y centrifugando a 78000 g durante 90 min. La concentración de la suspensión viral se determinó por espectrofotometría usando un coeficiente de extinción  $E_{260\text{ nm}}^{0.1\%}=2,4$ , y teniendo en cuenta que la relación  $A_{260/280}$  de la suspensión viral debe aproximarse a 1,25 (Bravo, 1984).

#### **4.2. Extracción del RNA viral**

El RNA viral se purificó a partir de una suspensión de virus mediante extracción con fenol/cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989), previa incubación durante 1 h a 37°C con SDS al 1%.

Los ácidos nucleicos contenidos en la fase acuosa se precipitaron con 2,5 v de etanol y 0,1 v de acetato sódico 3 M, pH 5,2. El precipitado se resuspendió en TE (Tris-HCl 10 mM , EDTA 1 mM) pH 8,0.

El RNA extraído se analizó por electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa al 1,3% (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **5. SINTESIS DE c-DNA VIRAL**

La síntesis de DNA complementario al RNA viral se realizó usando el kit "c-DNA Synthesis Plus" (Amersham), partiendo aproximadamente de 1 µg de RNA, y utilizando como cebador para

la transcripción inversa oligo (dT), a fin de elongar a partir del extremo 3' del RNA viral.

Para la síntesis de la segunda cadena, y siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizaron las actividades combinadas de la RNasa H y la DNA polimerasa I. La RNasa H genera fragmentos de RNA en el híbrido RNA-DNA, que son usados como cebadores por la DNA polimerasa I para elongar la segunda cadena de c-DNA.

Finalmente, un tratamiento con la T4 DNA polimerasa, mediante su actividad 3'-5' exonucleasa asegura la existencia de extremos romos en las moléculas de c-DNA sintetizadas. Se realizó una extracción con fenol/cloroformo y una precipitación con acetato amónico 4 M y etanol, resuspendiéndose el precipitado final en 10  $\mu$ l de TE.

Para medir la eficiencia en la síntesis, tanto de la primera como de la segunda cadena, se añadieron en ambas reacciones 20  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Amersham, actividad específica 3000 Ci/mmol). Se analizó el c-DNA resultante mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, que se secó en un secador de geles (Slab dryer 483 Bio Rad), y expuso con una película autorradiográfica (Kodak X-OMAT AR) con pantalla intensificadora a  $-70^{\circ}$ C.

## 6. CLONACION Y MANIPULACION DE DNA

### 6.1. Vectores

El plásmido utilizado como vector fue Bluescript KS (Stratagene). Este vector permite la selección de los clones recombinantes por ausencia de color azul en las colonias derivadas de células transformadas al añadir IPTG (isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido) como inductor, y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido) como sustrato cromogénico (Sambrook *et al.*, 1989). El plásmido es portador, además, del gen de resistencia a ampicilina.

Para la clonación del c-DNA se utilizó el vector digerido con la endonucleasa de restricción *Sma* I, que produce extremos romos.

En las subclonaciones realizadas se empleó el mismo vector digerido con *Eco* RI y con *Cla* I, generando ambos extremos 5' protuberantes. Las condiciones de reacción en todas las digestiones fueron las recomendadas por los proveedores (Boehringer y Amersham). Tras la digestión con la enzima correspondiente, se realizó una extracción con fenol/cloroformo y una precipitación con etanol (Sambrook *et al.*, 1989).

## 6.2. Tratamiento con CIP

Con el fin de evitar la recircularización del plásmido en las reacciones de ligación, se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina de ternera (CIP) (Boehringer). Para los vectores con extremos 5' protuberantes (50 pmoles), el plásmido linearizado y precipitado se resuspendió en 180  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y se añadieron 2 u de CIP, incubando a 30 min a 37°C. La inactivación de la enzima se realizó incubando a 65°C durante 1 h en presencia de 5 mM EDTA, pH 8,0.

Para el vector digerido con *Sma* I (50 pmoles de DNA con extremos romos), el vector linearizado, y resuspendido en 180  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 se incubó durante 10 min a 65°C, pasándolo después a hielo y añadiendo 1,5 u de CIP; a continuación, se incubó 15 min a 37°C y 15 min a 56°C. Se repitió el tratamiento con CIP añadiendo 1,5 u e incubando de igual forma. Se inactivó la enzima incubando 1 h a 65°C en presencia de 5 mM EDTA pH 8,0.

Tras la desfosforilación del DNA plasmídico linearizado se realizó una extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol.

## 6.3. Reacciones de ligación

Se realizaron a 15°C durante una noche, en un volumen final de 10  $\mu$ l, con 200 ng de vector linearizado desfosforilado, en una proporción molar vector/inserto aproximada de 10:1 para extremos romos, con 5 u de T4 DNA ligasa (Boehringer), y de 1:1 para cohesivos con 1 u de ligasa.

#### **6.4. Preparación de células competentes de *E. coli***

La cepa utilizada fue DH5 $\alpha$ , y el protocolo seguido fue el de Hanahan (1983) con algunas modificaciones.

Se creció un preinóculo en 10-15 ml de medio  $\phi$  broth (bactotripton a al 2%, extracto de levadura al 0,5%, KCl 10 mM y MgSO<sub>4</sub> al 0,4%, pH 7,6) a 37°C con agitación hasta alcanzar una A<sub>550</sub> de 0,3. Con 5 ml del preinóculo se inocularon 100 ml de  $\phi$  broth, que se incubó a 37°C con agitación orbital hasta alcanzar una A<sub>550</sub> de 0,48. Las células se enfriaron rápidamente en hielo y se centrifugaron a 6000 g a 4°C, resuspendiéndolas seguidamente en 30 ml de TFB1 (RbCl 100 mM, MnCl 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM y 15% de glicerol) y volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. El precipitado se resuspendió finalmente en 4 ml de TFB2 (RbCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, MOPS pH 7,0 10 mM y 15% de glicerol), y se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ l, que se conservaron a -80°C hasta su utilización.

#### **6.5. Transformación y selección de clones recombinantes**

A una alícuota de 200  $\mu$ l de células competentes, descongelada y mantenida en hielo 10 min se añadieron 5  $\mu$ l de mezcla de ligación y se dejó en hielo durante 20 min. A continuación, se realizó un choque térmico de 37°C durante 3 min, pasando de nuevo a hielo. A fin de reactivar el metabolismo celular, las células se incubaron durante 1 h a 37°C en agitación en 800  $\mu$ l de medio  $\phi$  broth. Seguidamente se procedió a extender las células sobre medio LB sólido (bactotripton a al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%, pH 7,0 y 1,5% de agar) suplementado con ampicilina (50  $\mu$ g/ml).

#### **6.6. Preparación de DNA plasmídico**

Las preparaciones de DNA plasmídico se realizaron generalmente a pequeña escala, siguiendo el protocolo de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) a partir de cultivos de 3 ml en LB con ampicilina (50  $\mu$ g/ml) durante una noche. El DNA obtenido se utilizó, bien directamente en digestiones con endonucleasas de

restricción, o bien para secuenciación, en cuyo caso se sometía a un tratamiento con RNasa A (Sambrook *et al.*, 1989) y posterior extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol.

Las preparaciones de plásmido a gran escala se hicieron a partir de 250 ml de cultivo en LB (bactotriptono al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%, pH 7,0) con ampicilina (50 µg/ml) por el protocolo de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), y la preparación de DNA obtenida se sometió a centrifugación en gradiente de CsCl-BrEt, extrayendo el BrEt con 2-propanol saturado en agua saturada con NaCl (Sambrook *et al.*, 1989). Finalmente se precipitó con etanol.

## **7. HIBRIDACIONES DE ACIDOS NUCLEICOS**

### **7.1. Transferencia a membranas**

#### **7.1.1. Transferencia tipo "Southern"**

Los ácidos nucleicos a transferir se sometieron a electroforesis en geles de agarosa. Se realizó una transferencia alcalina con NaOH 0,4 M durante 1 h según Sambrook *et al.* (1989) a membranas de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham). Las membranas se guardaron en bolsas de plástico a 4°C tras enjuagarlas en SSC 2 X (NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M).

#### **7.1.2. Transferencia a partir de colonias**

Las membranas de nylon (Hybond N, Amersham) se dejaron caer sobre la placa con las colonias a analizar. Tras 1 min, se trataron con una solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) durante 7 min, y a continuación, se les dió dos pases de 3 min cada uno en una solución de neutralización (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,2, EDTA 0,001 M). Se lavaron las membranas en SSC 2 X 1 min y se escurrieron en papel 3MM, horneándose a continuación durante 2 h a 80°C.

### **7.1.3. "Dot blot" de extractos vegetales**

Se realizó básicamente según Frenkel *et al.*, (1992) Las muestras, trituradas en 10 X SSC:formaldehído (1:1), en una proporción 1:5 (p/v) se fenolizaron con un volumen de fenol:cloroformo (1:1), depositándose 10 µl del sobrenadante obtenido (y sus posteriores diluciones) sobre una membrana de nitrocelulosa (Hybond C, Amersham) previamente empapada en agua destilada y saturada en 20 X SSC. Se dejó secar brevemente y se horneó la membrana a 80°C durante 2 h.

## **7.2. Marcaje de las sondas**

### **7.2.1. Marcaje con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP**

Los fragmentos de DNA se marcaron mediante síntesis iniciada por oligonucleótidos al azar en presencia del radioisótopo (kit Megaprime DNA labelling system, Amersham). La sonda se purificó eliminando los nucleótidos no incorporados mediante cromatografía en columna de Sephadex G-50. La incorporación en las sondas se determinó haciendo lecturas en un contador de centelleo.

### **7.2.2. Marcaje con digoxigenina**

Se realizó mediante el kit "DNA labelling and detection nonradioactive" (Boehringer), con hexanucleótidos al azar en presencia de dNTPs y dig-dUTP. La sonda se precipitó con LiCl 4 M y etanol.

## **7.3. Condiciones de hibridación**

### **7.3.1. Hibridación con sondas radiactivas**

Las membranas se prehibridaron a 65°C durante 2 h en 50 µl/cm<sup>2</sup> de membrana en una solución SSC 5 X, solución de Denhardt 5 X (ficoll 0,1%, PVP-40 0,1%, BSA 0,1%), SDS al 0,5%, y 20 µg/ml de

DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado (Sambrook *et al.*, 1989). A continuación se añadió la sonda marcada desnaturalizada por calor a la solución de prehibridación, y se hibridó durante toda la noche a 65°C. Tras la hibridación, se realizaron los siguientes lavados: dos veces en SSC 2 X, SDS al 0,1% durante 15 min a temperatura ambiente, y dos veces en SSC 0,5 X, SDS al 0,1% durante 15 min a 65°C. Las membranas se expusieron a -70°C con pantalla intensificadora con películas autorradiográficas.

### **7.3.2. Hibridación con sondas marcadas con digoxigenina**

Se prehibridaron las membranas en 200 µl/cm<sup>2</sup> de solución SSC 5 X con agente de bloqueo al 0,5%, N-laurilsarcosina al 0,1% y SDS al 0,02% durante 2 h a 65°C. A continuación, se añadió la sonda marcada desnaturalizada por calor a la solución de prehibridación, y se realizó la hibridación y los posteriores lavados en las mismas condiciones que en el apartado anterior. Se detectó la digoxigenina mediante anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina que, en presencia de NBT (sal azul de nitrotetrazolio) y X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato de toluidinio) producen una reacción colorimétrica.

## **8. SECUENCIACION**

### **8.1. Reacciones y estrategia**

Las reacciones de secuenciación se realizaron sobre moldes de DNA de doble cadena según el método de terminadores de cadena (Sanger *et al.*, 1977), siguiendo el procedimiento descrito por Zhang (1988), con el kit de secuenciación versión 2.0 (USB), y usando como isótopo radiactivo [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP. Las reacciones se efectuaron en las condiciones aconsejadas por el fabricante para 3 µg de DNA molde.

Para completar la secuencia de los clones de c-DNA se recurrió a una estrategia de deleciones solapantes, que se llevó a cabo con el kit "double-stranded nested deletion" (Pharmacia). Por este método se generan deleciones unidireccionales en doble banda mediante la

acción de la exonucleasa III sobre extremos romos y 5' protuberantes. La digestión con una endonucleasa de restricción que genere extremos 3' protuberantes, cercana al gen de interés, produce un extremo resistente a la acción de la exo III. Las deleciones solapantes se consiguen tomando alícuotas a distintos intervalos de tiempo durante la digestión con la exonucleasa. Las regiones de cadena sencilla producidas por la enzima se eliminan usando la nucleasa S1. La religación del DNA se efectúa mediante la actividad de la T4 DNA ligasa.

Para cubrir la secuencia de algunas regiones fue preciso el uso de oligonucleótidos específicos (Bio-synthesis S.L.) en las reacciones de secuencia.

## **8.2. Geles de secuenciación**

Los productos de secuenciación se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (5,7% de acrilamida, 0,3% de bisacrilamida) con urea 8 M como agente desnaturalizante.

Los tampones utilizados fueron TBE 0,5 X como tampón superior y como tampón inferior 1/3 de acetato sódico 3 M, 2/3 de TBE 1 X, para producir un efecto de apilamiento de bandas en el gel (R. Kettmann (Gembloux, Bélgica), comunicación personal).

La cubeta utilizada para secuenciación fue el modelo "poker face" SE 1500 sequencer (Hoefer Scientific Instruments).

Tras la electroforesis, los geles se sometieron a una fijación con una solución de metanol al 10% y acético al 10% en agua durante 20 min y secado a 80°C en un secador de geles (TDI) para su posterior exposición con películas autorradiográficas (Kodak X-OMAT AR).

## **9. TECNICAS ELECTROFORETICAS**

### **9.1. Electroforesis en geles de agarosa**

Se realizó siguiendo las indicaciones de Sambrook *et al.*, (1989), utilizando TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0)



como tampón y concentraciones de agarosa comprendidas entre 0,8-1,3%. Los geles se tiñeron con BrEt (1 µg/ml) y el DNA se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta.

### **9.1.1. Extracción de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

Se realizó utilizando agarosa de bajo punto de fusión (Sea Plaque, FMC), (Sambrook *et al.*, 1989).

## **9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Los geles analíticos y preparativos se realizaron según Sambrook *et al.* (1989), utilizando TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0), y concentraciones comprendidas entre 3,5-5%, según el tamaño de fragmento a analizar. Los geles se tiñeron con BrEt (1 µg/ml), o bien con una solución de azul de metileno en agua al 0,2%.

### **9.2.1. Extracción de fragmentos de DNA a partir de geles de poliacrilamida**

Se realizó cortando la banda de interés con un bisturí estéril, y se colocó dentro de una punta desechable de pipeta automática de 1 ml, sellada previamente en su extremo por calor, y taponada con lana de vidrio siliconizada. A continuación, se maceró la acrilamida con una varilla de vidrio y 200 µl de tampón de elución (acetato amónico 0,5 M, EDTA 10 mM, pH 8,0), transfiriendo todo el conjunto a un tubo de ensayo, que se incubó durante una noche a 37°C en agitación. Después se cortó la parte inferior de la punta, pasándola a un tubo Eppendorf agujereado en su tapa, centrifugándolo a 1500 g durante 5 min; se añadieron otros 200 µl de tampón de elución y se centrifugó de nuevo. Los ácidos nucleicos eluidos en los 400 µl se precipitaron con etanol, acetato sódico y 0,01 v de MgCl<sub>2</sub>.

## **10. ANALISIS FILOGENETICO**

Para determinar la metodología más apropiada a aplicar en el análisis filogenético de las secuencias manejadas, se necesita saber qué propiedades tienen las distancias genéticas observadas entre los aislados virales analizados. En el mejor de los casos, se cumplirá que cada antecesor sea equidistante de todos sus descendientes (distancias ultramétricas), con lo que se podrían aplicar métodos de la familia del UPGMA (Sokal y Rolfh, 1981); si no, hay que aplicar métodos que tengan en cuenta la falta de ultrametricidad (Swofford y Olsen, 1990). Para esto, se aplica el test de tasa de evolución desigual.

### **10.1. Aplicación del test de tasa de evolución desigual**

Para la aplicación del test de tasa de evolución desigual, "inequality rate test" (Felsenstein, 1984), se utiliza el método de reconstrucción filogenética por mínimos cuadrados (Fitch y Margoliash, 1967) bajo dos supuestos: a) las distancias son ultramétricas, y b) no lo son. Este análisis se realizó con los programas KITSCH y FITCH (PHYLIP package, Felsenstein, 1990) respectivamente. De ellos se obtienen las sumas residuales de cuadrados (SS), sin restricción, o asumiendo que las distancias son ultramétricas. El cociente  $[SS(\text{reloj}) - SS(\text{sin restricción})] / SS(\text{sin restricción})$  debería, para las distancias ultramétricas, tener una distribución F con  $n-2$  y  $N-(2n-3)$  grados de libertad respectivamente.

### **10.2. Derivación de árboles filogenéticos**

El método utilizado fue el de "neighbour-joining" (Saitou y Nei, 1987), y las distancias genéticas se obtuvieron mediante el estimador de Jukes y Cantor (1969) en el caso de las secuencias nucleotídicas, y por el método de Kimura (1983) en el caso de secuencias aminoacídicas.

Para evaluar la fiabilidad de los árboles inferidos, se aplicó el método "bootstrap" (Efron, 1982). Los intervalos de confianza para

los nodos del árbol se obtuvieron según Felsenstein (1985), y para la longitud de las ramas según Dopazo (1993).

Siguiendo este procedimiento, se derivaron árboles filogenéticos para nueve secuencias nucleotídicas de las regiones 3' no codificantes (3' NCR), así como para catorce secuencias aminoacídicas de los genes de la proteína de la cápsida de BCMV y otros potyvirus relacionados.

La raíz u origen evolutivo de los árboles fue obtenida en base al árbol inferido por Rybicki *et al.* (1992) debido a su topología similar.

## **11. AMPLIFICACION ENZIMATICA DE BCMV**

El ensayo de amplificación enzimática mediante la reacción en cadena de la polimerasa está basado en la replicación específica de un segmento determinado de DNA mediante dos oligonucleótidos cebadores que flanquean dicho segmento, a través de sucesivos ciclos de desnaturalización, hibridación o anillamiento y extensión a partir de ellos mediante la actividad de una DNA polimerasa termoestable (Innis *et al.*, 1990). En el caso de los virus cuyo genoma está constituido por RNA, es preciso realizar una reacción previa de transcripción inversa, aplicándose entonces métodos que combinan transcripción inversa y PCR (RT-PCR) (Langeveld *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1991).

Los ensayos de RT-PCR realizados para la detección de BCMV se han realizado siguiendo dos procedimientos distintos. Por un lado, realizando el ensayo directamente a partir de extracto vegetal (planta o semilla) crudo, sin un proceso previo de purificación de ácidos nucleicos, y, por otro lado, en otro tipo de ensayo en el que se realiza la inmunocaptura del virus en una placa de microtitulación, donde se realiza la transcripción inversa, y, posteriormente, el producto de ésta se somete a la amplificación enzimática por PCR.

### **11.1. RT-PCR a partir de extracto vegetal**

La reacción se realizó según el método descrito por Borja y Ponz (1992), con variaciones en las concentraciones de los reactivos.

El tejido foliar y las semillas trituradas en seco de judía fueron homogeneizados en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, Tween 20 0.5%, gelatina 0,1% y KCl 500 mM. A 10 µl del extracto vegetal se añadieron 10 µl de la mezcla de transcripción inversa, siendo las condiciones finales de reacción dNTPs 1 mM, 48 u de inhibidor de ribonucleasas (HPRI, Amersham), 20 pmoles de cebador 3', MgCl<sub>2</sub> 3 mM, y 200 u de transcriptasa inversa (M-MLV, Gibco BRL). El volumen final de 20 µl se completó con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC (Sambrook *et al.*, 1989). Se incubó a 37-42°C. Una vez sintetizado el c-DNA de cadena sencilla se incubó a 94°C 5 min para desnaturalizar el híbrido RNA-cDNA e inactivar la transcriptasa inversa. A continuación, se procedió a la amplificación en un volumen de 80 ó 100 µl, añadiendo a la reacción de transcripción inversa 20 pmoles de cebador 5', tampón 10 X de la ampliTaq polimerasa (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM), 2,5 u de ampliTaq DNA polimerasa (Perkin Elmer Cetus), y MgCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 1,8 mM.

La reacción se sometió finalmente a 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 45 s, anillamiento a 52°C 1 min y extensión a 72°C 1 min en un termociclador (Gene Amp PCR System 9600 Perkin Elmer). Un ciclo final de 72°C 5 min permite completar la síntesis de DNA en las cadenas iniciadas.

### **11.2. RT-PCR previa adsorción del virus a placas de microtitulación mediante anticuerpos específicos (PCR-INIA)**

Este ensayo está basado en el método descrito por Nolasco *et al.*, (1993) denominado PCR-INIA.

Placas de microtitulación de fondo cóncavo (Nunc) se tapizaron con 50 µl del anticuerpo específico en tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6, a la dilución habitual para ELISA, incubando entre 1-4 h a 37°C. Se lavaron los pocillos cuidadosamente tres veces con PBS-Tween, pH 7,4, y se añadieron 50 µl de muestra vegetal en

tampón de extracción (Tris-HCl 0,5M, pH 8,3, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%, PVP-40 al 2%, PEG-6000 al 1%, y azida sódica 3 mM) a distintas diluciones desde 1/10 (p/v) para planta y 1/50 (p/v) para semilla (harina). Después de una incubación a 4°C durante una noche, o bien 1-4 h a 37°C y de tres lavados con PBS-Tween, pH 7,4 se procedió a la transcripción inversa; para ello, se añadieron 20 µl de mezcla de transcripción inversa (dNTPs 1 mM, cebador 3' 1 µM, tampón 5 X de la transcriptasa inversa (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), y 30 u de HPRI, y 200 u de transcriptasa inversa por reacción. Los pocillos se taparon con plástico adhesivo, y las placas se incubaron a 37-42°C 1 h en agitación, a fin de cubrir toda la superficie tapizada del pocillo. Transcurrido este tiempo, el volumen de reacción se transfirió a un tubo eppendorf donde se sometió a 94°C 5 min y a la amplificación en un volumen de 60, 80 ó 100 µl, previa adición de 20 pmoles de cebador 5', tampón 10 X de la ampliTaq polimerasa (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM), 2,5 u de ampliTaq DNA polimerasa, y MgCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 1,8 mM. El número y tipo de ciclos fue igual que en el caso anterior.

### **11.3. Detección de los productos de amplificación**

Se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa, y tinción con BrEt. El volumen sometido al análisis osciló entre el 15 y el 25% del volumen final de reacción.

En los ensayos de determinación del límite máximo de dilución del extracto vegetal para la detección de BCMV, en las diluciones no detectables en las condiciones anteriores, se realizó una precipitación con etanol (Sambrook *et al.*, 1989) y se analizó por electroforesis el volumen total de resuspensión.

### **11.4. Aislados utilizados**

En las reacciones de PCR se ensayaron muestras infectadas con BCMV recogidas en distintas zonas españolas, además de otros aislados del virus y de potyvirus relacionados que fueron cedidos

por distintos investigadores, o bien adquiridos de algunas instituciones. La relación de estos últimos es la siguiente:

BCMV cepa NL8 (Dr. F. J. Morales, CIAT, Colombia)  
BCMV cepa NL4 (Dr. F. J. Morales, CIAT, Colombia)  
BCMV cepa Fla (Dr. F. J. Morales, CIAT, Colombia)  
BCMV cepa NY15 (Dr. F. J. Morales, CIAT, Colombia)  
BCMV, aislado italiano (Lisa, 1977)  
BYMV, aislado 1 v italiano (Lisa, 1977)  
WMV 2, aislado italiano (Lisa y Dellavalle, 1981)  
CIYVV, aislado italiano (Lisa y Dellavalle, 1983)  
PWV, PV-0292, DSM Braunschweig  
PStV, PV-0338, DSM Braunschweig

Los lotes de semillas empleados en los ensayos de amplificación proceden todos del País Vasco, y fueron proporcionados por el Dr. D. Berra de la Unidad de Sanidad Vegetal, Gobierno Vasco. Cada lote está compuesto por semillas recogidas de una única planta, de cultivares autóctonos, con síntomas de mosaico y deformación foliar. La infección por uno u otro serotipo de BCMV fue determinada previamente por ELISA con los anticuerpos monoclonales específicos.

## RESULTADOS

### III. RESULTADOS

#### 1. ESTIMACION DE LAS VIROSIS EN EL CULTIVO DE JUDIA

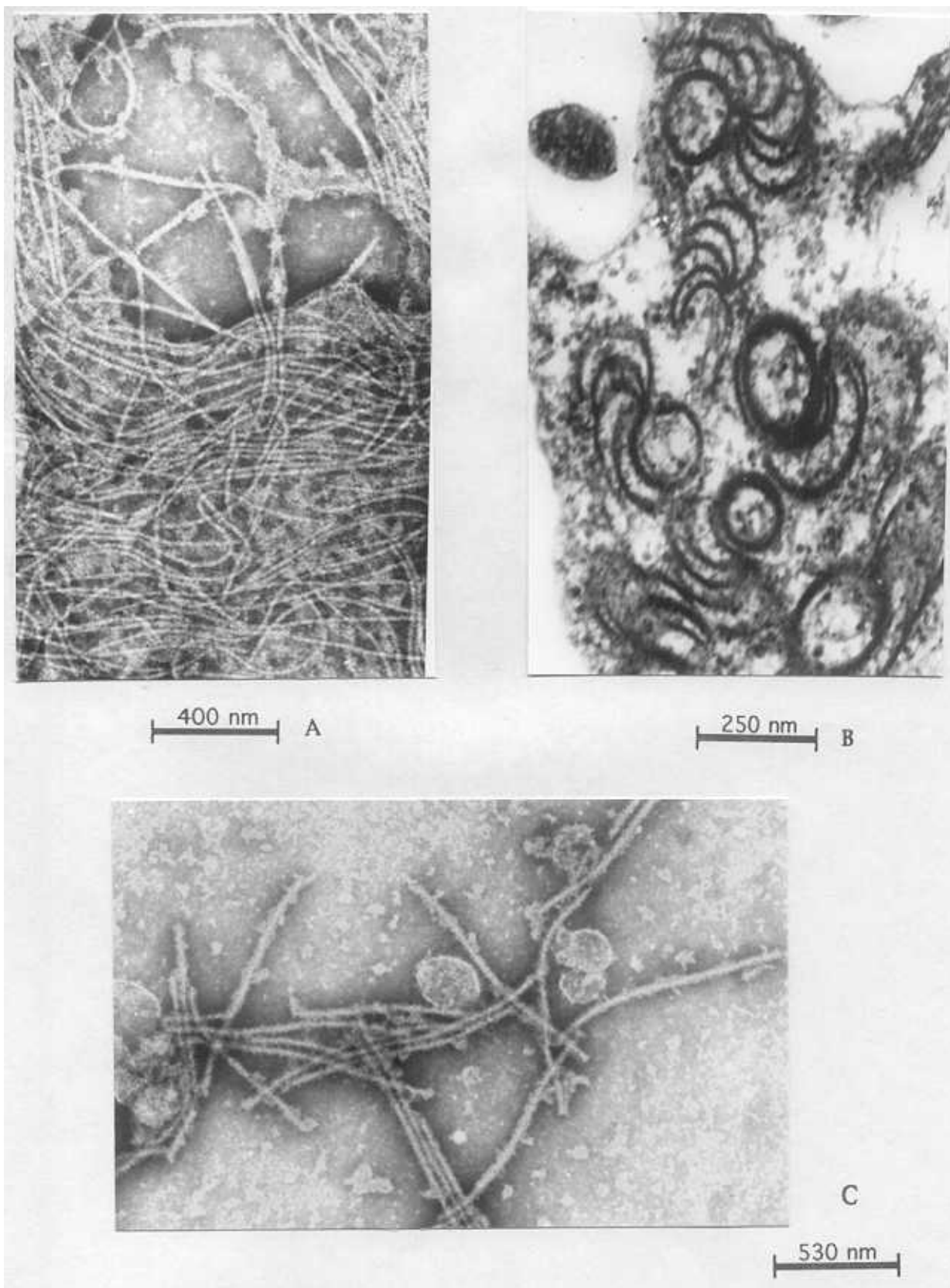
Con el fin de obtener una primera estimación de las infecciones virales en judía, se recogieron 24 muestras con síntomas de posibles virosis (mosaico, bandeado de venas, deformación foliar, etc.) en las provincias de León, Valladolid y Madrid. Dada la importancia descrita en la literatura de las infecciones producidas por potyvirus en este cultivo, se analizaron por ELISA todas las muestras frente al monoclonal anti-potyvirus, resultando el 75% de ellas positivas. La etiología potyviral de estas infecciones se confirmó por análisis de microscopía electrónica mediante tinción negativa y secciones ultrafinas, observándose la presencia de partículas anisométricas flexuosas de unos 750 nm, y de inclusiones citoplásmicas en roseta ("pinwheels") (figura 7), ambas típicas de los potyvirus.

Paralelamente, se realizó un estudio de gama de huéspedes y ensayo frente a otros anticuerpos antivirales disponibles en el laboratorio, encontrándose que 3 muestras estaban infectadas por CMV. Dentro de las infecciones potyvirales, un 70% de los aislados resultó ser sólo transmisible a judía, y reaccionó positivamente en ensayos de inmunomicroscopía electrónica con el anticuerpo bc-197, de amplio espectro para BCMV (figura 7). Además, se detectó la infección por BYMV en una muestra.

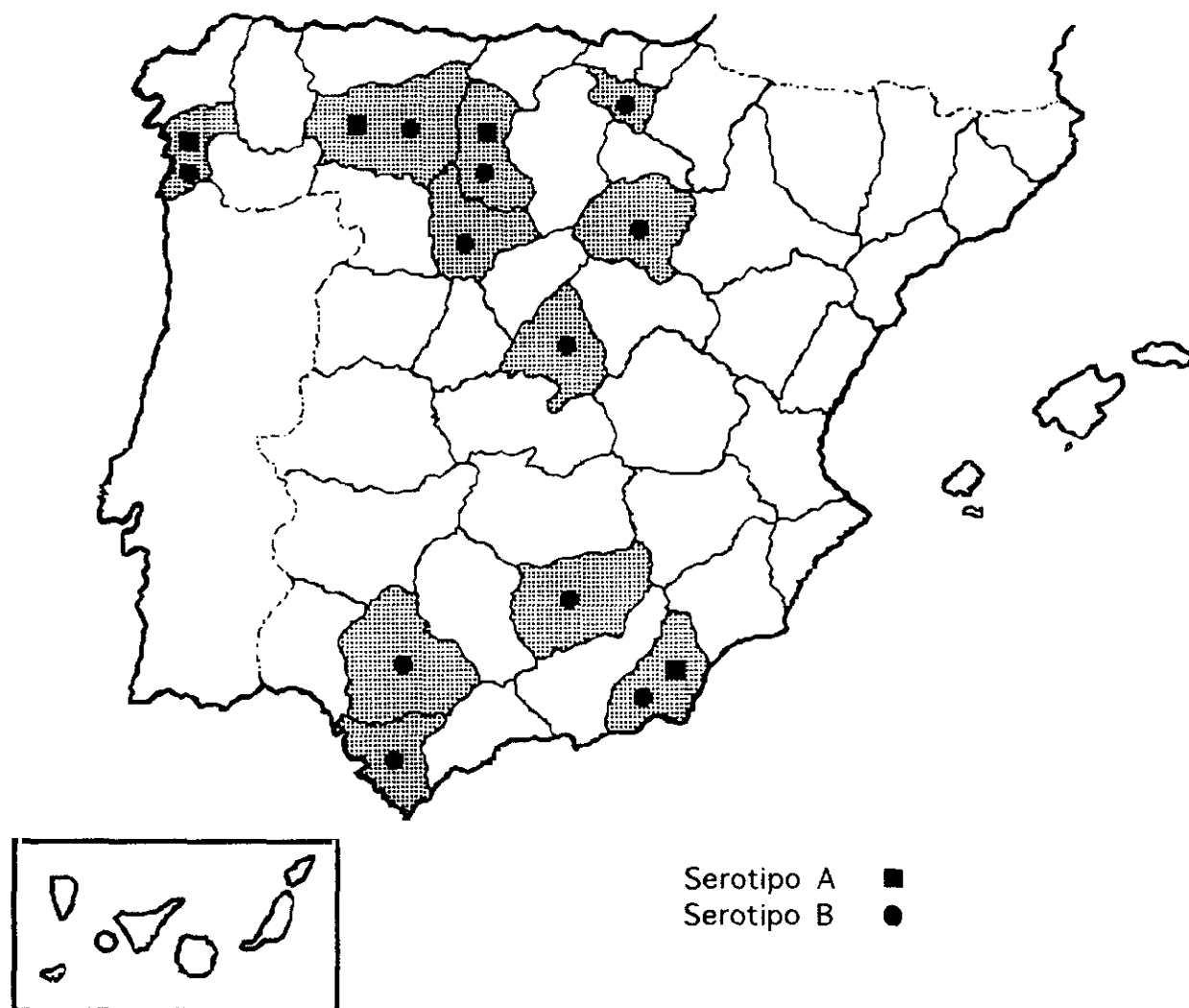
A partir de 1991 se emprendió un muestreo más amplio, abarcando las principales zonas productoras españolas (figura 8). Los resultados globales de las muestras recogidas durante estos cinco años (1989-1993) se resumen en la tabla 3. Del total de 253 muestras resultaron positivas 189 frente al monoclonal anti-PTY, lo que representa un 75% de infecciones producidas por potyvirus.

Las muestras recogidas a partir de 1991, junto con dos muestras desecadas del muestreo previo, se analizaron frente al monoclonal bc-197, de amplio espectro para BCMV, resultando positivas el 71% (tabla 3).





**Figura 7.** Análisis por microscopía electrónica de muestras de judía supuestamente infectadas con BCMV. **A:** tinción negativa de extracto de hoja. **B:** secciones ultrafinas de tejido foliar. **C:** inmunomicroscopía electrónica con el anticuerpo bc-197 de extracto de hoja.



provincia	año	N	potyvirus	A	B	A+B
León	1989/91	4/43	3/34	NR/6	NR/23	NR/4
Valladolid	1989/90	2/2	0/2	0/0	0/1	0/0
Madrid	1990	16	13	NR	NR	NR
Pontevedra	1991	52	29	6	13	6
Soria	1991/92	6/41	1/41	0/0	1/36	0/0
Palencia	1991/92	4/31	2/31	1/0	1/30	0/0
Sevilla	1992	4	4	0	4	0
Cádiz	1992	2	2	0	2	0
Jaén	1992	5	5	0	5	0
Alava	1992	18	12	0	9	0
Almería	1993	21	10	0	5	1

**Figura 8.** Distribución geográfica de serotipos de BCMV en las regiones muestreadas. N= nº de muestras recogidas. NR= ensayo no realizado

Algunos de los síntomas observados en campo en muestras infectadas por BCMV se muestran en la figura 9.

## **2. CARACTERIZACION DE AISLADOS DE BCMV**

Debido a la importante presencia de BCMV en el cultivo de judía, y a la falta de datos acerca de su incidencia, así como la de sus cepas y serotipos, se abordó la caracterización de los aislados de este virus presentes en los campos españoles.

El hecho de pertenecer a uno u otro serotipo lleva implícita una serie de características biológicas, serológicas y moleculares diferenciables, englobando el serotipo A a las cepas inductoras de necrosis y el B a las inductoras de mosaico en general. Con el fin de evaluar la representatividad de estos dos grupos en los aislados de campo españoles, se procedió a su caracterización serológica mediante ELISA, y a la determinación de algunas de las cepas presentes mediante ensayos biológicos (Drijfhout, 1978).

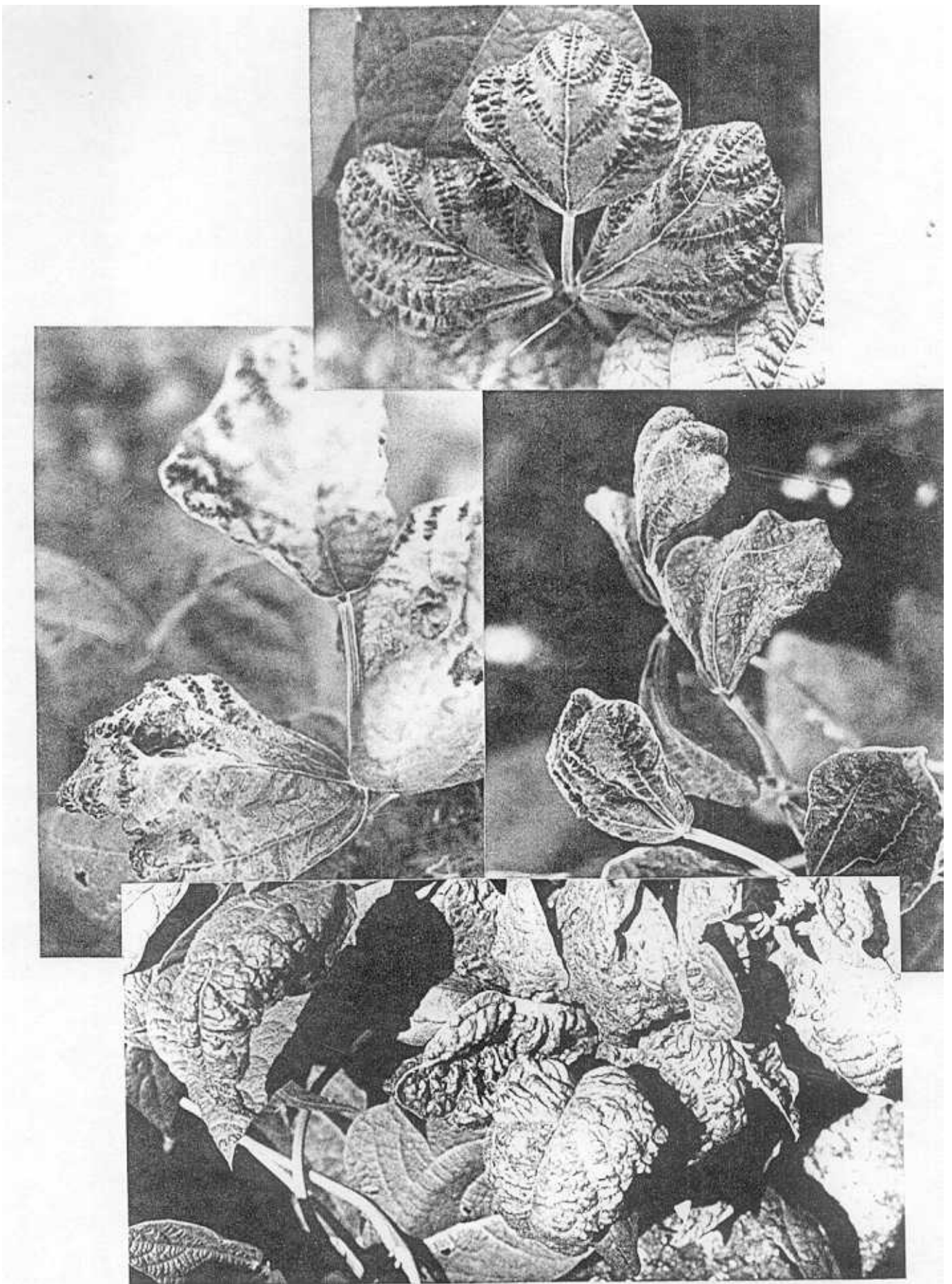
### **2.1. Caracterización serológica**

Para la determinación serológica de los aislados se ensayaron las muestras recogidas frente a los anticuerpos específicos de serotipo del virus: los monoclonales I-2 e I-3 y el policlonal NL-5, específicos del serotipo A, y el monoclonal 15E5 y el policlonal NY-15 específicos del serotipo B.

En el anexo 1 se refleja la procedencia, fecha de recogida, variedad o tipo de judía, síntomas y reacción frente a los anticuerpos de todas las muestras recogidas, así como información adicional en algunas de ellas sobre la presencia de otros virus detectados con anticuerpos específicos o ensayo de gama de huéspedes.

Los resultados obtenidos frente a los anticuerpos monoclonales específicos se muestran en la tabla 4, y frente a los policlonales en la tabla 5.

Las muestras recogidas en el año 91 se ensayaron con toda la batería de anticuerpos monoclonales y policlonales. Los



**Figura 9.** Síntomas observados en muestras de campo infectadas por BCMV.

**Tabla 3.** Resultados globales de las muestras recogidas en los años 1989-1993 frente a los anticuerpos monoclonales anti-potyvirus (anti-PTY) y de amplio espectro para BCMV (bc-197).

anticuerpo	nº muestras analizadas	nº muestras positivas	% sobre el total
anti-PTY	253	189	75
bc-197	231	164	71

**Tabla 4.** Resultados de las muestras analizadas frente a los monoclonales específicos de serotipo de BCMV.

	SEROTIPO A		SEROTIPO B
anticuerpo	I - 2	I - 3	15 E 5
nº muestras analizadas	231	231	231
nº muestras positivas	24	24	141
% sobre el total	10	10	61

monoclonales 15E5, I-2 e I-3 no presentaron reacciones cruzadas entre serotipos, mientras que los policlonales sí; sin tener en cuenta las infecciones mixtas, un 29% de las muestras B positivas fueron reconocidas por el policlonal NL-5 (A-específico), y un 58% de las muestras A positivas fueron reconocidas por el policlonal B-específico NY-15, por lo que la asignación de serotipos se realizó considerando exclusivamente la reacción frente a los anticuerpos monoclonales específicos. Las muestras recogidas durante los años sucesivos no se analizaron frente a los policlonales, debido a sus numerosas reacciones cruzadas.

Los resultados obtenidos en los ensayos serológicos se suman en la tabla 6. Las muestras infectadas por aislados de serotipo A representaron un 5% del total de muestras analizadas, al igual que las infecciones mixtas con aislados de ambos serotipos (tabla 6). Las infecciones por aislados de serotipo B representaron un 56% del total. Un 6% de las muestras, no reconocibles por los monoclonales específicos de serotipo, pero sí por el monoclonal de amplio espectro de BCMV, podrían estar infectadas por potyvirus estrechamente relacionados con BCMV (perfiles I y II, tabla 9). En resumen, las muestras infectadas por BCMV suponen un 89% de las infectadas por potyvirus. Las infecciones por aislados de serotipo A representaron un 8% de las infecciones producidas por BCMV, al igual que las infecciones mixtas, mientras que el 84% de las muestras infectadas con el virus, lo fueron por aislados del serotipo B (tabla 6).

En la figura 8 se muestra la distribución de los aislados de BCMV en las distintas regiones muestreadas.

### **2.1.1. Perfiles serológicos de los aislados**

Debido a la complejidad de las reacciones de los aislados frente a los distintos anticuerpos, se realizó un estudio de los diferentes perfiles serológicos. Las muestras con perfiles atípicos fueron analizadas al menos dos veces para confirmar los resultados, sin presentar variación en su reacción frente a los anticuerpos.

Los perfiles serológicos de los aislados de serotipo A se muestran en la tabla 7. Los monoclonales I-2 e I-3 no mostraron

**Tabla 5.** Resultados de las muestras analizadas frente a los policlonales específicos de serotipo de BCMV.

	SEROTIPO A	SEROTIPO B
antisuero	NL-5	NY-15
nº muestras analizadas	112	112
nº muestras positivas	32	55
% sobre el total	28,5	49

**Tabla 6.** Asignación por serotipos de BCMV referida al total de muestras analizadas y al total de muestras BCMV positivas. (\*) perfiles I y II (tabla 9). Las 12 muestras A+B no han sido contabilizadas en los perfiles A y B por separado.

	A	B	A+B	* potyvirus relacionados
nº muestras analizadas	231	231	231	231
nº muestras BCMV +	154	154	154	154
nº muestras asignadas a cada grupo	12	130	12	13
% que representa cada grupo frente al total de muestras BCMV +	8	84	8	—

ninguna diferencia en cuanto a su capacidad de reconocimiento de los aislados de serotipo A, reaccionando siempre de igual forma para todas las muestras ensayadas. El policlonal NY-15 (B-específico) reconoció cinco muestras A positivas (perfil  $A_2$ ), y, sin embargo, el policlonal NL5 (A-específico) no reconoció dos muestras positivas para los monoclonales A-específicos (perfil  $A_3$ ).

Los perfiles serológicos de los aislados de serotipo B se muestran en la tabla 8. El policlonal NL-5 reconoció 11 muestras B positivas (perfil  $B_3$ ), mientras que una muestra positiva para el monoclonal B-específico no fue reconocida por NY15 (perfil  $B_2$ ).

De las 231 muestras analizadas con los monoclonales, 10 reaccionaron positivamente frente a los tres anticuerpos A y B específicos, considerándose como posibles infecciones mixtas por aislados de ambos serotipos. El perfil de las muestras A+B y otros perfiles atípicos de algunas muestras se reflejan en la tabla 9. De estas 10 muestras, 6 fueron reconocidas también por los policlonales específicos y por el monoclonal de amplio espectro bc-197 [perfil  $(A+B)_1$ ], mientras que 2 de ellas no fueron reconocidas por los policlonales [perfiles  $(A+B)_2$  y  $(A+B)_3$ ], y una, además, tampoco por el monoclonal de amplio espectro  $(A+B)_3$ . Las dos muestras de perfil  $(A+B)_4$  fueron reconocidas por todos los anticuerpos monoclonales y policlonales excepto por bc-197. Estas 4 últimas muestras podrían considerarse como infecciones mixtas por aislados A y B no reconocibles por alguno de los anticuerpos.

Entre las muestras ensayadas, hubo 11 que resultaron positivas para el monoclonal anti-PTY, y no fueron reconocidas por ninguno de los anticuerpos monoclonales específicos de serotipo, pero sí por el monoclonal de amplio espectro bc-197 (II), y 2 muestras igualmente potyvirus positivas que fueron reconocidas por los dos policlonales, y no por los monoclonales (I). Estas 13 últimas muestras podrían estar infectadas por otros potyvirus estrechamente relacionados con BCMV, reconocibles por los policlonales y el monoclonal de amplio espectro (Mink y Silbernagel, 1992), pero no por los monoclonales específicos de serotipo.



**Tabla 7.** Perfiles serológicos de los aislados de serotipo A. M: monoclonal; P: policlonal; A: serotipo A-específico; B: serotipo B-específico; ae: amplio espectro.

PERFIL	anti-PTY	M-ae	M-A	M-A	P-A	M-B	P-B	n <sup>2</sup> muestras
		197	I-3	I-2	NL-5	15E5	NY-15	
A <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	-	-	5
A <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	-	+/ $\pm$	5
A <sub>3</sub>	+	+	+	+	-	-	+/ $\pm$	2

**Tabla 8.** Perfiles serológicos de los aislados de serotipo B. NR: ensayo no realizado. M: monoclonal; P: policlonal; A: serotipo A-específico; B: serotipo B-específico; ae: amplio espectro.

PERFIL	anti-PTY	M-ae	M-B	M-A	M-A	P-B	P-A	n <sup>2</sup> muestras
		197	15E5	I-3	I-2	NY-15	NL-5	
B	+	+	+	-	-	NR	NR	90
B <sub>1</sub>	+	+	+	-	-	+	-	28
B <sub>2</sub>	+	+	+	-	-	-	-	1
B <sub>3</sub>	+	+	+	-	-	+	+/ $\pm$	11

**Tabla 9** Perfiles serológicos de las muestras A+B, y otros perfiles atípicos.

NR: ensayo no realizado. M: monoclonal; P: policlonal; A: serotipo A-específico; B: serotipo B-específico; ae: amplio espectro.

PERFIL	PTY	M-ae	M-B	M-A	M-A	P-B	P-A	nº muestras
		197	15E5	I-3	I-2	NY-15	NL-5	
A+B	+	+	+	+	+	+ / NR	+ / NR	6 / 2
(A+B) <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	-	-	1
(A+B) <sub>2</sub>	+	-	+	+	+	-	-	1
(A+B) <sub>3</sub>	+	-	+	+	+	+	+	2
I	+	+	-	-	-	+	+	2
II	+	+ / ±	-	-	-	NR	NR	11

**Tabla 10.** Datos de los aislados caracterizados como cepas de BCMV.

Nº DE AISLADO	PROCEDENCIA	SEROTIPO	CEPA
J-31	León	B	Fla/US5
J-51	León	A	NL3
J-53	León	A	NL3
J-56	León	A	NL3
J-63	León	B	Fla/US5
J-73	Pontevedra	B	Fla/US5
J-77	Pontevedra	B	NL4
J-84	Pontevedra	A	NL3
J-90	Pontevedra	A	NL3

## **2.2. Caracterización biológica de aislados**

Según las reacciones diferenciales de los cultivares indicadores propuestos por (Drijfhout, 1978) frente a los distintos aislados de BCMV, interpretadas mediante observación de síntomas y ELISA, se realizó la caracterización de las cepas presentes en nueve aislados de BCMV procedentes de dos de las zonas españolas muestreadas. El número de aislado, la procedencia y el serotipo, así como la cepa determinada en cada caso se muestra en la tabla 10.

Los 5 aislados de serotipo A caracterizados presentaron un comportamiento biológico idéntico al descrito para la cepa NL3, mientras que uno de los aislados de serotipo B fue identificado como cepa NL4, y 3 de ellos como Fla/US5.

## **3. CLONACION Y SECUENCIACION DE LOS GENES DE LA PROTEINA DE LA CAPSIDA Y REGION 3' NO CODIFICANTE DE DOS AISLADOS DE BCMV**

Una vez identificada la presencia de aislados pertenecientes a los dos serotipos de BCMV en España, se abordó la clonación y secuenciación del gen de la proteína de la cápsida de un aislado de cada serotipo, con el fin de disponer de información molecular que permitiese el diseño de estrategias de control, y de poder realizar análisis comparativos con otros potyvirus.

Los aislados escogidos para este estudio fueron: i) el aislado J-56 de serotipo A, procedente de León, y caracterizado como la cepa NL3 del virus, y ii) el aislado J-8 de serotipo B, procedente de Valladolid. Ambos aislados se multiplicaron en los cultivares Bountiful y Garrafal Oro respectivamente. La purificación del virus se realizó según Moghal y Francki (1976), y el rendimiento, determinado por espectrofotometría, osciló entre 1-5  $\mu$ g de partículas virales por g de material vegetal. A partir de suspensiones de virus purificado se extrajo el RNA viral mediante fenolización, con un tratamiento previo con SDS (Materiales y Métodos), y se analizó en geles desnaturizantes de agarosa, observándose una banda de aproximadamente 10 Kb. El RNA

extraído se empleó como molde para la síntesis de DNA complementario (c-DNA).

### **3.1. Estrategia de clonación**

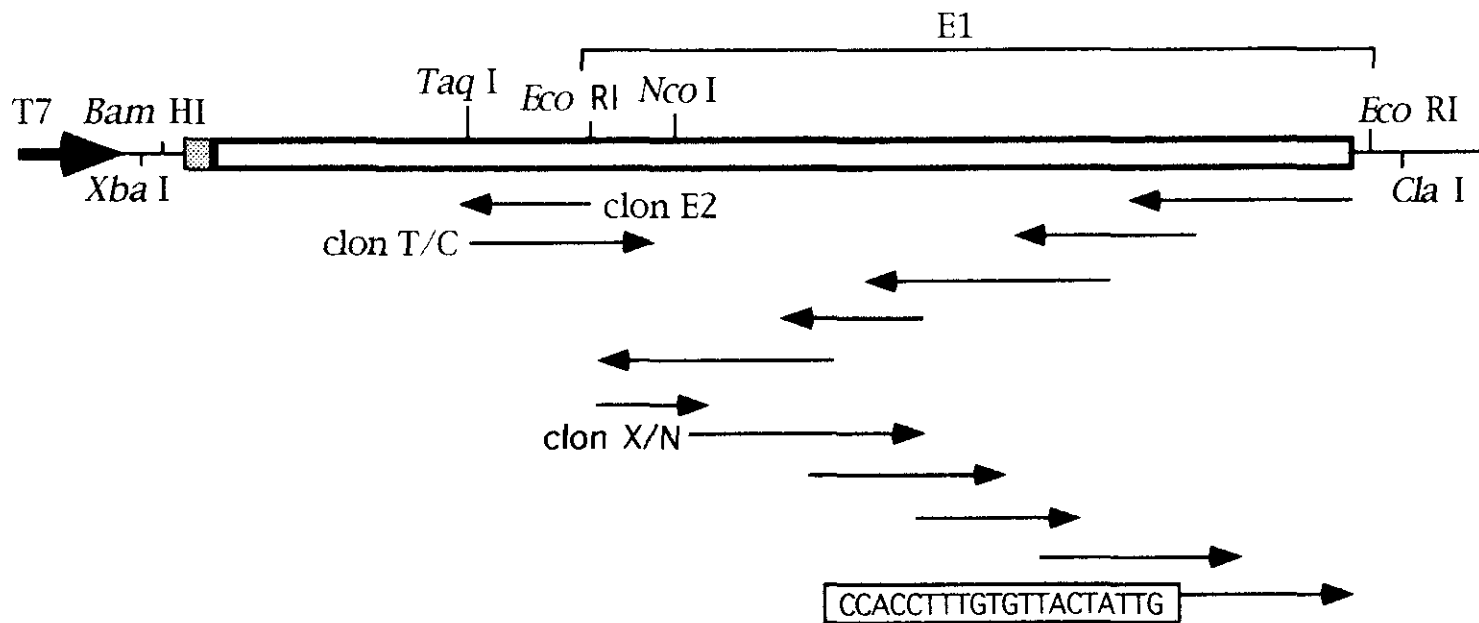
Dos características implícitas a la estructura genómica de los potyvirus fueron consideradas ventajosas a la hora de diseñar la estrategia de clonación de los genes de la proteína de la cápsida. En primer lugar, dicho cistron se encuentra situado próximo al extremo 3' del RNA viral, y en segundo lugar, la presencia de una región poliadenilada en el extremo 3' permite el uso de oligo (dT) como cebador para la síntesis de la primera cadena de c-DNA. La segunda cadena se sintetizó mediante las actividades combinadas de la RNasa H y la DNA polimerasa I. La existencia de extremos romos se aseguró con un tratamiento con la T4 DNA polimerasa.

Una vez sintetizado el c-DNA con extremos romos, se clonó en el sitio único *Sma* I del vector bluescript. La selección de los clones recombinantes se realizó mediante el análisis de su longitud y mapa de restricción, y por secuenciación parcial. El tamaño medio de inserto obtenido fue de 1500 nt, oscilando entre 1200 y 2800 nt.

### **3.2. Secuenciación del gen de la proteína de la cápsida del aislado J-8 de serotipo B**

Se seleccionó un clon de un tamaño estimado de inserto de 2,5 Kpb (clon 46), que, por longitud, mapa de restricción y secuenciación parcial parecía contener el gen de la proteína de la cápsida. La estrategia de secuenciación integrada se muestra en la figura 10. Con el fin de delimitar lo más posible la extensión del clon a dicho gen, se realizó una primera subclonación del fragmento *Eco* RI, de aproximadamente 1 Kpb, en el sitio único *Eco* RI de bluescript, generándose el clon E1. El inserto de E1, utilizado como sonda en experimentos de hibridación tipo "dot blot" hibridó con el extracto vegetal del aislado J-8.

Paralelamente se efectuó la religación del clon original conteniendo el fragmento restante de 1,5 Kpb (clon E2).



**Figura 10**

Estrategia de secuenciación del gen de la proteína de la cápsida del aislado J-8 aplicada sobre el clon 46. Escala 1cm= 100pb. ■ continuación del clon fuera de escala. El sentido y la longitud de las flechas indican la banda y la extensión secuenciada en cada subclón.

	10	20	30	40	50	60
0001	CUUUGACUAC	GAGGUAGGAU	GCGGAGAAUC	UGUGCACCUA	CAAUCAGGAA	CUGGACAGCC
0061	ACAGCCACCA	AUAGUAGAUG	CUGGUGUGGA	UUCUGGGAAA	GACAAGAAAG	AGAAAAGCAA
0121	CAAAGGAAAG	GACCCAGAAA	GCAGGGAAGG	GGCAGGAAAC	AACAACCGUG	GUGCAGGGAA
0181	UUCGGCAAG	AGAGACAAGG	AUGUGAAUGC	AGGUUCCAAA	GGGAAGGUUG	UUCCUCGGCU
0241	UCAAAGAUC	ACAAAAGGA	UGAAUUUGCC	CAUGGUGAAA	GGGAUGUGA	UCUAAAUUU
0301	AGAUCAUCUG	UUGGACUACA	AGCCAGAGCA	AACUGAUCUU	UUUAACACAA	GAGCAACAAA
0361	GAUGCAGUUU	GAAAUGUGGU	ACAAUGCUGU	GAAGGCUGAG	UAUGAGAUAG	AUGAUGAUCA
0421	GAUGUCAAUU	GUAUUGAACG	GCUUUUUGGU	GUGGUGUAUU	GACAAUGGCA	CUUCACCGGA
0481	UGUGAACGBC	ACUUGGAUAA	UGAUGGAUGG	AGAUGAGCAA	GUGGAAUACC	CACUCAAAC
0541	AAUGGUUGAA	AAUGC AAAAC	CAACACUCCG	CCAAAUCAUG	CACCAUUUUU	CAGAUGCAGC
0601	UGAAGCGUAC	AUUGAGAUGA	GAAAUUCCGA	GAGGCCGUAU	AUGCCUAGGU	ACGGACUACU
0661	UCGGAAUUG	AGGGACAAAA	ACCUAGCUCG	CUACGCUUUU	GAUUUCUAUG	AAGUAACAUC
0721	CAAAACAUCA	GAUCGAGCAA	GAGAAGCAGU	AGCACAGAUG	AAGGCAGCAG	CCCUCAGCAA
0781	CGUUAGCAGC	AAGUUGUUUG	GACUUGAUGG	UAACGUGGCA	ACAACCAGCG	AGAAUACUGA
0841	AAGGCACACU	GCAAGGGACG	UCAAUCAGAA	CAUGCACACA	CUUCUUGGCA	UGGGUCCUCC
0901	GCAG <b>UAA</b> AGG	UUAGGUAAAC	UGACCACAGU	UAGCAUCUCG	CGUCGCUGAA	UAGUUUCAUA
0961	UAGUAAUCUU	UUAUGUUCUC	UUUAGUUUCA	GUGUGGUUCU	ACCACCUUUG	UGUUACUAUU
1021	GUGAUAGCGU	GGUUGGUCCA	CCAACAUUUU	GUGAGUACUU	UAUGUUUAUG	AGUAAGCCGG
1081	AAGAACCAUU	GCAAUGGUGA	GGGCAUGCAG	AGUGAUUUCA	UCACGCGUCA	UGAGGUAAACU
1141	ACGGCAAUGU	UUGUUGUUCC	(A) <sub>n</sub>			

	10	20	30	40	50	60
--	----	----	----	----	----	----

**Figura 11.** Secuencia nucleotídica de los 1160 residuos 3' terminales del RNA del aislado J-8 de BCMV. El codón de STOP precedente a la zona 3' no codificante se ha marcado en **negrita**.

Sobre el subclón E1 se aplicó una estrategia de deleciones solapantes de 200 pb. Para deleccionar desde el extremo correspondiente al 5' del RNA viral, se procedió a la digestión previa del clon con las endonucleasas de restricción *Sac* I y *Bam* HI. Las deleciones desde el extremo contrario, equivalente al 3' del RNA viral, se realizaron sobre el clon E1 digerido con *Apa* I y *Cla* I.

Desde el extremo 3' se cubrió la secuencia del subclon E1 con cuatro clones deleccionados, mientras que desde el extremo 5' los cuatro clones deleccionados obtenidos no bastaron para completar la secuencia, siendo preciso deleccionar el fragmento *Nco* I/*Xba* I, generar extremos romos con la actividad del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, y religar el clon resultante (clon X/N); para completar la secuencia hasta la cola de poli (A), se precisó además la síntesis de un oligonucleótido específico de la zona 3' terminal (figura 10).

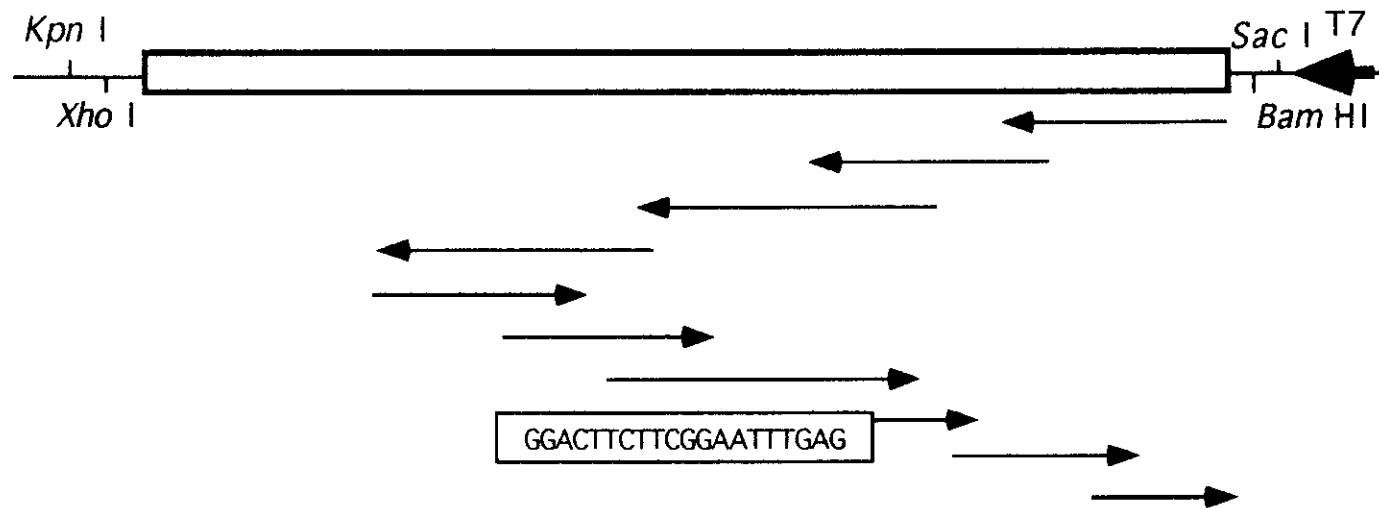
Por otra parte, el clon E1 no resultó suficiente en longitud para cubrir el gen de la proteína de la cápsida en toda su extensión, por lo que se subclonó el fragmento *Taq* I/*Cla* I (clon T/C) de 1,2 Kpb a partir del clon original de 2,5 Kpb, cubriéndose la secuencia de esa zona en sentido inverso con el clon E2.

Siguiendo la estrategia anteriormente descrita, se determinó la secuencia de los 1160 nt 3'-terminales, excluyendo la cola de poli (A) (figura 11), y su análisis con los programas "DNA strider" y "Microgenie" mostró la existencia de una única fase de lectura abierta, seguida de una región 3' no codificante de 256 residuos.

### **3.3. Secuenciación del gen de la proteína de la cápsida del aislado J-56 de serotipo A**

Los clones recombinantes se identificaron por hibridación tipo "colony hybridization", utilizando como sonda el fragmento *Eco* RI de 1 Kpb del aislado J-8 de BCMV (figura 10).

Se seleccionó un clon con un tamaño de inserto de aproximadamente 1,4 Kpb (clon 54), y se efectuaron deleciones de 200 pb en los dos sentidos, previa digestión con las endonucleasas de restricción *Kpn* I y *Xho* I para deleccionar desde el extremo equivalente al 5' del RNA viral. Para deleccionar desde el extremo 3',



**Figura 12**

Estrategia de secuenciación del gen de la proteína de la cápsida del aislado J-56, aplicada sobre el clon 54. Escala 1cm=100pb. El sentido y la longitud de las flechas indican la banda y la extensión secuenciada en cada subclón.



	10	20	30	40	50	60
0001	UGAAACAGCU	CGAAUUUGAU	UCUGAUGAUG	AGGUGUAUGA	AUCCGUGUCA	ACACAAUCCA
0061	GDAAGAAAGA	AGAAGAGAAA	GACGCUGGGG	CCGAUAAGAG	AGAGAAGGAC	AAAGGCAAAG
0121	GDECCAGCGGA	UAAAGACGUU	GGAGCUGGCU	CAAAAGGAAA	AGUAGUGCCA	AGACUGCAGA
0181	AAAUACACCAA	AAAGAUGAAU	UUGCCUAUGG	UUGGCCGUAG	GAUGAUUCUA	AACUUGGAUC
0241	ACCUAAUUGA	AUACAAACCG	CAGCAGACGG	ACUUGUACAA	CACAAGAGCU	ACCAAGGCAC
0301	AAUUUGAAAG	AUGGUACGAA	GCAGUCAAGA	CUGAAUAUGA	GCUUGAUGAC	CAGCAAUUGG
0361	GAGUAGUAAU	GAAUGGCUUC	AUGGUGUGGU	GCAUCGAUAA	UGGAACAUCU	CCC GAUGUGA
0421	AUGGAGUGUG	GGUAAUGAUG	GAUGGAGAUG	AGCAAUAGA	AUACCCAUUG	AAGCCAUUGG
0481	UUGAGAAUGC	AAAGCCUACG	CUGCGACAAG	UUAUGCAUCA	UUUUUCAGAU	GCAGCGGAGG
0541	CUUAUUAUAGA	GAUGAGGAAU	UCUGAAGGGU	UCUACAUGCC	UAGGUAUGGA	CUUCUUCGGA
0601	AUUUGAGGGA	UAAAAGCUUG	GCUCGCUAUG	CAUUCGAUUU	CUAUGAGGUU	AACUCAAAAA
0661	CCUCAGACAG	AGCCAGAGAA	GCGGUUGCUC	AGAUGAAAGC	GGCAGCCCUC	GCUAACGUUA
0721	ACACUAGAUU	GUUUGGUCUA	GAUGGUAACG	UGGCAACAAC	CAGCGAGAAU	ACUGAAAGGC
0781	ACACUGCACG	GGACGUCAAU	CAAAACAUGC	AUCAUJUGCU	UGGUAUGACU	UCUGGGCAGU
0841	AAAGGAGUGG	GGCAACCCCU	CUACAGUUAG	CAUCUCGCGU	CGUUCAUAGU	UUUCUGUAUU
0901	<b>AGAUAGUACG</b>	CUUUCAAUUC	CAGUGUGGUU	AUACCACCUU	GUGUUUAUGU	AAGUUAGAGU
0961	GSCUAUGCCA	CCAGUAUGUC	AUGCUAUUUC	AGUUUAUGCG	AGCAGGAGGA	GCCAUUCCAA
1021	CACCGGAGCU	GCCAGCGUGG	UUGUAUCAUG	AGUGCUGUCC	GAGGUGCGGG	UAUGAAUAAU
1081	CUCU(A) <sub>n</sub>					
	10	20	30	40	50	60

**Figura 13.** Secuencia nucleotídica de los 1084 residuos 3' terminales del RNA del aislado J-56 de BCMV. El codón de STOP que marca el comienzo de la región 3' no codificante se ha resaltado en negrita.

el clon 54 fue previamente digerido con *Sac I* y *Bam HI*. La estrategia de secuenciación se muestra en la figura 12.

Con cuatro clones delecionados desde el extremo 3' se cubrió toda la secuencia del gen de la proteína de la cápsida, y desde el extremo 5' se secuenciaron cinco clones, pero fue precisa la síntesis de un oligonucleótido sintético para completar la secuencia de todo el gen en los dos sentidos (figura 12). De esta forma, se determinó la secuencia de los 1084 nt 3'-terminales, excluyendo la cola de poli(A) (figura 13). El análisis de dicha secuencia reveló la existencia de una única fase de lectura abierta, seguida de una zona 3' no codificante de 245 residuos.

#### **4. ANALISIS DE LAS PROTEINAS DE LA CAPSIDA DEDUCIDAS PARA LOS AISLADOS DE BCMV SECUENCIADOS**

Por analogía con otros potyvirus (Dougherty *et al.*, 1988) se determinó el sitio de corte predicho para la proteasa viral NIa, situado entre la proteína NIb (replicasa) y la proteína de la cápsida (figura 14).

Las proteínas deducidas para ambos aislados serían de 261 aminoácidos para el aislado J-56 (cepa NL3), y de 287 para J-8, y el grado de identidad entre ellas es de un 75,8%, lo que supone un valor intermedio entre los establecidos para virus distintos y para cepas, similar al 74% obtenido para aislados de las cepas NL4 y NL8 (Vetten *et al.*, 1992). El alineamiento de las dos proteínas se muestra en la figura 14. Se han realizado también los alineamientos de las cápsidas de J-8 y NL3 con las de NL4 y NL8 (Vetten *et al.*, 1992), y de dicho análisis se deduce que las cápsidas de los aislados del serotipo A analizadas presentan un grado de identidad mucho mayor que el que presentan los aislados de serotipo B. La similitud entre NL3 y NL8 es del 98,6% (figura 15), con sólo dos sustituciones a lo largo de toda la proteína, mientras que entre J-8 y NL4 es del 90,7% (figura 16), valor que supone el límite inferior propuesto para cepas del mismo potyvirus (Shukla y Ward, 1988), con el 71% de las sustituciones en la región N-terminal de la proteína (figura 16).

	10	20	30	40	50	60
	<-Nib CP->					
001	FDYEVGCGES	VHLQSGTGQP	QPPIVDAGVD	SGKDKKEKSN	KGKDPESREG	AGNNNRGAGN
001	FSDSDEVYES	VSTQS	SK KEEKDA	GADKREK D	KGKGP	A
059	SAMRDKDVNA	GSKGKVVPR	LQKITKRMNLP	MVKGNVILNL	DHLLDYKPEQ	TDLFNTRATK
039	DKDVGA	GSKGKVVPR	LQKITKKMNLP	MVGGRMILNL	DHLIEYKPOQ	TDLYNTRATK
119	MQFEMWYNAV	KAEYEIDDDQ	MSIVMNGFMV	WCIDNGTSPD	VNGTWIMMDG	DEQVEYPLKP
095	AQFERWYEAV	KTEYELDDQQ	MGVVMNGFMV	WCIDNGTSPD	VNGVWVMMDG	DEQIEYPLKP
179	MVENAKPTLR	QIMHHFSDAA	EAYIEMRNSE	RPYMPRYGLL	RNLRDKNLAR	YAFDFYEVTS
155	MVENAKPTLR	QVMHHFSDAA	EAYIEMRNSE	GFYMPRYGLL	RNLRDKSLAR	YAFDFYEVNS
241	KTSDRAREAV	AQMKAALSN	VSSKLFGLDG	NVATTSENTE	RHTARDVNQN	MHTLLGMGPP
215	KTSDRAREAV	AQMKAALAN	VNTRLFGLDG	NVATTSENTE	RHTARDVNQN	MHLLGMTSG
301	Q					
275	Q					
	10	20	30	40	50	60

**Figura 14.** Alineamiento de las proteínas de la cápsida deducidas para los aislados J-8 (superior) y J-56 (inferior). El comienzo de la proteína de la cápsida, limitando con la proteína Nib se ha marcado con una flecha.

	10	20	30	40	50	60
	<-NIB CP->					
001	LEFSDSDEVY	ESVSTQSSKK	EEEKDAGADK	REKDKGKGP	DKDVGAGSKG	KVVPRLQKIT
001	LEFGSDDEVC	ESVSTQSSKK	EEEKDAEADK	REKDKGKGP	DKDVGTGSKG	KVVPRLQKIT
061	KKMNLPMVGG	RMILNLDHLI	EYKPQOTDLY	NTRATKAQFE	RWYEAVKTEY	ELDDQQMGVV
061	KKMNLPMVGG	RMILNLDHLI	EYKPQOTDLY	NTRATKAQFE	RWYEAVKTEY	ELDDQQMGVV
121	MNGFMVWCID	NGTSPDVNGV	WVMMDGDEQI	EYPLKPMVEN	AKPTLRQVMH	HFSDAAEAYI
121	MNGFMVWCID	NGTSPDVNGV	WVMMDGDEQI	EYPLKPMVEN	AKPTLRQVMH	HFSDAAEAYI
181	EMRNSEGFYM	PRYGLLRNLR	DKSLARYAFD	FYEVNSKTS	RAREAVAQMK	AAALANVNTR
181	EMRNSEGFYM	PRYGLLRNLR	DKSLARYAFD	FYEVNSKTS	RAREAVAQMK	AAALANVNTR
241	LFGLDGNVAT	TSENERHTA	RDVNQNMHHL	LGMTSGQ		
241	LFGLDGNVAT	TSENERHTA	RDVNQNMHHL	LGMTSGQ		
	10	20	30	40	50	60

**Figura 15.** Alineamiento de las proteínas de la cápsida deducidas para el aislado J-56 (NL3) (superior) y NL8 (Vetten *et al.*, 1992) (inferior), ambos pertenecientes al serotipo A de BCMV. El límite entre las proteínas NIB y la proteína de la cápsida se ha marcado con flechas.

	10	20	30	40	50	60
	<-Nib CP->					
001	LDFDYEVGCG	ESVHLQSGSG	HPPLPVVDAG	VDTEKDKKDK	SSRGKDPENK	EETRNNSRGT
001	LDFDYEVGCG	ESVHLQSGTG	QPQPPIVDAG	VDSGKDKKEK	SNKGKDPEER	EGAGNNNRGA
061	ENPTMRDKDV	NAGSRGKVVP	RLQRITKRMN	LPMVKGNVIL	NLDHLLDYKP	EQTDLFNTRA
061	GNSAMRDKDV	NAGSKGKVVP	RLQKITKRMN	LPMVKGNVIL	NLDHLLDYKP	EQTDLFNTRA
121	TKMQFEMWYN	AVKGEYEIDD	DQMAIIMNGF	MVWCIDNGTS	PDVNGTWMM	DGDEQVEYPL
121	TKMQFEMWYN	AVKAEYEIDD	DQMSIVMNGF	MVWCIDNGTS	PDVNGTWIMM	DGDEQVEYPL
181	KPMVENAKPT	LRQIMHHFSD	AAEAYIEMRN	SERPYPYRG	LLRNLRDKNL	VCYAFDFYEV
181	KPMVENAKPT	LRQIMHHFSD	AAEAYIEMRN	SERPYPYRG	LLRNLRDKNL	ARYAFDFYEV
241	TSKTSDRARE	AVAQMKAAL	SNVSSKLFGL	DGNVATTSEN	TERHTARDVN	QNMHTLLGMG
241	TSKTSDRARE	AVAQMKAAL	SNVSSKLFGL	DGNVATTSEN	TERHTARDVN	QNMHTLLGMG
301	PPQ					
301	PPQ					
	10	20	30	40	50	60

**Figura 16.** Alineamiento de las proteínas de la cápsida deducidas para NL4 (Vetten *et al.*, 1992) (superior) y el aislado J-8 (inferior), ambos del serotipo B de BCMV. El límite entre la proteína de la cápsida y la proteína Nib se ha marcado con flechas.

## **5. ANALISIS DE LAS REGIONES 3' NO CODIFICANTES DE LOS AISLADOS DE BCMV SECUENCIADOS**

La región 3' no codificante (3' NCR) del aislado de serotipo A (J-56, cepa NL3) tiene una extensión de 245 nt, frente a los 256 nt del aislado de serotipo B (J-8), y el grado de identidad entre ellos es del 70,1% (figura 17), similar al 70,9% obtenido para NL4 y NL8 (Vetten *et al.*, 1992). El alineamiento de las 3' NCRs de NL3 y NL8 (Vetten *et al.*, 1992) se muestra en la figura 18, y la identidad entre ellas es del 96,3%. La similitud existente entre las 3' NCRs de J-8 y NL4 es del 98,4% (figura 19).

## **6. COMPARACION CON LAS PROTEINAS DE LA CAPSIDA DE OTROS POTYVIRUS ESTRECHAMENTE RELACIONADOS**

Dadas las confusas relaciones descritas para BCMV y otros potyvirus que infectan leguminosas, a nivel de gama de huéspedes, serología y mapa de péptidos por HPLC (Dijkstra y Khan, 1992; Mink y Silbernagel, 1992; McKern *et al.*, 1992), se planteó un estudio comparativo a nivel de proteína, de las cápsidas de los dos aislados de distinto serotipo secuenciados (J-8 y J-56) con los potyvirus relacionados de secuencia disponible, a fin de dilucidar posibles parentescos correlacionables con sus propiedades biológicas, serológicas y moleculares. La relación de los virus utilizados en la comparación, así como la fuente de sus secuencias se muestran en la tabla 11, y las similitudes obtenidas se recogen en la tabla 12.

## **7. COMPARACION CON LAS REGIONES 3' NO CODIFICANTES DE OTROS POTYVIRUS ESTRECHAMENTE RELACIONADOS**

La región 3' no codificante de los potyvirus ha sido utilizada en comparaciones entre cepas del mismo virus, mostrando un grado de identidad comprendido entre el 83-99%, y existiendo entre potyvirus distintos sólo un 39-53% de similitud (Frenkel *et al.*,

	10	20	30	40	50	60
001	TAAAG GTT	AGGTAAACTG	ACCACAGTTA	GCATCTCGCG	TCGCTGAATA	GTTTCATATA
001	TAAAGGAGTG	GGGCAACCCC	TCTACAGTTA	GCATCTCGCG	TCG TTCATA	GTTTTCTGTA
059	GTAATCTTTT	ATGTTCTCTT	TAGTTTCAGT	GTGGTCTAC	CACCTTTGTG	TTACTATTGT
060	TTAGATAGT	ACG CT TT	CAATTCCAGT	GTGGTTATAC	CACC TTGTG	TTTAT GTAA
119	GATAGCGTGG	TTGGTCCACC	AACATATTGT	GAGTACTTTA	TGTTTATGAG	TAAGCCGGAA
114	GTTAGAGTGG	CTATGCCACC	AGTATGTCAT	G CTA TTTC	AGTTTATGCG	AGCAGGAG
179	GAACCATTGC	AATGGTGAGG	GCATGCAGAG	TGATTTCATC	ACGCGTCATG	AGGTAACTAC
170	GAGCCATTCC	AACACCG GA	GCTGCCAGCG	TGGTTGTATC	ATGAGTGCTG	TCCGAGGTGC
239	GGCAATGTTT	GTTGTTCC				
229	GGGTATGAAT	ATTCTCT				

**Figura 17.** Alineamiento de las regiones 3' no codificantes de J-8 (superior) y NL3 (inferior).

	10	20	30	40	50	60
001	TAAAGGAGTG	GGGCAACCCC	TCTACAGTTA	GCATCTCGCG	TCGTTTCATAG	TTTTCTGTAT
001	TAAAGGAGTG	GGGCAACCCC	TCTACAGTTA	GCATCTCGCG	TCGTTTCATAG	TTTTCTGTAG
061	TAGATAGTAC	GCTTTCAATT	CCAGTGTGGT	TATACCACCT	TGTGTTTATG	TAAGTTAGAG
061	TAGATAGTAC	GCTTTCAATT	CCAGTGTGGT	TATACCACCT	TGTGTCTATG	TAAGTCAGAG
121	TGGCTATGCC	ACCAGTATGT	CATGCTATTT	CAGTTTATGC	GAGCAGGAGG	AGCCATTCCA
121	TGGCTATGCC	ACCAGTATGT	TATGCTATTT	CAGTTTATGC	GAGCAGGAGG	AGCCATTCCA
181	ACACCGGAGC	TGCCAGCGTG	GTTGTATCAT	GAGTGCTGTC	CGAGGTGCGG	GTATGAATAT
181	ACACCGGAGC	TGCCAGAGTG	GTTACACCAC	GAGTGCTGTC	CGAGGTGCGG	GTATGAATAT
241	TCTCT					
241	TCTCT					
	10	20	30	40	50	60

**Figura 18.** Alineamiento de las regiones 3' no codificantes de NL3 (superior) y NL8 (Vetten *et al.*, 1992) (inferior).



	10	20	30	40	50	60
001	TAAAGGTTAG	GTAAACTGAC	CACAGTTAGC	ATCTCGCGTC	GCTGAATAGT	TTCATATAGT
001	TAAAGGTTGG	GTAAACTGAC	CACAGTTAGC	ATCTCGCGTC	GCTGAATAGT	TTCATATAGT
061	AATCTTTTAT	GTTCTCTTTA	GTTTCAGTGT	GGTTCTACCA	CCTTTGTGTT	ACTATTGTGA
061	AATCTTTTAT	GTTCTCTTTA	GTTTCAGTGT	GGTTTTACCA	CCTTTGTGTT	ACTATTGTGA
121	TAGCGTGGTT	GGTCCACCAA	CATATTGTGA	GTACTTTATG	TTTATGAGTA	AGCCGGAAGA
121	TAGCGTGGTT	GGTCCACCAA	CATATTGTGA	GTACTTTATG	TTTATGAGTA	AGCCGGAAGA
181	ACCATTGCAA	TGGTGAGGGC	ATGCAGAGTG	ATTTTCATCAC	GCGTCATGAG	GTA ACTACGG
181	ACCATTGCAA	TGGTGAGGAC	ATGCAGAGTG	ATTTTCATCAC	GCGTCATGAG	GTAGCTACGG
241	CAATGTTTGT	TGTTCC				
241	CAATGTTTGT	TGTTCC				
	10	20	30	40	50	60

**Figura 19.** Alineamiento de las regiones 3' no codificantes de NL4 (Vetten *et al.*, 1992) (superior) y J-8 (inferior).

**Tabla 11.** Información sobre los aislados potyvirales empleados en los estudios comparativos de secuencia y en el análisis filogenético.

Nombre, acrónimo y cepa o aislado del virus	Referencia de la secuencia
Virus del mosaico común de la judía, BCMV, aislado J-8, serotipo B	Sáiz <i>et al.</i> , 1993; EMBL., Z15057
Virus del mosaico común de la judía, BCMV, NL-3	Sáiz <i>et al.</i> , 1993; EMBL., Z17203
Virus del mosaico común de la judía, BCMV, NL-4	Vetten <i>et al.</i> , 1992
Virus del mosaico común de la judía, BCMV, NL-8	Vetten <i>et al.</i> , 1992
Virus del mosaico amarillo de la judía, BYMV	EMBL., X-63358
Virus del amarilleo de las venas del trébol, CIYVV	EMBL., D-00605
Virus del estriado del cacahuete, PStV	McKern <i>et al.</i> , 1991
Virus del amaderamiento de la pasionaria, PWV, K	en Rybicki y Shukla, 1992
Virus del amaderamiento de la pasionaria, PWV, TB	en Rybicki y Shukla, 1992
Virus de la pasionaria sudafricana, SAPV	Brand <i>et al.</i> , 1993
Virus del mosaico de la soja, SbMV, N	Frenkel <i>et al.</i> , 1989
Virus del mosaico de la sandía, WMV, 2-Aus	Frenkel <i>et al.</i> , 1989
Virus del mosaico de la sandía, WMV, 2-US	en Rybicki y Shukla, 1992
Virus del mosaico amarillo del calabacín, ZYMV, F	en Rybicki y Shukla, 1992

**TABLA 12.** Porcentaje de similitud entre las secuencias de la proteína de la cápsida BCMV y otros potyvirus relacionados (tabla 11).

1	PWV-TB														
2	PWV-K	85,9													
3	WMV2-AUS	73,2	72,4												
4	WMV2-US	73,2	72,3	95,0											
5	SbMV-N	76,3	76,5	87,4	87,1										
6	PStV	76,2	77,3	74,2	74,0	77,7									
7	NL4	77,0	76,3	73,1	72,6	77,3	89,5								
8	J-8	77,7	77,3	73,8	73,7	78,0	91,3	90,7							
9	NL3	77,6	78,4	74,5	75,6	80,1	77,1	73,5	75,8						
10	NL8	77,2	78,0	74,5	75,6	80,1	77,1	74,0	75,8	98,6					
11	SAPV	72,9	71,8	74,5	74,9	73,3	73,7	72,9	73,7	78,4	78,8				
12	ZYMV	72,9	69,1	69,9	69,8	71,6	68,5	66,8	68,5	71,2	70,5	72,2			
13	BYMV	57,9	55,1	58,7	59,0	59,7	58,5	56,2	57,3	55,1	55,1	58,2	55,7		
14	CIYVV	55,2	52,8	55,7	54,9	58,1	56,2	55,1	56,2	54,6	54,6	57,0	54,2	70,3	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

**Tabla 13.** Porcentaje de similitud entre las secuencias de las regiones 3' no codificantes de BCMV y otros potyvirus relacionados (tabla 11).

1	NL3									
2	NL8	96,3								
3	NL4	70,9	70,9							
4	J-8	70,1	70,1	98,4						
5	SbMV-N	66,0	66,0	70,7	70,7					
6	WMV2	70,9	70,9	74,5	74,1	83,4				
7	BYMV	71,4	71,1	70,5	70,5	69,7	68,9			
8	CIYVV	69,6	70,9	67,9	67,2	65,5	67,8	83,1		
9	SAPV	74,1	72,6	62,8	62,0	59,0	62,5	69,4	70,4	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9

1989). Se realizó una comparación, a nivel de nucleótido, entre las 3' NCRs de los dos aislados de BCMV secuenciados y las de los potyvirus relacionados que infectan leguminosas disponibles (tabla 11), con el fin de comprobar si los valores obtenidos se mantenían en el rango de lo descrito para otros potyvirus. Los resultados, en forma de similitudes se recogen en la tabla 13.

## **8. ANALISIS FILOGENETICO DE BCMV**

Los datos de secuencia disponibles, tanto de BCMV como de potyvirus estrechamente relacionados que infectan leguminosas, fueron utilizados para la derivación de árboles filogenéticos, con el fin de discernir posibles relaciones evolutivas entre ellos, y aclarar en lo posible la controvertida posición de los aislados de BCMV en dicho grupo.

Los nombres de los virus empleados en este análisis, así como el origen de las secuencias utilizadas se recogen en la tabla 11.

Se utilizaron para este estudio dos regiones distintas pero contiguas en el genoma potyviral, la región 3' no codificante (3' NCR), y el gen de la proteína de la cápsida.

### **8.1. Aplicación del test de tasa de evolución desigual**

Para valorar si es adecuado asumir que las distancias genéticas entre las secuencias analizadas son ultramétricas (cada antecesor común es equidistante de todos sus descendientes), supuesto asumido en estudios filogenéticos previos (Rybicki y Shukla, 1992), y plantear así la metodología de análisis más apropiada, se aplicó el test de tasa de evolución desigual (Felsenstein, 1984). Se reconstruyó un árbol mediante el método de mínimos cuadrados (Fitch y Margoliash, 1967) bajo dos supuestos: a) las distancias son ultramétricas, y b) no lo son.

A continuación, se realizaron las sumas residuales de los cuadrados (SS), sin restricción (tabla 14, 1ª columna), o asumiendo que las distancias son ultramétricas (2ª columna). El cociente  $[SS(\text{reloj})-SS(\text{sin restricción})]/SS(\text{sin restricción})$  fue computado (3ª

**Tabla 14.** Aplicación del test de tasa de evolución desigual (Felsenstein, 1984). Los datos fueron ajustados por el método de mínimos cuadrados (Fitch & Margoliash, 1967) sin restricción, o asumiendo que las distancias son ultramétricas mediante los programas "FITCH and KITSCH" (PHYLIP package, Felsenstein, 1990). Las sumas de los cuadrados (SS) se computaron (primera y segunda columnas). En la tercera columna se muestra el cociente  $[SS(\text{reloj})-SS(\text{sin restricción})]/ SS(\text{sin restricción})$ .

	Sin restricción	Distancias ultramétricas	Cociente F	Valor crítico para P=0.05
<b>3' NCR</b>	0.108	0.570	F(6,15)=4.2685	2.79
<b>Cápsida</b>	0.272	0.945	F(11,55)=2.4805	1.95

columna). Este cociente debería, para las distancias ultramétricas, tener una distribución F con  $n-2$  y  $N-(2n-3)$  grados de libertad respectivamente. Los resultados del test (tabla 14) indican claramente que el cociente F está en la cola superior de su distribución (un 5%) para los dos grupos de secuencias, lo que demuestra que no se puede asumir que las distancias son ultramétricas para describir la evolución de este grupo de virus. Esto puede ser debido a que los virus no han evolucionado a una tasa constante, aunque la aplicación del test en virus RNA no implica necesariamente que no exista un reloj molecular, ya que, debido a sus elevadas tasas de evolución, pueden, simplemente, no ser contemporáneos (o ambas cosas). En cualquier caso, estos resultados sugieren que los métodos filogenéticos utilizados para reconstruir la evolución de estos virus no deberían asumir que las distancias son ultramétricas (ver Felsenstein, 1988 para discusión).

## **8.2. Derivación de árboles filogenéticos**

El método utilizado para la derivación de árboles filogenéticos fue el de "neighbour-joining" (Saitou y Nei, 1987), que no exige que las distancias sean ultramétricas, y es de los más eficientes (Sourdis y Nei, 1988).

Las comparaciones, en forma de distancias genéticas, obtenidas mediante el estimador de Jukes y Cantor (1969) en el caso de las secuencias nucleotídicas, y por el método de Kimura (1983) para las secuencias aminoacídicas, se muestran en las tablas 15 (3' NCRs), y 16 (cápsidas).

Algunos de los virus cuyas cápsidas se utilizan en la comparación, no son incluidos en el árbol de 3' NCRs, debido a la falta de disponibilidad de dichas secuencias.

El árbol inferido para catorce secuencias de proteínas de la cápsida de BCMV y potyvirus relacionados se muestra en la figura 20, y el árbol derivado para ocho secuencias disponibles de la región 3' no codificante, en la figura 21.

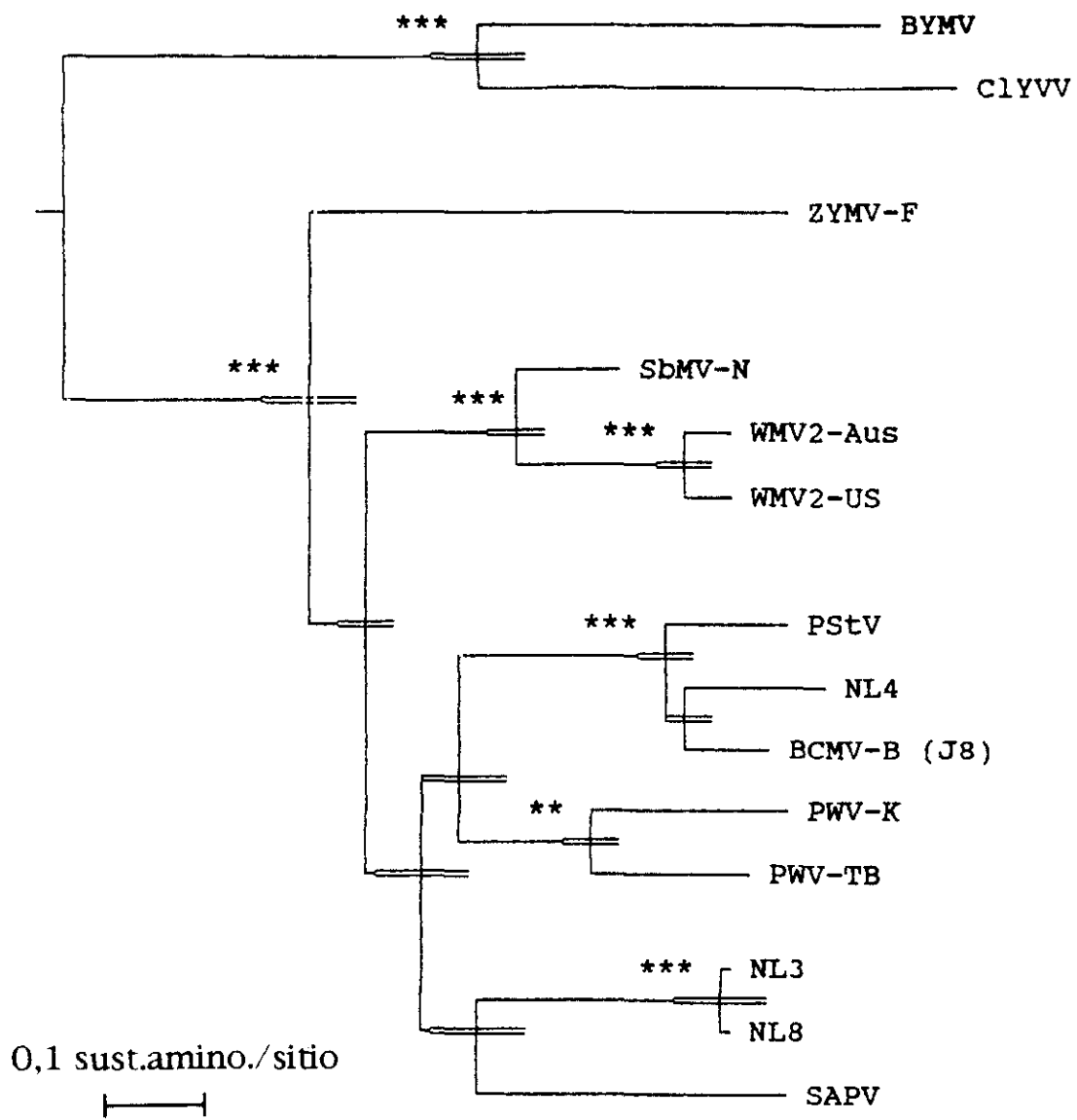
En los árboles inferidos, los nodos que no fueron significativos por el método clásico de Felsenstein (1985), tampoco lo fueron cuando se aplicó el análisis de error de la longitud de las ramas



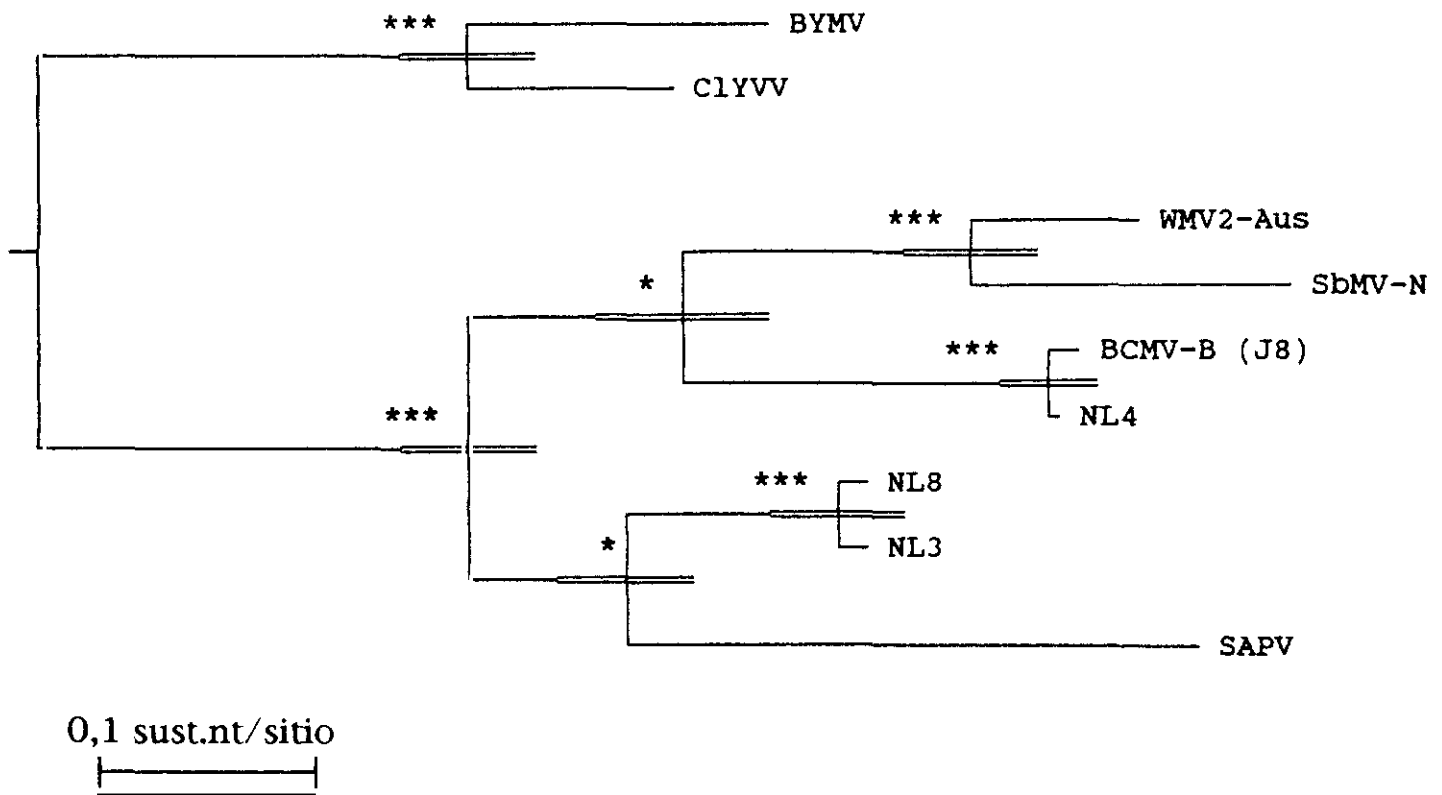


**Tabla 16.** Número de sustituciones aminoacídicas por sitio entre pares de secuencias de proteínas de la cápsida (Tabla 11) calculadas por el método de Kimura (1983).

1	PWV-TB														
2	PWV-K	0,152													
3	WMV2-AUS	0,312	0,323												
4	WMV2-US	0,312	0,325	0,051											
5	SbMV-N	0,271	0,268	0,135	0,138										
6	PStV	0,272	0,257	0,298	0,301	0,253									
7	NL4	0,262	0,271	0,313	0,320	0,258	0,110								
8	J-8	0,252	0,257	0,303	0,306	0,248	0,091	0,098							
9	NL3	0,254	0,243	0,294	0,279	0,222	0,260	0,308	0,277						
10	NL8	0,259	0,248	0,294	0,279	0,222	0,260	0,301	0,277	0,014					
11	SAPV	0,316	0,332	0,294	0,289	0,310	0,305	0,316	0,305	0,243	0,238				
12	ZYMV-F	0,317	0,370	0,358	0,360	0,334	0,378	0,404	0,378	0,339	0,350	0,326			
13	BYMV	0,546	0,596	0,533	0,527	0,516	0,537	0,576	0,556	0,597	0,596	0,541	0,585		
14	CIYVV	0,594	0,638	0,586	0,600	0,543	0,575	0,595	0,575	0,605	0,605	0,562	0,612	0,352	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14



**Figura 20.** Arbol filogenético derivado de las secuencias de la proteína de la cápsida de BCMV y de potyvirus relacionados (tabla 11). Las distancias verticales son arbitrarias. Las distancias horizontales representan el número de sustituciones por sitio a la escala indicada en la figura. La doble línea en los puntos de bifurcación representa la desviación estándar de la longitud de la rama correspondiente. \*\*\* indica que el punto de ramificación es significativo para  $\alpha < 0,001$  y \*\* para  $\alpha < 0,01$ . Los puntos de ramificación restantes no son significativos para  $\alpha < 0,05$ .



**Figura 21.** Arbol filogenético derivado de las secuencias nucleotídicas de las 3' NCRs de BCMV y de potyvirus relacionados (tabla 11). Las distancias verticales son arbitrarias. Las distancias horizontales representan el número de sustituciones nucleotídicas por sitio a la escala indicada en la figura. La doble línea en los puntos de bifurcación representa la desviación estándar de la longitud de la rama correspondiente. \*\*\* indica que el punto de ramificación es significativo para  $\alpha < 0,001$  y \* para  $\alpha < 0,05$ .

(Dopazo, 1993), es decir, en las ramas con errores de magnitud comparables a sus longitudes, el punto de ramificación localizado a su derecha en el árbol no fue significativo estadísticamente.

En el árbol que describe la evolución de las proteínas de la cápsida, se separan dos ramas principales, una de ellas incluyendo a BYMV y CIYVV, y la otra a los virus restantes (figura 20). El análisis estadístico permite dividir la otra rama en seis subgrupos bien definidos (ver figura 20): el primero, constituido exclusivamente por ZYMV-F, el segundo grupo englobando a SbmV-N y a los aislados de WMV2, en el que se aprecia una ramificación interna significativa para dar lugar a WMV2 Aus y US. El tercer grupo está constituido por los aislados de serotipo B de BCMV (NL4 y J-8) y por PStV. Un cuarto subgrupo engloba a las dos cepas de PWV. Las cepas de serotipo A de BCMV constituirían un quinto subgrupo independiente, y, por último, el recientemente descrito SAPV formaría otra rama independiente. La información contenida en la proteína de la cápsida no permitió resolver significativamente las ramas internas de esta segunda rama principal del árbol.

En el árbol inferido para las 3' NCRs (figura 21) se observa una topología similar a la obtenida para las proteínas de la cápsida, confirmando la identidad de los subgrupos. El análisis de esta región reveló además la existencia de dos parentescos estadísticamente significativos, no apreciables en el árbol inferido para las cápsidas: i) el existente entre WMV2, SbmV y los aislados de serotipo B de BCMV, y ii) la relación significativa entre los aislados de serotipo A de BCMV y SAPV, por lo que, al menos en el rango de distancias genéticas que caracteriza al grupo analizado, la 3' NCR mostró un mayor contenido informativo que la proteína de la cápsida.

## **9. DETECCION DE BCMV MEDIANTE TRANSCRIPCION INVERSA Y AMPLIFICACION ENZIMATICA**

Dada la falta de disponibilidad de anticuerpos comerciales específicos frente a BCMV y sus serotipos, y la complejidad de algunos perfiles serológicos obtenidos por ELISA, difícilmente interpretables, se desarrolló un método de detección diferencial de

los aislados de serotipo A y B mediante transcripción inversa y amplificación enzimática, utilizando la información de secuencia de los genes de la proteína de la cápsida y región 5' adyacente (gen N1b) de los aislados J-56 y J-8 de BCMV, y la información disponible a nivel de proteína de las cepas NL4 y NL8 de BCMV (Vetten *et al.*, 1992).

### 9.1. Diseño de cebadores específicos

El sistema de amplificación diseñado constó de tres cebadores:

El cebador C de 22 mer 5' AAATTCGAAGAAGTCCATACC 3', utilizado como cebador 3' antisentido, común en las reacciones de amplificación, tanto de aislados de serotipo A como B, que se corresponde con los nucleótidos 528-549 del gen de la proteína de la cápsida del aislado J-56, y los nucleótidos 541-562 del gen de la cápsida del aislado J-8, a excepción de dos nucleótidos desapareados (545 y 551) (figura 22). En el producto de la traducción del RNA viral, la secuencia complementaria al cebador C mapea en el "core" de la proteína (figura 23).

El cebador A de 21 mer, 5' GCCCAGCGGATAAAGACGTTG 3' diseñado para actuar como cebador 5' en la amplificación específica de aislados del serotipo A de BCMV, de secuencia idéntica al fragmento comprendido entre los residuos 65-85 del gen de la cápsida del aislado de serotipo A J-56 (figura 22). La secuencia correspondiente al cebador A en el producto de traducción mapea en la región N-terminal de la proteína de la cápsida, en la zona de mayor diferencia a nivel de secuencia entre las cápsidas de aislados de distinto serotipo (figura 23).

El cebador B, de 19 mer, de secuencia 5' GATGCGGAGAATCTGTGCA 3', correspondiente a la región comprendida entre los nucleótidos -26 y -8 respecto al gen de la proteína de la cápsida del aislado de serotipo B J-8 (figura 22). Este oligonucleótido se concibió como cebador 5' para la amplificación específica de los aislados de serotipo B. La secuencia correspondiente a este cebador, en el producto de traducción, mapea fuera de la cápsida, en la zona C-terminal de la proteína N1b, adyacente a la región de reconocimiento de la proteasa viral, con

0001 TTAATAAATGTTTAAATTTGATTCGTGATGATTAAGGTGTATGAAATCCGGTGTCAACACACAATCCAGCAAGAAA TAAGAGAGAAAA  
 0002 GAATTTTGGGTTTAA TAAGAGAGAGAAAATAAAGGCAAAAGGCCAGCGGATAAAGACGTTGGAGCTTTTAAAAAGGAAA  
 0003 AACTGATGCTAASATTTCAAGAAAATTAACAATAAGATGAATTTGCTATGTTTGGGCGGTAGGATGACTTAAACTTGGATC  
 0004 ACTTAATTTAAATATAAAAGGAGAGAGATTAATTTTACAAACACAAGAATACCAAAGGCAAAATTTGAAAATGATGGTAGCAA  
 0005 GGAGTCAAGACTCAATAACAATTTGATTAACAGCAAAATGGGAGTAGTAATGAATGGCTTCATGGTGT TTTGGCATCGATAA  
 0006 TGCAACATCTTCCGATGTGAATGGACGCTTGGTAATGATGGATGGAGATGAGCAAAATAGAAATACCCATTGAAGCCAAATGG  
 0007 TTTGAGAATGCAAAAGCTAGGTTGGGACAAATTTATGTCATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCTTATAATAAGATGAGGAAT  
 0008 TATGAAAGGGTCTTACATGCTAGGTAAGGACTTCTTGGGAATTTGATGGGATAAAAGCTTGGCTCGCTATGCAATTEGATTTT  
 0009 CTATGAAATTAATTCGAAAAAGCTTCAGACAAGCCAGAGAAAGCGGTTTCTCAGATGAAAGCGGAGGCTTTTCTAAAGTTA  
 0010 ACAGTAGATTGTTTGTCTAGATGCTAATTTGGCAACAACAGCCAGAACTACTGAAAGGCAACTGTAATGGGAGTCAAT  
 0011 TAAAAATGATTAATTTGGTTGGTATGATTTCTGTCGCACTAAAGGAGTGGGGCAACCCCTCTACAGTTAATCATCTGGGCT  
 0012 CGTTTATAGTTTTCTGATCTAGATAGTATTTTCTTAATTCAGTGTGCTTATACCACTTGTGTITATTAAGTTAGAGT  
 0013 GATTAATGCAATGATGATGATGCTATTTTCTTATGCAAGTAGGAGAGGCAATTCGCAAGCCGTAATTTGGTAGGCTGG  
 0014 TTTGATCATGATGGGCTGTCGAGGTTGGGCTATGAAATTTCTCT(A)<sub>n</sub>

(A)

0001 CTCTGACTAATAAGGTAGGATGCGGAGAATTTGTGCCTTACAATCAGGAAGTGGACAGCCACAGCCATTAATAGTAGATG  
 0002 CTGGTGTGGAATCTGGGAAAGACAAGAAAAGAAATAGCAACAAAGGAAAAGGACCCAGAAAAGCAGGGAATGGGAGGAAAC  
 0003 AAATAAGCTGTTGTCAGGGCAATTTGGCAATTAAGAGACAAGGATGTGAATGGAGGTTCCAAAAGGGAATTTCTTCTCTGGCT  
 0004 TCAAAAAGATCACAATAAAGCAATGAAATGTTTATGCTGAAAAGGGAATGTGATCTTAAATTTAGATCATTTCTGGACTACA  
 0005 AGCCAGAGCAAACTGATCTTTTTAACACAAAGCAACAAGATGCAATTTGAAATGTGGTACAATGTTTGAAGGCTGAG  
 0006 TATGAGATAGATGATGATCAGATGTCAAATTTGTAATGAACGGCTTTATGGTGTGGTGTATTGACAATGTTACTTCACCGGA  
 0007 TGTGAACGCTACTTGGATAATGATGGATGGAGATGAGCAAGTGGAAATACCCACTCAAACCAATGGTTTAAAAATGCAAAAC  
 0008 TAAAGCTCCGTAATAATCATGCACTATTTTTCAGATGCAAGCTGAAGCGTACATTGAGATGAGAAATTTCTGAGAGGCGTAT  
 0009 ATGGCTAGGTAAGGACTACTTCGGAAATTTGAGGGACAAAAAGCTAGCTGCTACGGCTTTTGATTTCTATGAAGTAACATC  
 0010 TAAAAATGATGATGAGCAAGGAGAGGCACTAGCAAGATGAAGGCAAGCCCTCAGCAAGCTTAGTAATGAAGTTGTTTGG  
 0011 GATTTGATGCTAAGCTGCAACAACAGGAGAAATACTGAAAGGCAACTGCAAGGCAAGTCAATCAAAAGTGCACACA  
 0012 TTTTCTGGTATGCTGCTTCCAGTAAATTTTATGTAANTGAAATGAGTATAGCACTCTGGGCTGGCTTAATAGTTTCATA  
 0013 TAGTAATCTCTTATGTTCTCTTATGCTTCAATGGGTTCTTAAGCTTTGTTGTTACTATTGTGATGCTTTGGTTGGTCCA  
 0014 CCAACATATTTGAGTATTTTATTTTTATTAAGTAAGCCGGAAGAACCATTTGCAATGGTGAAGGCACTGTAAGTGAATTTCA  
 0015 TCAAGGCTCATGAGTTAATCAAGGCAATTTTGTGCTTCC(A)<sub>n</sub>

(B)

**Figura 22. (A) Cebadores A y C sobre la secuencia de los 1084 nt 3' terminales del clon 54 del aislado J-56.**

**Cebador A:** 5' GCC CAG CGG ATA AAG ACG TTG 3'

**Cebador C:** 5' AAA TTC CGA AGA AGT CCA TAC C 3'

**(B) Cebadores B y C sobre la secuencia de los 1160 nt 3' terminales del clon 46 del aislado J-8.**

**Cebador B:** 5' GAT GCG GAG AAT CTG TGC A 3'

**Cebador C:** 5' AAA TTC CGA AGA AGT CCA TAC C 3'

**B** <-N1b CP->

```

001 FDYEVGCGES VHLQSGTGQP QPPIVDAGVD SGKDKKEKSN KGKDPEAREG AGNNNRGAGN
    ||      || |  ||      ||      | || ||  || |  |
001 FDSDEVEYES VSTQS  SK KEEKDA      GADKREK D KGKGP  A  A

059 SAMRDKDVNA GSKGKVVPR L QKITKRMNLP MVKGNVILNL DHLLDYKPEQ TDLFNTRATK
    |||| | ||||| |||| | || | |||| | ||| ||| | ||| |||||
039      DKDVGA GSKGKVVPR L QKITKMNLP MVGGRMILNL DHLIEYKPPQ TDLYNTRATK
    <----->

119 MQFEMWYNAV KAEYEIDDDQ MSIVMNGFMV WCIDNGTSPD VNGTWIMMDG DEQVEYPLKP
    ||| || || | | ||| || | | ||||| ||||| ||| | |||| | ||| |||||
095 AQFERWYEAV KTEYELDDQQ MGVMNGFMV WCIDNGTSPD VNGVWVMMDG DEQIEYPLKP
                                     C
179 MVENAKPTLR QIMHHFSDAA EAYIEMRNSE RPYMPRYGLL RNLRDKNLAR YAFDFYEVTS
    ||||| ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
155 MVENAKPTLR QVMHHFSDAA EAYIEMRNSE GFYMPRYGLL RNLRDKSLAR YAFDFYEVNS
    <----->

241 KTSDRAREAV AQMKAAALSN VSSKLFGLDG NVATTSENTE RHTARDVNQN MHTLLGMGPP
    ||||| ||||| ||||| | | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || |||||
215 KTSDRAREAV AQMKAAALAN VNTRLFGLDG NVATTSENTE RHTARDVNQN MHHLLGMTSG

301 Q
    |
275 Q

```

**Figura 23.** Localización orientativa en las proteínas deducidas para los aislados J-8 (superior) y J-56 (inferior) de la secuencia de los cebadores A, B y C.

grandes diferencias a nivel de secuencia entre aislados de distinto serotipo (figura 23).

Los oligonucleótidos A, B y C fueron analizados con la ayuda del programa OLIGO <sup>TM</sup>, siendo el producto de amplificación esperado con los cebadores A y C de 484 pb, y de 652 pb con B y C.

## **9.2. Amplificación de aislados de serotipo A y B de BCMV**

El análisis por electroforesis en geles de agarosa, del 15-25% del volumen de las reacciones de amplificación de los ensayos de RT-PCR y de PCR-INIA, realizados según se describe en Materiales y Métodos, con la pareja de cebadores A/C mostró la presencia de una banda del tamaño esperado (484 pb) en las muestras de hoja de judías infectadas por aislados del serotipo A de BCMV (figura 24). No se obtuvo banda alguna en los controles de planta sana ni en las muestras de plantas infectadas por aislados de serotipo B (figura 24). Con los cebadores A/C se amplificó, igualmente, un aislado de la cepa NL8 (CIAT), así como diversos aislados de serotipo A recogidos en distintas zonas de España (figura 24).

En algunos ensayos de RT-PCR, directamente en el extracto vegetal, con el par de cebadores A/C, a partir de muestras infectadas con BCMV de serotipo A, se observaron algunas bandas adicionales a la esperada, siempre mayoritaria, también de origen viral (figuras 29 A y 29 B).

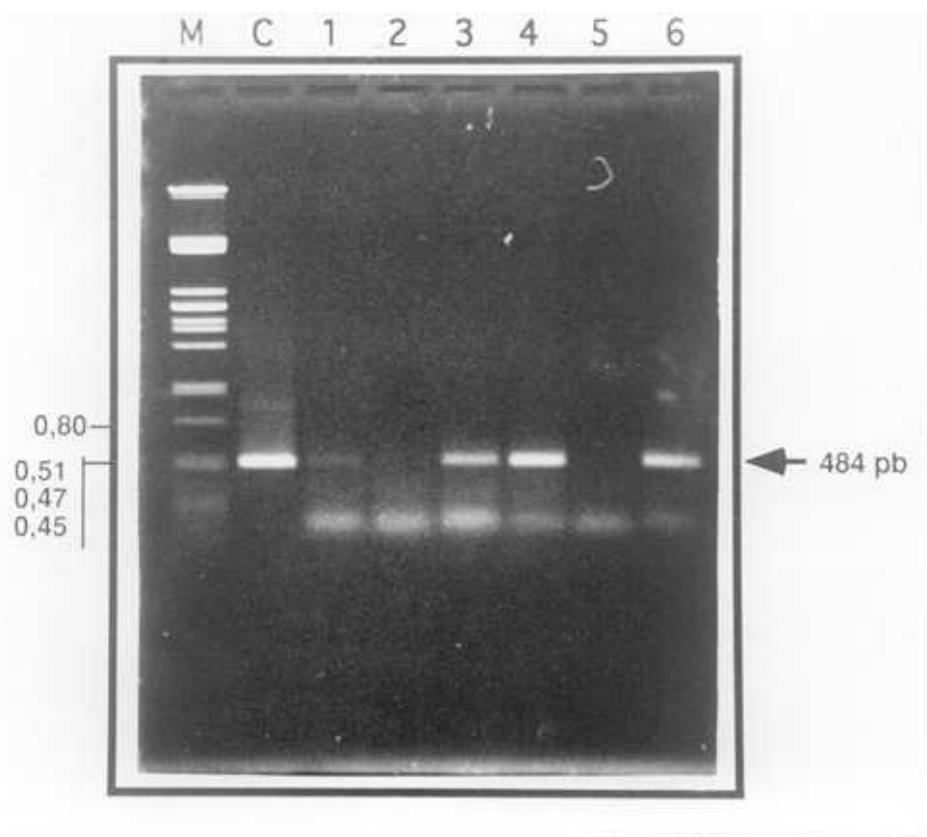
Con el par de cebadores B/C se realizaron ensayos de PCR en las mismas condiciones, con muestras de hoja de judías infectadas con aislados de serotipo B de BCMV. El único producto de amplificación observable fue una banda de migración equivalente al tamaño de DNA esperado (652 pb). No se produjo amplificación en ningún caso a partir de muestras infectadas por aislados de serotipo A ni de los controles sanos (figura 25).

Entre las muestras amplificadas con los cebadores B/C se encuentran diferentes aislados recogidos en distintas zonas de España (figura 25 A), aislados de las cepas NL4, Fla y NY15 y un aislado italiano de BCMV (ver Materiales y Métodos). En el caso de NY15 se observó una banda adicional de tamaño inferior al esperado (figura 25 B).

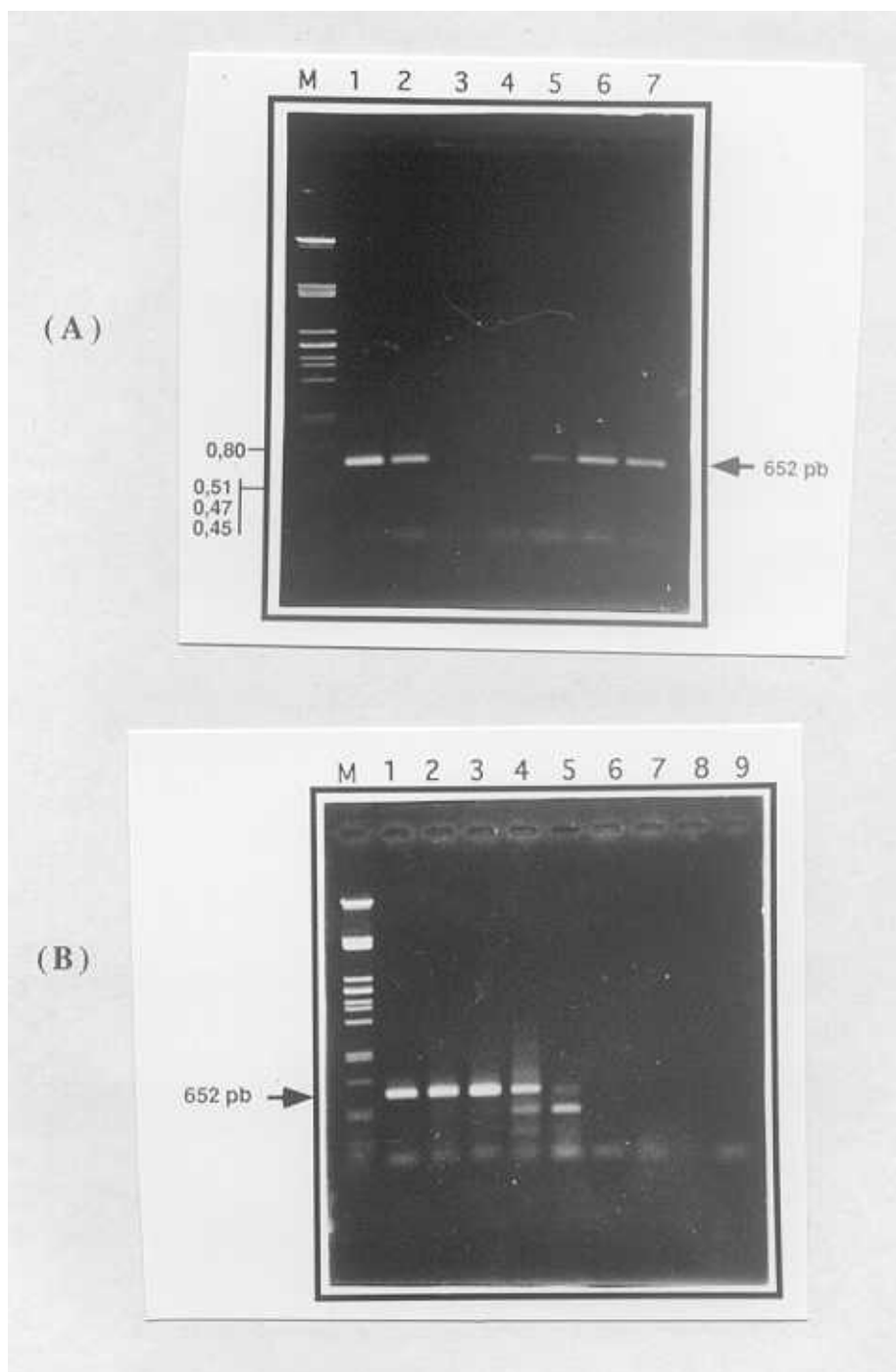


EXTRACTO DE HOJA					EXTRACTO DE SEMILLA				
ELISA	RT-PCR		PCR-INIA		ELISA	RT-PCR		PCR-INIA	
	A/C	B/C	A/C	B/C		A/C	B/C	A/C	B/C
10 <sup>-5</sup> (1 µg)	10 <sup>-10</sup> (1 pg)	10 <sup>-11</sup> (0,1 pg)	10 <sup>-10</sup> (10 pg)	10 <sup>-8</sup> (1 ng)	10 <sup>-4</sup> (10 µg)	10 <sup>-7</sup> (1 ng)	10 <sup>-6</sup> (10 ng)	10 <sup>-9</sup> (100 pg)	10 <sup>-7</sup> (10 ng)

**Tabla 17.** Límite de dilución y cantidad mínima de material infectado detectable con todos los extractos, protocolos y cebadores ensayados.



**Figura 24.** Electroforesis en agarosa al 1% de los productos de amplificación, con los cebadores A/C, mediante RT-PCR y PCR-INIA, de las siguientes muestras: 1. BCMV NL8, PCR-INIA; 2. Judía sana, PCR-INIA; 3. Aislado J-56 (NL3), PCR-INIA; 4. Aislado J-86 de serotipo A de Pontevedra, PCR-INIA; 5. Aislado J-8 de serotipo B, PCR-INIA. 6. Aislado J-56 (NL3), RT-PCR. M: DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Pst* I (Kpb). C: clon 54 linearizado sometido a amplificación con los cebadores A/C.



**Figura 25.** Electroforesis en agarosa al 1% de los productos de amplificación, con los cebadores B/C, mediante RT-PCR y PCR-INIA, de las muestras: (A) 1. Aislado J-8, RT-PCR; 2. Aislado J-8, PCR-INIA; 3. judía sana, RT-PCR; 4. Aislado J-56 (NL3) de serotipo A, PCR-INIA; 5. Aislado J-70 de serotipo B de Pontevedra, PCR-INIA; 6. Aislado J-224 de serotipo B de Alava, PCR-INIA; 7. Aislado J-41 de serotipo B de León, PCR-INIA. (B) Amplificación por PCR-INIA de: 1. Aislado italiano de BCMV (serotipo B); 2. BCMV NL4; 3. BCMV Fla; 4. PStV; 5. BCMV NY15; 6. BYMV; 7. PWV; 8. WMV 2; 9. CIYVV. M: DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Pst* I (Kpb).

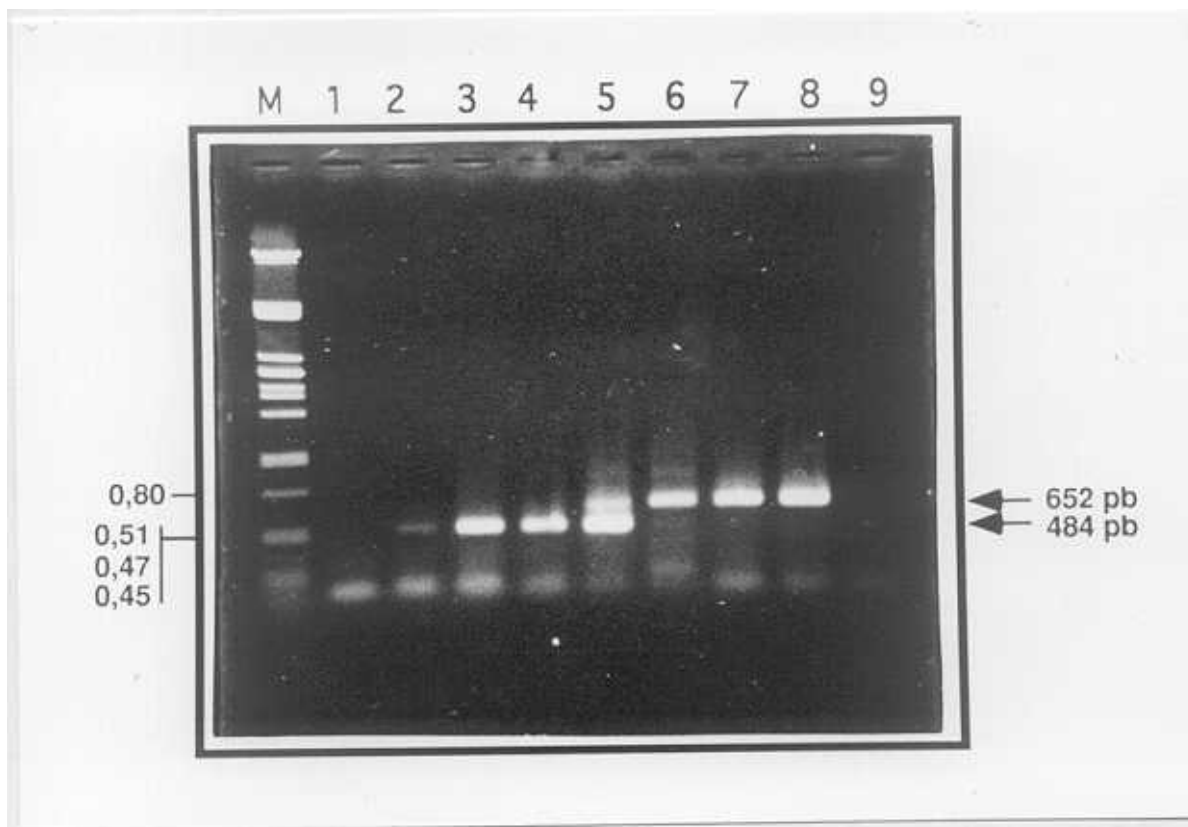
Algunos potyvirus estrechamente relacionados con los aislados de serotipo B de BCMV (Rybicki y Shukla, 1992; Sáiz *et al.*, 1993) se incluyeron en las reacciones de PCR (ver Materiales y Métodos), en las mismas condiciones, no obteniéndose ningún producto de amplificación con BYMV, PWV, WMV 2, ni CIYVV. En el caso de PStV se observó la banda esperada de 652 pb, así como una serie de bandas adicionales. La amplificación en este último confirma el alto grado de parentesco entre PStV y los aislados de serotipo B de BCMV (Rybicki y Shukla, 1992; Sáiz *et al.*, 1993).

Mediante el grupo de cebadores descrito anteriormente, se consiguió la amplificación de aislados de serotipo A y B de BCMV a partir de lotes de semillas infectados procedentes del País Vasco (ver Materiales y Métodos). Para estos ensayos, la harina de las semillas (en grupos de 5 a 10), trituradas en seco, fue resuspendida y diluida en el tampón apropiado (según se tratase de RT-PCR o de PCR-INIA), siguiéndose el mismo protocolo de transcripción inversa y amplificación que para las muestras de hoja. En la figura 26 se observan las bandas obtenidas, equivalentes a las observadas con muestras de hoja.

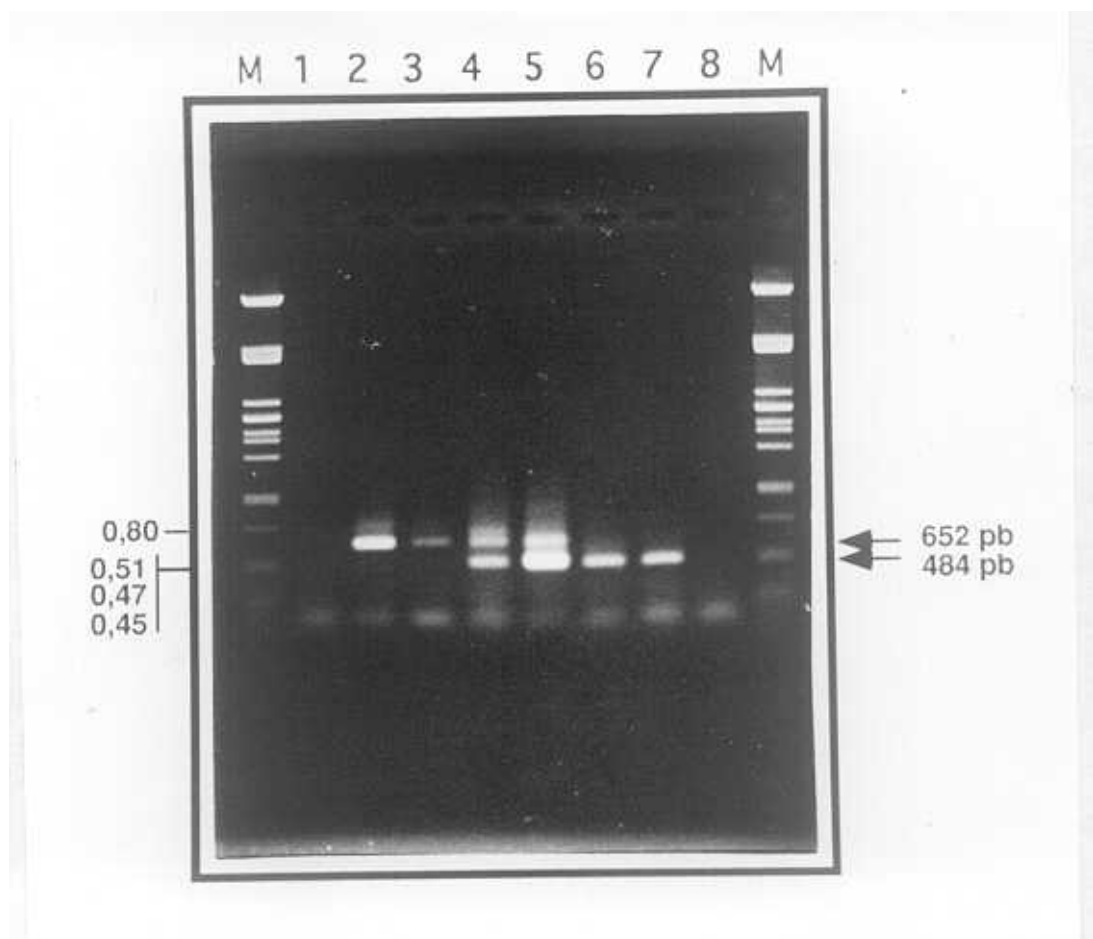
Para simplificar la determinación de los serotipos de BCMV presentes en una muestra, se realizaron reacciones mixtas con los cebadores A/B/C para conseguir la amplificación de aislados de los serotipos A y B en un único ensayo, utilizando una mezcla de muestras de distinto serotipo, tanto de hoja como de semilla. Cada muestra, por separado, fue sometida, como control, a la reacción de amplificación con los cebadores específicos de su serotipo. Las bandas observadas como producto de amplificación se corresponden con los tamaños esperados (652 y 484 pb), y su migración es equivalente a la de las bandas obtenidas en las reacciones de amplificación independiente de cada una de las muestras con los cebadores A/C y B/C (figuras 26 y 27).

### **9.3. Especificidad de los productos de amplificación**

La especificidad de los productos de amplificación se comprobó mediante hibridación tipo "Southern", usando como sonda, en el caso de los aislados de serotipo A el fragmento KX54



**Figura 26.** Electroforesis en agarosa al 1% de los productos de amplificación de muestras de harina de distintos lotes de semilla procedentes del País Vasco. 1. Semillas libres de virus, cebadores A/C, PCR-INIA; 2. Muestra de hoja infectada con el aislado J-56 (NL3), cebadores A/C, RT-PCR; 3. Semillas del lote S90 (infectado con BCMV serotipo A), cebadores A/C, PCR-INIA; 4. Semillas del lote S86 (infectado con BCMV serotipo A), cebadores A/C, PCR-INIA; 5. Mezcla de harinas de semillas de los lotes S86 y S98 (infectado con BCMV serotipo B), cebadores A/B/C, PCR-INIA; 6. Semillas del lote S98, cebadores B/C, RT-PCR; 7. Semillas del lote S99 (infectado con BCMV serotipo B), PCR-INIA; 8. Muestra de hoja infectada con el aislado J-8, cebadores B/C, RT-PCR; 9. Semillas libres de virus, cebadores A/C, RT-PCR. M: DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Pst* I (Kpb).



**Figura 27.** Electroforesis en agarosa al 1% de los productos de amplificación de las siguientes muestras: 1. Hoja de judía sana, cebadores A/B/C, RT-PCR; 2. Semillas del lote S99 (infectado con BCMV serotipo B), cebadores A/B/C, PCR-INIA; 3. Aislado J-8 (muestra de hoja), cebadores B/C, RT-PCR; 4. Mezcla de muestras de hoja de los aislados J-8 (serotipo B) y J-56 (serotipo A), cebadores A/B/C, PCR-INIA; 5. Mezcla de harinas de los lotes de semillas S86 (infectado con BCMV serotipo A) y S99 (infectado con BCMV serotipo B), cebadores A/B/C, PCR-INIA; 6. Aislado J-56 (muestra de hoja), cebadores A/C, RT-PCR; 7. Semillas del lote S86 (infectado con BCMV serotipo A), cebadores A/B/C, PCR-INIA; 8. Semillas libres de virus, cebadores A/B/C, RT-PCR. M: DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Pst* I (Kpb).

(figura 28) marcado con digoxigenina. En la figura 29 se observa que la sonda hibridó con las bandas cuya movilidad correspondía a la del tamaño esperado (484 pb), e incluso con las bandas adicionales obtenidas en algunos ensayos de RT-PCR, sin apreciarse señal alguna en los carriles correspondientes a las muestras sanas.

Usando como sonda el fragmento BS46 (figura 30) marcado con digoxigenina se comprobó la especificidad de los productos de amplificación de los cebadores B/C (aislados de serotipo B) (figura 31). En este caso tampoco se observó señal en los controles sanos, pero sí en las bandas de tamaño esperado (652 pb).

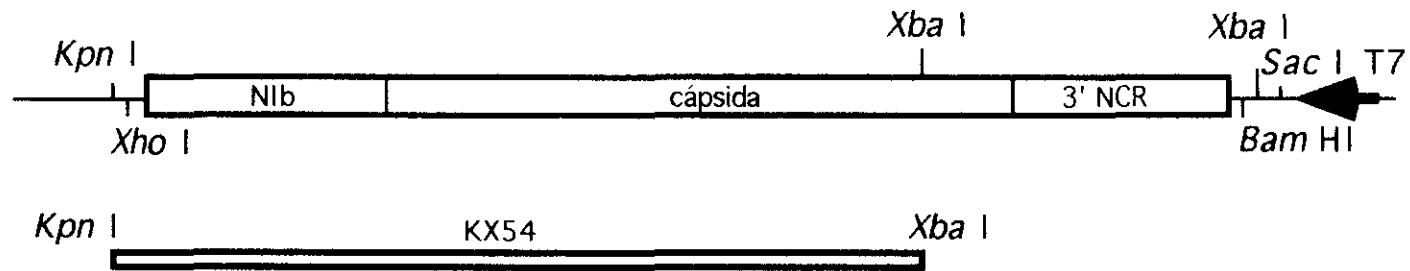
#### **9.4. Sensibilidad de los ensayos**

Para determinar el límite de detección en los ensayos de amplificación enzimática, se realizaron diluciones seriadas del extracto vegetal de hoja o de semillas de judía infectadas con BCMV. Se escogieron para ello muestras de distinto serotipo con valores de absorbancia similares en ELISA.

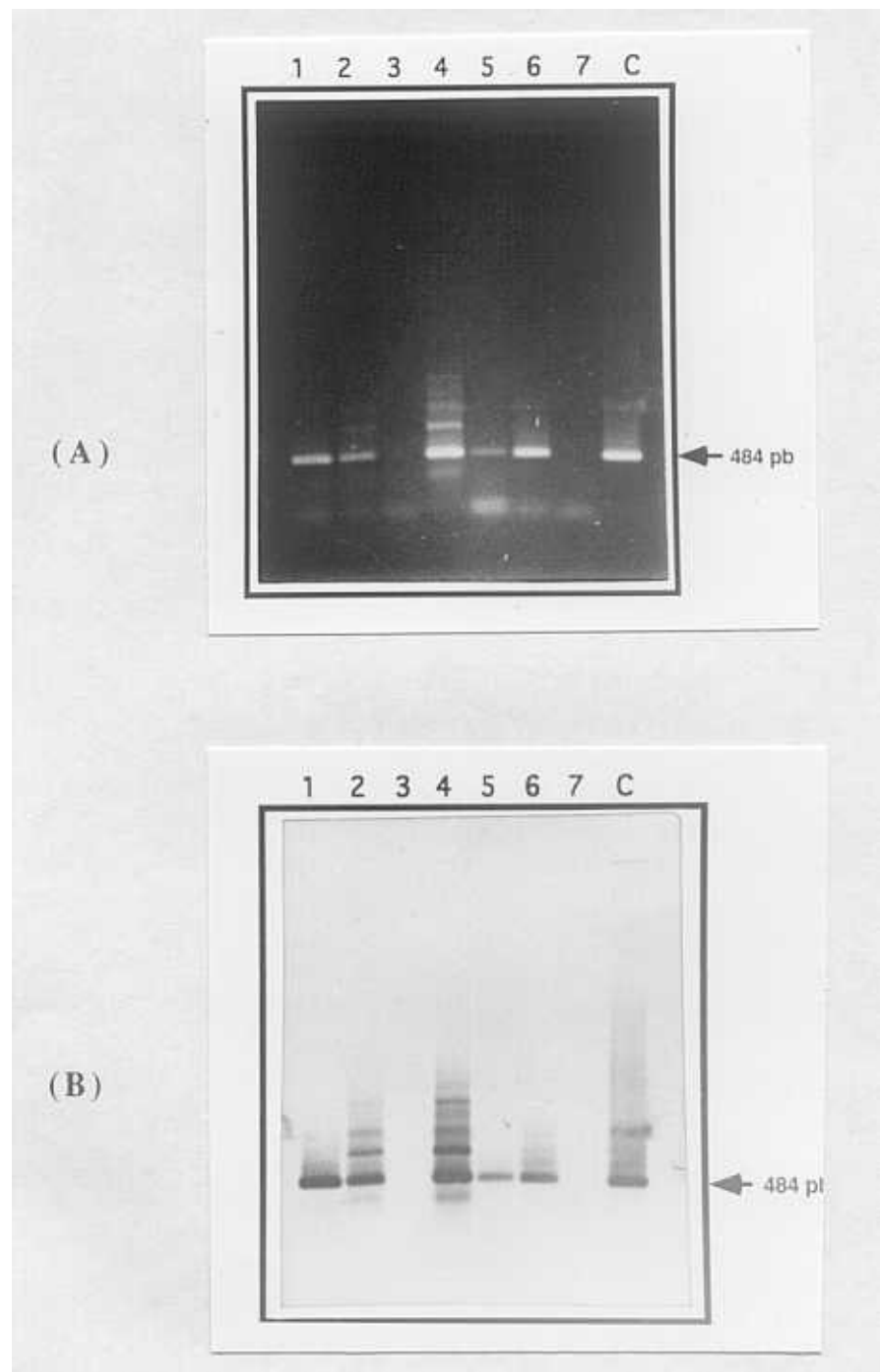
En el sistema diseñado, las diluciones mínimas de los extractos vegetales para conseguir amplificación mediante RT-PCR, que conlleva la presencia de elementos inhibidores de la hibridación presentes en estos durante todo el proceso (Maule *et al.*, 1983; Borja y Ponz, 1992), fueron 1/100 para hoja y 1/1000 para semilla.

Los resultados de las comparaciones obtenidos para las parejas de cebadores A/C y B/C mediante RT-PCR y PCR-INIA se muestran en la tabla 17. Con el par de cebadores A/C se llegó a detectar el virus a la dilución  $10^{-10}$  (p/v) de hoja infectada, obteniéndose el mismo resultado en PCR-INIA y RT-PCR, lo que equivale a 10 pg de material infectado en el primer caso, y a 1 pg en el segundo. Con muestras de semilla se llegó a detectar 1 ng de material infectado mediante RT-PCR y 100 pg por PCR-INIA (figura 32).

Con la pareja de cebadores B/C se llegó a amplificar aislados de serotipo B a partir de hoja hasta la dilución  $10^{-8}$ (p/v) por PCR-INIA y  $10^{-11}$  mediante RT-PCR (figura 33), valor este último equivalente a 0,1 pg de material infectado. A partir de semilla la

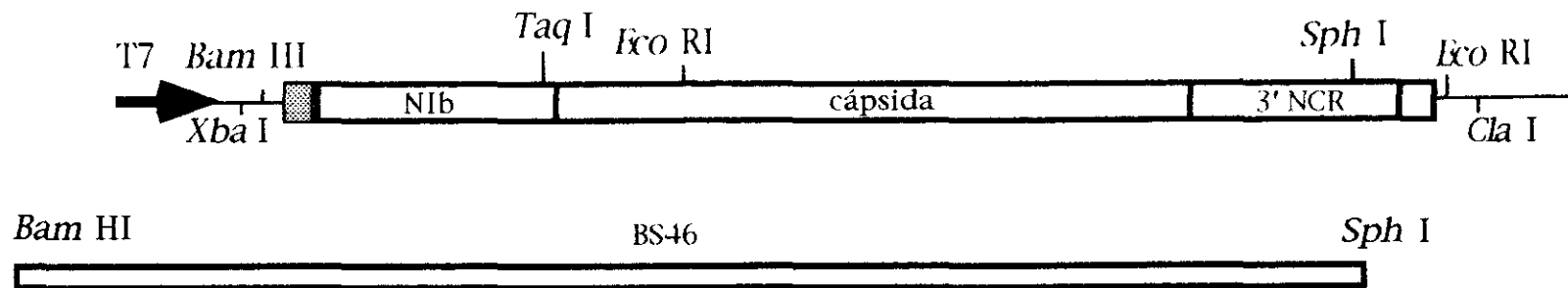



**Figura 28.** El fragmento KX54 de 1 Kpb se obtuvo por digestión del clon 54 con *Kpn* I y *Xba* I, delecionándose así del inserto un fragmento de 377 pb correspondiente al extremo 3' del RNA viral (cola de poli (A), 3' NCR y los 161 nt 3' terminales del gen de la cápsida). KX54 contiene también un fragmento del gen N1b. Escala: 1 cm= 100pb.

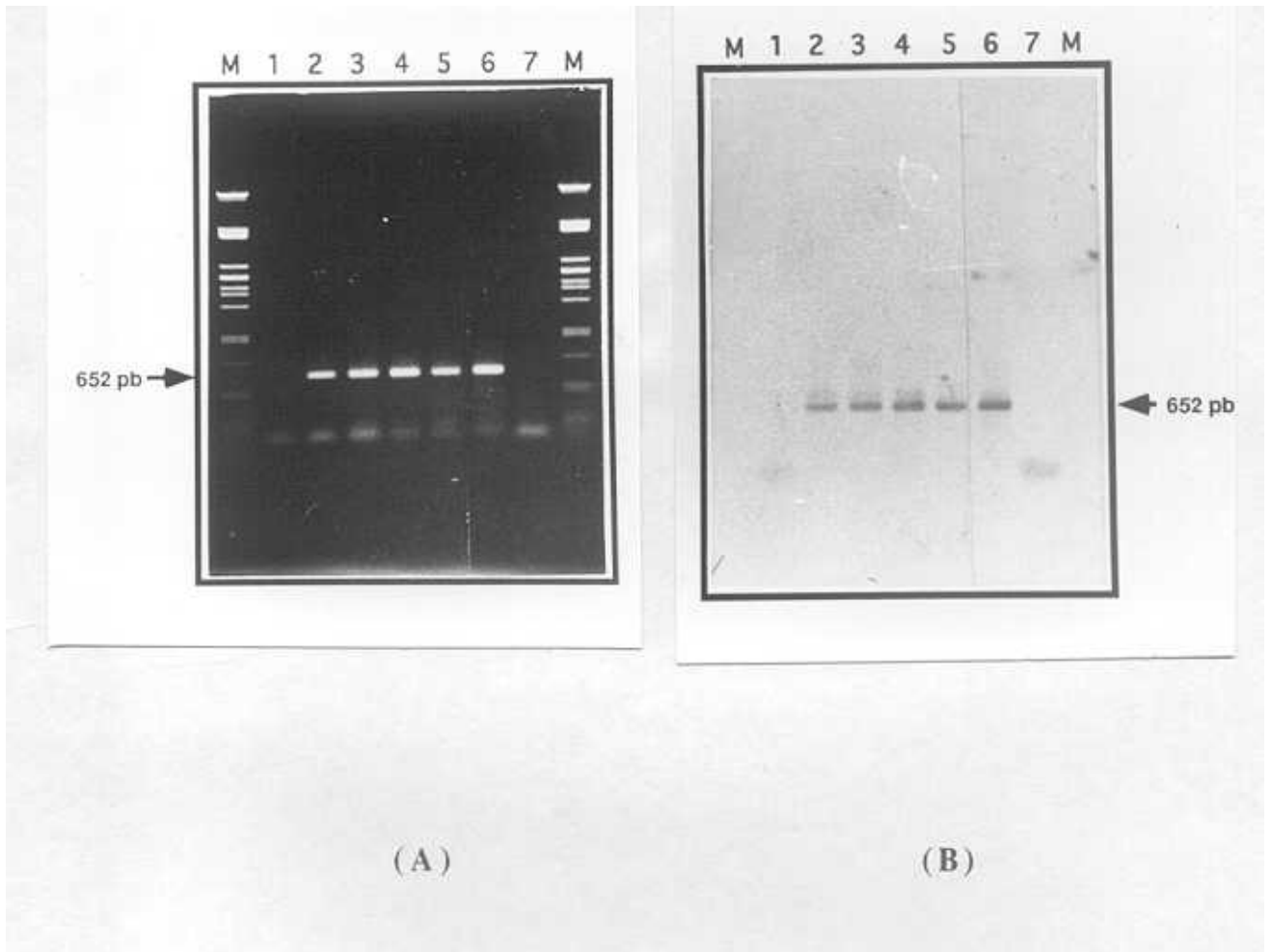


**Figura 29.** (A) Electroforesis en agarosa al 1% de los productos de amplificación con la pareja de cebadores A/C de las muestras: 1. Aislado J-56, PCR-INIA; 2. Aislado J-56, RT-PCR; 3. Judía sana, PCR-INIA; 4. Semillas del lote S90 (infectado con BCMV serotipo A), RT-PCR; 5. Semillas del lote S90, PCR-INIA; 6. Semillas del lote S86 (infectado con BCMV serotipo A), PCR-INIA; 7. Semillas libres de virus, RT-PCR. C: clon 54 linearizado y sometido a amplificación. (B) Hibridación tipo "Southern" de los productos de amplificación transferidos del gel A a una membrana de nylon, con la sonda KX54 marcada con digoxigenina.





**Figura 30.** El fragmento BS46 de aproximadamente 1,9 Kpb procede de la digestión del clon 46 con *Bam* HI y *Sph* I. Se liberan también un fragmento *Bam* HI de 0,8 Kpb y un fragmento *Sph* I que contiene la cola de poli (A) y los 57 nt 3' terminales de la 3' NCR. BS46 contiene, por tanto, parte del gen NIB, el gen de la proteína de la cápsida y la 3' NCR excepto los 57 nt 3' terminales. Escala: 1 cm= 100 pb.  continuación del clon fuera de escala.



**Figura 31.** (A) Electroforesis en agarosa al 1% de los productos de amplificación con la pareja de cebadores B/C de las muestras: 1. Judía sana, RT-PCR; 2. Aislado J-8, PCR-INIA; 3. Aislado J-70 de Pontevedra, RT-PCR; 4. Semillas del lote S99 (infectado con BCMV serotipo B), PCR-INIA; 5. Semillas del lote S98 (infectado con BCMV serotipo B), RT-PCR-; 6. BCMV NL4; 7. Semillas libres de virus, PCR-INIA. M: DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Pst* I (Kpb). (B) Hibridación tipo "Southern" de los productos de amplificación transferidos del gel A a una membrana de nylon, con la sonda BS46 marcada con digoxigenina.

cantidad mínima de material infectado detectable fue de 10 ng en ambos casos.

En experimentos de ELISA paralelos con el monoclonal anti-potyvirus (anti-PTY), utilizado a igual concentración que en la fase de inmunocaptura de PCR-INIA, el límite de dilución de los extractos de hoja y de semilla infectados por BCMV (ambos serotipos), fue de  $10^{-5}$ (p/v) y  $10^{-4}$  respectivamente, lo que equivale a 1 µg de hoja y a 10 µg de harina.



**Figura 32.** Electroforesis en agarosa al 1% de los productos de amplificación, a partir de muestras de semilla del lote S90 a distintas diluciones, mediante PCR-INIA, con el par de cebadores A/C. 1. Dilución  $10^{-3}$  (p/v) 2. Harina de semillas libres de virus a la dilución  $10^{-3}$ ; 3.  $10^{-9}$ ; 4.  $10^{-8}$ ; 5.  $10^{-7}$ ; 6.  $10^{-10}$ . M: DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Pst* I (Kpb).



**Figura 33.** Electroforesis en agarosa al 1% de los productos de amplificación, a partir de muestras de hoja del aislado J-8 a distintas diluciones, mediante RT-PCR, con el par de cebadores B/C. 1. Dilución 10<sup>-2</sup> (p/v); 2. 10<sup>-4</sup>; 3. 10<sup>-6</sup>; 4. 10<sup>-10</sup>; 5. 10<sup>-11</sup>; 6. Judía sana a la dilución 10<sup>-2</sup>. M: DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Pst* I (Kpb).

## *DISCUSSION*

## V. DISCUSION

### 1. Estudio epidemiológico de BCMV

El virus del mosaico común de la judía (BCMV) es considerado como uno de los patógenos más comunes e importantes que afectan al cultivo de judía a nivel mundial, ya que su distribución abarca los cinco continentes, y su dispersión se ve favorecida por su elevado porcentaje de transmisión por semilla (Morales y Bos, 1988).

Tomlinson (1987) lo consideró, en cuanto a importancia por pérdidas económicas, como el segundo en Italia y Portugal, el tercero en Suecia, y el cuarto en China, en un estudio en cultivos hortícolas en 28 países o regiones con clima templado.

En España, a pesar de la constante presencia en campo de síntomas similares a los descritos para BCMV, así como las importantes disminuciones de rendimiento en la cosecha atribuidas por los agricultores a estos síndromes, no se había realizado de manera sistemática un estudio de diagnóstico viral en muestras de judía, que confirmara la presencia de BCMV en campo.

Los resultados del estudio epidemiológico realizado en diversas zonas productoras de once provincias españolas, revela la elevada incidencia de infecciones producidas por potyvirus (75% de las muestras analizadas) en el cultivo de judía, siendo BCMV el potyvirus más frecuente, ya que el 81,5% de las muestras infectadas por potyvirus lo fueron por BCMV. La presencia de otros virus, como CMV fue detectada en algunas de las muestras analizadas, y en ocasiones, produciendo infecciones mixtas con BCMV (ver anexo 1), mientras que sólo se identificó un aislado de BYMV en un cultivar de judía de verdeo en la provincia de Madrid. En algunas muestras procedentes de Almería se detectaron infecciones por el virus del bronceado del tomate (TSWV).

Los aislados de BCMV han sido tradicionalmente agrupados en dos serotipos, que engloban, por un lado, a las cepas inductoras de necrosis en cultivares con el gen *I* de necrosis (serotipo A), y por otro, a las cepas inductoras de mosaico (serotipo B). En este trabajo, se ha realizado la caracterización serológica de los aislados de BCMV

identificados en las muestras de campo, y es importante destacar la presencia de aislados de serotipo A, descrita por primera vez en España, en cuatro de las once provincias en las que se tomaron muestras. La incidencia de este tipo de cepas parece ser muy inferior a la de los aislados serotipo B. Sin considerar las posibles infecciones mixtas, un 8% de los aislados de BCMV identificados pertenecieron al serotipo A, frente al 84% de los aislados de serotipo B. El 8% restante estuvo constituido por muestras que reaccionaron frente a los dos monoclonales A y B específicos, pudiendo tratarse de infecciones mixtas por aislados de los dos serotipos.

La diversidad de los perfiles serológicos obtenidos pone de manifiesto la complejidad intrínseca a los hasta ahora denominados aislados de serotipo A y B de BCMV. En función de su comportamiento en ELISA, un 6% de las muestras analizadas puede considerarse formado por infecciones producidas por potyvirus relacionados en mayor o menor grado con BCMV, ya que reaccionaron positivamente frente a los anticuerpos policlonales y/o al monoclonal de amplio espectro de BCMV. Por otra parte, están descritas reacciones del anticuerpo monoclonal de amplio espectro para BCMV bc-197 frente a PStV, AzMV, BICMV y CABMV, y del monoclonal serotipo B-específico 15E5 frente a los tres primeros (Mink y Silbernagel, 1992), lo que dificulta la identificación específica mediante ensayos serológicos, de los aislados de serotipo B en sentido estricto, ya que estos potyvirus estrechamente relacionados están entre los miembros del propuesto subgrupo de BCMV (Dijkstra y Khan, 1992; McKern *et al.*, 1992), que en un futuro próximo quizá englobe a todos estos potyvirus bajo la denominación común de un único virus o subgrupo de virus.

La problemática interpretación de los análisis serológicos utilizando exclusivamente anticuerpos policlonales en el caso de los potyvirus (Shukla *et al.*, 1988b) se hace patente en los resultados de este trabajo: el 58% de las muestras de serotipo A fueron reconocidas en ELISA por el policlonal B-específico, y el 29% de las muestras de serotipo B por el policlonal A-específico. Aunque no se descarta que, asignando los serotipos a las muestras exclusivamente en función de las reacciones frente a los monoclonales específicos,



se esté perdiendo alguna muestra con epítomos no reconocibles por el monoclonal específico, la diferenciación de serotipos basada en las reacciones frente a policlonales se excluye claramente, así como la ya de por sí compleja diferenciación de aislados de serotipo B frente a potyvirus relacionados.

La caracterización biológica de aislados de BCMV puede tener un interés práctico en programas de mejora genética clásica, que facilite la elección, entre los genes de resistencia descritos, de aquellos a introducir en las líneas de interés, en función de las cepas del virus presentes en cada zona. Un estudio epidemiológico amplio debería ser una labor previa al abordaje de líneas de selección y mejora, ya que de otra forma, la resistencia conseguida podría verse vencida en poco tiempo por las cepas presentes en la región, sin tener en cuenta la posible introducción de nuevos aislados.

El sistema propuesto por Drijfhout (1978), aceptado internacionalmente (Drijfhout *et al.*, 1978), diferencia cepas según su comportamiento frente a once grupos de cultivares de *Phaseolus vulgaris* con distintos genotipos de resistencia para BCMV. Este sistema puede presentar un gran número de indeterminaciones en el caso de infecciones mixtas por más de una cepa, llegándose a situaciones difícilmente interpretables, o simplemente, escapes por enmascaramiento de unas cepas con otras (ver tabla 2). Por otra parte, no es extraño encontrar en la literatura referencias acerca de aislados de BCMV con comportamientos atípicos al ser inoculados sobre el grupo de cultivares indicadores (Silbernagel *et al.*, 1986; Mattos y Fernández, 1987), difícilmente asignables a alguna de las cepas, o bien produciendo síntomas distintos a los descritos en algunos grupos. Sólo ha de considerarse, por tanto, como un sistema indicativo, y en ningún caso cerrado, para la clasificación de cepas del virus.

Los datos de caracterización biológica de aislados de BCMV obtenidos en este trabajo muestran que NL3 podría ser la cepa de serotipo A prevalente en las regiones muestreadas, ya que los cinco aislados caracterizados, procedentes de dos provincias distintas, mostraron un comportamiento idéntico al descrito para esta cepa (Drijfhout *et al.*, 1978). En cuanto al serotipo B, los cuatro aislados

analizados fueron identificados como cepas NL4 y US5 (Fla). Dada la limitación numérica de este ensayo biológico, no se descarta en absoluto la presencia de otras cepas del virus en los aislados de campo españoles, aunque sí sorprende la baja representación de las al menos diez cepas distintas descritas para el virus. Cabe pensar en un fenómeno de competencia o colonización de una o un pequeño número de cepas del virus en una zona concreta, aunque la confirmación de esta hipótesis requeriría la caracterización de un número más elevado de aislados procedentes de cada una de las zonas estudiadas.

En resumen, la elevada presencia de los dos grandes grupos de cepas de BCMV en los campos de judía españoles, hace necesario el planteamiento de unas normas estrictas de circulación de material vegetal libre de virus, especialmente semillas, ya que es sabido que la infección por BCMV de lotes de semilla constituye un inóculo primario en los campos, que posteriormete es dispersado por los áfidos vectores de manera no persistente (Klein *et al.*, 1989), siendo también frecuente la introducción, a través de semillas infectadas, de nuevas cepas del virus en zonas donde se habían introducido por mejora genes de resistencia frente a las cepas "domésticas" del virus, produciéndose pérdidas económicas importantes (Providenti *et al.*, 1984).

La aplicación de los métodos de diagnóstico disponibles, así como el desarrollo de nuevas técnicas más sensibles, han de ser objetivos importantes en el control de este potyvirus, así como el abordaje biotecnológico que permita la generación de nuevas formas de resistencia.

## **2. Secuenciación del gen de la cápsida y región 3' no codificante de dos aislados de distinto serotipo de BCMV**

La falta de información molecular suficiente para aportar nueva luz en la aparente complejidad existente entre los aislados de serotipo A y B de BCMV, así como el abrir nuevas vías que permitieran el desarrollo de estrategias de control, hizo especialmente interesante el proyecto de secuenciación parcial de

un aislado perteneciente a cada serotipo. Se secuenciaron los extremos 3' de los RNAs genómicos de los aislados J-8 de serotipo B, de Valladolid, y del aislado J-56 (cepa NL3), de León, abarcando el gen de la proteína de la cápsida y la región 3' no codificante (3' NCR).

El gen de la proteína de la cápsida ha sido hasta el momento el de mayor peso en la clasificación taxonómica de potyvirus (Ward y Shukla, 1991; Ward *et al.*, 1992). Shukla y Ward (1988) observaron, comparando las secuencias aminoacídicas de las cápsidas de 17 cepas de 8 potyvirus distintos, que la similitud de secuencia se ajustaba a una distribución bimodal, con similitudes comprendidas entre 38-71% para distintos potyvirus, con la mayor variabilidad concentrada en el extremo N-terminal de la proteína, y de un 90-99% para cepas del mismo potyvirus.

El grado de similitud encontrado entre las proteínas de la cápsida de J-8 y NL3 fue de un 76%, similar al 74% obtenido para las cepas NL4 (serotipo B) y NL8 (serotipo A) secuenciadas por Vetten *et al.* (1992), lo que representa unos valores intermedios entre los propuestos para cepas y para virus distintos. Estos últimos autores lanzaron la primera propuesta para considerar a las cepas englobadas en los dos serotipos como dos potyvirus independientes.

En cuanto al grado de identidad existente entre cápsidas de aislados del mismo serotipo, se obtuvo un 90,7% para los aislados de serotipo B, J-8 y NL4, y un 98,6% para los de serotipo A de las cepas NL3 y NL8. Estos valores parecen indicar que la proteína de la cápsida de los aislados de BCMV-A está muy conservada, produciéndose sólo dos sustituciones aminoacídicas a lo largo de toda la proteína. Este último dato fue también observado por McKern *et al.* (1992), mediante el estudio de perfiles de HPLC.

Los valores de similitud existentes entre las cápsidas de los dos aislados de serotipo B, J-8 y NL4 (90,7%), plantean el problema de estar en el límite de los valores propuestos, ya que se considera un 90% de identidad como el mínimo para ser considerados cepas del mismo potyvirus. La cápsida en estos aislados no parece estar muy conservada, especialmente observando el extremo N-terminal de la proteína, donde mapea el 71% de las sustituciones.

Es de destacar el elevado grado de identidad observado entre J-8 y PStV (91,3%), similar, e incluso ligeramente superior al existente entre J-8 y NL4 (90,7%), y entre NL4 y PStV (89,5%), sugiriendo la reconsideración de PStV como una cepa de BCMV. Una vez más, se pone de manifiesto la complejidad implícita a los tradicionalmente considerados como aislados de serotipo B de BCMV.

Con respecto a la región 3' NCR, Frenkel *et al.* (1989), comparando las secuencias de 13 cepas de 7 potyvirus distintos, observaron similitudes comprendidas entre 83-99% para cepas del mismo virus, y entre 39-53% para virus distintos. Los valores obtenidos en este trabajo para los aislados de distinto serotipo secuenciados (J-8 y NL3) fue de un 70%, similar al 71% encontrado para los aislados de las cepas NL4 y NL8 (Vetten *et al.*, 1992). Nuevamente, estos valores caen en una zona intermedia entre los propuestos para cepas y para virus distintos, mientras que analizando las 3' NCRs de aislados del mismo serotipo, se obtienen valores mucho más altos, tanto en el caso de J-8 y NL4, con un 98,4% de identidad, como en el de NL3 y NL8, con un 96,3%. Este último resultado parece indicar que la 3' NCR está bastante conservada entre aislados del mismo serotipo, incluso en los de serotipo B, a diferencia de lo observado para la cápsida.

La información molecular de este grupo de virus, pone de manifiesto que el sistema y criterios de clasificación de potyvirus y sus cepas no son aplicables en muchos casos de manera directa, atendiendo a los valores de similitudes de la proteína de la cápsida y 3' NCR. Frenkel *et al.* (1991) encontraron una inesperada diversidad en la secuencia del extremo N-terminal de la cápsida de dos cepas del virus del mosaico de la caña de azúcar, SCMV (SCMV-SC y MDMV-B), de manera que, considerando la proteína completa, la identidad de secuencia entre ellos era del 77%, situándolas claramente como virus distintos, mientras que si se prescindía de la zona altamente variable, de 44 y 59 residuos respectivamente, el valor obtenido era del 92%, asignable a cepas del mismo potyvirus. No parece acertado, por tanto, considerar estos valores de similitud de una manera absoluta para la asignación de parentescos, siendo preciso un análisis más detallado de la distribución de las

diferencias, y no descartándose, a medida que vaya siendo disponible la información de secuencia de un mayor número de potyvirus, como se pone de manifiesto en los resultados de este trabajo, la existencia de valores claramente intermedios entre los propuestos, no ajustables directamente a la distribución bimodal (Shukla y Ward, 1988).

En resumen, la compleja interpretación de los valores obtenidos, indica que la clasificación de aislados de este virus requiere un estudio comparativo más amplio, como el que se propone a continuación, introduciendo en el análisis otros potyvirus estrechamente relacionados, e intentando establecer un marco evolutivo y taxonómico en el que las relaciones de los aislados de BCMV queden mejor definidas.

### **3. Análisis filogenético de BCMV**

La inferencia de relaciones filogenéticas a partir de datos moleculares requiere la aplicación de una metodología apropiada de entre todas las técnicas descritas. La extrapolación directa de los métodos aplicados a organismos eucarióticos al caso de los virus cuyo genoma es RNA ha conducido a una serie de errores conceptuales, implícitos a los planteamientos del análisis, como es el caso de asumir la existencia del equivalente a un reloj molecular en la evolución de los virus (Rybicki y Shukla, 1992). El supuesto anterior implica que la tasa de evolución de los individuos analizados ha sido constante, y las diferencias en las fechas de aislamiento despreciables, y que, por tanto, las distancias genéticas existentes entre ellos tienen propiedades ultramétricas, es decir, que cada antecesor común es equidistante de todos sus descendientes.

En el caso de los virus RNA, a diferencia de los organismos eucariotas, dadas sus elevadas tasas de evolución (Domingo y Holland, 1988), incluso en caso de existir un reloj molecular, las distancias podrían no ser ultramétricas por el mero hecho de que los aislados no fueran contemporáneos.

El considerar que las distancias genéticas son ultramétricas, o no, conlleva grandes diferencias en la metodología a aplicar en el análisis filogenético, por lo que, en el caso de las secuencias de la proteína de la cápsida y 3' NCRs de BCMV y los potyvirus que infectan leguminosas más relacionados, se realizó previamente el test de tasa de evolución desigual ("inequality rate test") (Felsenstein, 1984), cuyo resultado indica claramente que no se puede asumir que las distancias genéticas existentes entre las secuencias analizadas sean ultramétricas. Este resultado descarta la aplicación de métodos de reconstrucción filogenética de la familia del UPGMA (Sokal y Rolfh, 1981), escogiéndose para la derivación de árboles filogenéticos el método de "neighbour-joining" (Saitou y Nei, 1987) por su eficiencia (Sourdis y Nei, 1988).

Otro punto de discusión es la aplicación del análisis estadístico en la reconstrucción filogenética, que permite evaluar la fiabilidad de los árboles inferidos y la significación de cada uno de los nodos de éste, estableciéndose así un entorno de parentescos estable, en el que se puede situar un nuevo aislado de manera rápida y fiable (Felsenstein, 1988).

En el estudio filogenético realizado en este trabajo, se incluyeron las secuencias de los dos aislados españoles de BCMV secuenciados, los dos secuenciados por Vetten *et al.* (1992), y 10 aislados de potyvirus que infectan leguminosas, considerados como relacionados con BCMV.

En el árbol inferido para las proteínas de la cápsida se aprecian dos grandes líneas: una de ellas constituida por BYMV y CIYVV, y otra, que comprende al resto de los aislados. Dentro de esta segunda línea, los aislados de serotipo B de BCMV formarían un grupo aparte, junto con PStV, e independiente del grupo constituido por las cepas de serotipo A. La información contenida en la cápsida no permitió, si embargo, resolver significativamente el orden de ramificación de las sublíneas.

En el árbol inferido para las 3' NCRs disponibles se observó una topología similar al de las cápsidas, confirmándose así la identidad de los grupos, y revelando la existencia de dos relaciones de parentesco, no apreciables en el árbol de las proteínas de la cápsida, que eran estadísticamente significativas: la existente entre

WMV 2, SbMV y los aislados de serotipo B, por un lado, y, por otro, la de las cepas del serotipo A con el recientemente descrito SAPV, con el que constituyen una línea independiente.

La región 3' NCR de los potyvirus ha sido considerada de utilidad para resolver parentescos entre cepas del mismo potyvirus (Frenkel *et al.*, 1991), e incluso se han establecido subgrupos en base a la presencia de secuencias consenso en esta zona (Uyeda 1992). Rodríguez Cerezo *et al.* (1991) describieron que una inserción de 58 nt en una estructura tipo tallo-bucle ("stem-loop") en la 3' NCR del virus del moteado de los nervios del tabaco (TVMV) atenuaba la expresión de síntomas, localizando de este modo un determinante de gravedad de síntomas en esta región del genoma. Por otra parte, Van Der Vlugt *et al.* (1993), realizando un análisis de estructura secundaria de RNA de las 3' NCRs de 12 aislados de PVY, encontraron cuatro estructuras tipo tallo-bucle en las que las secuencias de los bucles daban un agrupamiento similar al obtenido comparando sus cápsidas y sus 3' NCRs completas, sugiriendo una significación biológica para estos elementos estructurales. A pesar de su todavía muy desconocido, pero claramente importante papel en el ciclo biológico del virus, esta zona ha sido considerada irrelevante para establecer parentescos entre potyvirus distintos (Frenkel *et al.*, 1991; Rybicki y Shukla, 1992). Los resultados obtenidos en el análisis de las 3' NCRs de BCMV y potyvirus relacionados pone de manifiesto una situación muy distinta: al menos en el rango de las distancias genéticas que caracterizan al grupo analizado, la región 3' no codificante mostró un contenido informativo mayor que la proteína de la cápsida, sugiriendo para esta zona del genoma un papel de mayor relevancia en los estudios filogenéticos y, por tanto, de mayor utilidad en los criterios taxonómicos aplicables a potyvirus.

La complejidad evidente en las interrelaciones de los aislados y cepas de BCMV con los potyvirus de leguminosas analizados, y el hecho de que filogenéticamente los aislados de distinto serotipo estén más próximos a otros virus que entre sí, hace necesaria una revisión en profundidad de la posición taxonómica de dichos aislados. Parece razonable la propuesta de considerarlos en conjunto como un subgrupo (Dijkstra y Khan, 1992) en el que habría que

definir las entidades consideradas como virus independientes, y donde claramente coexistirían al menos dos potyvirus distintos, incluyendo a los aislados de serotipo A y B de BCMV respectivamente.

#### **4. Detección de BCMV mediante transcripción inversa y amplificación enzimática**

La tecnología asociada a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1985) ha sido extensivamente aplicada como método de amplificación "in vitro" de genomas virales, tanto constituidos por DNA (Rybicki y Hughes, 1990; Pasamontes *et al.*, 1991; Soler *et al.*, 1991), como por RNA, en cuyo caso se introduce un paso previo de transcripción inversa (RT-PCR) (Vunsh 1990; Jones 1991; Korschineck *et al.*, 1991; Nicolas y Laliberté, 1991; Robertson *et al.*, 1991). Un método de amplificación de amplio espectro de potyvirus mediante cebadores degenerados fue descrito por Langeveld *et al.* (1991).

Kohnen *et al.* (1992) desarrollaron el primer sistema de detección específica por PCR de un virus transmisible por semilla, en concreto del patotipo P1 del virus del mosaico del guisante transmitido por semilla (PSbMV), a partir de extractos de hojas, raíces, pétalos, polen y distintas partes de la semilla. En este trabajo, un resultado sorprendente fue la amplificación a partir de extractos de ejes embrionarios de semillas procedentes de plantas infectadas, pero no de las testas o cubiertas seminales, que eran positivos en ELISA.

En un sistema tan complejo y heterogéneo como es el de los aislados virales clásicamente considerados como serotipos A y B de BCMV, resultaba especialmente sugerente el desarrollo de un sistema específico de amplificación diferencial de ambos grupos, teniendo en cuenta, además, la difícil interpretación del comportamiento serológico de los aislados de serotipo B debido a las numerosas reacciones cruzadas en ELISA con otros aislados potyvirales estrechamente relacionados.



Por otro lado, el disponer de un método sensible de detección de este virus, que permitiese la identificación específica en lotes de semilla, proporcionaría una herramienta eficaz en su control epidemiológico.

En este trabajo, mediante un sistema constituido por tres cebadores (A, B y C), se ha conseguido la amplificación diferencial de los dos grupos de aislados, a partir de muestras de hoja y semilla, así como la amplificación simultánea de aislados de ambos serotipos en un único ensayo.

La metodología aplicada a los ensayos de amplificación enzimática no conlleva ningún tipo de extracción de ácidos nucleicos previa, y está basada en : a) realización de la transcripción inversa y PCR directamente en el extracto vegetal de hoja o semilla (referido en este trabajo como RT-PCR), siguiendo básicamente el protocolo descrito por Borja y Ponz (1992); b) la inmunocaptura previa de las partículas virales por adsorción a un soporte sólido mediante anticuerpos específicos (PCR-INIA, Nolasco *et al.*, 1993).

La comparación de las técnicas de detección utilizadas es un tema delicado, ya que, en el caso de ELISA frente a PCR, se trata de la detección de proteínas virales, y de ácidos nucleicos en el segundo caso. Incluso entre los dos protocolos de PCR utilizados existe una diferencia importante, que es la introducción de un anticuerpo en uno de ellos, cuyas características y concentración pueden ser variables adicionales. Resulta indicativo, no obstante, realizar una visión global e integrada de los resultados, con el fin de valorar la "aplicabilidad" de cada una de las técnicas, partiendo de la premisa de que todas ellas tienen validez por sí mismas, y pueden ser utilizadas de manera reproducible y fiable en el diagnóstico de virus.

La cantidad mínima de material infectado detectable varió en función del protocolo seguido, de la combinación de cebadores, y del tipo de extracto (tabla 17). Con la pareja de cebadores A/C se llegó a detectar 1 pg de material vegetal infectado procedente de hoja, sin apreciarse diferencias en cuanto al protocolo de amplificación seguido. Sin embargo, tratándose de extractos de semillas infectadas, se observó una diferencia de dos órdenes de magnitud a favor del método que conlleva inmunocaptura (PCR-INIA). Este

resultado se repitió en el caso de los cebadores B/C, aunque la diferencia fue algo menor, de un orden de magnitud. Sin embargo, los ensayos de RT-PCR con los cebadores B/C a partir de muestras de hoja, resultaron ser tres órdenes de magnitud más sensibles que los paralelos de PCR-INIA, lo que supone el límite máximo de detección alcanzado, una dilución  $10^{-11}$ , equivalente a 0,1 pg de material vegetal, valor muy inferior a los 60  $\mu\text{g}$  de material infectado por el virus del cascabeleo del tabaco (TRV) detectados por Robinson (1992), o a los 4 mg de tejido de vid infectada con el virus del entrenudo corto infeccioso de la vid (GFLV) detectados por Rowhani *et al.* (1993).

Los niveles de detección obtenidos por ELISA fueron siempre muy inferiores a los alcanzados mediante PCR, siendo de 1  $\mu\text{g}$  y de 10  $\mu\text{g}$  de material infectado, según se tratara de hoja o semilla respectivamente. Estos valores suponen dos órdenes de magnitud de diferencia para semilla, con respecto al límite más bajo obtenido por PCR, y de cinco con respecto al más alto. En el caso de muestras de hoja, las diferencias oscilan entre tres y seis órdenes de magnitud.

El hecho de que los niveles de detección de BCMV en semilla fueran siempre considerablemente inferiores a los conseguidos en planta es compatible, por un lado, con la posible presencia de polifenoles en estos extractos, y por otro, con el bajo título viral generalmente existente en semilla. Wang *et al.* (1985) encontraron que la distribución del antígeno viral de BCMV era muy errática dentro de las distintas partes de la semilla, y podría no estar asociada en alguna de ellas, como en el caso de PSbMV (Kohnen *et al.*, 1992), a la presencia de RNA amplificable por PCR. Puede tratarse, por tanto, de un efecto conjunto, ya que la detectabilidad en semilla mediante PCR-INIA, es decir, con inmunocaptura previa del virus, siempre fue mayor que en los ensayos directos en el extracto vegetal íntegro.

La amplificación de PStV mediante los cebadores B y C, combinación diseñada para la amplificación de los aislados de BCMV-B, confirma el alto grado de parentesco existente entre ellos, puesto de manifiesto también en estudios serológicos (Mink y Silbernagel, 1992) y filogenéticos (Rybicki y Shukla, 1992; Sáiz *et*

*al.*, 1993). La zona 5' adyacente a la región de reconocimiento de la proteasa NIa de PStV no pudo ser analizada durante el diseño del cebador B al no ser disponible dicha secuencia, siendo predecible una similitud de secuencia elevada entre ellos en esta zona, conservada entre los aislados de serotipo B de BCMV, pero con grandes diferencias respecto a otros potyvirus.

## ANEXO A LA DISCUSION

## ANEXO A LA DISCUSION

En el ejemplar del mes de octubre del volumen 74 de *Journal of General Virology*, Khan *et al.* (1993) publicaron la secuencia del gen de la proteína de la cápsida y 3' NCR de tres aislados de BCMV y uno de BICMV. Los aislados de BCMV pertenecen a las cepas NL1, NL3 y NY15, y el de BICMV a la cepa W. En este trabajo, la comparación de dichas secuencias revela una similitud en la proteína de la cápsida comprendida entre 94-97%, y de un 93-96% entre sus 3' NCRs. Por el contrario, la cápsida de NL3 mostró similitudes del 87-89% con NL1, NY15 y W, y su 3' NCR de 56-63%. Estos valores les conducen a concluir que NL1, NY15 y W han de ser considerados cepas del mismo virus, mientras que NL3 es una cepa de un potyvirus distinto.

El aislado secuenciado por nosotros de la cepa NL3 muestra una similitud del 97,7% a nivel de aminoácido con el secuenciado por Khan *et al.* (1993), con tres sustituciones en el extremo N-terminal de la proteína. Se confirma de nuevo el alto grado de conservación de la cápsida en los aislados considerados clásicamente de serotipo A de BCMV.

Respecto a los aislados de serotipo B, el nivel de identidad es del 95% entre J-8 y NL1, y también entre J-8 y NY15, ligeramente superior al 91% de similitud entre J-8 y la cepa NL4 secuenciada por Vetten *et al.* (1992). La similitud entre J-8 y la cepa W de BICMV es del 94,7%. Los valores entre aislados de distinto grupo fueron similares a los descritos, oscilando entre el 76-85%.

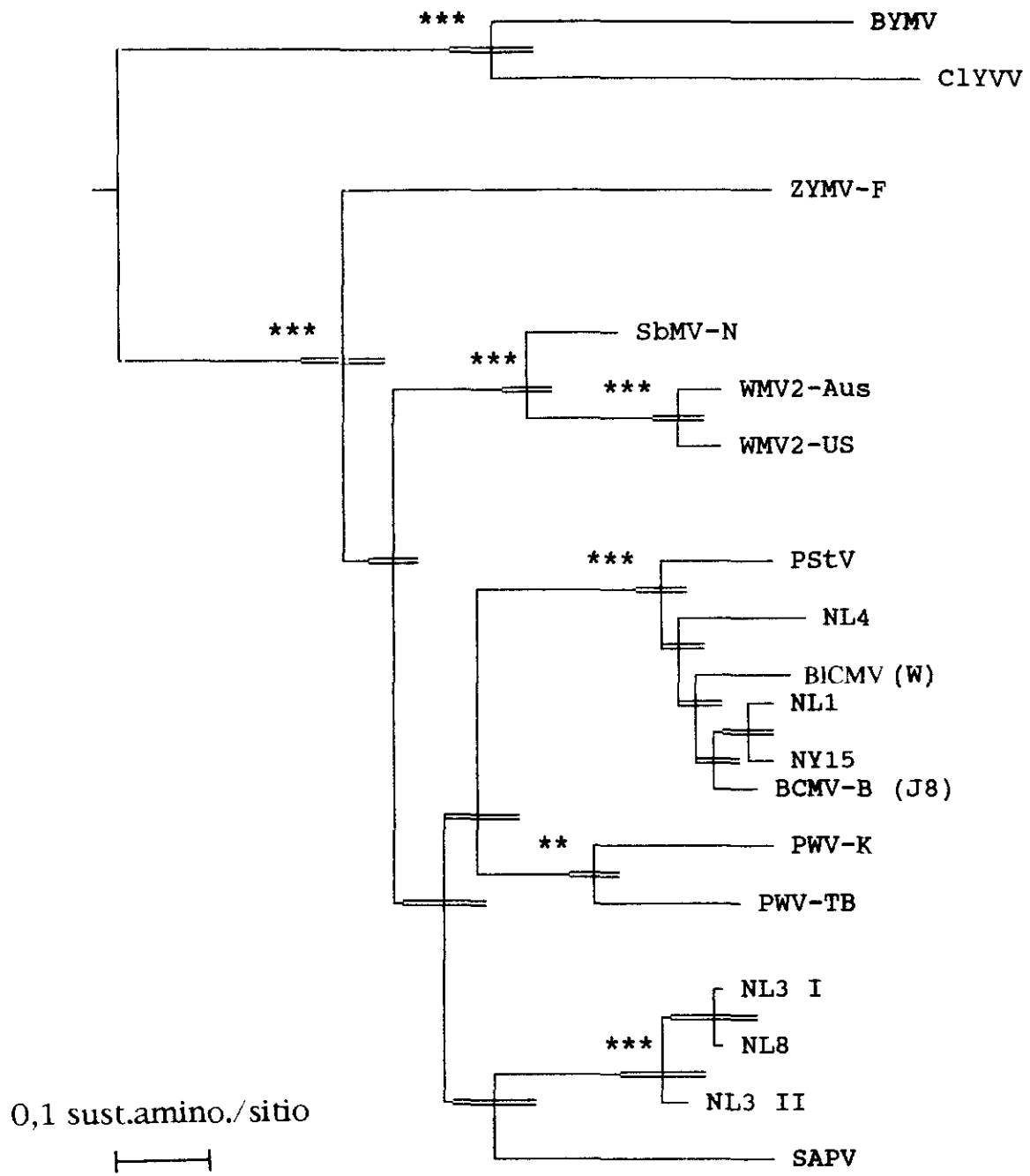
En cuanto a la 3' NCR, la identidad entre los dos aislados de NL3 es del 97,5%, y la existente entre el aislado J-8 y NL1, NY15 y W oscila entre 96,5-98%. Entre los aislados de distinto grupo, la similitud fue del 70,5-72%.

La posición filogenética que ocuparían los nuevos aislados secuenciados por Khan *et al.* (1993) respecto a los analizados en este estudio se muestra en las figuras 34 y 35.

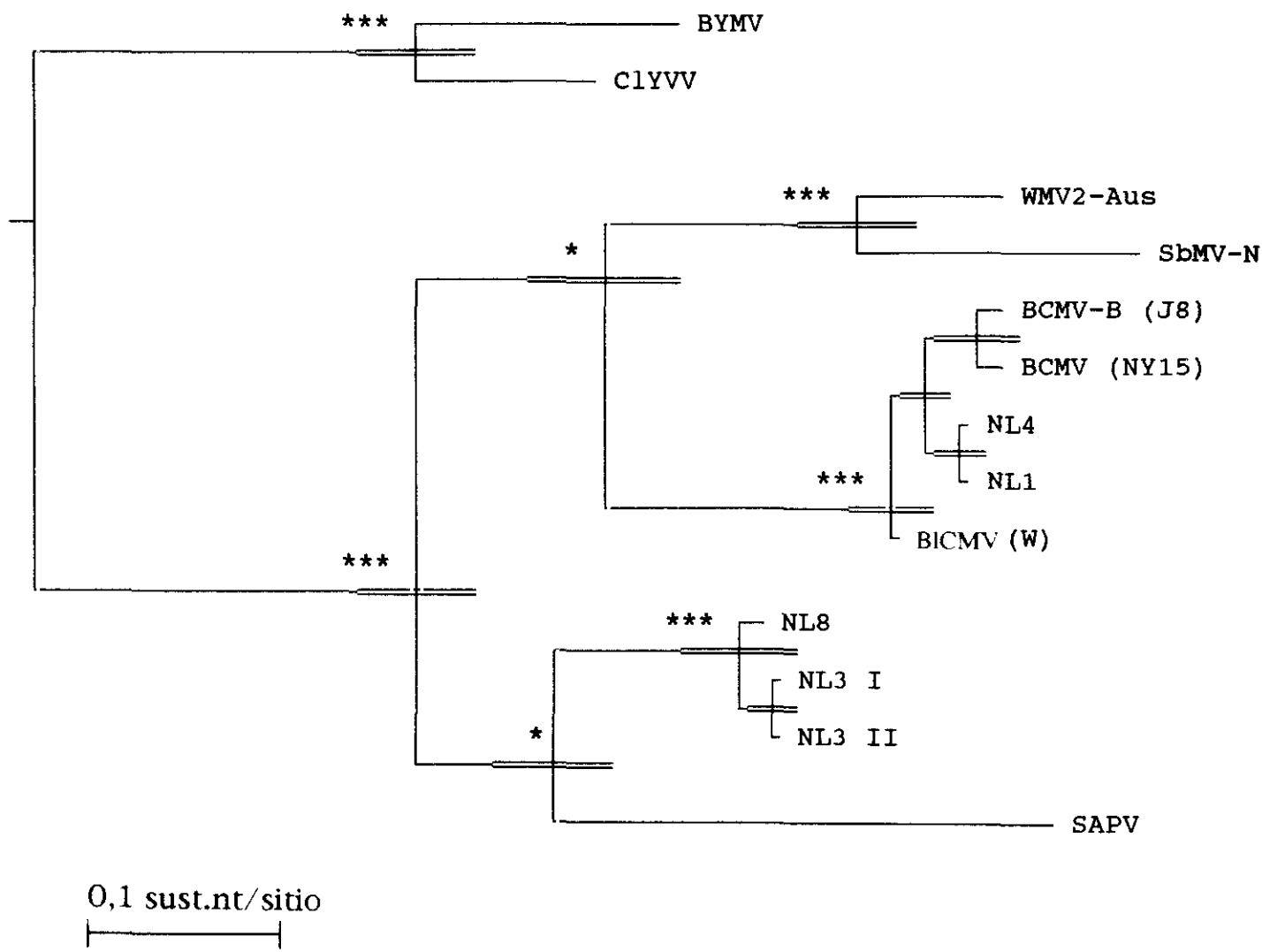
El análisis de las zonas correspondientes a las secuencias de los cebadores A, B y C indica que no existen diferencias a nivel de secuencia en dichas zonas, que pudieran dificultar la hibridación de

alguno de los cebadores en las reacciones de amplificación de NL1, NY15 y NL3, así como de BICMV-W. Este hecho se confirma empíricamente por el amplio espectro, en cuanto a capacidad de amplificación, mostrado por los tres cebadores.

Los valores obtenidos en el trabajo citado, y las conclusiones que de él se desprenden, apoyan los datos presentados y discutidos en esta Tesis, confirmando, por otro lado, la necesaria reclasificación taxonómica de los aislados de BCMV y potyvirus relacionados.



**Figura 34.** Arbol filogenético derivado de las secuencias de la proteína de la cápsida de BCMV, potyvirus relacionados (tabla 11) y de BCMV NL3 (NL3 II), NL1, NY15 y BICMV-W (Khan *et al.*, 1993). Las distancias verticales son arbitrarias. Las distancias horizontales representan el número de sustituciones por sitio a la escala indicada en la figura. La doble línea en los puntos de bifurcación representa la desviación estándar de la longitud de la rama correspondiente. \*\*\* indica que el punto de ramificación es significativo para  $\alpha < 0,001$  y \*\* para  $\alpha < 0,01$ . Los puntos de ramificación restantes no son significativos para  $\alpha < 0,05$ .



**Figura 35.** Arbol filogenético derivado de las secuencias nucleotídicas de las 3' NCRs de BCMV, potyvirus relacionados (tabla 11) y de BCMV NL3 (NL3 II), NL1, NY15 y BICMV-W (Khan *et al.*, 1993). Las distancias verticales son arbitrarias. Las distancias horizontales representan el número de sustituciones por sitio a la escala indicada en la figura. La doble línea en los puntos de bifurcación representa la desviación estándar de la longitud de la rama correspondiente. \*\*\* indica que el punto de ramificación es significativo para  $\alpha < 0,001$  y \* para  $\alpha < 0,05$ . Los puntos de ramificación restantes no son significativos para  $\alpha < 0,05$ .



## *RESUMEN Y CONCLUSIONES*

## VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En la presente Tesis, se ha abordado la caracterización biológica, serológica y molecular de aislados del virus del mosaico común de la judía (BCMV), procedentes de muestras de campo de distintas regiones españolas.

En un estudio epidemiológico realizado mediante prospecciones de campo en once provincias, BCMV ha sido el potyvirus más frecuentemente encontrado infectando judía, y se han caracterizado por ELISA, con una serie de anticuerpos monoclonales y policlonales, sus aislados, pertenecientes a dos grupos de cepas: los serotipos A y B.

Mediante ensayos biológicos utilizando cultivares diferenciales de *Phaseolus vulgaris*, se ha determinado la presencia de tres cepas de BCMV.

Se ha realizado paralelamente un estudio molecular mediante la secuenciación de la región 3' terminal del genoma viral (gen de la proteína de la cápsida y región 3' no codificante) de dos aislados de distinto serotipo, que ha permitido realizar un estudio comparativo con aislados secuenciados previamente, así como con otros potyvirus.

Mediante el análisis filogenético basado en los datos moleculares obtenidos en este trabajo, y los disponibles sobre BCMV y otros potyvirus relacionados que infectan leguminosas, se ha establecido un marco taxonómico en el que las relaciones de parentesco entre estos virus aparecen mejor definidas.

Utilizando la información de secuencia disponible, se ha desarrollado un método molecular de diagnóstico de los dos grupos de aislados, considerados como serotipos de BCMV a partir de extractos de hoja y de semilla mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

En el cultivo de judía destaca la elevada incidencia de infecciones producidas por potyvirus: el 75% de las muestras

analizadas. De entre ellos, el virus del mosaico común de la judía (BCMV) es el más importante, ya que fue el responsable del 81% de las infecciones potyvirales.

Se ha detectado la presencia de cepas necróticas del virus, pertenecientes al serotipo A en el 8% de las muestras BCMV positivas, lo que supone una incidencia mucho menor a la de las cepas del serotipo B, que constituyeron el 84% de las infecciones producidas por BCMV. En el 8% restante se ha detectado por ELISA la presencia simultánea de los dos tipos de aislados.

Las reacciones cruzadas entre los anticuerpos policlonales específicos de serotipo utilizados, excluye su aplicación en la diferenciación de aislados de BCMV. Los anticuerpos monoclonales específicos distinguieron eficazmente entre los aislados de los dos serotipos, aunque se han descrito reacciones cruzadas entre el monoclonal 15E5 B-específico y otros potyvirus relacionados. Un 6% de las muestras reaccionó con alguno de los anticuerpos policlonales y/o el monoclonal de amplio espectro para BCMV, pero no frente a los monoclonales específicos de serotipo, por lo que podrían estar infectadas por potyvirus relacionados en mayor o menor grado a BCMV.

Los aislados de serotipo A caracterizados biológicamente mostraron un comportamiento idéntico al descrito para la cepa NL3 de BCMV, mientras que los aislados de serotipo B fueron asignados a dos cepas: NL4 y US5/Fla.

El estudio comparativo de secuencias y el análisis filogenético realizados ponen de manifiesto la complejidad implícita a las relaciones entre los aislados de BCMV y con otros potyvirus relacionados que infectan leguminosas. Los aislados de distinto serotipo parecen estar más próximos a otros virus que entre sí, lo que apoya su reclasificación como potyvirus distintos. Los aislados de serotipo A constituyen una línea independiente en la que el SAPV es el virus más cercano a ellos, mientras que los aislados de

serotipo B podrían ser considerados junto con, al menos PStV y BICMV-W, como otro potyvirus distinto.

En el rango de las distancias genéticas que caracteriza al grupo de virus analizado, la 3' NCR mostró un contenido informativo mayor que la proteína de la cápsida, revelando parentescos significativos, como los existentes entre las cepas de serotipo A y SAPV, o el de WMV 2, SbmV y los aislados de serotipo B de BCMV, sugiriendo para esta zona del genoma un papel de mayor relevancia en los estudios filogenéticos y, por tanto, en los criterios taxonómicos aplicables a potyvirus.

Se ha desarrollado un sistema de detección diferencial de los clásicamente considerados como aislados de serotipo A y B de BCMV en semilla. La sensibilidad del ensayo permite detectar hasta 100 pg de harina procedente de lotes infectados.

## *BIBLIOGRAFIA*

## VII. BIBLIOGRAFIA

Asensio, C., Montoya, J.L. y Alonso, J. (1990) Judías de Castilla y León. Monografías INIA 75, 47 pp. Madrid.

Barnett, O.W. (1993) Presidential address: modern technology improves plant virus taxonomy or melding the molecular and classical. *Phytopathology* 83, 33-34

Beachy, R.N., Loesch-Fries, S. y Tumer, N.E. (1990) Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 451-474

Borja, M.J. y Ponz, F. (1992) An appraisal of different methods for the detection of the walnut strain of cherry leafroll virus. *J. Virol. Methods* 36, 78-83

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

Bos, L. (1992) Potyviruses, chaos or order? *Arch. Virol. Suppl.* 5, 31-46

Brand, R.J., Burger, J.T. y Rybicki, E.P. (1993) Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the coat protein gene of a new potyvirus infecting South African *Passiflora*. *Arch. Virol.* 128, 29-41

Brandes, J. y Wetter, C. (1959) Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8, 99-115

Bravo, E. (1984) Estudios moleculares sobre tres cepas del virus del mosaico común del frijol, M. S. Thesis Thesis, Universidad del Valle, Colombia.

Brawn, C.J. y Hemenway, C.L. (1992) Expression of amino-terminal portions or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection. *Plant Cell* 4, 735-744

Brown, F. (1989) The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Edmonton, Canada, 1987. *Intervirology* 30, 181-186

Carr, J.P. y Zaitlin, M. (1991) Resistance in transgenic tobacco plants expressing a nonstructural gene sequence of tobacco mosaic virus is a consequence of markedly reduced virus replication. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4, 579-585

Carrington, J.C. y Dougherty, W.G. (1988) A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3391-3395

Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D. y Dougherty, W.G. (1989) A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J.* 8, 365-370

Christie, R.G. y Edwardson, J.R. (1977) Light and electron microscopy of plant virus inclusions, *Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr. Ser. IX* 150 pp.

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

Dawson, W.O. y Hilf, M.E. (1992) Host-range determinants of plant viruses. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 527-555

Day, A.G., Bejarano, E.R., Buck, K.W., Burrell, M. y Lichtenstein, C.P. (1991) Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6721-6725

Debouck, D.G. y Hidalgo, R. (1985). Morfología de la planta de frijol común. En: M. López., F. Fernández. y A. Van Schoonhoven (eds), *Frijol: investigación y producción*, pp. 419. Cali, Colombia.

Debouck, D.G. (1987) Mejoramiento de frijol gracias a sus formas silvestres. *Hojas de frijol* 9, 4-6 pp. Centro Comercial de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

Dijkstra, J. y Khan, J.A. (1992) A proposal for a bean common mosaic subgroup of potyviruses. *Arch. Virol. Suppl.* 5, 389-395

Domier, L.L., Shaw, J.G. y Rhoads, R.E. (1987) Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. *Virology* 158, 20-27

Domingo, E. y Holland, J.J. (1988) High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replicating systems, *RNA Genetics III*, 3-36 pp. CRC Press, Boca Ratón.

Dopazo, J. (1993) Estimating errors and confidence intervals for branch lengths in phylogenetic trees by a bootstrap approach. *J. Mol. Evol.* (en prensa).

Dougherty, W.G. y Carrington, J.C. (1988) Expression and function of potyviral gene products. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 123-143

Dougherty, W.G. y Parks, T.D. (1989) Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays. *Virology* 172, 145-155



Dougherty, W.G. y Parks, T.D. (1991) Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-KDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* 183, 449-456

Drijfhout, E., Silbernagel, M. y Durke, D. (1978) Differentiation of strains of bean common mosaic virus. *Neth. J. Pl. Path.* 84, 13-26

Drijfhout, E. (1978) Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. *Agric. Res. Rep.* 872, 98 pp

Edwardson, J.R. (1974) Some properties of the potato virus-Y group. *Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr. Ser.* V, 225 pp

Edwardson, J.R. y Christie, R.G. (1984) Potyvirus cylindrical inclusions-subdivision-IV. *Phytopathology* 74, 1111-1114

Edwardson, J.R. (1992) Inclusion bodies. *Arch. Virol. Suppl.* 5, 25-30

Efron, B. (1982) *The Jackknife, the bootstrap and other resampling plans.* SIAM, Phyladelphia.

FAO (1990) *Food and Agriculture Organizations of the United Nations. Production,* 44. Roma.

Felsenstein, J. (1984) Distance methods for inferring phylogenies: a justification. *Evolution* 38, 16-24

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791

Felsenstein, J. (1988) Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22, 521-565

Felsenstein, J. (1990) PHYLIP manual version 3.3. University Herbarium, University of California, Berkeley, California.

Fitch, W.M. y Margoliash, E. (1967) The construction of phylogenetic trees. *Science* 155, 279-284

Francki, R.I.B., Milne, R.G. y Hatta, T. (1985) Potyvirus group. En: *Atlas of Plant Viruses*, pp. 183-217. CRC Press, Boca Ratón.

Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. y Brown, F. (1991) Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2, 357-359

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

Fraser, R.S.S. (1990) The genetics of resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 179-200

Frenkel, M.J., Ward, C.W. y Shukla, D.D. (1989) The use of 3' non-coding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: application to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus-N. *J. Gen. Virol.* 70, 2775-2783

Frenkel, M.J., Jilka, J.M., McKern, N.M., Strike, P.M., Clark, J.M. y Shukla, D.D. (1991) Unexpected sequence diversity in the amino-terminal ends of the coat proteins of strains of sugarcane mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 72, 237-242

Frenkel, M.J., Jilka, J. M., Shukla, D. D. y Ward, C. W. (1992) Differentiation of potyviruses and their strains by hybridisation with the 3' non-coding region of the viral genome. *J. Virol. Methods* 36, 51-62

García, J.A., Riechmann, J.L. y Laín, S. (1989) Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NIa-like protein in *Escherichia coli*. *Virology* 170, 362-369

Golemboski, D.B., Lomonossoff, G.P. y Zaitlin, M. (1990) Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6311-6315

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

Hall, R. (eds) (1991) *Compendium of bean diseases*. APS Press, Minnesota

Hanahan, D. (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580

Hari, V., Siegel, A., Rozek, D. y Timberlake, W.E. (1979) The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). *Virology* 92, 568-571

Hemenway, C., Fang, R.-X., Kaniewski, W.K., Chua, N.-H. y Tumer, N.E. (1988) Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.* 7, 1273-1280

Hirai, A. y Wildman, S.G. (1969) Effect of TMV multiplication on RNA and protein synthesis in tobacco chloroplasts. *Virology* 38, 73-82

Hitchborn, J.G. y Hills, G.J. (1965) The use of negative staining in the electron microscopy examination of plant viruses in crude extracts. *Virology* 27, 528-540

Hollings, M. y Brunt, A.A. (1981) Potyviruses. En: E. Kurstak (eds), Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, pp. 943. Elsevier/North Holland Biomedical, New York.

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J.(eds) (1990) PCR protocols. A guide to methods and applications, pp.482. Academic Press, Inc., San Diego.

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

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

Jukes, T.H. y Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. En: H.N. Munro (eds), Mammalian protein metabolism, pp. 21-132.

Kawchuk, L.M., Martin, R.R. y McPherson, J. (1991) Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 4,

Khan, J.A., Lohuis, D., Goldbach, R. y Dijkstra, J. (1993) Sequence data to settle the taxonomic position of bean common mosaic virus and blackeye cowpea mosaic virus isolates. J. Gen. Virol. 74, 2243-2249

Kimura, M. (1983) The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge.

Klein, R.E., Wyatt, S.D. y Kaiser, W.J. (1989) Influence of propagation on incidence of seedborne bean common mosaic virus in the USDA Phaseolus germ plasm collection. Plant Dis. 73, 759-761

Klein, R.E., Wyatt, S.D., Kaiser, W.J. y Mink, G.I. (1992) Comparative immunoassays of bean common mosaic virus in individual bean (*Phaseolus vulgaris*) seed and bulked bean seed samples. *Plant Dis.* 76, 57-59

Koenig, R. (1981) Indirect ELISA for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55, 53

Kohnen, P.D., Dougherty, W.G. y Hampton, R.O. (1992) Detection of pea seedborne mosaic potyvirus by specific enzymatic amplification. *J. Virol. Methods* 37, 253-258

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

Laín, S., Riechmann, J.L. y García, J.A. (1989) The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res.* 13, 157-172

Lana, A.F., Lohuis, H., Bos, L. y Dijkstra, J. (1988) Relationships among strains of bean common mosaic virus and blackeye cowpea mosaic virus-members of the potyvirus group. *Ann. Appl. Biol.* 113, 493-505

Langeveld, S.A., Dore, J.M., Memelink, J., Derks, A.F.L.M., Van der Vlugt, C.I.M., Asjes, C.J. y Bol, J.F. (1991) Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Gen. Virol.* 71, 1531-1541

Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P. y Tumer, N.E. (1990) Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: Resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology* 8, 127-134

Ling, K., Namba, S., Gonsalves, C., Slightom, J.L. y Gonsalves, D. (1991) Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. *Biotechnology* 9, 752-758

Lisa, V. (1977) Gravi danni da virosi al fagiolo in Piemonte. *Inf.tore Fitopatol.* 4, 19-23

Lisa, V. y Dellavalle, G. (1981) Characterization of two potyviruses in *Cucurbita pepo*. *Phytopath. Z.* 100, 279-286

Lisa, V. y Dellavalle, G. (1983) Clover yellow vein virus in climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopath. Medit.* 22, 49-52

Lovisoló, O. y Kitajima, E.W. (1992) Nomenclature and relationships of some Brazilian leguminous potyviruses related to bean common mosaic virus and/or passionfruit woodiness viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 5, 307-310

Maiss, E., Timpe, U., Briske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D. y Katinger, H.W.D. (1989) The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *J. Gen. Virol.* 70, 513-524

MAPA (1988) Anuario de Estadística Agraria, pp. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

Maroto, J.V. (1991) Leguminosas hortícolas. En: L. Rallo y F. Nuez (eds), *La horticultura española en la C.E.*, pp. 543. SECH, Reus.

Martínez, M.A., Dopazo, J., Hernández, J., Mateu, M.G., Sobrino, F., Domingo, E. y Knowles, N.J. (1992) Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. *J. Virol.* 66, 3557-3565

Matthews, R.E.F. (1991) Plant virology, 835 pp. Academic Press, Inc., San Diego.

Mattos, L. y Fernández-Northcote, E.N. (1987) Caracterización de strains del virus del mosaico común del frijol en la costa central del Perú. *Fitopatología* 22, 10-14

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

McKern, N.M., Barnett, O.W., Vetten, H.J., Dijkstra, J., Whittaker, L.A. y Shukla, D.D. (1989) Use of high performance liquid chromatographic peptide profiling of coat protein digests to compare strains of peanut stripe virus with related and unrelated potyviruses, pp. 2nd Coordinators Meet on Peanut Stripe Virus, ICRISAT, Hyderabad.

McKern, N.M., Whittaker, L.A., Strike, P.M., Ford, R.E., Jensen, S.J. y Shukla, D.D. (1990) Coat protein properties indicate that maize dwarf mosaic virus KS1 is a strain of Johnsongrass mosaic virus. *Phytopathology* 80, 907-912

McKern, N.M., Edskes, H.K., Ward, C.W., Strike, P.M., Barnett, O.W. y Shukla, D.D. (1991) Coat protein of potyviruses. 7. Amino acid sequence of peanut strip virus. *Arch. Virol.* 119, 25-35

McKern, N.M., Shukla, D.D., Barnett, O.W., Vetten, H.J., Dijkstra, J., Whittaker, L.A. y Ward, C.W. (1992a) Coat protein properties suggest that azuki bean mosaic virus, blackeye cowpea mosaic virus, peanut stripe virus and three isolates from soybean are all strains of the same potyvirus. *Intervirology* 33, 121-134

McKern, N.M., Mink, G.I., Barnett, O.W., Mishra, A., Whittaker, L.A., Silbernagel, M.J., Ward, C.W. y Shukla, D.D. (1992b) Isolates of bean common mosaic virus comprising two distinct potyviruses. *Phytopathology* 82, 923-929

Milne, R.G. (1988) The economic impact of filamentous plant viruses. En: R.G. Milne (eds), *The filamentous plant viruses*, pp. 423. Plenum Press, New York and London.

Mink, G.I. y Silbernagel, M.J. (1992) Serological and biological relationships among viruses in the bean common mosaic virus subgroup. *Arch. Virol. Suppl.* 5, 397-406

Moghal, S.M. y Francki, R.I.B. (1976) Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. *Virology* 73, 350-362

Mohamed, N.A. y Randles, J.W. (1972) Effect of tomato spotted wilt virus on ribosomes, ribonucleic acid and Fraction 1 protein in *Nicotiana tabacum* leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 2, 235-245

Morales, J.F. (1983) El mosaico común del frijol: metodología de investigación y técnicas de control, 26 pp. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

Morales, F.J. y Castaño, M. (1987) Seed transmission characteristics of selected bean common mosaic virus strains in differential bean cultivars. *Plant Dis.* 71, 51-53

Morales, F.J. y Bos, L. (1988) Bean common mosaic virus, AAB descriptions of plant viruses No. 337, 6 pp.

Murrant, A.F., Raccach, B. y Pirone, T.P. (1988) Transmission by vectors. En: R.G. Milne (eds), *The Filamentous Plant Viruses*, pp. 237-273. Plenum, New York and London.

Nejidat, A., Clark, W.G. y Beachy, R.N. (1990) Engineered resistance against plant virus diseases. *Physiologia Plantarum* 80, 662-668



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

Nolasco, G., De Blas, C., Torres, V. y Ponz, F. (1993) A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods* (en prensa).

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

Person, C. (1959) Gene-for-gene relationships in host:parasite systems. *Can. J. Bot.* 37, 1101-1130

Pierce y Hungerford (1929) *Phytopathology* 19, 605

Pirone, T.P. y Thornbury, D.W. (1983) Role of virion and helper component in regulating aphid transmission of tobacco etch virus. *Phytopathology* 73, 872-875

Ponz, F. (1993) Plantas transgénicas resistentes a virus. *Virología* 1, 66-76

Providenti, R., Silbernagel, M.J. y Wang, W.-Y. (1984) Local epidemic of NL-8 strain of bean common mosaic virus in bean fields of western New York. *Plant Dis.* 68, 1092-1094

Quantz, L. (1961) *Phytopath. Z.* 43, 79-101

Riechmann, J.L., Laín, S. y García, J.A. (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73, 1-16

Roberts, I.M. (1986) Practical aspects of handling, preparing and staining samples containing plant virus particles for electron microscopy. En: R. A. C. Jones y L. Torrance (eds) *Developments and*

applications in virus testing, pp. 213-243. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, U. K.

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

Robinson, D.J. (1992) Detection of tobacco rattle virus by reverse transcription and polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 40. 57-66

Rodríguez Cerezo, E., Gamble-Klein, P. y Shaw, J.G. (1991) A determinant of disease symptom severity is located in the 3'-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9863-9867

Rowahni, A., Chay, C., Golino, D.A. y Falk, B.W. (1993) Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology* 83, 749-753

Rubies-Autonell, C. y Faccioli, G. (1985) Bistribution of bean common mosaic and bean yellow mosaic viruses in bud tips of *Phaseolus vulgaris* L. *Phytopath. Medit.* 24, 241-244

Rubio-Huertos, M., Castro, S., Moreno, R. y López, D. (1968) Ultraestructura de células de *Dianthus caryophyllus* infectadas por dos virus al mismo tiempo. *Microbiol. Españ.* 21, 1-6

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

Rybicki, E.P. y Shukla, D.D. (1992) Coat protein phylogeny and systematics of potyviruses. *Arch. Virol. Suppl.* 5, 377-385

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

Saitou, N. y Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425

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

Sanger, F., Nickler, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467

Sáiz, M., Dopazo, J., Castro, S. y Romero, J. (1993) Evolutionary relationships among bean common mosaic virus strains and closely related potyviruses. *Virus Res.* (en prensa).

Shukla, D.D. y Ward, W. (1988) Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *J. Gen. Virol.* 69, 2703-2710

Shukla, D.D., McKern, N.M., Gough, K.H., Tracy, S.L. y Letho, S.G. (1988a) Differentiation of potyviruses and their strains by high-performance liquid chromatographic peptide profiling of coat proteins. *J. Gen. Virol.* 69, 493-502

Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H. y Ward, C.W. (1988b) The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *J. Gen. Virol.* 69, 1497-1508

Shukla, D.D., Tasic, M., Jilka, J., Ford, R.E., Toler, R.W. y Langham, M.A.C. (1989) Taxonomy of potyviruses infecting maize,

sorghum and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. *Phytopathology* 79, 223-229

Shukla, D.D., Lauricella, R. y Ward, C.W. (1992) Serology of potyviruses: current problems and some solutions. *Arch. Virol. Suppl.* 5, 57-69

Siaw, M.F.E., Shahabuddin, M., Ballard, S., Shaw, J.G. y Rhoads, R.E. (1985) Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of tobacco vein mottling virus RNA. *Virology* 142, 134-143

Silbernagel, M.J., Mills, L.J. y Wang, W.-Y. (1986) Tanzanian strain of bean common mosaic virus. *Plant Dis.* 70, 839-841

Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1981) *Biometry*, pp. Freeman & Co, New York.

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

Sourdis, J. y Nei, M. (1988) Relative efficiencies of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* 5, 298-311

Stark, D.M. y Beachy, R.N. (1989) Protection against potyvirus infection in transgenic plants: Evidence for broad spectrum resistance. *Biotechnology* 7, 1257-1262

Stewart, V.B. y Reddick, D. (1917) Bean mosaic. *Phytopathology* 7, 61

Swofford, D.L. y Olsen, G.J. (1990) Phylogeny Reconstruction. En: D.M. Hillis y C. Moritz (eds), Molecular Systematics, pp. Sinauer Ass. Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.

Temple, S.R. y Morales, F.J. (1986) Linkage of dominant hypersensitivity resistance to bean common mosaic virus to seed color in *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica* 35, 331-333

Tomlinson, J.A. (1986) Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.* 110, 661-681

Tsuchizaki, T. y Omura, T. (1987) Relationships among bean common mosaic virus, azuki bean mosaic virus, blackeye cowpea mosaic virus-members of the potyvirus group. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 53, 478-488

Uyeda, I. (1992) Bean yellow mosaic virus subgroup: search for the group specific sequences in the 3' terminal region of the genome. *Arch. Virol. Suppl.* 5, 377-385

Van der Vlugt, R.A.A., Leunissen, J. y Goldbach, R. (1993) Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3'-nontranslated regions. *Arch. Virol.* 131, 361-375

Van der Vlugt René, A.A., Ruiter, R.K. y Goldbach, R. (1992) Evidence for sense RNA-mediated protection to PVY<sup>N</sup> in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol. Biol.* 20, 631-639

Vela, A. (1971) Presencia de virus en nódulos de leguminosas producidos por *Rhizobium*. *Microbiol. Españ.* 24, 1-11

Verchot, J., Koonin, E.V. y Carrington, J.C. (1991) The 35-KDa protein from the N-terminus of a potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185, 527-535

Vetten, H.J., Lesemann, D.E. y Maiss, E. (1992) Serotype A and B strains of bean common mosaic virus are two distinct potyviruses. *Arch. Virol. Suppl.* 5, 415-431

Vos, P., Verver, J., Jaegle, M., Wellink, J. y Van Kammen, A. (1988) Two viral proteins involved in the proteolytic processing of the cowpea mosaic virus polyproteins. *Nucl. Acids Res.* 16, 1967-1985

Voysest, O. (1983) Variedades de frijol en América latina y su origen. pp. 87. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

Vunsh, R., Rosner, A. y Stein, A. (1990) The use of the polymerase chain reaction for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Ann. Appl. Biol.* 117, 561-569

Wang, W.-Y. (1983) Serology of bean common mosaic virus strains, 52 pp. Washington State University, Pullman, WA, USA.

Wang, W.-Y., Mink, G.I., Silbernagel, M.J. y Davis, W.C. (1984) Production of hybridoma lines secreting specific antibodies to bean common mosaic virus (BCMV) strains. *Phytopathology* 74, 1142

Wang, W.-Y. (1985) Production and characterization of hybridoma cell lines and a broad spectrum monoclonal antibody against bean common mosaic virus, Ph. D. Thesis, Washington State University, Pullman, WA, USA

Ward, C.W. y Shukla, D.D. (1991) Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology* 32, 269-296

Ward, C.W., McKern, N.M., Frenkel, M.J. y Shukla, D.D. (1992) Sequence data as the major criterion for potyvirus classification. *Arch. Virol. Suppl.* 5, 283-297

Wilkins, P.W. y Catherall, P.L. (1974) The effect of some isolates of ryegrass mosaic virus on different genotypes of *Lolium multiflorum*. *Ann. Appl. Biol.* 76, 209-216

Wilson, T.M.A. (1993) Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3134-3141

Yolken, R.H. y Leister, F.J. (1981) Staphylococcal protein A-enzyme immunoglobulin conjugates: versatile tools for enzyme immunoassays. *J. Immunol. Methods* 43, 209-218

Zaitlin, M. y Hull, R. (1987) Plant virus-host interactions. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38, 291-315

Zaumeyer, W.J. (1969) The origin of resistance to common bean mosaic in snap beans. *Seed World* 105, 8-9

Zhang, H., Scholl, R., Browse, J. y Somerville, C. (1988) Double stranded DNA sequencing as a choice for DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* 16, 1220

*ANEXO 1*





<u>Nº</u>	<u>VARIEDAD/TIPO</u>	<u>PROCEDENCIA</u>	<u>FECHA</u>	<u>SINTOMAS ORIGINALES</u>	<u>PTY</u>	<u>bc-197</u>	<u>bc-15E5</u>	<u>bc-13</u>	<u>I-2</u>	<u>NY-15</u>	<u>NL-5</u>	<u>OTROS VIRUS</u>
J-36	Pinta	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	+	-	-	+	+	
J-37	Pinta	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	+	-	-	+	+	
J-38	Pinta	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones fuertes	+	+	+	-	-	+	-	
J-39	Pinta	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	+	-	-	+	-	
J-40	Pinta	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	+	-	-	+	-	
J-41	Pinta	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	+	-	-	+	-	
J-42	Pinta	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	+	-	-	+	-	
J-43	Pinta	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	+	-	-	+	-	
J-44	Redondilla	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, enaciones	-	-	-	-	-	-	-	
J-45	Redondilla	Riego del Monte (LE)	8/7/91	Amarilleamiento, arrugamiento general	-	-	-	-	-	-	-	
J-46	Redondilla	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	-	-	-	-	-	-	-	
J-47	Redondilla	Riego del Monte (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	+	-	-	+	-	
J-48	Redondilla	Riego del Monte (LE)	8/7/91	Amarilleamiento, arrugamiento general	-	-	-	-	-	-	-	
J-49	Morada Larga	Cubillas de los Oteros (LE)	8/7/91	M amarillo, enaciones	-	-	-	-	-	-	-	
J-50	Morada Larga	Cubillas de los Oteros (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	-	+	+	+	-	-	
J-51	Morada Larga	Cubillas de los Oteros (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	-	+	+	+	+	+	
J-52	Morada Larga	Cubillas de los Oteros (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	-	+	+	+	+	+	
J-53	Morada Larga	Cubillas de los Oteros (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	-	+	+	+	+	
J-54	Morada Larga	Cubillas de los Oteros (LE)	8/7/91	Arrugamiento, enaciones	-	-	-	-	-	-	-	
J-55	Canellini	Corbillos de los Oteros (LE)	8/7/91	M C, enaciones	+	+	-	+	+	+	+	CMV
J-56	Canellini	Corbillos de los Oteros (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	-	+	+	+	+	
J-57	Canellini	Corbillos de los Oteros (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	-	+	+	+	+	CMV
J-58	Garrafal Oro	Fresno de la Vega (LE)	8/7/91	M C, arrugamiento fuerte	+	+	+	-	-	+	-	
J-59	Garrafal Oro	Fresno de la Vega (LE)	8/7/91	M C, arrugamiento fuerte, enaciones	+	+	+	-	-	+	+	
J-60	Garrafal Oro	Fresno de la Vega (LE)	8/7/91	M C, arrugamiento fuerte, enaciones	+	+	+	-	-	+	+	
J-61	AH-22	Sta. María del Páramo (LE)	8/7/91	Borde rizado, arrugamiento uniforme	-	-	-	-	-	-	-	CMV
J-62	AH-16	Sta. María del Páramo (LE)	8/7/91	M C, enaciones	+	+	-	-	-	+	+	
J-63	AH-16	Sta. María del Páramo (LE)	8/7/91	M C	+	+	+	-	-	+	-	
J-64	Canela	Laguna Dalga (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	+	+	+	+	+	
J-65	Canela	Laguna Dalga (LE)	8/7/91	M C, deformación foliar, enaciones	+	+	+	-	-	+	+	
J-66	Canela	Laguna Dalga (LE)	8/7/91	deformación foliar, arrugamiento	+	+	-	+	+	±	-	
J-67	Canela	Laguna Dalga (LE)	8/7/91	deformación foliar, arrugamiento	+	+	-	+	+	+	-	
J-68.1	autocultivo	Ventosa de Pisuerga (P)	15/7/91	M C, enaciones	+	+	-	+	+	-	+	
J-69.5	autocultivo	Quintanarubias (SO)	15/7/91	M C, enaciones	+	+	+	-	-	+	-	
J-70	A-228	Misión Biologica CSIC (PO)	15/9/91	M A, moteado	+	+	+	-	-	+	+	



<u>Nº</u>	<u>VARIEDAD/TIPO</u>	<u>PROCEDENCIA</u>	<u>FECHA</u>	<u>SINTOMAS ORIGINALES</u>	<u>PTY</u>	<u>hc-197</u>	<u>hc-15E5</u>	<u>hc-13</u>	<u>I-2</u>	<u>NY-15</u>	<u>NL-5</u>	<u>OTROS VIRUS</u>
J-106	Femera	Cambados (PO)	15/9/91	M A, deformación foliar	-	-	-	-	-	-	-	-
J-107	Femera	Cambados (PO)	15/9/91	M C, arrugamiento	-	-	-	-	-	-	-	-
J-108	Femera	Cambados (PO)	15/9/91	M C, arrugamiento	-	-	-	-	-	-	-	-
J-109	Femera	Cambados (PO)	15/9/91	M C, arrugamiento	-	-	-	-	-	-	-	-
J-110	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	sin síntomas	-	-	-	-	-	-	-	-
J-111	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	M tenue	-	-	-	-	-	-	-	-
J-112	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	moteado amarillo tenue	-	-	-	-	-	-	-	-
J-113	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	M suave	-	-	-	-	-	-	-	-
J-114	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	sin síntomas	+	-	-	-	-	-	-	-
J-115	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	M tenue	-	-	-	-	-	-	-	-
J-116	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	M C, arrugamiento	-	-	-	-	-	-	-	-
J-117	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	sin síntomas	-	-	-	-	-	-	-	-
J-118	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	M tenue	+	-	-	-	-	-	-	-
J-119	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	M tenue	-	-	-	-	-	-	-	-
J-120	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	sin síntomas	-	-	-	-	-	-	-	-
J-121	Helda	Cambados (PO) (invernadero)	15/9/91	M C y amarilleamiento	-	-	-	-	-	-	-	-
J-125	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, enaciones	+	+	+	-	-	-	-	-
J-126	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, enaciones	+	+	+	-	-	-	-	-
J-127	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, enaciones	+	+	+	-	-	-	-	-
J-128	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M, borde deformado ondulado	+	+	+	-	-	-	-	-
J-129	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M, enaciones	+	+	+	-	-	-	-	-
J-130	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, deformación foliar	+	+	+	-	-	-	-	-
J-131	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, bandeado de vena	+	+	+	-	-	-	-	-
J-132	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M, enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-	-	-	-
J-133	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M, enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-	-	-	-
J-134	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M, enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-	-	-	-
J-135	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M, enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-	-	-	-
J-136	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, enaciones	+	+	+	-	-	-	-	-
J-137	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M, enaciones, deformación foliar	+	+	-	-	-	-	-	-
J-138	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M, enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-	-	-	-
J-139	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	bandedo de vena, enaciones	+	+	+	-	-	-	-	-
J-140	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-	-	-	-
J-141	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M A, enaciones	+	+	+	-	-	-	-	-
J-142	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, enaciones	+	+	+	-	-	-	-	-
J-143	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-	-	-	-

<u>Nº</u>	<u>VARIEDAD/TIPO</u>	<u>PROCEDENCIA</u>	<u>FECHA</u>	<u>SINTOMAS ORIGINALES</u>	<u>PTY</u>	<u>hc-197</u>	<u>hc-15E5</u>	<u>hc-13</u>	<u>I-2</u>	<u>NY-15</u>	<u>NL-5</u>	<u>OTROS VIRUS</u>
J-144	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M. enaciones	+	+	+	-	-			
J-145	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M. enaciones, bandeado de vena	+	+	+	-	-			
J-146	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M. enaciones, bandeado de vena,	+	+	-	-	-			
J-147	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M. enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-148	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M. enaciones, bandeado de vena,	+	+	+	-	-			
J-149	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	bandeado de vena	+	+	-	-	-			
J-150	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M. enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-151	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-152	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-153	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl, deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-154	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	bandeado de vena	+	+	-	-	-			
J-155	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	6/7/92	M Cl	+	+	-	-	-			
J-157	s.i.	Azanaque (SE)	7/7/92	M A, enaciones	+	+	+	-	-			
J-158	s.i.	Azanaque (SE)	7/7/92	bandeado de vena, deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-159	s.i.	Azanaque (SE)	7/7/92	bandeado de vena, enaciones	+	+	+	-	-			
J-160	s.i.	El Souillo (CA)	7/7/92	M A, enaciones	+	+	+	-	-			
J-161	s.i.	Azanaque (SE)	7/7/92	M A, enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-162	s.i.	El Souillo (CA)	7/7/92	deformación foliar, enanismo	+	+	+	-	-			
J-163	s.i.	Linares (J)	7/7/92	M, deformación foliar, enanismo	+	+	+	-	-			
J-164	s.i.	Linares (J)	7/7/92	M, deformación foliar, enanismo	+	+	+	-	-			
J-165	s.i.	Linares (J)	7/7/92	M A, enaciones	+	+	+	-	-			
J-166	s.i.	Linares (J)	7/7/92	bandeado de vena, enaciones	+	+	+	-	-			
J-167	s.i.	Linares (J)	7/7/92	bandeado de vena, enaciones	+	+	+	-	-			
J-169	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	27/7/92	M C y enaciones	+	+	+	-	-			
J-170	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	27/7/92	M C, hoja asimétrica y con borde amarillo	+	+	+	-	-			
J-171	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	27/7/92	M A y bandeado de vena	+	+	+	-	-			
J-172	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	27/7/92	M	+	+	+	-	-			
J-173	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	27/7/92	M, hoja deforme y amarilla, enaciones	+	+	+	-	-			
J-174	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	27/7/92	M	+	+	+	-	-			
J-175	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	27/7/92	M A, enaciones y hoja filiforme	+	+	+	-	-			
J-176	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	27/7/92	bandeado de vena	+	+	+	-	-			
J-177	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	27/7/92	M y bandeado de vena	+	+	+	-	-			
J-178	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	27/7/92	M	+	+	+	-	-			
J-179	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M sin enaciones	+	+	+	-	-			
J-180	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M, arrugamiento general	+	-	-	-	-			

<u>Nº</u>	<u>VARIEDAD/TIPO</u>	<u>PROCEDECENCIA</u>	<u>FECHA</u>	<u>SINTOMAS ORIGINALES</u>	<u>PTY</u>	<u>bc-197</u>	<u>bc-15E5</u>	<u>bc-13</u>	<u>L-2</u>	<u>NY-15</u>	<u>NL-5</u>	<u>OTROS VIRUS</u>
J-181	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M y bandeo de vena	+	+	+	-	-			
J-182	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M y bandeo de venas	+	+	+	-	-			
J-183	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M amarillo	+	+	+	-	-			
J-184	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de venas suave	+	+	+	-	-			
J-185	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de venas	+	+	+	-	-			
J-186	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de venas	+	+	+	-	-			
J-187	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M. enaciones, deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-188	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M. enaciones	+	+	+	-	-			
J-189	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de venas	+	+	+	-	-			
J-190	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M suave	+	+	+	-	-			
J-191	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de venas fuerte	+	+	+	-	-			
J-192	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de venas suave	+	+	+	-	-			
J-193	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M, arrugamiento general	+	+	+	-	-			
J-194	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M. deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-195	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M, bandeo de venas suave	+	+	+	-	-			
J-196	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M suave, bandeo de venas muy suave	+	+	+	-	-			
J-197	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M y arrugamiento generalizado	+	+	+	-	-			
J-198	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de venas	+	+	+	-	-			
J-199	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M A punteado	+	+	+	-	-			
J-200	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M suave	+	+	+	-	-			
J-201	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de venas suave, enaciones, ¿N?	+	+	+	-	-			
J-202	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de venas, deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-203	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	¿N?	+	+	+	-	-			
J-204	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M A y bandeo de venas	+	+	+	-	-			
J-205	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M A y arrugamiento	+	+	+	-	-			
J-206	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de vena amarillo	+	+	+	-	-			
J-207	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M A y arrugamiento	+	+	+	-	-			
J-208	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	bandoe de vena	+	+	+	-	-			
J-209	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	11/8/92	M y deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-210	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	amarilleo y arrugamiento generalizado	-	-	-	-	-			
J-211	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	amarilleo y arrugamiento generalizado	+	+	+	-	-			
J-212	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	M A	-	-	-	-	-			
J-213	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	M y arrugamiento	+	+	+	-	-			
J-214	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	M fuerte y arrugamiento	+	+	±	-	-			
J-215	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	sin síntomas ¿ptos necróticos?	-	-	-	-	-			

<u>Nº</u>	<u>VARIEDAD/TIPO</u>	<u>PROCEDENCIA</u>	<u>FECHA</u>	<u>SINTOMAS ORIGINALES</u>	<u>PTY</u>	<u>bc-197</u>	<u>bc-15E5</u>	<u>bc-13</u>	<u>I-2</u>	<u>NY-15</u>	<u>NL-5</u>	<u>OTROS VIRUS</u>
J-216	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	muchos puntos necróticos ¿arrugamiento?	-	-	-	-	-			
J-217	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	amarilleo fuerte, clorosis	+	+	+	-	-			
J-218	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	arrugamiento general, amarilleo	-	-	-	-	-			
J-219	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	arrugamiento general, amarilleo	+	+	+	-	-			
J-220	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	amarilleo	+	+	+	-	-			
J-221	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	amarilleo, pto. necróticos	-	-	-	-	-			
J-222	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	fuerte arrugamiento, clorosis ligera	+	+	+	-	-			
J-223	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	M A, arrugamiento	+	+	+	-	-			
J-224	Roja Morada	Urarte (Alava)	20/8/92	M A, arrugamiento, deformación foliar	+	+	+	-	-			
J-225	Morada	Arkante (Alava)	1/9/92	M, arrugamiento ligero, manchas amarillas	+	±	-	-	-			
J-226	Guernikesa	Villarreal de Alava	1/9/92	M, arrugamiento ligero, manchas amarillas	+	±	-	-	-			
J-227	Morada	Arkante (Alava)	1/9/92	M, arrugamiento, deformación foliar	+	±	-	-	-			
J-68.2	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	15/7/91	M C, enaciones	+	+	+	-	-	+	-	
J-68.3	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	15/7/91	M suave, deformación foliar	-	-	-	-	-	-	-	
J-68.4	vainilla	Ventosa de Pisuerga (P)	15/7/91	M suave, deformación foliar	-	-	-	-	-	-	-	
J-69.1	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	15/7/91	M suave, deformación foliar	-	-	-	-	-	-	-	
J-69.2	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	15/7/91	M suave, deformación foliar	-	-	-	-	-	-	-	
J-69.3	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	15/7/91	M suave, deformación foliar	-	-	-	-	-	-	-	
J-69.4	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	15/7/91	M suave, deformación foliar	-	-	-	-	-	-	-	
J-69.6	autocultivo	Quintanarrubias (SO)	15/7/91	M suave, deformación foliar	-	-	-	-	-	-	-	
J-228	Strike	Mojonera (AL)	23/3/93	manchas cloróticas en borde	-	-	-	-	-			ISWV
J-229	Música	El Ejido (AL)	22/3/93	N en nervios, manchas amarillas en hojas	-	-	-	-	-			ISWV
J-230	Pampa	El Ejido (AL)	22/3/93	fruto deforme	-	-	-	-	-			
J-231	Strike	Mojonera (AL)	22/3/93	sin síntomas	-	-	-	-	-			
J-232	Garrafal Oro	Vícar (AL)	22/3/93	M, bandeado de venas	+	+	+	-	-			
J-233	Garrafal Oro	Vícar (AL)	22/3/93	enaciones suaves	+	+	+	-	-			
J-234	Garrafal Oro	Vícar (AL)	22/3/93	amarilleamiento	+	+	+	-	-			
J-235	Garrafal Oro	Vícar (AL)	22/3/93	bandedo de venas	+	+	+	-	-			
J-236	Garrafal Oro	Vícar (AL)	22/3/93	M y deformación foliar	+	-	-	-	-			
J-237	Garrafal Oro	Vícar (AL)	22/3/93	M y arrugamiento suaves	+	+	-	-	-			
J-238	Garrafal Oro	Vícar (AL)	22/3/93	M uniforme pronunciado	+	±	-	-	-			
J-239	Garrafal Oro	Vícar (AL)	22/3/93	hojas curvadas	+	+	+	+	+			
J-240	Garrafal Oro	Vícar (AL)	22/3/93	M y arrugamiento	+	±	-	-	-			
J-241	Garrafal Oro	Vícar (AL)	22/3/93	M A	+	+	+	-	-			
J-242	Perona	Vícar (AL)	22/3/93	M, arrugamiento, deformación foliar	-	-	-	-	-			

Nº	VARIEDAD/TIPO	PROCEDENCIA	FECHA	SINTOMAS ORIGINALES	PTY	hc-197	hc-15E5	hc-13	J-2	NY-15	NL-5	OTROS VIRUS
J-243	Perona	Vícar (AL)	22/3/93	M en borde de hoja filiforme	-	-	-	-	-	-	-	
J-244	Música	El Ejido (AL)	22/3/93	M y enaciones	-	-	-	-	-	-	-	ISWV
J-245	Música	El Ejido (AL)	22/3/93	N en tallo y nervios	-	-	-	-	-	-	-	ISWV
J-246	Música	El Ejido (AL)	22/3/93	M y enaciones	-	-	-	-	-	-	-	ISWV
J-247	Música	El Ejido (AL)	22/3/93	hojas aspecto seco	-	-	-	-	-	-	-	
J-248	Perona	Los Baños (AL)	22/3/93	M, fruto deforme	-	-	-	-	-	-	-	

**Síntomas:**

M= mosaico; A= amarillo; C= común; Cl= claro; pto= punto; N= necrosis

**Procedencia:**

LE= León; VA= Valladolid; M= Madrid; P= Palencia; SO= Soria; PO= Pontevedra; SE= Sevilla; CA= Cádiz;  
J= Jaén

**Variedad:**

s.l.= sin identificar

AH-22 y AH-16= variedades comerciales experimentales

**Clave muestras Misión Biológica (CSIC):**

Germoplasma recogido en distintas zonas de Galicia y multiplicado en la Misión Biológica (Pontevedra)  
A-228- Tomeza (Pontevedra); 237- Rebadanes (Tuy, Pontevedra); A-227- Ser (Santa Comba, La Coruña)  
z-3, z-9 y z-11- Anllo- San Martín (Sober, Lugo); v-2- Monforte de Lemos (Lugo).