

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

**ESTUDIO DE FACTORES IMPLICADOS EN LA EVOLUCIÓN
DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO
Y DE SU RNA SATÉLITE**

TESIS DOCTORAL

FERNANDO ESCRIU PARADELL
INGENIERO AGRÓNOMO

2000

Esta tesis ha sido escrita y presentada para optar al grado de Doctor en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid.

El Doctorando

Fernando Escriu Paradell

VºBº de los Directores de la tesis:

Fdo. Fernando García-Arenal Rodríguez
Dr. Ingeniero Agrónomo

Fdo. Aurora Fraile Pérez
Dra. Ingeniero Agrónomo

TRIBUNAL

PRESIDENTE:

VOCAL:

VOCAL:

VOCAL:

VOCAL SECRETARIO:

CALIFICACIÓN:

A mi familia...
...y amigos

AGRADECIMIENTOS

El trabajo desarrollado en esta tesis se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Virus de Plantas del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Madrid, en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, y ha sido posible gracias a la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador de la Comunidad de Madrid.

Quiero expresar mi agradecimiento a los Directores del trabajo, Profesor Fernando Gracia-Arenal Rodríguez, que me ha prestado su confianza, una total dedicación, y del que he recibido una valiosa formación científica, y la Profesora Aurora Fraile Pérez, a quien agradezco su colaboración, su apoyo en todo momento y sus buenos consejos. También quiero dedicar un agradecimiento especial al Profesor D. Eloy Mateo-Sagasta Azpeitia, por despertar mi entusiasmo por la patología vegetal.

Mi agradecimiento a todas aquellas personas que, desde un punto de vista profesional o personal, han facilitado la realización de esta tesis:

Al Dr. Keith L. Perry (Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University, West Lafayette, Indiana) por ofrecerme su laboratorio, su colaboración y su experiencia en los experimentos de transmisión por pulgones;

Al Dr. Peter Palukaitis (Department of Virology, Scottish Crop Research Institute, Dundee) por facilitar los clones de cDNA de longitud total de la cepa Fny del *Virus del mosaico del pepino*;

Al Dr. José María Malpica (Departamento de Protección Vegetal, Subdirección General de Investigación y Tecnología, INIA, Madrid), por su colaboración en los análisis estadísticos;

A Antolín López Quirós por su asistencia técnica y su esmerado manejo y cuidado de las plantas, y a Ana Illera por su ayuda en el procesado de un buen número de muestras; gracias a los dos por su paciencia;

A mis compañeros de laboratorio en Estados Unidos, especialmente a Yungsoon Park y James Ng, por su ayuda, disponibilidad y amistad, siempre de agradecer en tierras lejanas;

A mis primeros compañeros de laboratorio: a Miguel Aranda Regules, cuyo trabajo abrió las puertas al mío, a Tomás Canto Ceballos, Juanjo Bernal Muñoz y José Luis Alonso Prados, por sus sabios consejos durante mis primeros días en el laboratorio;

A mis otros compañeros, con los que he compartido innumerables buenos y no tan buenos momentos en el laboratorio, durante los últimos años: José María Gallego, Oscar Rogero, Jeremy Thompson, Anabel Sanz, Laureano Simón, Nacho Moreno, Margarita Domínguez, Clara Obies, Gonzalo Eiriz, Andrés Requena, Sol Sacristán, Jesús Maudes y Leticia Martín; aunque los cito juntos, cada uno merecería un agradecimiento particular;

A Pepe, Pedro, Rosa, Carolina y Martín, que me han aguantado, aconsejado y animado en los breves momentos entre trabajo y trabajo, y que de alguna manera han compartido conmigo la condición de becario;

A Belén, que no sólo ha sabido ser quien es, sino que además ha participado activamente para que este pequeño libro llegara a buen término.

Muchas gracias a todos.

RESUMEN

La virulencia es una de las principales características de los patógenos, y su capacidad de evolución es fundamental en cuanto a la prevención de las enfermedades y al diseño de estrategias eficaces para su control. Sin embargo, el conocimiento de los complejos factores que pueden determinar la evolución de la virulencia es todavía muy escaso. El trabajo presentado en esta tesis pretende analizar los factores implicados en la evolución de la virulencia en poblaciones naturales del virus del mosaico del pepino (CMV) y su RNA satélite (RNAsat).

Entre 1986 y 1992 se produjo un síndrome de necrosis sistémica en los cultivos de tomate de la costa mediterránea española causado por CMV con RNAsat. En 1989 la incidencia de la necrosis comenzó a disminuir hasta su casi completa desaparición a partir de 1992. La existencia de aislados de CMV con RNAsat con posterioridad a la desaparición de la necrosis y la elevada correlación entre los síntomas de necrosis en tomate y la presencia de variantes de RNAsat necrogénicas indicó que la población de CMV y su RNAsat evolucionó hacia una menor virulencia. Esta situación era una buena oportunidad para el estudio de la evolución de la virulencia en un virus de plantas.

El trabajo se abordó mediante el análisis experimental de los factores de la eficacia biológica de CMV y de su RNAsat. Dicho análisis mostró que no existen diferencias entre las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas en cuanto a su infectividad y capacidad de acumulación en tomate, y que las variantes necrogénicas compiten mejor en infecciones mixtas, y se transmiten con mayor probabilidad a la descendencia de CMV, que las variantes no necrogénicas. Además, las variantes de RNAsat necrogénicas tienen un efecto negativo más acusado que las variantes no necrogénicas en la eficacia biológica de CMV, ya que reducen en mayor grado tanto la

acumulación del virus en los tejidos infectados como la eficacia de su transmisión por pulgones. Por otro lado, los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos son más virulentos en tomate que los aislados de CMV sin RNAsat o con RNAsat no necrogénicos.

Estos resultados indican que la correlación entre la virulencia y la transmisión de CMV y su RNAsat es negativa para valores grandes de virulencia, es decir, cuando los RNAsat necrogénicos se asocian con CMV. Los modelos epidemiológicos de coevolución huésped-patógeno predicen que la virulencia de un patógeno puede evolucionar según distintas direcciones en función de la relación que exista entre la virulencia del patógeno y su transmisión. La aplicación de estos modelos al caso de CMV y su RNAsat permite predecir que la evolución de su virulencia en tomate depende del número de pulgones presentes en una planta y de la posibilidad de que existan acontecimientos de sobreinfección por aislados de CMV con RNAsat de plantas ya infectadas por CMV. Para valores pequeños e intermedios del número de pulgones por planta las predicciones de los modelos epidemiológicos se corresponden con la evolución observada en el campo hacia una menor virulencia. Cuando el número de pulgones por planta es superior o cuando se considera la posibilidad de sobreinfección, las predicciones pueden explicar la expansión epidémica de los RNAsat en la población de CMV. Tanto el número de pulgones por planta como las posibilidades de sobreinfección son factores epidemiológicos que podrían estar determinados por el tamaño de las poblaciones de pulgones en la región afectada por la epidemia de necrosis. Es importante destacar que la expansión de los RNAsat necrogénicos durante los primeros años de la epidemia coincidió aproximadamente con la expansión de las poblaciones de pulgones en la costa mediterránea, en especial de la especie *Aphis gossypii* (Glover), que es el vector más eficaz de CMV. Este dato apoya las predicciones realizadas por los modelos epidemiológicos sobre la evolución de la virulencia de CMV y su RNAsat.

La aplicación de los modelos epidemiológicos de coevolución huésped-patógeno al caso de CMV y su RNAsat ha permitido estimar la importancia de factores que son difíciles de analizar experimentalmente, como por ejemplo los relacionados con la interacción ecológica entre un patógeno, su huésped y sus vectores. Este tipo de factores ecológicos pueden tener un papel fundamental en la evolución de las poblaciones de un patógeno en la naturaleza.

SUMMARY

Virulence is one of the most important properties of pathogens, and its evolution is critical to deal with prevention of diseases and to design effective disease-control strategies. Nevertheless, our knowledge of complex factors that could influence the evolution of virulence is scarce. In this work we analyse factors affecting virulence evolution in natural populations of cucumber mosaic virus (CMV) and its satellite RNA (satRNA).

From 1986 to 1992 a syndrome of systemic necrosis caused by CMV plus CMV-satRNA occurred in tomato crops in eastern Spain. From 1989 onwards, the incidence of tomato necrosis diminished and almost completely disappeared after 1992. The existence of CMV plus CMV-satRNA isolates after the disappearance of necrosis, and the high degree of correlation between necrosis symptoms and the presence of satRNA variants necrogenic for tomato showed the evolution of CMV plus CMV-satRNA towards decreased virulence. This was a good opportunity to study the evolution of virulence in a plant virus population.

We approached this work through the experimental analysis of fitness factors of CMV and satRNA. This analysis showed that satRNA variants necrogenic and non-necrogenic for tomato do not differ in their infectivity and in their accumulation levels in tomato, and that necrogenic satRNA variants are favoured in mixed infections and are more effectively transmitted to the descendece of CMV compared with non-necrogenic satRNA variants. Moreover, necrogenic satRNA variants have a more pronounced negative effect on the fitness of CMV than non-necrogenic variants, as they have a greater depression effect on both virus accumulation in infected tissues and efficiency of

virus transmission by aphids. On the other hand, CMV plus necrogenic satRNA isolates are more virulent in tomato than those without satRNA or with non-necrogenic satRNA.

These results show that there is a negative correlation between virulence and transmission of CMV plus CMV-satRNA for high values of virulence, i.e. when necrogenic satRNAs are associated with CMV. The prediction of epidemiological models of host-pathogen coevolution is that virulence evolution will follow different paths depending on the relation between virulence and transmission of the pathogen. These models predict that the evolution of virulence of CMV and its satRNA depends on the number of aphids present in a single plant and on the possibility of superinfection of CMV infected plants by CMV plus satRNA isolates. For low and medium numbers of aphids per plant predictions of epidemiological models agree with the evolution towards decreased virulence in the field. For greater numbers of aphids per plant or when superinfections are possible, predictions of the models can explain the epidemic expansion of satRNAs in CMV population. Both the number of aphids per plant and the possibility of superinfection events are epidemiological factors that could be determined by the size of aphid populations in the region affected by the necrosis epidemic. It is important to note the coincidence between the expansion of necrogenic satRNAs early in the epidemic and the expansion of aphid populations in eastern Spain, specially those of *Aphis gossypii* (Glover), the most efficient vector of CMV. This supports the predictions of the epidemiological models about the evolution of virulence of CMV and its satRNA.

In the case of CMV and its satRNA, epidemiological models of host-pathogen coevolution have allowed an estimation of factors difficult to analyse experimentally, like those related to the ecological interaction between pathogens, their hosts and vectors. These factors could have an important role in the evolution of populations of pathogens in nature.

ABREVIATURAS PRINCIPALES

BSA	albúmina de suero bovino
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CMV	<i>Virus del mosaico del pepino</i>
col.	colaboradores
CP	proteína de la cápsida
cv.	cultivar
DNA	ácido desoxirribonucleico
dpi.	días después de la inoculación
ed. (eds.)	Editor (es)
EDTA	ácido etilendiamino tetra acético
ELISA	ensayo de inmunoabsorción asociado a enzima
ELISA- DAS	ensayo de inmunoadsorción acoplado a enzima (doble sandwich)
H ₃ BO ₃	ácido bórico
HCl	cloruro de hidrógeno (ácido clorhídrico en disolución)
LiCl	cloruro de litio
N ₂	nitrógeno
Na ₂ HPO ₄	fosfato de disodio
NaCl	cloruro de sodio
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pp.	páginas
PVP	polivinil pirrolidona
RbCl	cloruro de rubidio
RNA(s)	ácido ribonucleico (os)
RNA _{sat}	ácido ribonucleico satélite
RT-PCR	transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa
SDS	dodecilsulfato de sodio
TAE	tampón tris-acetato
TBE	tampón tris-borato
Tris	tris hidroximetil aminometano
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
³² P	isótopo 32 del fósforo

UNIDADES DE MEDIDA UTILIZADAS

cm	centímetro
g	gramo
g	aceleración de la gravedad (9,8 m/s ²)
ha	hectárea
kDa	kilodalton
M	molar
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
nm	nanómetro
V	voltio
%	porcentaje
°C	grado centígrado
μg	microgramo
μl	microlitro

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Factores implicados en la evolución de los virus de plantas.....	4
1.2.- Evolución de la asociación huésped-patógeno	10
1.2.1.- Modelos de coevolución huésped-patógeno	11
1.2.2.- Modelos epidemiológicos de evolución de la virulencia	13
1.2.2.1.- Selección del patógeno por su capacidad de transmisión entre huéspedes	14
1.2.2.2.- Selección del patógeno por su capacidad de competición en el huésped	17
1.2.2.3.- Efecto de la sobreinfección en la selección de la virulencia	19
1.2.2.4.- Selección en condiciones epidémicas	20
1.2.3.- Validez experimental de los modelos de evolución de la virulencia	21
1.3.- El <i>Virus del mosaico del pepino</i> y su RNA satélite en tomate	22
1.3.1.- El <i>Virus del mosaico del pepino</i>	22
1.3.2.- El RNA satélite de CMV	25
1.3.3.- Control del <i>Virus del mosaico del pepino</i>	27
1.3.4.- Una epidemia del <i>Virus del mosaico del pepino</i> y su RNA satélite en tomate	30
2.- OBJETIVOS	33
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1.- Material biológico	39
3.1.1.- Aislados de campo de CMV con RNA satélite	39
3.1.2.- Cepas y aislados de CMV usados como virus auxiliar	39
3.1.3.- Material vegetal.....	40
3.2.- Extracción y análisis del RNA viral	40
3.2.1.- Extracción del RNA de CMV y de CMV con RNA satélite	40
3.2.2.- Análisis del RNA de aislados de CMV con RNA satélite	42
3.3.- Clonaje de cDNA de las variantes de RNA satélite	43
3.4.- Secuenciación del cDNA de las variantes de RNA satélite de CMV	44
3.5.- Obtención de RNA infectivo de CMV y de CMV con RNA satélite	44

3.6.- Ensayos biológicos	45
3.6.1.- Inoculación de CMV y CMV con RNA satélite en tomate	45
3.6.2.- Ensayos de transmisión de CMV y su RNA satélite por pulgones...	46
3.7.- Análisis y cuantificación de CMV y del RNA satélite	47
3.7.1.- Análisis cualitativo de la infección por CMV y RNA satélite	47
3.7.2.- Análisis del RNA encapsidado por CMV	48
3.7.3.- Cuantificación de partículas virales de CMV	48
3.7.4.- Cuantificación del RNA satélite de CMV	48
3.8.- Análisis estadísticos	49
4.- RESULTADOS	51
4.1.- Evolución de la virulencia de CMV y de su RNA satélite en poblaciones naturales	53
4.1.1.- Análisis de las frecuencias de CMV y RNA satélite durante la epidemia de necrosis de tomate	54
4.1.2.- Análisis del fenotipo de las variantes de RNA satélite de CMV	58
4.2.- Factores de la eficacia biológica del RNA satélite de CMV relacionados con su ciclo biológico	65
4.2.1.- Infectividad del RNA satélite de CMV	66
4.2.2.- Acumulación del RNA satélite de CMV	67
4.2.3.- Encapsidado del RNA satélite en las partículas de CMV	69
4.2.4.- Transmisión del RNA satélite a la descendencia de CMV	72
4.3.- Factores de la eficacia biológica del RNA satélite de CMV relacionados con su interacción con el virus auxiliar	75
4.4.- Factores de la eficacia biológica de CMV y su RNA satélite relacionados con su transmisión por vectores	76
4.4.1.- Transmisión de CMV y su RNA satélite por pulgones	76
4.4.2.- Relación entre la frecuencia de transmisión de CMV y su acumulación en los tejidos infectados	80
4.5.- Virulencia de CMV y su RNA satélite en tomate	84
4.5.1.- Efecto de CMV y su RNA satélite en el crecimiento de las plantas de tomate	84
4.5.2.- Efecto de CMV y su RNA satélite en la senescencia de las plantas de tomate	86

4.6.- Evolución de la virulencia de CMV y su RNA satélite. Aplicación de modelos epidemiológicos de coevolución huésped-patógeno.....	90
4.6.1.- Estimación de la virulencia de CMV y su RNA satélite	91
4.6.2.- Estimación de la tasa de transmisión de CMV y su RNA satélite	94
4.6.3.- Predicciones sobre la evolución de la virulencia de CMV y su RNA satélite	96
4.6.4.- Dinámica de las poblaciones de plantas infectadas por CMV y su RNA satélite	100
5.- DISCUSIÓN	109
5.1.- Evolución de la virulencia en la población del RNA satélite de CMV	111
5.2.- Factores de la eficacia biológica de CMV y su RNA satélite	116
5.3.- Predicciones sobre la evolución de la virulencia de CMV y su RNA satélite	122
6.- CONCLUSIONES	129
7.- BIBLIOGRAFÍA	133
ANEJO	151

1.- INTRODUCCIÓN

La agricultura se enfrenta continuamente con la aparición de nuevas plagas y enfermedades y con el cambio de los agentes que las producen. La capacidad de variación y evolución de estos agentes puede comprometer seriamente la eficacia de las estrategias diseñadas para su control. En el caso de las enfermedades producidas por virus, los métodos de control más frecuentes son el uso de medidas preventivas destinadas a reducir las fuentes de inóculo (Moriones y Luis, 1996), el control químico de los organismos vectores para limitar la dispersión del virus (Loebenstein y Raccah, 1980; Satapathy, 1998; Walsh, 1998), y el uso de la resistencia para impedir el desarrollo de la infección. Las plantas pueden resultar resistentes a la infección por virus cuando se han introducido en su genoma genes de resistencia procedentes de otros genotipos o especies mediante técnicas de mejora convencional (Fraser, 1998), o secuencias derivadas del virus mediante técnicas de ingeniería genética (resistencia derivada del patógeno) (Baulcombe, 1996). Además las plantas pueden adquirir resistencia a un virus al ser inoculadas con cepas atenuadas de éste (protección cruzada) (Fraser, 1998; Lecoq, 1998). La capacidad de variación y evolución de los virus y de sus vectores puede limitar en gran medida la eficacia de estas estrategias de control. Es frecuente, por ejemplo, que los vectores puedan desarrollar resistencia a la acción de los productos fitosanitarios (May, 1993; McKenzie y Batterham, 1994), y que aparezcan nuevas cepas del virus de mayor virulencia capaces de superar la protección conferida a la planta por los genes de resistencia (Harrison y col., 1987). Además, el uso de la protección cruzada y de la resistencia derivada del patógeno implica riesgos importantes por la posible aparición de formas virulentas del virus, tanto por la capacidad de variación de las cepas atenuadas usadas en protección cruzada como por la posibilidad

de recombinación en las plantas entre el virus y el RNA transcrito a partir de un transgen (Gibbs y col., 1997; Jakab y col., 1997). Por todo ello y para el desarrollo de estrategias de control eficaces a largo plazo, es necesario un mejor conocimiento de la capacidad de variación de los virus, de los mecanismos que determinan su evolución en la naturaleza, y de los factores genéticos y ecológicos implicados en la interacción entre los virus, sus huéspedes y sus vectores.

Una de las principales características de los patógenos capaz de variar y evolucionar es la virulencia. El conocimiento de los mecanismos implicados en la evolución de la virulencia es clave en el diseño de medidas eficaces para combatir las enfermedades y limitar sus consecuencias negativas. Aunque la evolución de la virulencia se ha analizado experimentalmente en un cierto número de patógenos (Ebert, 1998), existen muy pocos trabajos que analicen dicha evolución en condiciones naturales. El trabajo más detallado es el realizado por Fenner y colaboradores sobre el *Virus de la mixomatosis del conejo* (género *Leporipoxvirus*) en Australia (revisado en Fenner, 1995). Que el autor conozca, no existen en la bibliografía trabajos similares realizados con algún virus de plantas.

Esta tesis trata del análisis de los factores que determinan la evolución de la virulencia en poblaciones naturales del *Virus del mosaico del pepino* (CMV, género *Cucumovirus*) y su RNA satélite (RNAsat) en tomate.

1.1.- FACTORES IMPLICADOS EN LA EVOLUCIÓN DE LOS VIRUS DE PLANTAS

La evolución es el proceso por el cual la estructura genética de la población de un organismo cambia con el tiempo, y tiene lugar en dos fases independientes: la primera consiste en la generación de variabilidad genética en cada generación y la segunda determina la estructura genética de la población y su cambio temporal a partir del material genético disponible. Si se concede a la selección natural el papel principal en esta segunda fase, en cada generación sobrevivirán aquellos individuos con mayor eficacia biológica, entendiendo por eficacia biológica la capacidad de reproducción relativa con la que cada individuo contribuye a la nueva generación en unas

determinadas condiciones ambientales (Maynard Smith, 1989). Además, el azar puede estar implicado en cualquier fase del proceso evolutivo, desde por ejemplo la determinación del punto donde una mutación produce variabilidad, hasta la determinación de los individuos que pasan a la siguiente generación por fenómenos de deriva genética (Mayr, 1994).

A pesar de que la capacidad de variación de los virus se conoce desde el principio de la virología, el estudio de su evolución no alcanzó inicialmente un desarrollo importante, quizá por la dificultad de encontrar características virales adecuadas para analizarla de forma experimental y de averiguar a qué niveles podía actuar la selección natural (Morse, 1994). A partir del desarrollo de la biología molecular y de su aplicación a la biología evolutiva, el estudio de la evolución de los virus comenzó a despertar un interés creciente y a experimentar un notable desarrollo. El análisis de la capacidad de variación y evolución de los virus se ha abordado por distintos autores según las teorías neutralista y seleccionista. La teoría neutralista (Kimura, 1968) considera que la mayor parte de los cambios moleculares son neutrales y no resultan ventajosos para los individuos que los portan (carecen de valor selectivo positivo), reservando a la selección negativa la eliminación de las mutaciones perjudiciales y a la deriva genética el papel principal como mecanismo evolutivo (Sala y Wain-Hobson, 1999). En cambio, la teoría seleccionista considera que el proceso más importante en la evolución es la fijación de los cambios moleculares ventajosos (selección natural positiva). La evolución de algunos virus se ha interpretado según ambas teorías evolutivas. Este es el caso, por ejemplo, de los trabajos de Gojobori y colaboradores (1990) y de Fitch y colaboradores (1991) sobre la evolución del *Virus A de la gripe* (género *Influenzavirus A, B*).

El análisis de la evolución viral ha incluido también a los virus de plantas, que desde las primeras pruebas de su capacidad de variación (McKinney, 1935) han sido objeto de investigación para desvelar sus orígenes, sus relaciones taxonómicas y los mecanismos implicados en su evolución. Los trabajos sobre los mecanismos de variabilidad y evolución de virus de plantas han sido revisados recientemente por varios autores (Gibbs y col., 1997; Roossinck, 1997; Bujarski, 1999; García-Arenal y col., 1999; Gibbs y col., 1999). Los experimentos de pases seriados tanto con cepas de laboratorio como con inóculo derivado de clones de cDNA biológicamente activos indican que los virus de plantas tienen una alta capacidad de variación y que las mutaciones pueden

acumularse con rapidez en sus poblaciones. Los mecanismos de generación de variabilidad genética en virus de plantas se han estudiado en profundidad (Roossinck, 1997; Bujarski, 1999), y un número razonable de trabajos se han centrado en caracterizar la diversidad y estructura genéticas de sus poblaciones (García-Arenal y col., 1999; Gibbs y col., 1999). Estos trabajos muestran que una gran capacidad de variación no siempre se traduce en una gran diversidad genética. De hecho, las poblaciones naturales de virus de plantas muestran en general una elevada estabilidad, independientemente de que se trate de virus de DNA o RNA (Gibbs y col., 1999), incluso cuando se analizan largas series temporales de aislados de un mismo virus (Hillman y col., 1991; Skotnicki y col., 1993; Fraile y col., 1997b). Aunque los trabajos sobre la diversidad y estructura genéticas de las poblaciones de virus de plantas son más o menos numerosos, son pocos los casos en los que se han analizado los factores que determinan dicha estructura genética. Como se describe a continuación, los factores asociados con la selección, la deriva genética y las interacciones entre virus, así como los factores epidemiológicos, pueden relacionarse con diferentes fases del ciclo biológico de los virus.

Selección

La selección es el proceso por el que las variantes genéticas mejor adaptadas aumentan su frecuencia en las poblaciones y las peor adaptadas son eliminadas. Las presiones selectivas pueden estar asociadas a distintas fases del ciclo biológico de un virus determinando así su eficacia biológica. Un primer grupo de factores de selección puede relacionarse con el mantenimiento de determinadas características estructurales necesarias para determinadas funciones biológicas del virus. Un ejemplo es la elevada conservación de los aminoácidos implicados en el ensamblaje y estabilización de las partículas virales (Altschuh y col., 1987) o la estabilidad en regiones del genoma relacionadas con la replicación (Kurath y col., 1993; Bacher y col., 1994; Argüello-Astorga y col., 1994; Sanz y col., 1999). El mantenimiento de una estructura molecular funcional se considera el principal factor de selección en moléculas no codificantes como los RNAs satélites o los viroides (Fraile y García-Arenal, 1991; Kofalvi y col., 1997; Ambros y col., 1998).

La selección puede asociarse también con factores de la eficacia biológica del virus implicados en la interacción con su huésped o sus vectores. Varios ejemplos

demuestran que la selección asociada a huésped puede operar sobre distintas variantes genéticas en experimentos de pases seriados (Donis-Keller y col., 1981; Kurath y Palukaitis, 1990; Moriones y col., 1991) o sobre distintos pseudorrecombinantes en experimentos de intercambio genético (Qiu y col., 1998). La distribución de las poblaciones naturales de virus de plantas en relación con las especies del huésped, así como la coevolución de algunos grupos de virus junto con sus huéspedes, que se ha sugerido en el caso de los *Tobamovirus*, pueden explicarse también por procesos de selección asociada a huésped (Skotnicki y col., 1996; Lartey y col., 1996; Kofalvi y col., 1997; Gibbs, 1999). Los factores que pueden estar implicados en este tipo de presión selectiva no están claros en general, aunque el transporte y la colonización del huésped pueden ser buenos candidatos, ya que estas funciones se han relacionado con la resistencia de la planta a la infección (Atabekov y Dorokhov, 1984).

La selección asociada al vector ha sido puesta de manifiesto en varios virus al observarse que algunas cepas mantenidas en laboratorio por transmisión mecánica perdían su capacidad de transmisión a través de vectores (Reddy y Black, 1977; Pirone y Blanc, 1996). La selección asociada al vector puede explicar por ejemplo los resultados de experimentos de transmisión por pulgones de *Cucumovirus*, en los que ciertos tipos genéticos eran transmitidos de forma preferencial a partir de infecciones mixtas (Perry y Francki, 1992; Fraile y col., 1997a). Factores como la interacción entre las proteínas del virus y las proteínas del vector o como la multiplicación y la acumulación del virus en los tejidos de la planta podrían estar implicados en la selección asociada al vector (Banik y Zitter, 1990; Gray y col., 1991; Gray y Banerjee, 1999).

Deriva genética

La deriva genética consiste en los cambios al azar que se producen en la estructura genética de la población de un organismo cuando sólo unos pocos genotipos pasan a iniciar una nueva población (cuello de botella). Entre las consecuencias más importantes de los fenómenos de deriva genética asociados con los cuellos de botella se incluyen la fijación de alelos independientemente de su eficacia biológica (Nei, 1987) y la reducción de eficacia biológica en poblaciones asexuales por acumulación de mutaciones perjudiciales, fenómeno que se ha denominado "trinquete de Muller" (*Muller's ratchet*) (Muller, 1964; Lynch y col., 1993). El efecto de "trinquete de Muller" sólo se ha comprobado experimentalmente en las poblaciones de algunos virus

como el *Bacteriófago $\phi 6$ de Pseudomonas* (género *Cystovirus*) (Chao, 1990) y el *Virus de la estomatitis vesicular* (VSV, género *Rhabdovirus*) (Duarte y col., 1992; Novella y col., 1995). Sin embargo, las consecuencias de la deriva genética en poblaciones de virus de plantas no han sido analizadas experimentalmente, aunque algunos autores han señalado que este tipo de fenómenos pueden ser importantes en la evolución de su estructura genética (Roossinck, 1997; García-Arenal y col., 1999; Gibbs y col., 1999). Pirone y Blanc (1996) han sugerido que la transmisión no persistente de los virus por pulgones puede representar cuellos de botella poblacionales, y que el mecanismo de transmisión dependiente de un factor auxiliar podría compensar en algunos casos la disminución de eficacia biológica asociada con dichos cuellos de botella. Aunque estas suposiciones no han sido comprobadas de forma experimental, la existencia de cuellos de botella asociados a ciertas funciones biológicas, como la transmisión del virus entre plantas, podrían explicar los cambios al azar de genotipo observados en experimentos de pases seriados (Aldaoud, 1989; Kurath y Palukaitis, 1989a; Kurath y Dodds, 1995), y los distintos patrones de distribución de la estructura genética en poblaciones naturales de algunos virus (Moya y col., 1993; Fraile y col., 1996; Fraile y col., 1997a).

Interacciones entre virus

Las interacciones entre virus pueden tener una gran influencia en la evolución de la estructura genética de las poblaciones de virus de plantas. Un caso importante de interacción es el fenómeno de complementación, que permite que variantes defectivas en alguna función biológica puedan mantenerse en la población porque otra variante no defectiva complementa dicha función. De esta forma, la complementación puede modificar el efecto de la selección y modular de forma importante el proceso evolutivo. El único caso en el que se ha obtenido una estima cuantitativa del efecto de la complementación en la evolución de virus de plantas es el análisis realizado por Moreno y colaboradores (1997) para el *Virus de la aspermia del tomate* (TAV, género *Cucumovirus*), en el que un mutante del RNA3 defectivo para el movimiento de célula a célula y que presentaba una elevada eficacia en replicación, podía ser complementado por variantes competentes para movimiento. La estimación del grado de complementación a partir de las eficacias biológicas de variantes defectivas y competentes permitió prever que el mutante defectivo podría mantener una alta frecuencia en la población.

Otro tipo de interacción con importantes consecuencias evolutivas se ha descrito entre el *Virus del mosaico de tabaco* (TMV, género *Tobamovirus*) y el *Virus del mosaico verde atenuado del tabaco* (TMGMV, género *Tobamovirus*) (Fraile y col., 1997b). La presencia de ambos virus se detectó en plantas de herbario de *Nicotiana glauca* Graham australianas recogidas antes de 1950, sin embargo sólo TMGMV estaba presente en las muestras más recientes, lo que sugería la desaparición de TMV de esta población. En experimentos de coinfección de plantas de *N. glauca* con ambos virus se demostró que la presencia de TMGMV reducía alrededor de diez veces la acumulación de TMV. Este efecto podría haber significado la reducción de la concentración de TMV en las plantas por debajo de un umbral mínimo que asegurara la transmisión de este virus, favoreciéndose la acumulación de mutaciones perjudiciales por el mecanismo del "trinquete de Muller" y provocando la desaparición de TMV de la población.

Por último, la interacción entre virus defectivos y virus auxiliares puede constituir un factor importante en la determinación de la estructura genética de las poblaciones de ambos virus. Un ejemplo bien estudiado es la interacción entre CMV y su RNAsat, para la que se ha descrito el efecto del virus auxiliar (CMV) en la estructura genética del RNAsat, pero este caso será comentado en el apartado 1.3.

Factores epidemiológicos

Múltiples factores asociados con la ecología de los virus, derivados de su interacción con sus huéspedes y sus vectores, como son la transmisión y la virulencia, pueden jugar un papel importante en la evolución de sus poblaciones. Aunque tales factores no han sido analizados en virus de plantas, su importancia epidemiológica se ha puesto de manifiesto en modelos teóricos que analizan la evolución de los parásitos y sus huéspedes (May, 1995).

En este apartado se han citado los factores más importantes que pueden determinar la evolución de los virus de plantas, algunos de ellos relacionados con el huésped o sus vectores. De forma recíproca, los virus, y en un sentido más amplio los patógenos y parásitos en general, constituyen también un importante factor determinante en la evolución del huésped (Ebert, 1994). Los parásitos pueden ser responsables de gran parte de la variabilidad genética existente en las poblaciones de

sus huéspedes y regular su magnitud y distribución geográfica (May y Anderson, 1983). Esta interacción recíproca entre huéspedes y parásitos hace necesario el estudio de su evolución en el contexto de la asociación huésped-parásito, cuyos aspectos más relevantes se indican en el apartado siguiente. Hay que destacar que en la bibliografía se utiliza indistintamente el término parásito o patógeno para referirse a un mismo tipo de organismo. Esta tesis trata sobre la evolución de un virus patógeno de plantas, por lo que se ha preferido utilizar a partir de ahora el término patógeno para referirse a un microparásito que vive y se reproduce a expensas de un huésped.

1.2.- EVOLUCIÓN DE LA ASOCIACIÓN HUÉSPED-PATÓGENO

La dinámica de la asociación huésped-patógeno ha sido estudiada mediante el desarrollo de modelos matemáticos que se basan en consideraciones teóricas sobre la distribución de los caracteres de resistencia del huésped y de virulencia del patógeno en sus respectivas poblaciones. La interacción entre los patógenos y sus huéspedes presenta una doble componente: genética y epidemiológica. Los modelos que analizan la componente genética describen los cambios que se producen en las frecuencias de genotipos en las poblaciones del huésped y del patógeno sin tener en cuenta los posibles cambios de tamaño y de densidad de esas poblaciones. Por el contrario los modelos que consideran la componente epidemiológica describen los cambios que la acción del patógeno sobre su huésped provoca en el tamaño de las poblaciones de ambos, sin tener en cuenta los cambios genéticos que dicha acción pudiera producir en ellas (May, 1995). Esta separación se debe a la dificultad de integrar en un único modelo todos los parámetros necesarios para cuantificar la variación con el tiempo de los factores que pueden intervenir en la interacción huésped-patógeno (Frank, 1992b).

Los modelos epidemiológicos que estudian la interacción huésped-patógeno están básicamente orientados al análisis de la evolución de la virulencia. Pese a las múltiples acepciones que este término tiene, su significado biológico está relacionado con la reducción que la infección por el patógeno produce en la eficacia biológica del huésped, y por tanto en su capacidad reproductiva (Read, 1994). La virulencia es pues el principal factor epidemiológico, ya que determina el tamaño de la población del huésped, del que a su vez el patógeno depende para su multiplicación y transmisión.

Además del importante interés teórico de los modelos genéticos y epidemiológicos de evolución huésped-patógeno, sus conclusiones tienen importantes consecuencias prácticas en cuanto al establecimiento de comportamientos sociales y de aplicaciones tecnológicas destinados a mejorar las estrategias de control de las enfermedades, tanto en el campo de la medicina como de la veterinaria y de la agricultura (Leonard y Czocho, 1980; Bull, 1994; Frank, 1996).

En los siguientes apartados se presentan los principales modelos de coevolución huésped-patógeno y los principales modelos de evolución de la virulencia, describiendo brevemente sus características y conclusiones más relevantes.

1.2.1.- Modelos de coevolución huésped-patógeno

Los modelos genéticos de coevolución huésped-patógeno se desarrollaron originalmente para analizar las interacciones entre las plantas y sus patógenos, y se basan en la observación de asociaciones específicas entre genotipos del huésped y genotipos del patógeno. De esta forma y teniendo en cuenta un sistema de un *locus* y dos alelos, a cada par de alelos de susceptibilidad-resistencia en el huésped le correspondería un par de alelos de virulencia-avirulencia en el patógeno. Estas interacciones gen a gen fueron descritas por primera vez por Flor (1955; 1971) en la interacción entre la roya del lino (*Melampsora lini* (Ehrenb.) Lév.) y su huésped (*Linum usitatissimum* L.), identificándose hasta 29 factores de resistencia en el lino que se correspondían con otros tantos factores de virulencia en la roya. Desde entonces se han descrito relaciones gen a gen en muchas otras interacciones de plantas con hongos, virus o bacterias (Burdon, 1987). Basándose en la interacción gen a gen, los modelos incluyen dos consideraciones teóricas importantes. En primer lugar suponen que la eficacia biológica del huésped depende de las frecuencias génicas de la virulencia en la población del patógeno y, recíprocamente, la eficacia biológica del patógeno depende de las frecuencias génicas de la resistencia en la población del huésped. En segundo lugar suponen que la existencia de polimorfismos en la población del patógeno implica un coste asociado al mantenimiento de factores de virulencia innecesarios en ausencia de los correspondientes factores de resistencia en el huésped. De forma recíproca, existiría un coste asociado a la resistencia del huésped por la permanencia de factores de

resistencia en ausencia de los correspondientes factores de virulencia en el patógeno. Partiendo de estas consideraciones los modelos predicen que en condiciones de equilibrio del sistema: a) la frecuencia de un factor de resistencia aumentará cuanto mayor sea el coste asociado al correspondiente factor de virulencia; b) la frecuencia de un factor de virulencia aumentará cuanto menor sea el coste asociado al correspondiente factor de resistencia. De esta forma las frecuencias génicas en las poblaciones del huésped y del patógeno estarán y variarán ligadas hasta que las diferencias de eficacia biológica entre los factores de virulencia y avirulencia del patógeno (coste de la virulencia) se equilibren con las diferencias de frecuencia de los factores de resistencia y susceptibilidad (Leonard y Czochor, 1980; Frank, 1992b).

El análisis de los polimorfismos de resistencia y virulencia en algunas poblaciones naturales de huéspedes y patógenos indican que, aunque los factores de resistencia sean numerosos en la población del huésped, su frecuencia en los individuos es relativamente baja, mientras que la frecuencia de los factores de virulencia es alta en los individuos de la población del patógeno (Dinoor y Eshed, 1987; Clarke y col., 1990; Burdon y Jarosz, 1991; Burdon, 1993). Según la predicción de los modelos genéticos de coevolución huésped-patógeno, esta situación correspondería a bajos costes asociados a la virulencia y a la resistencia en las poblaciones de patógenos y huéspedes (Frank, 1992b).

Como ya se ha comentado, los modelos basados en consideraciones estrictamente epidemiológicas se centran principalmente en el análisis de la evolución de la virulencia, ya que este es el factor principal de los cambios en la densidad de las poblaciones de huéspedes y patógenos. Este segundo tipo de modelos se presentan específicamente en el apartado siguiente.

Una tercera clase de modelos pretende describir situaciones más realistas de la interacción de los huéspedes y sus patógenos integrando los factores genéticos anteriormente descritos con algunos factores epidemiológicos (Gillespie, 1975; May y Anderson, 1983; 1990). Uno de estos factores tiene en cuenta la disminución ocasional del tamaño de la población del huésped (y por consiguiente del patógeno) producida por un desarrollo epidémico de la enfermedad. Como consecuencia, la recolonización de la población se realizará por genotipos poco frecuentes del huésped que son resistentes al genotipo más frecuente del patógeno, seguida por la recolonización con genotipos poco frecuentes del patógeno capaces de infectar a los nuevos genotipos resistentes del

huésped. Tales recolonizaciones tienden a reducir los polimorfismos de resistencia y virulencia en las poblaciones del huésped y del patógeno, que tenderán a un nuevo equilibrio. A su vez, las recolonizaciones pueden suponer nuevos desarrollos epidémicos de la enfermedad. De este modo, los ciclos epidémicos sucesivos podrían causar cambios temporales radicales en las frecuencias genéticas de las poblaciones de patógenos y huéspedes (Frank, 1992b). Un segundo factor epidemiológico importante son los acontecimientos ocasionales de migración de genotipos del patógeno entre poblaciones separadas en el espacio. El análisis de los polimorfismos de algunas poblaciones naturales de huéspedes y patógenos indica que entre poblaciones separadas geográficamente puede existir un elevado grado de diversidad genética (Burdon y col., 1990; Clarke y col., 1990). Por tanto, la migración ocasional puede ser una fuente de nuevos genotipos de virulencia, que podrán dispersarse de forma local y epidémica en cada una de las poblaciones, produciendo nuevos ciclos de variación temporal de los polimorfismos. El resultado global indica que los polimorfismos genéticos pueden mantenerse en la población, bien de forma estable, o bien de forma cíclica o caótica, dependiendo de la dinámica de las frecuencias genéticas que según los casos puede resultar impredecible (May y Anderson, 1983; 1990). Además, teniendo en cuenta los polimorfismos a escala espacial, los costes asociados a la resistencia del huésped y a la virulencia del patógeno siguen siendo los mecanismos de regulación del equilibrio de las frecuencias genéticas (Frank, 1992b).

1.2.2.- Modelos epidemiológicos de evolución de la virulencia

Los modelos genéticos de coevolución patógeno-huésped indican que el mantenimiento del polimorfismo genético en las poblaciones del patógeno y del huésped es posible si existen costes biológicos asociados a la virulencia del patógeno y a la resistencia del huésped. En ausencia de otros factores, la evolución hacia formas de menor virulencia y de menor resistencia sería beneficiosa para ambos elementos de la interacción. De hecho, los partidarios de las teorías de selección de grupo afirman que los patógenos bien adaptados deberían evolucionar para perjudicar lo mínimo al huésped, del que depende su supervivencia (Palmieri, 1982; Holmes, 1982). Allison (1982) ha descrito algunos ejemplos de patógenos que son poco virulentos en aquellos

huéspedes con los que han coexistido largo tiempo manteniendo una relación estable, y que muestran mayor virulencia cuando se introducen en otras regiones o atacan a huéspedes establecidos recientemente en la región. Sin embargo, la disminución de la virulencia del patógeno no siempre se produce. Existen interacciones huésped-patógeno en las que la muerte del huésped es parte integral del ciclo de transmisión del patógeno (May y Anderson, 1990). Así mismo, en poblaciones naturales de patógenos de animales y de plantas se han descrito numerosos casos de polimorfismos asociados con la virulencia (Burdon, 1987; Power, 1992; Read, 1994), en los que la virulencia puede estar sujeta a selección (Bull y col., 1991; Read, 1994; Messenger y col., 1999). La evolución de la virulencia cuando las poblaciones del patógeno y del huésped están sometidas a diferentes grados de presión selectiva se ha estudiado a través de modelos teóricos en los que se analiza la interrelación de los factores asociados con la virulencia del patógeno con los factores asociados con su transmisión (Garnett y Antia, 1994; May, 1995). La conclusión fundamental de estos modelos es que la evolución de la virulencia puede seguir múltiples direcciones, dependiendo de la interrelación entre la virulencia y la transmisión en cada caso concreto (Anderson y May, 1982; May, 1995). Desde un punto de vista epidemiológico esta interrelación determina el coste biológico asociado con la virulencia del patógeno. La complejidad de estos modelos va aumentando a medida que se consideran un mayor número de factores sometidos a selección (Read, 1994; Bull, 1994; Frank, 1996). A continuación se describen las consideraciones teóricas, la formulación matemática y las conclusiones de los modelos de evolución de la virulencia que se consideran más relevantes, en orden de menor a mayor complejidad.

1.2.2.1.- Selección del patógeno por su capacidad de transmisión entre huéspedes

Los modelos de evolución de la virulencia más sencillos suponen que la selección natural opera únicamente sobre las componentes de la eficacia biológica que afectan a la transmisión del patógeno entre sus huéspedes. En un principio se considera que la transmisión es horizontal, es decir, los huéspedes que reciben la nueva infección no son descendientes directos de los huéspedes origen de la infección. En un segundo

nivel de complejidad, los modelos contemplan la posible transmisión vertical del patógeno a los descendientes directos del huésped infectado.

Transmisión horizontal

Los modelos que se describen en este apartado están basados en el conjunto de ecuaciones diferenciales propuestas por Anderson y May (1979) para analizar el efecto de regulación de la población de un huésped por un microparásito. Estas ecuaciones representan la variación con respecto al tiempo t de las densidades de individuos susceptibles $X(t)$, infectados $Y(t)$ y recuperados o inmunes $Z(t)$, en la población total del huésped $N = X + Y + Z$:

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= B(X, Y, Z) - bX - \beta XY \\ \frac{dY}{dt} &= \beta XY - (b + \alpha + \nu)Y \\ \frac{dZ}{dt} &= \nu Y - bZ\end{aligned}\tag{Ecuaciones 1.1}$$

donde β , b , α y ν son parámetros epidemiológicos que representan las tasas *per capita* de transmisión del patógeno, de mortalidad del huésped en ausencia de enfermedad, mortalidad del huésped debida a la enfermedad y de recuperación del huésped, respectivamente, por unidad de tiempo; y $B(X, Y, Z)$ es una función que representa la tasa de aumento de individuos susceptibles, que puede depender de la distribución de la enfermedad en la población del huésped.

Modelos con esta formulación (Bremermann, 1980; Anderson y May, 1982; May y Anderson, 1983) han servido para evaluar la eficacia biológica del patógeno en función de los valores que tomen los parámetros epidemiológicos en las Ecuaciones 1.1. Estos parámetros se relacionan entre sí a través de la expresión de la tasa neta reproductiva de Fisher para el patógeno, R_0 :

$$R_0 = \frac{\beta N}{b + \alpha + \nu}\tag{Ecuación 1.2}$$

donde β , b , α , ν y N son los mismos parámetros y variable indicados en las Ecuaciones 1.1. R_0 representa el número de infecciones secundarias producidas por un

huésped infectado cuando es introducido en una población no infectada (Dietz, 1975; Yorke y col., 1979; Anderson y May, 1981), y es una medida válida de la eficacia biológica del patógeno cuando el sistema huésped-patógeno está en equilibrio (May, 1995; Frank, 1996). El cociente: $1 / (b + \alpha + \nu)$ en la Ecuación 1.2 representa el tiempo t_β durante el cual la transmisión del patógeno es posible antes de que el huésped muera o se recupere de la enfermedad. Estos modelos suponen que la selección natural favorecerá el valor máximo de R_0 , y que este valor dependerá de la interrelación entre la virulencia y la transmisión (modelos de "interacción virulencia-transmisión", o modelos "trade-off") (Fenner y col., 1956; Anderson y May, 1982; Lenski, 1988). Los parámetros que afectan a la transmisión (β y t_β) se correlacionan con la virulencia a través de la tasa de multiplicación del patógeno en el huésped, de forma que cuanto mayor sea ésta, mayor será la virulencia α , mayor será la tasa de transmisión β y menor el tiempo t_β en el que la transmisión es posible. De esta forma, la tasa de transmisión del patógeno y la tasa de recuperación del huésped pueden considerarse funciones que varían con la virulencia: $\beta = \beta(\alpha)$ y $\nu = \nu(\alpha)$. Así, la virulencia representa un coste biológico inevitable asociado a una alta tasa de transmisión, y el patógeno tendrá que obtener un valor de virulencia compromiso que signifique una transmisión aceptable durante un tiempo aceptable.

La conclusión fundamental es que la virulencia puede seguir diferentes direcciones en su evolución dependiendo de la interrelación que en cada caso exista entre la virulencia y los parámetros que afectan a la transmisión (Anderson y May, 1982; May y Anderson, 1983).

Existen modelos más complejos que, basándose en la misma formulación y las mismas suposiciones descritas, consideran variaciones en la interrelación virulencia-transmisión por el efecto de otros factores, tales como el crecimiento del patógeno en el huésped o la respuesta inmune en el caso de patógenos de animales (Garnett y Antia, 1994).

Transmisión horizontal y transmisión vertical

La eficacia biológica de un patógeno de transmisión vertical obligada está íntimamente ligada a la eficacia biológica de su huésped, del que depende para su reproducción. Por tanto, cualquier reducción en la eficacia biológica del huésped, es decir, cualquier nivel de virulencia en el patógeno, significaría la desaparición de éste a

largo plazo (Fine, 1975). Sin embargo, según los modelos expuestos anteriormente, la existencia de una fracción de huéspedes infectados sólo puede explicarse por un equilibrio selectivo entre la virulencia del patógeno y su transmisión, que no podría existir bajo condiciones de transmisión estrictamente vertical. Frank (1996) considera que la transmisión vertical estricta es poco probable y que debe existir una proporción de transmisión horizontal en el patógeno para que sea posible su permanencia en la población del huésped. Bajo esta suposición, los modelos de interacción virulencia-transmisión siguen siendo válidos sin más que considerar la transmisión vertical como la persistencia del patógeno en el huésped y su descendencia (Bull, 1994; Lipsitch y col., 1995; Frank, 1996), de forma que en el equilibrio la pérdida global de infecciones en el linaje del huésped por transmisión vertical se compensa con nuevas infecciones por transmisión horizontal. La evolución de la virulencia dependerá de la relación entre transmisión horizontal y transmisión vertical, aunque esta relación no está determinada por el patógeno, sino más bien por las condiciones ambientales (Bull, 1994; Frank, 1996).

1.2.2.2.- Selección del patógeno por su capacidad de competición en el huésped

Varios modelos matemáticos han analizado la competición que se produce en un huésped cuando está infectado por dos o más genotipos del patógeno. Estos modelos están basados en dos supuestos fundamentales: el primero es que los distintos genotipos del patógeno difieren en su capacidad de adaptación al huésped, debido a diferencias en su nivel de multiplicación en él; el segundo es que la virulencia se asocia con niveles altos de multiplicación del patógeno en el huésped, por lo que estos modelos se han denominado "modelos de asociación" (Bull, 1994). Cuando existe infección múltiple en un huésped, la evolución de la virulencia estará determinada por dos componentes de selección: la selección del patógeno por su capacidad de competición en el huésped, que provocará cambios en la frecuencia de los genotipos que lo coinfectan, y la selección del patógeno por su capacidad de transmisión entre huéspedes. Las conclusiones fundamentales de estos modelos son que la selección tiende a favorecer el aumento de la virulencia y competición del patógeno en el huésped aún a costa de no mantener su máximo potencial de reproducción, y que la coexistencia en equilibrio de los genotipos

competidores depende de la forma que en cada caso presente la interacción virulencia-transmisión y del número de genotipos en competición (Bremermann y Pickering, 1983; Garnett y Antia, 1994; Nowak y May, 1994). Frank (1992a) y Van Baalen y Sabelis (1995) estudiaron el efecto de la infección múltiple del huésped aplicando la teoría de la selección de parientes en un modelo de "interacción virulencia-transmisión". La formulación matemática empleada está ampliamente revisada en Frank (1996) y a continuación se resumen sus rasgos principales. El modelo tiene en cuenta que la tasa neta reproductiva R_{ia} de un genotipo a del patógeno en un huésped i es, según la Ecuación 1.2:

$$R_{ia} = \frac{\beta(\alpha_{ia})N}{b + \alpha_i + \nu(\alpha_{ia})} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

donde la tasa de transmisión horizontal $\beta(\alpha_{ia})$ y la respuesta de recuperación inducida en el huésped $\nu(\alpha_{ia})$ son funciones que dependen de la virulencia α_{ia} del propio genotipo a , mientras que la tasa de mortalidad del huésped i depende de la virulencia α_i del conjunto de genotipos del patógeno que coinfectan al huésped. La selección tenderá a maximizar el valor de la Ecuación 1.3 y este valor determinará la virulencia final en el sistema. En la condición de equilibrio el valor máximo de R_{ia} (3) depende del término $d\alpha_i/d\alpha_{ia}$. Considerando a α_i y α_{ia} como las componentes del valor genotípico del patógeno que corresponden a la virulencia, el término $d\alpha_i/d\alpha_{ia}$ representa la variación del valor genotípico medio del conjunto de patógenos en el huésped i con respecto al valor genotípico del patógeno a , es decir, el coeficiente de relación r de la teoría de selección de parientes (Hamilton, 1972; Queller, 1992; Frank, 1996). El coeficiente r mide el grado de correlación o asociación estadística entre los distintos genotipos del patógeno en el huésped. De una forma intuitiva, a mayor asociación entre los genotipos ($r = 1$ cuando son idénticos) mayor beneficio obtiene cada genotipo cuando se selecciona el conjunto de genotipos del patógeno. En el modelo de selección de parientes de Frank (1992a; 1996) la virulencia es tanto mayor cuanto menor sea la asociación entre genotipos (r pequeño: mayor diversidad de patógenos en el huésped), sin que se llegue a alcanzar un valor de equilibrio ($\alpha \rightarrow \infty$) para valores de r suficientemente pequeños. Estos resultados constituyen una generalización de las conclusiones que Bremermann y Pickering (1983) obtuvieron aplicando la teoría de juegos a la evolución de la virulencia.

La selección por competición de genotipos distintos del patógeno en un huésped puede tener además un efecto adicional sobre su capacidad de transmisión que puede ser positivo o negativo. Por ejemplo, nuevas variantes capaces de superar la respuesta defensiva del huésped pueden competir favorablemente frente a otras y pueden prolongar la infección, aumentando el tiempo disponible para la transmisión entre huéspedes. De este modo la virulencia podría mantenerse a largo plazo. Otro tipo de variantes del patógeno pueden ser seleccionadas debido a su mayor capacidad de multiplicación en el huésped, aumentando la virulencia del patógeno y la tasa de mortalidad del huésped, y reduciendo el periodo útil para la transmisión. La selección de este tipo de variantes tendría lugar sólo a corto plazo, al resultar perjudicadas en su transmisión (Levin y Bull, 1994).

1.2.2.3.- Efecto de la sobreinfección en la selección de la virulencia

Un efecto adicional en la evolución de la virulencia es la capacidad de un patógeno de infectar un huésped que ya estaba infectado por otro patógeno. Como se ha comentado en el apartado anterior, la infección múltiple resultante puede suponer la selección de los patógenos por su capacidad de competición en el huésped, pero independientemente del efecto por competición la sobreinfección también puede alterar los equilibrios de las poblaciones, permitiendo la coexistencia de genotipos del patógeno con diferentes grados de virulencia. Este efecto ha sido descrito por Levin y Pimentel (1981) utilizando el conjunto de ecuaciones diferenciales de Anderson y May (1979). En su trabajo analizaron la coexistencia en la misma población de dos patógenos con la misma capacidad de transmisión y distintas virulencias: α_1 y α_2 , con $\alpha_1 > \alpha_2$. Asumiendo que el patógeno más virulento podía sobreinfectar huéspedes infectados con el patógeno menos virulento, la coexistencia de ambos sólo era posible para valores intermedios de α_1/α_2 en relación con su transmisión. El efecto de la sobreinfección por determinados genotipos del patógeno ha sido investigado también por Nowak y May (1994), y recientemente por Zhang y colaboradores (2000) para el caso de complejos virales de plantas dependientes de un virus auxiliar para la transmisión. En las plantas existen virus o complejos subvirales, como los RNAs satélites, que sólo pueden transmitirse al sobreinfectar huéspedes previamente infectados con un virus ayudante.

Este fenómeno puede alterar de diferentes formas la coexistencia y el equilibrio entre virus ayudante y virus dependiente en función de la interrelación de varios parámetros epidemiológicos, entre ellos la relación entre la tasa de infección y la tasa de pérdida de huéspedes por la infección (Zhang y col., 2000).

1.2.2.4.- Selección en condiciones epidémicas

Los modelos de evolución de la virulencia discutidos en los apartados anteriores tratan de predecir el valor que adquiere la virulencia cuando las poblaciones del huésped y del patógeno alcanzan el equilibrio. La cepa del patógeno con una mayor tasa neta reproductiva R_0 se establecerá en la población y determinará el valor de la virulencia. Sin embargo, cuando un patógeno se introduce en una población en expansión de un huésped no infectado, la selección favorecerá a la cepa cuya tasa de transmisión permita la mayor tasa de incremento del patógeno sobre la población del huésped (Lenski y May, 1994; Bull, 1994). La tasa de incremento o de dispersión de un patógeno cuando se introduce en una población (E_0) viene dada por la diferencia entre la aparición de nuevas infecciones y su desaparición por muerte del huésped (ver Ecuaciones 1.1), es decir:

$$E_0 = \beta(\alpha)N - [b + \alpha + v(\alpha)] \quad \text{Ecuación 1.4}$$

En condiciones endémicas, cuando la infección está establecida, la selección favorece el nivel de virulencia que hace máxima la tasa neta reproductiva R_0 expresada en la Ecuación 1.2, llegando a un equilibrio que depende de la interrelación virulencia-transmisión (Anderson y May, 1982). Esta situación de equilibrio se produce cuando la población de huéspedes infectados permanece constante, es decir, cuando la Ecuación 1.4 toma el valor 1. Sin embargo, cuando las condiciones son epidémicas, la selección favorece las altas tasas de incremento de dicha población, alcanzadas para el valor de la virulencia que hace máximo el valor de la Ecuación 1.4 (Frank, 1996). Frank (1996) analizó el desarrollo del patógeno en condiciones epidémicas en el caso de la existencia de infecciones múltiples del huésped por distintos genotipos del patógeno, relacionados a través del coeficiente r de relación de la teoría de la selección de parientes. Observó que la dinámica epidémica no afecta a la relación entre la virulencia del patógeno y la

respuesta de recuperación del huésped, mientras que sí influye en la relación entre la virulencia y la transmisión, de forma que el valor de virulencia seleccionado en condiciones epidémicas depende principalmente de la tasa de transmisión y del número de huéspedes susceptibles, y no de la tasa de mortalidad o recuperación inducida en el huésped. El efecto de una menor asociación entre los genotipos del patógeno que infectan el mismo huésped, medida por el coeficiente r , provoca el aumento de la competición entre dichos genotipos y un aumento global de la virulencia (Frank, 1996). Estos resultados coinciden con los de otros autores, que indican que en epidemias en expansión, la virulencia está determinada por la tasa de transmisión e infección de nuevos huéspedes (Bremermann, 1983; Lenski y May, 1994; Levin y Bull, 1994).

1.2.3.- Validez experimental de los modelos de evolución de la virulencia

La validez experimental de las consideraciones teóricas tenidas en cuenta en los modelos epidemiológicos ha sido analizada en varias investigaciones. Entre los primeros trabajos destaca el análisis de la relación entre la virulencia de bacterias patógenas de ratones y el tamaño de la población de éstos regulado por la infección, o la relación entre la virulencia y la eficiencia de transmisión de *Baculovirus* en lepidópteros (Anderson y May, 1979; 1981; 1982). El mejor ejemplo de análisis experimental de la virulencia es el clásico trabajo sobre el *Virus de la mixomatosis* infectando al conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus* L.) en Australia. Fenner y Ratcliffe (1965) clasificaron el virus en seis cepas atendiendo a su virulencia mediante su ensayo frente a conejos de laboratorio que no habían desarrollado resistencia alguna frente al virus. Con estos datos Anderson y May (1982) estimaron experimentalmente la interrelación entre virulencia y transmisión, prediciendo la evolución del *Virus de la mixomatosis* hacia formas de virulencia intermedia. Los virus de fenotipo más virulento tendrían un periodo infeccioso demasiado corto por causar una muerte rápida en los conejos, mientras que la enfermedad causada por las cepas más benignas sería rápidamente superada por los conejos, evitando así la transmisión eficaz del virus. Los resultados predichos por el modelo coincidieron de forma significativa con la distribución de virulencia observada en el campo (Anderson y May, 1982). Otros trabajos han investigado la interrelación entre la virulencia y la transmisión en condiciones experimentales (Ebert, 1998;

Mackinnon y Read, 1999) y también en las poblaciones naturales de algunos patógenos, como nematodos parásitos de las avispas polinizadoras de la higuera (Herre, 1993), protistas parásitos de crustáceos del plancton (Ebert, 1994) y protistas parásitos de mosquitos (Agnew y Koella, 1997). Existen, además, bastantes ejemplos de otros sistemas patógeno-huésped que apoyan las hipótesis de los modelos de "interacción virulencia-transmisión", tanto en el caso de patógenos de animales (revisado en Bull, 1994) como en el de patógenos de plantas, especialmente virus (revisado en Power, 1992). La respuesta de la virulencia a la selección según diferentes grados de transmisión vertical y horizontal ha sido estudiada experimentalmente en bacteriófagos y plásmidos de bacterias (Bull y col., 1991; Turner y col., 1998; Messenger y col., 1999). También existen ejemplos que apoyan la existencia de una relación entre la virulencia y el modo de transmisión de los patógenos en condiciones naturales, como es el caso de los piojos y ácaros de palomas (Clayton y Tompkins, 1994), o los virus crípticos de plantas, que dependen de la transmisión vertical por semilla para su dispersión y son prácticamente avirulentos en sus huéspedes (Boccardo y col., 1987; Power, 1992). La selección de la virulencia por competición de diferentes genotipos de patógenos coinfectando un huésped ha sido observada en varios casos de patógenos de animales (Bull, 1994; Frank, 1996). El efecto de la sobreinfección en el equilibrio de las poblaciones de complejos virales dependientes de virus auxiliar ha sido analizada en plantas para los agentes causantes de las enfermedades de la roseta del cacahuete y del tungro del arroz (Zhang y col., 2000). Sin embargo, no conocemos casos de análisis experimental de la evolución de la virulencia en virus de plantas.

1.3.- EL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO Y SU RNA SATÉLITE EN TOMATE

1.3.1.- El Virus del mosaico del pepino

El *Virus del mosaico del pepino* (CMV) pertenece, junto con el *Virus de la aspermia del tomate* (TAV) y el *Virus del enanismo del cacahuete* (PSV), al género de los *Cucumovirus* dentro de la familia *Bromoviridae* (Van Regenmortel, 1999). CMV es

un virus bien caracterizado y su estudio ha dado lugar a la publicación de numerosa bibliografía, que se ha revisado recientemente en varias ocasiones: Francki y colaboradores (1979), Palukaitis y colaboradores (1992), Palukaitis y García-Arenal (1999). A continuación se describen algunas de sus principales características.

CMV se encuentra distribuido en las zonas templadas y tropicales de todo el mundo causando enfermedades en gran variedad de cultivos hortícolas. Es el virus más importante por las pérdidas económicas que produce en cucurbitáceas, pimiento, tomate, lechuga y apio, en países de la costa mediterránea, Portugal, Polonia, Croacia, Suecia, nordeste de Estados Unidos, este de China y Japón (Tomlinson, 1987; Gallitelli, 1998). Su gama de huéspedes es la más amplia descrita hasta ahora para un virus de plantas, incluyendo más de 1200 especies distribuidas en más de 100 familias de dicotiledóneas y monocotiledóneas (Edwardson y Christie, 1991). La sintomatología inducida por CMV es variable y depende de la cepa del virus, de la planta huésped y de su cultivar. En tomate suele producir reducción del tamaño de la planta, mosaicos y reducción de la lámina foliar (filimorfismo), y además puede producir clorosis y necrosis cuando se encuentra asociado a RNAs satélites (Palukaitis y col., 1992).

Se conoce una gran número de cepas de CMV que se diferencian por sus características biológicas, sus propiedades físico-químicas y serológicas, y por la secuencia de nucleótidos de su genoma. Teniendo en cuenta alguna o varias de estas características diferenciales, las cepas de CMV han sido agrupadas siguiendo varias clasificaciones (García-Arenal y Palukaitis, 1999). En este trabajo se sigue la clasificación en dos subgrupos I y II propuesta por Owen y Palukaitis (1988) atendiendo a la homología de la secuencia de nucleótidos de los RNAs genómicos, aunque recientemente el subgrupo I se ha subdividido en los subgrupos IA y IB en función de la secuencia del RNA 3 (Palukaitis y Zaitlin, 1997; Roossinck y col., 1999). Se conoce la secuencia completa de nucleótidos de varias cepas, por ejemplo: CMV-Fny (Rizzo y Palukaitis, 1988; 1989; Owen y col., 1990), CMV-Y (Nitta y col., 1988; Kataoka y col., 1990a; 1990b) del subgrupo I, y CMV-Q del subgrupo II (Richards y col., 1978; Rezaian y col., 1985; Davies y Symons, 1988).

El genoma de CMV está compuesto por tres moléculas de RNA monocatenario de sentido mensajero: los RNA1 y RNA2 codifican las proteínas 1a (111 kDa) y 2a (97 kDa), respectivamente, que junto con proteínas del huésped están implicadas en la replicación del genoma viral (Hayes y Buck, 1990); el RNA 2 codifica además la

proteína 2b (15 kDa), que se expresa a través de un mensajero subgenómico RNA 4A, y parece estar implicada en la virulencia e inhibición de la respuesta defensiva del huésped (Li y col., 1999); el RNA 3 codifica la proteína de movimiento 3a (30 kDa) (Kaplan y col., 1995) y la proteína de la cápsida CP (24,5 kDa) (Schwinghamer y Symons, 1975), que se expresa a través del mensajero subgenómico RNA 4 (Ding y col., 1994). Las proteínas 3a y CP son necesarias para el movimiento de célula a célula y el movimiento sistémico del virus (Boccard y Baulcombe, 1993; Canto y col., 1997; Ryabov y col., 1999). Los RNAs 1 a 4 contienen regiones no codificantes en los extremos 5' y 3' que podrían estar relacionadas con las funciones de replicación y encapsidado (Palukaitis y col., 1992). Las secuencias de los RNAs genómicos contienen además los determinantes para otras funciones como la capacidad de mantener RNAsat, inducir lesiones cloróticas o necróticas en determinados huéspedes o inducir distintos síntomas en otros (Palukaitis y García-Arenal, 1999).

Los RNAs genómicos y subgenómicos se encapsidan en partículas isométricas de 28-30 nm de diámetro, formadas por 180 subunidades de CP organizadas en grupos de simetría $T = 3$ (Finch y col., 1967). Estas partículas virales se encuentran estabilizadas por interacciones proteína-RNA (Kaper y Geelen, 1971), formando una estructura tridimensional que ha sido resuelta recientemente por cristalografía de rayos X (Wikoff y col., 1997). Los RNAs 1 y 2 se encapsidan en partículas distintas y los RNAs 3 y 4 lo hacen en la misma partícula, aunque se han descrito partículas que contienen únicamente el RNA 4 (Kaplan y Palukaitis, 1998).

CMV puede transmitirse por semilla y por pulgones como insectos vectores. La transmisión por semilla es posible con diferentes eficacias en más de 20 especies de plantas, muchas de ellas malas hierbas, por lo que este tipo de transmisión podría tener consecuencias epidemiológicas (Palukaitis y col., 1992). CMV es transmitido eficazmente de forma no persistente por más de 80 especies de pulgones (Edwardson y Christie, 1991), entre las que *Aphis gossypii* (Glover) y *Myzus persicae* (Sulzer) son las más importantes tanto en condiciones experimentales como en la naturaleza (Kennedy y col., 1962; Racciah y col., 1985). Diferentes especies de pulgones varían en su capacidad de transmitir CMV y no todas las cepas del virus se transmiten con igual eficacia (Simons, 1957; Mossop y Francki, 1977), indicando un cierto grado de especificidad (Badami, 1958; Perry y col., 1998). Los determinantes de transmisión están totalmente contenidos en la secuencia de la proteína de la cápsida (Gera y col., 1979; Chen y

Francki, 1990), y se conocen los aminoácidos directamente implicados en la transmisión y en su especificidad (Perry y col., 1994; 1998). La localización de estos aminoácidos en la estructura tridimensional de la partícula viral sugiere que podrían estar implicados en la interacción directa entre el vector y la CP o en la estabilidad de la partícula viral en el estilete (Perry y col., 1998; Perry, 2000).

Varias líneas de evidencia sugieren que la transmisión puede ejercer un papel importante en la evolución de CMV y de sus vectores. Por un lado, la existencia de especificidad en la transmisión (Badami, 1958; Perry y col., 1998) sugiere la posible existencia de presiones selectivas sobre el virus ejercidas por cambios en las poblaciones de vectores (Pirone y Blanc, 1996). Otro dato que apoya la existencia de presión selectiva es la alta estabilidad del fenotipo de transmisión de CMV en ausencia del vector (Ng y Perry, 1999). También se ha descrito la existencia de transmisión diferencial por pulgones de virus pseudorrecombinantes a partir de infecciones mixtas (Perry y Francki, 1992; Fraile y col., 1997a). Todo ello, unido al elevado número de factores que pueden influir en la eficacia de transmisión (temperatura, especie de la planta huésped, cepa del virus y especie del vector), indica que una compleja interacción de factores genéticos, ecológicos y epidemiológicos modula el papel de la transmisión en la evolución de CMV en poblaciones naturales.

1.3.2.- El RNA satélite de CMV

La asociación de un RNA satélite (RNAsat) con CMV fue descrita por primera vez por Kaper y colaboradores (1976) y pronto se relacionó con la inducción de necrosis letal en tomate (Kaper y Waterworth, 1977). Desde entonces se han identificado numerosas variantes de RNAsat asociadas a CMV procedentes de diversas partes del mundo. Las principales características estructurales y funcionales de los RNAsat de CMV han sido objeto de revisión recientemente (García-Arenal y Palukaitis, 1999). A continuación se resumen aquellas que se consideran más relevantes en relación a su estructura, sus características patogénicas y su interacción con CMV.

Los satélites de CMV son moléculas de RNA lineales, monocatenarias y no codificantes que dependen de CMV (virus auxiliar) para su replicación, encapsidado y transmisión. Atendiendo a su tamaño los RNAsat pueden clasificarse en dos grupos: en

el primero las moléculas varían entre 332 y 342 nucleótidos y cuentan con representantes procedentes de todo el mundo; en el segundo las moléculas varían entre los 368 y 405 nucleótidos y sólo se han encontrado asociadas a aislados de CMV procedentes de Japón, China o Italia (García-Arenal y Palukaitis, 1999).

El RNAsat de CMV es capaz de modular los síntomas inducidos por CMV en su huésped, de forma que pueden agravarse causando clorosis o necrosis, pueden atenuarse o pueden no resultar afectados. Esta modulación depende de la triple interacción entre la variante de RNAsat, la cepa de CMV y la especie de la planta huésped (Palukaitis y col., 1992). Los síntomas más habituales producidos por la interacción CMV-RNAsat en tomate son la necrosis o la clorosis (Kaper y Waterworth, 1977; Gonsalves y col., 1982), o la atenuación (Mossop y Francki, 1979; Takanami, 1981; Gonsalves y col., 1982; Jacquemond y Leroux, 1982; Palukaitis, 1988).

Se han intentado identificar los mecanismos implicados en la patogenicidad del RNAsat mediante el estudio de su secuencia de nucleótidos y el análisis de su estructura secundaria. Los determinantes del fenotipo necrogénico en tomate se han encontrado en la mitad 3' de la molécula (Devic y col., 1989; Kurath y Palukaitis, 1989b; Masuta y Takanami, 1989), y se han localizado en tres posiciones de nucleótidos que deben conservar un determinado espaciamiento entre ellas (Devic y col., 1990; Sleat y Palukaitis, 1990). A partir de las secuencias completas de algunas variantes de RNAsat se han propuesto distintos modelos de su estructura secundaria (Gordon y Symons, 1983; Bernal y García-Arenal, 1997; Rodríguez-Alvarado y Roossinck, 1997), y en alguno de ellos se ha detectado elementos estructurales comunes entre las variantes de RNAsat necrogénicas que no pueden formarse en las variantes no necrogénicas, lo que sugiere que alteraciones de la estructura secundaria del RNAsat podrían estar relacionadas con cambios en su patogenicidad RNAsat (Sleat y col., 1994; Rodríguez-Alvarado y Roossinck, 1997).

La presencia del RNAsat asociado a CMV va acompañada de una reducción de la acumulación del virus auxiliar (Kaper y col., 1976; Mossop y Francki, 1979; Takanami, 1981; Gonsalves y col., 1982; Jacquemond y Leroux, 1982). Se ha sugerido que este efecto podría deberse a la competición del RNAsat con el RNA viral por la replicasa, ya que el aumento de la acumulación de intermediarios de replicación del RNAsat se ha correlacionado con la reducción de acumulación de los RNAs de CMV (Habibi y Kaper, 1981; Piazzolla y col., 1982). También se ha sugerido que el efecto del

RNASat en la acumulación viral podría deberse a la inhibición de la expresión de la CP de CMV a través de la unión del RNAsat a secuencias del RNA 4 del virus (Rezaian y Symons, 1986), sin embargo se ha descrito la formación de complejos estables del RNAsat con los RNAs 2, 3 y 4 sin que la expresión de la CP resultase afectada (Fraile y col., 1993).

El RNAsat se encapsida en las partículas de CMV y puede representar hasta el 50% del total del RNA encapsidado (Mossop y Francki, 1979; Jacquemond y Leroux, 1982). Lot y Kaper (1976) analizaron la distribución de los RNAs de CMV en las nucleocápsidas del virus mediante su fraccionamiento en gradientes de RbCl. En estos experimentos detectaron partículas de CMV que contenían los RNAs genómicos 1 y 2 en diferentes fracciones, mientras que las partículas que contenían los RNAs 3, 4 y el RNAsat estaban presentes en todas las fracciones del gradiente. Este resultado sugiere dos posibles alternativas para la distribución del RNAsat en las partículas de CMV: el RNAsat se encapsida en partículas junto con cualquiera de los tres RNAs genómicos del virus, o bien se encapsida en partículas separadas, en las que puede haber diferente número de moléculas. Por tanto, los detalles de la distribución del RNAsat en las partículas de CMV siguen sin estar claros. Una vez encapsidado, el RNAsat puede ser transmitido por pulgones junto con los RNAs genómicos del virus auxiliar, con una eficacia que depende de la especie de la planta utilizada para la adquisición del virus por los pulgones (Jacquemond, 1982a).

1.3.3.- Control del *Virus del mosaico del pepino*

Las estrategias más frecuentes usadas para el control de las enfermedades producidas por CMV son la lucha contra los insectos vectores y la utilización de plantas resistentes al virus, obtenidas por mejora genética convencional, protección cruzada o resistencia transgénica.

El control de CMV mediante el tratamiento de pulgones con productos químicos es en general poco efectivo debido a que el virus se transmite de forma no persistente, lo que dificulta que el producto actúe con la suficiente rapidez como para evitar la infección. Sin embargo, los tratamientos dirigidos contra las formas aladas y realizados

en el momento adecuado, sí pueden contribuir a reducir la incidencia de la enfermedad (Gallitelli, 1998).

La utilización de genes de resistencia introducidos en el genoma de la planta por mejora genética convencional ha supuesto la disponibilidad de variedades resistentes en varios cultivos, como por ejemplo la espinaca, el pimiento y algunas cucurbitáceas (Gallitelli, 1998). Aunque se siguen buscando accesiones que proporcionen nuevas fuentes de resistencia, en los últimos años el mayor esfuerzo en investigación se ha dirigido hacia las estrategias de resistencia no convencionales (protección cruzada y resistencia transgénica).

La protección cruzada es una estrategia interesante en cultivos como el tomate, en el que no se dispone de variedades resistentes o tolerantes. La protección cruzada en tomate se ha llevado a cabo por inoculación de las plantas con cepas poco virulentas de CMV que pueden llevar o no variantes de RNAsat atenuantes. Según señala Gallitelli (1998), la utilización de cepas que no portan RNAsat sólo sería aconsejable en zonas donde no existe riesgo de aparición de variantes necrogénicas de RNAsat debido a la alta probabilidad de que éstas sean multiplicadas eficazmente por la cepa de CMV preinoculada. El efecto de protección mediante coinoculación de CMV con RNAsat atenuantes ha sido comprobado con éxito en experimentos en invernadero y al aire libre en varios países (Jacquemond, 1982b; Gallitelli y col., 1991; Montasser y col., 1991; Tien y Wu, 1991; Crescenzi y col., 1993), y está siendo utilizado de forma comercial en China y Japón tras una fase de experimentación preliminar (Yoshida y col., 1985; Wu y col., 1989; Sayama y col., 1993).

La protección de plantas mediante la expresión transgénica de secuencias derivadas de variantes atenuantes de RNAsat de CMV es otra posible alternativa para el control del virus. Tanto las variantes atenuantes de RNAsat como las necrogénicas se han expresado en plantas de tomate transgénicas, pudiendo replicarse, encapsidarse e inducir necrosis en su caso, cuando estas plantas son inoculadas con CMV (Baulcombe y col., 1986; McGarvey y col., 1990). Se ha demostrado que la expresión transgénica de los RNAsat atenuantes disminuye la intensidad de los síntomas inducidos por CMV y reduce la acumulación del virus en la planta (Harrison y col., 1987). La utilización de este tipo de RNAsat para la protección de plantas de tomate se ha evaluado con resultados satisfactorios tanto en condiciones experimentales (Tien y Wu, 1991; Saito y

col., 1992; McGarvey y col., 1994), como en ensayos de campo realizados en China y en Italia (Tien y Wu, 1991; Yie y Tien, 1993; Monti y col., 1999).

El uso de variantes atenuantes de RNAsat en estrategias de control biológico de CMV tanto en protección cruzada como en plantas transgénicas entraña importantes riesgos ecológicos, ya que el RNAsat de CMV tiene una alta capacidad de variación genética en condiciones naturales (Aranda y col., 1993; Grieco y col., 1997), y se ha demostrado que un único cambio de nucleótido puede convertir una variante atenuante en necrogénica (Palukaitis y Roossinck, 1996). Además, las variantes de RNAsat pueden ser transmitidas por pulgones, asociadas a CMV, desde las plantas protegidas a plantas que no lo están, en las que puede desarrollarse la enfermedad (Jacquemond y Tepfer, 1998). La protección cruzada con RNAsat se ha evaluado en condiciones de campo (Gallitelli y col., 1997), observándose que se podían producir cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante de RNAsat utilizada, aunque estos cambios no significaron un aumento de su patogenicidad, al menos durante un periodo de dos años. Experimentos similares en cultivos de tomate transgénico que expresaban variantes atenuantes de RNAsat sirvieron para detectar la dispersión del RNAsat a cultivos cercanos, sin que se observaran aumentos de la incidencia de la enfermedad o de su sintomatología (Monti y col., 1999). No se conoce bien bajo qué condiciones pueden seleccionarse los posibles cambios genéticos del RNAsat en el campo hacia variantes de mayor virulencia, aunque en condiciones experimentales estos cambios parecen depender de la propia variante de RNAsat, de la variante de CMV que actúa de virus auxiliar (Palukaitis y Roossinck, 1995; Roossinck y Palukaitis, 1995), y de las características del huésped (García-Luque y col., 1984; Kaper y col., 1988; Kurath y Palukaitis, 1989a).

Por tanto, es necesario obtener más información acerca de la capacidad de variación y evolución del RNAsat en condiciones naturales, incluyendo el análisis experimental de los factores ecológicos que pueden influir en la evolución de su virulencia. Dicha información puede servir para evaluar convenientemente los riesgos del uso de RNAsat como agentes de control biológico de CMV.

1.3.4.- Una epidemia del *Virus del mosaico del pepino* y su RNA satélite en tomate

En 1986 se produjo en España un síndrome de necrosis en los cultivos de tomate de la zona mediterránea. Este síndrome se detectó inicialmente al norte de la ciudad de Valencia y fue extendiéndose hacia el Norte hasta Barcelona y hacia el Sur hasta Murcia, afectando en 1990 casi a la totalidad de las áreas de cultivo de la costa mediterránea (Jordá y col., 1992). La enfermedad adquirió características epidémicas causando un importante impacto económico en la producción de tomate, hasta el punto de que el cultivo tuvo que ser abandonado en muchas de estas zonas en las que era tradicional. El síndrome coincidía con la etapa de pleno crecimiento de la planta, desde el inicio de la primavera hasta el comienzo del verano. Los síntomas de necrosis aparecían en forma de estrías necróticas en el tallo, que se extendían por el peciolo y en forma de manchas necróticas en la lámina de las hojas hasta necrosarla totalmente. La necrosis se extendía también de forma sistémica a los brotes jóvenes y a los frutos, llegando a producir la muerte de toda la planta. El análisis de aislados de CMV procedentes de la zona de la epidemia demostró que el síndrome estaba causado por CMV asociado a cepas de RNAsat necrogénicas para tomate (Jordá y col., 1992). También se observó la presencia de cepas de RNAsat que no modificaban los síntomas de enanismo, mosaico y filimorfismo típicos de la infección por CMV, o que causaban un rizado de las hojas y un acortamiento de los entrenudos que daban a la planta un aspecto arrepollado. La frecuencia de necrosis en el campo comenzó a disminuir durante los años 1989-1990 hasta prácticamente desaparecer a partir de 1992.

CMV se encuentra frecuentemente en España infectando a la mayoría de los cultivos hortícolas, en los que se ha descrito su carácter endémico (Luis-Arteaga y col., 1988; 1998). Hasta 1986 no se habían detectado RNAsat asociados a CMV en España. La frecuencia del RNAsat en aislados de CMV procedentes de poblaciones naturales es también baja en otras partes del mundo (Kearney y col., 1990; Rodríguez-Alvarado y col., 1995; Grieco y col., 1997). Se ha sugerido que el RNAsat en cultivos de tomate en España podía provenir de su presencia en huéspedes alternativos, en los que las cepas de RNAsat necrogénicas para tomate pudieran comportarse como atenuantes y no ser detectadas (Jordá y col., 1992).

Epidemias semejantes a la española, causadas por CMV asociado a RNAsat necrogénicos para tomate, se han descrito también en Francia (Marrou y col., 1973), en

Italia (Gallitelli y col., 1988) y en Japón (Kosaka y col., 1989). Las epidemias española e italiana han permitido el estudio de la diversidad y estructura genética del RNAsat en poblaciones naturales (Aranda y col., 1993; Grieco y col., 1997). Las conclusiones de estos trabajos son básicamente las mismas. La diversidad genética parece aumentar rápidamente por la acumulación secuencial de mutaciones hasta un límite superior impuesto por la existencia de constricciones evolutivas, que pueden ser debidas en parte a la necesidad de mantener una estructura secundaria funcional en el RNAsat (Aranda y col., 1997). Los análisis filogenéticos muestran el agrupamiento de los RNAsat en dos líneas evolutivas diferentes (Aranda y col., 1993; Grieco y col., 1997), aunque también se han detectado RNAsat originados por recombinación entre ellas (Aranda y col., 1997). Estos RNAsat no se agrupan según la especie de planta huésped o según el aislado de CMV de los que proceden (Grieco y col., 1997; Alonso-Prados y col., 1998), indicando la ausencia de presión selectiva asociada a la planta huésped o al virus auxiliar. El análisis de la población española indica además que los RNAsat no se distribuyen según el año o la zona geográfica de procedencia (Alonso-Prados y col., 1998), al contrario que las poblaciones de CMV, que muestran una estructura en metapoblación (Fraile y col., 1997a). Todo ello indica que el RNAsat se ha extendido de forma epidémica, como un hiperparásito, sobre las poblaciones de CMV (Alonso-Prados y col., 1998).

CMV causa importantes pérdidas en el cultivo de tomate, que es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia económica en España. La epidemia de necrosis de tomate española mostró una evolución de la incidencia de la necrosis que podría reflejar cambios en la estructura genética de la población de CMV y su RNAsat. En esta tesis se investiga la evolución de la virulencia de este patógeno en los cultivos de tomate de la costa mediterránea y se analizan experimentalmente los factores que pueden estar implicados en ella. También se analiza la interacción entre los factores asociados con la virulencia de CMV y su RNAsat y los factores asociados con su transmisión, mediante modelos epidemiológicos. Que nosotros conozcamos, este es el primer trabajo sobre la evolución de la virulencia en la naturaleza de un virus de plantas.

2.- OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es contribuir al conocimiento de la evolución de la virulencia en los patógenos. El trabajo se ha centrado en el sistema formado por CMV y su RNAsat en los cultivos de tomate de la región mediterránea española, y se han planteado tres objetivos principales:

- 1º Caracterizar la evolución de la virulencia en la población de CMV y su RNAsat de la región mediterránea;**
- 2º Analizar experimentalmente la relación entre la virulencia y la transmisión de CMV y su RNAsat;**
- 3º Predecir la evolución de la virulencia de CMV y su RNAsat mediante modelos epidemiológicos de coevolución huésped-patógeno y contrastar las predicciones obtenidas con los resultados del primer objetivo.**

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1.- Aislados de campo de CMV con RNA satélite

Los aislados de CMV y RNAsat utilizados en este trabajo proceden de plantas recogidas en zonas de cultivo de tomate de la costa mediterránea española afectadas por una epidemia de necrosis. Entre 1989 y 1994 se realizaron muestreos en las localidades de Cullera, Benifaió, Alginet, Pozalet y Benaguasil en Valencia, Muchamiel en Alicante, Benicarló en Castellón, y Cabrils, Mataró, Llavaneras, Cabrera de Mar, Viladecans y San Boi en Barcelona. En los muestreos, realizados generalmente en los meses de junio y julio, se recolectaron las hojas terminales de plantas que mostraban síntomas de infección por CMV o por CMV con RNAsat. Las plantas se recolectaron de forma que el número de plantas necróticas en la muestra reflejara la proporción de necrosis que se observaba en el campo. Se consideró como un aislado de CMV a la preparación de viriones obtenida a partir de una misma rama de una planta, mostrando el mismo tipo de síntomas (Aranda y col., 1993). La Tabla 3.1 indica los aislados de CMV de los que proceden los RNAsat utilizados en los experimentos biológicos y su lugar de procedencia.

3.1.2.- Cepas y aislados de CMV usados como virus auxiliar

En los experimentos biológicos se utilizó como virus auxiliar la cepa Fny de CMV (Owen y Palukaitis, 1988) y los aislados de campo de CMV indicados en la

Tabla 3.2. Estos aislados proceden de distintas regiones españolas y pertenecen a los tipos genéticos 1 y 2 según la clasificación realizada por Fraile y colaboradores (1997a) de los aislados españoles de CMV del subgrupo I.

3.1.3.- Material vegetal

La multiplicación a gran escala de las cepas y aislados de CMV se realizó en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Xanthi nc mantenidas en invernadero. Los ensayos biológicos a los que se refiere el apartado 3.6 se llevaron a cabo en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Rutgers. Como huésped de lesión localizada de CMV se utilizó *Chenopodium quinoa* Willd. La cría y mantenimiento de la colonia de pulgones para los experimentos de transmisión (ver apartado 3.2.6) se realizó sobre plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.).

3.2.- EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA VIRAL

3.2.1.- Extracción del RNA de CMV y de CMV con RNA satélite

Las preparaciones de viriones de CMV y de CMV con RNAsat se obtuvieron a partir de los tejidos foliares infectados según el método descrito por Lot y colaboradores (1972). La extracción del RNA de las partículas virales de CMV se llevó a cabo en un volumen de tampón VEBA (Tris-HCl 200 mM pH 8; NaCl 1M; EDTA 2 mM; 1% de SDS) y mediante tres ciclos de extracción con una mezcla de fenol y cloroformo en proporción 4:1. El RNA se precipitó dos veces con acetato sódico 0,3 M y 2,5 volúmenes de etanol (Gonsalves y col., 1982).

La extracción de RNA total de los tejidos vegetales infectados se realizó según se describe en Moriones y colaboradores (1992). Se molieron aproximadamente 200 mg de tejido vegetal en N₂ líquido y se homogeneizaron en 400 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8; EDTA 10 mM; 2% de SDS) y 400 µl de una mezcla de fenol-cloroformo en proporción 3:1. El RNA se precipitó con una concentración final de

Tabla 3.1 Aislados de CMV y RNAsat procedentes de la región mediterránea afectada por la epidemia de necrosis y utilizados en los experimentos.

Nombre del aislado ^a	Procedencia		Nombre del aislado ^a	Procedencia	
89/3	Cullera	(Valencia)	90/18	Cullera	(Valencia)
89/12	Cullera	(Valencia)	90/19	Cullera	(Valencia)
89/15	Cullera	(Valencia)	90/20	Cullera	(Valencia)
89/16	Cullera	(Valencia)	90/21	Cullera	(Valencia)
89/42	Muchamiel	(Alicante)	90/22	Cullera	(Valencia)
89/19	Benifaió	(Valencia)	90/24	Cullera	(Valencia)
89/20	Benifaió	(Valencia)	91/1	Benifaió	(Valencia)
89/21	Benifaió	(Valencia)	91/2	Benifaió	(Valencia)
89/22	Benifaió	(Valencia)	91/3	Benifaió	(Valencia)
89/23	Benifaió	(Valencia)	91/4	Benifaió	(Valencia)
89/24	Benifaió	(Valencia)	91/5	Benifaió	(Valencia)
90/5	Alginet	(Valencia)	91/7	Benifaió	(Valencia)
90/8	Alginet	(Valencia)	91/8	Benifaió	(Valencia)
90/10	Pozalet	(Valencia)	92/1	Cabrils	(Barcelona)
90/11	Pozalet	(Valencia)	92/4	Cabrils	(Barcelona)
90/12	Pozalet	(Valencia)	92/6	Cabrils	(Barcelona)
90/13	Pozalet	(Valencia)	92/10	Cabrils	(Barcelona)
90/14	Pozalet	(Valencia)	92/12	Cabrils	(Barcelona)
90/15	Pozalet	(Valencia)	92/18	Cabrils	(Barcelona)
90/16	Cullera	(Valencia)	94/31	Benaguasil	(Valencia)
90/17	Cullera	(Valencia)	94/32	Benaguasil	(Valencia)

^a Cada aislado de CMV y RNAsat se ha denominado de la forma N/i, siendo el aislado i recolectado en el año N.

LiCl 2 M (133 µl de LiCl 8 M en 400 µl de fase acuosa) a 4°C durante 10-15 horas, se sedimentó por centrifugación y se lavó con etanol al 70%. El RNA obtenido se resuspendió en agua estéril a razón de 0,5 µl por cada mg de tejido vegetal de partida.

Tabla 3.2 Aislados de CMV utilizados como virus auxiliar en los experimentos.

Nombre del aislado de CMV	Huésped y lugar de procedencia	Tipo genético ^a
Fny	Rizzo y Palukaitis, 1992	-
MAD T93 / 4	Tomate, Madrid	1
MAD Z94 / 1	Calabacín, Madrid	1
VAL M95 / 437	Melón, Valencia	1
BAR M95 / 458	Melón, Barcelona	1
MUR M95 / 429	Melón, Murcia	1
BAR T93 / 7	Tomate, Barcelona	2
BAR T93 / 47	Tomate, Barcelona	2
BAR T94 / 96	Tomate, Barcelona	2
BAR T94 / 104	Tomate, Barcelona	2
BAR T94 / 108	Tomate, Barcelona	2

^a Tipo genético según la clasificación realizada por Fraile y col. (1997a) para los aislados españoles de CMV pertenecientes al subgrupo I.

3.2.2.- Análisis del RNA de aislados de CMV con RNA satélite

El análisis y separación de los RNAsat presentes en los aislados de campo de CMV se realizó mediante electroforesis en geles semidesnaturalizantes de poliacrilamida. Este método permite la separación de moléculas de RNAsat de peso molecular muy parecido en virtud de sus diferencias estructurales (García-Luque y col.,

1984). Para ello, muestras de entre 6 y 12 μg de RNA viral se incubaron a 100°C durante 3 minutos en un tampón con 75% de formamida, EDTA 8 mM, 0,075% de azul de bromofenol y 0,075% de azul de xilencianol y se pasaron inmediatamente a un baño de hielo y agua. Estas muestras se sometieron a electroforesis durante 16 horas a 12 V/cm en geles del 9% de poliacrilamida (acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida en proporción 39:1), urea 8 M y 1× TAE pH 7,8 (1× TAE: Tris-HCl 40 mM pH 8; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM). Los geles se tiñeron con azul de toluidina al 0,05% o bromuro de etidio a 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, permitiendo la detección de las variantes electroforéticas de RNAsat, que se recortaron y se eluyeron según se describe en Palukaitis y Zaitlin (1984). Las variantes de RNAsat se denominaron N/i,j, significando la variante electroforética de RNAsat j procedente del aislado de CMV i y recolectada en el año N.

3.3.- CLONAJE DE cDNA DE LAS VARIANTES DE RNA SATÉLITE

Los clones de cDNA de longitud total de las variantes electroforéticas de RNAsat se obtuvieron como se describe en Aranda y colaboradores (1997) mediante transcripción reversa *in vitro* del RNAsat, seguida de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sambrook y col., 1989). Para la síntesis de la primera cadena de cDNA se utilizó como cebador un oligonucleótido con la secuencia: 5' GGAATTCCCGGGTCCTG 3' , que posee 8 bases complementarias al extremo 3' de todos los RNAsat descritos hasta la fecha (bases subrayadas) y que incluye las dianas de restricción de las endonucleasas *EcoRI* y *SmaI*. Para la síntesis de la segunda cadena se utilizó como cebador el oligonucleótido con la secuencia: 5' GGAATTCTAATACGACTCACTATAGGTTTTGTTTG 3' , cuyas 10 últimas bases (subrayadas) coinciden con las 10 primeras del extremo 5' de todos los RNAsat, incluye la diana de restricción de la endonucleasa *EcoRI*, y contiene la secuencia de un promotor modificado de transcripción para la RNA polimerasa del *Colífago T7* (Sambrook y col., 1989). La reacción PCR se realizó durante 30 ciclos de desnaturalización del cDNA a 94°C durante 15 segundos, hibridación de los oligonucleótidos a 40°C durante 15 segundos, y polimerización a 72°C durante 60

segundos. El cDNA amplificado fue digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *SmaI* y se introdujo en el plásmido *pBS+*. Los plásmidos recombinantes se multiplicaron en bacterias DH5 α (Hanahan, 1983) y a partir de ellas se extrajo el DNA plasmídico por el método de la lisis alcalina (Sambrook y col., 1989).

3.4.- SECUENCIACIÓN DEL cDNA DE LAS VARIANTES DE RNA SATÉLITE DE CMV

Los clones de cDNA de longitud total de las variantes de RNAsat se secuenciaron sobre molde de cadena doble mediante polimerización con DNA polimerasas DNA dependientes y terminación de cadenas con dideoxinucleótidos (Sanger y col., 1977; Sambrook y col., 1989).

3.5.- OBTENCIÓN DE RNA INFECTIVO DE CMV Y DE CMV CON RNA SATÉLITE

El RNA infectivo de la cepa Fny de CMV se obtuvo a partir de clones de cDNA de longitud total de sus RNAs genómicos. Los plásmidos *pF109*, *pF209* y *pF309*, correspondientes a los RNAs 1, 2 y 3 de la cepa Fny de CMV (Rizzo y Palukaitis, 1990), fueron cedidos por el Dr. Peter Palukaitis (Department of Virology, Scottish Crop Research Institute, Dundee). El DNA de los tres plásmidos fue digerido con la endonucleasa de restricción *PstI* y se utilizó como molde en reacciones de transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa del *Colifago T7* (Sambrook y col., 1989). El RNA transcrito obtenido se utilizó para multiplicar la cepa Fny de CMV a gran escala.

El RNA infectivo de las variantes de RNAsat se obtuvo a partir de sus clones de cDNA de longitud total obtenidos según se describe en el apartado 3.3. Para ello, el DNA de los plásmidos se linearizó mediante digestión con la endonucleasa *SmaI*. Esta enzima corta en la diana introducida durante el proceso de clonaje y proporciona un extremo 3' idéntico al de los RNAsat. El producto de la digestión se utilizó como molde

en reacciones de transcripción *in vitro* según se ha descrito en el párrafo anterior. El RNA infectivo obtenido se utilizó directamente en los bioensayos o se multiplicó con la cepa Fny de CMV en plantas de tabaco antes de ser utilizado en los ensayos biológicos.

3.6.- ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.6.1.- Inoculación de CMV y CMV con RNA satélite en tomate

Excepto en los experimentos de transmisión por pulgones, las plantas se inocularon con una mezcla de RNA transcrito de las variantes de RNAsat y RNA del virus auxiliar en tampón Na₂HPO₄ 0,1 M y utilizando siempre 10 µl de inóculo por planta. La concentración de RNA del virus auxiliar en el inóculo fue de 100 µg/ml en la mayoría de los experimentos y de 10 µg/ml en el ensayo de infectividad. La concentración del RNAsat en el inóculo fue diferente dependiendo del experimento y del tamaño de la planta. En la mayor parte de los experimentos el RNAsat se inoculó a 20 µg/ml en los cotiledones o en la primera hoja de plantas con una o dos hojas. En el ensayo de infectividad el RNAsat se inoculó a tres concentraciones distintas: 1 - 0,1 - 0,01 µg/ml en los cotiledones de plantas con una o dos hojas, y en los experimentos para estimar el crecimiento y la longevidad de las plantas el RNAsat se inoculó una concentración de 50 µg/ml sobre la tercera hoja de plantas que ya habían alcanzado un estado de cuatro o cinco hojas.

Las plantas utilizadas para la adquisición del CMV por los pulgones en los experimentos de transmisión se inocularon con RNA obtenido tras la multiplicación de la cepa Fny de CMV y de las variantes de RNAsat en tabaco. Este RNA se inoculó a 10 µg/ml en los cotiledones de plantas de tomate en estado de dos hojas como mínimo, con el fin de evitar que un desarrollo demasiado rápido de la necrosis impidiera tener hojas en condiciones óptimas para la adquisición del virus por los pulgones.

Tras las inoculaciones las plantas se mantuvieron en el invernadero hasta que aquellas inoculadas con RNAsat necrogénicos comenzaran a mostrar los primeros síntomas de necrosis, lo que generalmente ocurría entre 12 y 17 días después de la inoculación (dpi). Sin embargo, en los experimentos para estimar el crecimiento de las

plantas, los primeros síntomas aparecieron 20 dpi y las plantas se mantuvieron en el invernadero hasta 27 dpi, antes de que se produjera la muerte total de aquellas con necrosis más intensa. En el experimento para estimar la longevidad de las plantas, éstas permanecieron en el invernadero durante un periodo de 75 días desde su trasplante. En los dos últimos experimentos citados el peso seco del material vegetal cosechado se determinó tras su permanencia en una estufa a 65°C durante al menos 48 horas, hasta que el peso se mantuviera constante.

3.6.2.- Ensayos de transmisión de CMV y su RNA satélite por pulgones

Los ensayos de transmisión se realizaron con pulgones de la especie *Aphis gossypii* (Glover) (*Homoptera, Aphididae*), que adquirieron el virus en hojas de plantas infectadas por CMV o por CMV con variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas (por brevedad, en adelante las plantas utilizadas para la adquisición de virus por los pulgones se denominarán plantas "fuente" de inóculo), y se utilizaron para inocular nuevas plantas de tomate. Estas últimas se utilizaron cuando mostraban los cotiledones extendidos, entre 9 y 13 días después de su siembra. Se usaron 48 de estas plantas por cada planta "fuente" de inóculo.

Los pulgones procedían de una colonia de *A. gossypii* mantenida en la Universidad de Purdue (West Lafayette, Indiana). Estos pulgones se criaron sobre plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) en cámara climática a 23-25°C hasta obtener un número suficientemente elevado de individuos. Antes de realizar los experimentos de transmisión los pulgones permanecieron ayunando entre 3 y 6 días a 4°C, y durante este tiempo se mantuvieron sobre las hojas de pepino y en cajas de plástico para evitar la pérdida de humedad.

Los pulgones adquirieron el virus en hojas infectadas sistémicamente de las plantas "fuente" de inóculo y se mantuvieron sobre ellas entre 1 y 5 minutos para observar su comportamiento y asegurarse de que adquirirían el virus. Sólo se utilizaron pulgones ápteros. Posteriormente se transfirieron tres pulgones a los cotiledones de cada una de las nuevas plantas y se mantuvieron sobre ellas entre 12 y 24 horas. Transcurrido este tiempo, las plantas se trataron con el insecticida acefato (Orthene, Valent USA Corporation) y se llevaron al invernadero. El número de plantas con síntomas de

infección por CMV o CMV con RNAsat se registró en dos ocasiones, 15 y 30 días después de realizar las transmisiones. Las infecciones por CMV-Fny o por CMV con RNAsat necrogénicos se detectaron únicamente por observación visual de los síntomas típicos de CMV (enanismo, mosaico y filimorfismo) o de síntomas inequívocos de necrosis vascular. La infección por CMV con RNAsat no necrogénicos se detectó mediante hibridación frente a sondas de CMV y de RNAsat, según se describe en el apartado 3.7.1.

3.7.- ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE CMV Y DEL RNA SATÉLITE

3.7.1.- Análisis cualitativo de la infección por CMV y RNA satélite

La infección por CMV y por RNAsat se detectó por hibridación en filtros de nylon (Hybond-N, RPN 203N, Amersham-Pharmacia Biotech) del RNA contenido en extractos de RNA total de los tejidos infectados. La detección específica de CMV se realizó por hibridación con una sonda de RNA, derivada del plásmido *pFCP*, que contiene la secuencia del RNA3 de la cepa Fny de CMV comprendida entre los nucleótidos 1389 y 1840 y correspondiente a la fase de lectura abierta de la proteína de la cápsida (Owen y col., 1990; Fraile y col., 1997a). El plásmido *pFCP* se linearizó con la endonucleasa de restricción *EcoRI* y la sonda se sintetizó por transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa del *Colífago T7* (Sambrook y col., 1989). La detección específica del RNAsat se realizó por hibridación con una sonda de RNA derivada del plásmido *pB2tr1*, complementaria a la longitud total del RNAsat B2 (Bernal y García-Arenal, 1994). El plásmido *pB2tr1* se linearizó con la enzima *EcoRI* y la sonda se sintetizó por transcripción *in vitro* usando la RNA polimerasa del *Enterobacteriofago T3* de (Sambrook y col., 1989).

La hibridación de los filtros se realizó en 6× SSC (1× SSC: NaCl 150 mM; citrato sódico 15 mM), 5× Reactivo de Denhardt's (50× Denhardt's: 1% de Ficoll; 1% de PVP; 1% de BSA), 0,1% de SDS y 250 µg/ml de tRNA de levadura, incubando a 65°C durante la noche, según se describe en Sambrook y colaboradores (1989).

3.7.2.- Análisis del RNA encapsidado por CMV

La purificación de las partículas virales de CMV y la extracción de su RNA se realizó según se ha descrito en el apartado 3.2. El RNA encapsidado se analizó por electroforesis en geles del 1% de agarosa en tampón 0,5× TBE (1× TBE: Tris-HCl 89 mM pH 8; H₃BO₃ 89 mM; EDTA 2 mM). Las bandas se tiñeron con bromuro de etidio a 0,5 µg/ml. La proporción relativa de cada RNA frente al RNA total encapsidado se cuantificó por densitometría de los geles, utilizando la versión 1.52 del programa de análisis de imagen NIH (W.Rasband; NIH, Research Service Branch, NIMH, Bethesda, Maryland) (Lennard, 1990).

3.7.3.- Cuantificación de partículas virales de CMV

Las partículas virales de CMV se cuantificaron en preparaciones obtenidas de hasta 500 mg de tejido vegetal infectado. La purificación se realizó por el método indicado en el apartado 3.2, excepto en que se hizo un sólo ciclo de centrifugación diferencial a 8000 g durante 10 minutos y a 337000 g durante 30 minutos. Los viriones se resuspendieron a razón de 500 µl de tampón citrato sódico 50 mM pH 7 por g de tejido vegetal.

La cuantificación de las partículas virales se realizó mediante ELISA indirecto o ELISA doble sandwich (ELISA- DAS) (Copeland, 1998) en 100 µl de diluciones 1/10, 1/100 o 1/1000 de las preparaciones de viriones de CMV. Para realizar la cuantificación, las muestras se cargaron en la placa de ELISA junto con una serie de cantidades conocidas de la cepa Fny de CMV: de 10^{0.5} hasta 10⁻² µg de viriones en diluciones sucesivas 1/10^{0.25}. Los ELISA se realizaron con anticuerpos frente a la CP de la cepa Fny de CMV (Perry y Francki, 1992; Thompson y García-Arenal, 1998).

3.7.4.- Cuantificación del RNA satélite de CMV

La cuantificación del RNAsat de CMV en infecciones individuales o en infecciones mixtas de variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas se realizó en

extractos de RNA total de tejidos infectados. El análisis del RNAsat se realizó por hibridación en filtros de nylon con oligonucleótidos marcados con ^{32}P en el extremo 5'. Estos oligonucleótidos: 5' GCGTCATGACTCATA 3' y 5' CGTCATCCACGATAC 3', son complementarios a las secuencias comprendidas aproximadamente entre los nucleótidos 250 y 260 de las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas para tomate, respectivamente (las bases subrayadas corresponden a las secuencias específicas de cada tipo de RNAsat). Para realizar la cuantificación, los extractos de RNA total se cargaron en los filtros junto con cantidades conocidas de controles de RNAsat necrogénicos y no necrogénicos en diluciones sucesivas 1/5. Se cargaron 25 μl de diluciones 1/1 y 1/100 de los extractos para asegurar que los valores de absorbancia de las variantes de RNAsat necrogénicas y las no necrogénicas presentes en las muestras estuvieran incluidos en el intervalo de variación lineal de las curvas absorbancia-acumulación de RNAsat de los controles (Figura 4.4). La hibridación se realizó como se ha descrito en el apartado 3.7.1, excepto en que la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos fue de 40°C. La cuantificación del RNAsat se llevó a cabo por densitometría de las autorradiografías de los filtros según se ha descrito en el apartado 3.7.2. Tras la cuantificación los filtros se deshibridaron haciendo varios lavados con una disolución 0,1% de SDS a 95°C, y se rehibridaron a 65°C con una sonda complementaria a una secuencia de aproximadamente 800 nucleótidos del RNA ribosómico 18S de cebada (Gerlach y Bedbrook, 1979). De esta forma se tuvo un control interno de la carga de RNA en el filtro.

3.8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados de los ensayos biológicos se compararon con distintas pruebas estadísticas para comprobar si las diferencias entre los tratamientos eran debidas a la naturaleza de cada tratamiento o únicamente a variaciones al azar.

Las distribuciones de frecuencia se compararon aplicando la prueba *G* (Sokal y Rohlf, 1981, p.745) o la prueba de la probabilidad exacta de Fisher (Sokal y Rohlf, 1981, p. 740) para el análisis de la independencia. Las curvas obtenidas por regresión lineal (Sokal y Rohlf, 1981, p. 454) en los ensayos de la infectividad del RNAsat o en

los experimentos para estimar la longevidad de las plantas se compararon mediante pruebas de comparación de rectas de regresión basadas en el análisis de covarianza (Sokal y Rohlf, 1981, pp. 499 y 509). Los parámetros de correlación en estos mismos experimentos se calcularon mediante análisis de correlación lineal (Sokal y Rohlf, 1981, p. 561).

Los resultados de acumulación de CMV o del RNAsat se compararon por análisis de varianza y mediante pruebas de comparación múltiple de medias (Sokal y Rohlf, 1981, p. 242) o mediante comparación ortogonal de medias (Sokal y Rohlf, 1981, p. 530). En todos los casos la prueba realizada fue la de Bonferroni. En el experimento para determinar la acumulación de CMV los datos se transformaron a través de una función logarítmica para obtener una distribución normal y poder aplicar los análisis de varianza. En este caso se utilizó también la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1981, p. 430).

La mayoría de los análisis estadísticos se realizaron con la versión 3.0 del programa Statgraphics (Statistical Graphics Corporation, Englewood Cliffs, New Jersey).

4.- RESULTADOS

4.1- EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA DE CMV Y DE SU RNA SATÉLITE EN POBLACIONES NATURALES

Entre los años 1986 y 1989 se produjo en España la aparición y posterior expansión de un síndrome de necrosis en los cultivos de tomate de la costa mediterránea, causado por cepas de CMV que mantenían RNAsat necrogénicos para tomate (Jordá y col., 1992). A partir del año 1989 la frecuencia de plantas de tomate necróticas comenzó a disminuir paulatinamente hasta su casi total desaparición con posterioridad a 1991. El análisis de la estructura genética de las poblaciones de CMV y RNAsat de la costa mediterránea y de otras regiones españolas indica que el RNAsat apareció y se expandió de forma epidémica sobre la población de CMV, y desapareció a partir de 1994 (Alonso-Prados y col., 1998). Estos antecedentes sugieren que la desaparición de la necrosis en los cultivos de tomate podría haber ocurrido por dos procesos alternativos: en primer lugar por la disminución de la frecuencia del RNAsat en la población de CMV; en segundo lugar por la disminución de la frecuencia de las variantes de RNAsat necrogénicas para tomate en la población de RNAsat. También es posible que ambos procesos ocurrieran más o menos simultáneamente. En este apartado se investiga qué alternativa de las anteriores puede haber determinado con mayor probabilidad la reducción y desaparición de la necrosis en los cultivos de tomate de la costa mediterránea, mediante el análisis de las frecuencias de CMV y RNAsat con distinto fenotipo en las poblaciones correspondientes a distintos años de la epidemia de necrosis en tomate.

4.1.1.- Análisis de las frecuencias de CMV y RNA satélite durante la epidemia de necrosis de tomate

Entre los años 1989 y 1994 se llevaron a cabo muestreos anuales en diferentes zonas de cultivo de tomate afectadas por la epidemia de necrosis en diferentes localidades alrededor de la ciudad de Valencia, punto de origen de la epidemia, y en áreas de la provincia de Barcelona hacia las que la epidemia se fue extendiendo. En los muestreos se recolectaron un total de 208 plantas de tomate que mostraban los síntomas asociados a la infección por CMV o por CMV con RNAsat, de forma que el número de plantas necróticas reflejara la proporción de necrosis en el campo. Así, una parte de las plantas mostraban síntomas de necrosis vascular con diferentes intensidades en distintos órganos de la planta. El resto de las plantas no eran necróticas y podían mostrar o bien los síntomas de mosaico y filimorfismo típicos de la infección por CMV, o bien un rizado de las hojas y un acortamiento de los entrenudos que daban a la planta un aspecto arpeollado. Estos tres tipos de síntomas se muestran en la Figura 4.1. Las plantas recolectadas se analizaron para detectar la presencia de CMV y de su RNAsat. Los resultados de este análisis, algunos de ellos ya publicados por Aranda y colaboradores (1993) y por Alonso-Prados y colaboradores (1998), están expuestos en la Tabla 4.1, que además muestra la fracción de plantas necróticas. La Tabla 4.1 indica que la incidencia anual de la necrosis disminuyó progresivamente a partir del año 1989. Hay que destacar que los datos del año 1994 no siguen esta tendencia general porque las plantas fueron recolectadas en un área pequeña de la provincia de Valencia en la que se detectó un rebrote del síndrome de necrosis. El 73% del total de plantas recolectadas estaban infectadas por CMV, aunque esta proporción variaba entre el 40% y el 100% de unos años a otros. En la mayoría de plantas sintomáticas no infectadas por CMV se detectó la presencia del *Virus del bronceado del tomate* (TSWV, género *Tospovirus*), que en esta especie produce un empardecimiento y necrosis de las hojas y los brotes jóvenes que podría confundirse con los síntomas de necrosis vascular y apical causados por CMV con RNAsat. Con la excepción mencionada del año 1994, la frecuencia de plantas infectadas con CMV que portaban RNAsat aumentó desde 1989 hasta un máximo en los años 1990 y 1991 para disminuir posteriormente. Si la frecuencia de plantas con necrosis se calcula con respecto al número de plantas infectadas con CMV y



Figura 4.1 Plantas de tomate con síntomas de necrosis vascular (A), con rizado y arrollado (B), o con enanismo, mosaico, y filiformismo (C), asociados a la infección por CMV y RNAsat (Jordá y col., 1992).



Tabla 4.1 Detalles de la población de CMV y RNAAsat y evolución de la necrosis en los cultivos de tomate^a.

Año	Número de plantas muestreadas		Número de plantas infectadas con CMV		Número de plantas infectadas con CMV y RNAAsat			Variantes de RNAAsat por planta
	Total	Necróticas ^b	Total	Necróticas ^c	Total ^c	Necróticas ^d	No necróticas ^d	
1989	27	19 (0,70)	27	18 (0,67)	14 (0,78)	4 (0,22)	1,75	
1990	22	12 (0,55)	22	21 (0,95)	12 (0,57)	9 (0,43)	1,60	
1991	21	10 (0,48)	11	9 (0,82)	4 (0,44)	5 (0,56)	1,33	
1992	36	0 (0,00)	36	17 (0,47)	0 (0,00)	17 (1,00)	1,37	
1993	40	0 (0,00)	33	12 (0,36)	0 (0,00)	12 (1,00)	1,43	
1994	62	7 (0,11)	23	14 (0,61)	7 (0,50)	7 (0,50)	1,00	
Total	208	48 (0,23)	152	91 (0,60)	37 (0,41)	54 (0,59)	1,50	

^a La tabla incluye datos de Aranda y col. (1993) y Alonso-Prados y col. (1998).

^b Los números entre paréntesis son las frecuencias de plantas necróticas respecto al número total de plantas muestreadas.

^c Los números entre paréntesis son las frecuencias de plantas infectadas con CMV y RNAAsat respecto al número de plantas infectadas con CMV.

^d Los números entre paréntesis son las frecuencias de plantas necróticas o no necróticas respecto al número de plantas infectadas con CMV y RNAAsat.

con el RNAsat se observa de forma clara que el aumento de la incidencia del RNAsat no va acompañado por un aumento de la proporción de plantas necróticas (Tabla 4.1), lo que indica la existencia de aislados de CMV con RNAsat que no producían necrosis en tomate.

Aranda y colaboradores (1993) han descrito que los aislados de CMV recogidos en la costa mediterránea podían mantener más de una variante de RNAsat, y que éstas se podían separar mediante el análisis de los aislados de CMV con RNAsat por electroforesis en geles semidesnaturalizantes de poliacrilamida. Dicho análisis permitió la detección y la separación de las distintas variantes electroforéticas de RNAsat presentes en una misma planta. El número medio de variantes electroforéticas de RNAsat por planta está indicado en la Tabla 4.1, y disminuye desde 1,75 para el año 1989 hasta 1,0 para el año 1994, mostrando una tendencia paralela a la de la frecuencia de necrosis durante los tres primeros años analizados de la epidemia.

4.1.2.- Análisis del fenotipo de las variantes de RNA satélite de CMV

Se sabe que los RNAsat presentes en los aislados de CMV de la región afectada por la epidemia de necrosis están asociados con al menos tres tipos de síntomas en tomate, que ya se han descrito en el apartado anterior: necrosis vascular, arropollado de la planta y no modificación de los síntomas típicos de CMV (Jordá y col., 1992). También se sabe que pueden encontrarse distintos RNAsat en una misma planta. En este capítulo se describen los ensayos realizados para analizar el fenotipo de las variantes de RNAsat, y para conocer el efecto producido en una planta de tomate por el virus auxiliar y por las mezclas de RNAsat con distinto fenotipo.

Dada la gran capacidad de variación de los RNAsat se decidió realizar los ensayos partiendo de RNAsat transcrito a partir de clones de cDNA. Para ello, se escogieron al azar 60 variantes electroforéticas de RNAsat procedentes de las plantas de campo y se obtuvieron clones de longitud total para 54 de ellas, que se utilizaron como molde para sintetizar RNAsat infeccioso mediante transcripción *in vitro*. El fenotipo de las 54 variantes de RNAsat clonadas se ensayó en tomates cv. Rutgers utilizando la cepa Fny de CMV como virus auxiliar. Como puede verse en la Figura 4.2, las plantas desarrollaron los mismos tres tipos de síntomas observados en el campo durante la

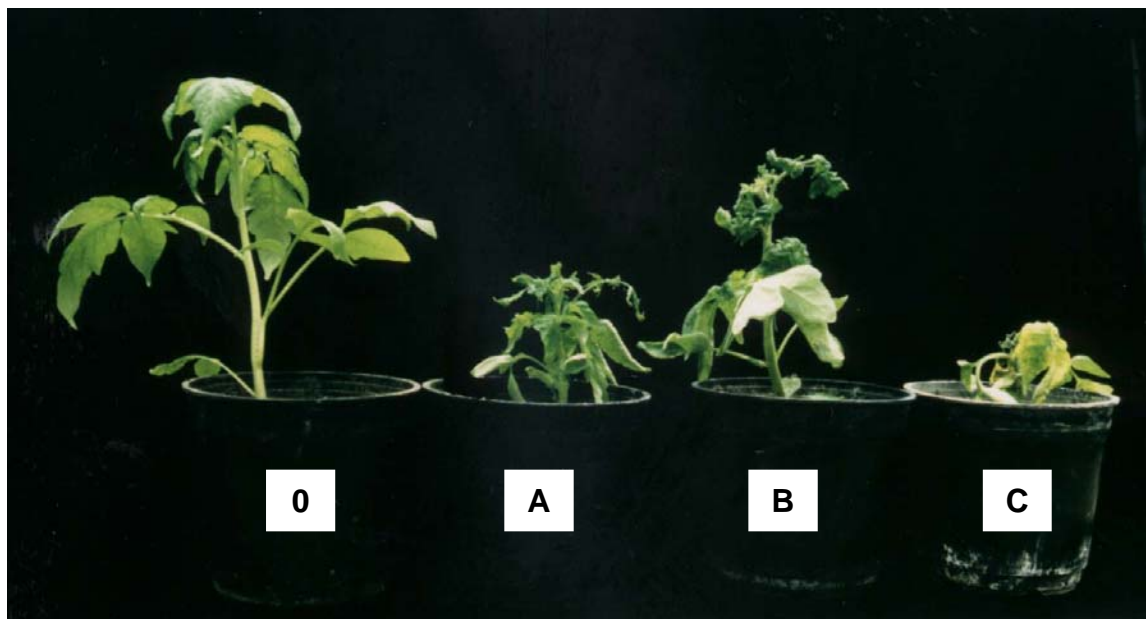


Figura 4.2 Bioensayo de las variantes de RNAsat en tomate cv. Rutgers con la cepa Fny de CMV. Las plantas muestran los síntomas de filimorfismo (A), arrollado (B) y necrosis vascular (C), en comparación con una planta sana control (0).

epidemia. El 9,2% de las variantes no modificaron los síntomas de enanismo, mosaico y filimorfismo inducidos por la cepa Fny de CMV, el 61,1% de las variantes indujeron síntomas de arrepollado y el 29,7% de las variantes indujeron necrosis (Tabla 4.2). De estas últimas, 14 variantes causaron una necrosis sistémica asociada inicialmente a los tejidos vasculares de la planta, como se ha descrito para la mayoría de las cepas de RNAsat necrogénicas para tomate (Kaper y Waterworth, 1977), y las variantes 89/24.1 y 91/8.1 indujeron una necrosis diferente caracterizada por la aparición de manchas necróticas en la lámina de las hojas seguida por una necrosis sistémica.

Tabla 4.2 Análisis del fenotipo de las variantes de RNAsat de CMV en tomate.

Síntomas inducidos por las variantes de RNAsat ^a	Número de variantes de RNAsat	Porcentaje de cada fenotipo
Necrosis	16	29,7
Arrepollado	33	61,1
Filimorfismo	5	9,2
Total	54	100,0

^a Las variantes de RNAsat se ensayaron en plantas de tomate cv. Rutgers con la cepa Fny de CMV como virus auxiliar.

Existe la posibilidad de que las frecuencias de RNAsat con distinto fenotipo fueran el resultado de un artefacto derivado del proceso de clonaje. Los errores introducidos por la DNA polimerasa en la reacción de RT-PCR podrían haber provocado que la variante de RNAsat clonada tuviera un fenotipo distinto a la variante de partida, ya que una única mutación en una de las posiciones en la secuencia de nucleótidos que determinan el fenotipo de la variante de RNAsat puede ser suficiente para cambiar su fenotipo (Palukaitis y Roossinck, 1996). Para poder examinar esta posibilidad se analizaron y compararon las secuencias de nucleótidos de parejas de clones de cDNA obtenidos de forma independiente, procedentes de 15 variantes de

RNASat distintas. La tasa de error en la reacción RT-PCR fue estimada en $2,35 \cdot 10^{-3}$ incorporaciones erróneas por nucleótido, de forma que la probabilidad de que se produjera un error en una de las tres posiciones que determinan el fenotipo necrogénico (Sleat y Palukaitis, 1990) sería de $2,10 \cdot 10^{-5}$. Por tanto, la probabilidad de un cambio de fenotipo del RNASat debido a su proceso de clonaje se considera despreciable.

Para examinar si el fenotipo en tomate de las variantes de RNASat podía depender de la cepa de CMV utilizada como virus auxiliar, se escogieron 10 variantes de RNASat de entre las 54 variantes clonadas, cinco de las cuales habían resultado necrogénicas con la cepa Fny de CMV y las otras cinco habían resultado no necrogénicas. Cada una de las 10 variantes de RNASat se volvió a ensayar en tomate con 10 aislados distintos de CMV, cinco de los cuales representaban el tipo genético 1 y otros cinco representaban el tipo genético 2, según la clasificación en tipos genéticos realizada por Fraile y colaboradores (1997a) para aislados españoles de CMV. Los tipos genéticos 1 y 2 pertenecen al subgrupo I de aislados de CMV y son los más abundantes en las poblaciones españolas de este virus, incluidas las existentes en las regiones afectadas por la epidemia de necrosis de tomate (Alonso-Prados y col., 1998). Los aislados de CMV utilizados en este experimento están indicados en la Tabla 3.1, en el capítulo de materiales y métodos. El fenotipo necrogénico o no necrogénico en tomate de las 10 variantes de RNASat ensayadas fue el mismo cuando se inocularon junto con la cepa Fny de CMV que cuando se inocularon con cualquiera de los 10 aislados de CMV utilizados como virus auxiliar. Estos resultados indican que la inducción de necrosis en tomate sólo depende de la variante de RNASat y no de su interacción con el aislado de CMV que actúe como virus auxiliar.

Ya se ha señalado que en una misma planta de tomate podía encontrarse más de una variante de RNASat. Para conocer la relación entre los síntomas de las plantas de tomate observados en campo y el fenotipo de los RNASat procedentes de estas plantas, las 54 variantes de RNASat ensayadas anteriormente se clasificaron según dos criterios (Tabla 4.3): primero, por el fenotipo de cada variante al ser ensayada en tomate con la cepa Fny de CMV (ver total por fenotipo); segundo, por el síntoma de la planta de campo de la cual procedía cada variante de RNASat (ver total por síntoma de la planta de origen). El tipo de síntoma (necrosis o ausencia de necrosis) de la planta de campo y el fenotipo (necrogénico o no necrogénico en tomate) de cada variante de RNASat mostraron entre sí un grado de asociación estadística significativo ($P = 0,007$ en una

Tabla 4.3 Relación entre el fenotipo de las variantes de RNAsat de CMV y los síntomas de la planta de campo de la que proceden^a.

Fenotipo de las variantes de RNAsat	Síntomas de la planta de origen		Total por fenotipo
	Necrosis	No necrosis	
Necrosis	13	3	16
Arrepollado	12	21	33
Filimorfismo	4	1	5
Total por síntoma de la planta de origen	29	25	54

- ^a Los datos indican el número de variantes de RNAsat clasificadas según dos criterios:
- 1) Por su fenotipo al ser ensayadas en tomate con la cepa Fny de CMV (en columnas).
 - 2) Por el síntoma que mostraba la planta de campo de la que procede cada variante de RNAsat (en filas).

prueba *G* de independencia). Este análisis indica que el síntoma mostrado por la planta está determinado por el fenotipo de las variantes de RNAsat que la infectan, al menos en el caso de las variantes de RNAsat necrogénicas. En efecto, 13 de 16 variantes necrogénicas (81%) procedían de plantas que mostraban necrosis sistémica, mientras que sólo 22 de 38 variantes no necrogénicas (58%) procedían de una planta no necrótica. La Tabla 4.3 muestra además la proporción de infecciones mixtas de RNAsat necrogénicos y RNAsat no necrogénicos, indicada por el número de variantes de RNAsat necrogénicas en plantas no necróticas y por el número de variantes no necrogénicas en plantas necróticas. La proporción de infecciones mixtas fue mayor en plantas necróticas (16/29, 55%) que en plantas no necróticas (3/25, 12%). Todos estos resultados sugieren que el fenotipo necrogénico es dominante sobre el no necrogénico cuando las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas infectan a la misma planta.

La posible dominancia del síntoma de necrosis en plantas con infecciones mixtas de variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas se ensayó en un experimento en el que 20 combinaciones al azar de una variante necrogénica y una variante no necrogénica se inocularon en 10 plantas de tomate cada una, con la cepa Fny de CMV

como virus auxiliar. Las 20 combinaciones estaban formadas por 10 variantes de RNAsat necrogénicas y 10 variantes no necrogénicas, de forma que cada variante de RNAsat entraba a formar parte de 2 combinaciones distintas (Tabla 4.4). En 18 de las 20 combinaciones las 10 plantas inoculadas desarrollaron necrosis. En una de las dos combinaciones restantes no se observaron plantas necróticas, y en la otra combinación sólo se observó una planta necrótica de las 10 inoculadas. En estas dos últimas combinaciones (G - 4 y G - 9 en la Tabla 4.4) entraba a formar parte la misma variante de RNAsat necrogénica, 91/3.1, que procedía de una planta de campo que no mostraba necrosis. En cambio, la variante necrogénica 91/3.2, procedente de la misma planta, sí produjo la necrosis de las 10 plantas inoculadas en cualquiera de las dos combinaciones en las que entraba a formar parte (H - 6 y H - 10 en la Tabla 4.4). Estos resultados indican que en la mayor parte de las infecciones mixtas de RNAsat distintos el fenotipo necrogénico domina sobre el no necrogénico.

Tabla 4.4 Combinaciones de variantes de RNAsat de CMV ensayadas en tomate.

Variantes de RNAsat necrogénicas ^a		Variantes de RNAsat no necrogénicas ^a		Combinaciones de variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas	
89/15.1	A	89/15.2	1	A - 1	A - 6
89/42.1	B	89/20.1	2	B - 3	B - 8
89/42.2	C	89/23.1	3	C - 2	C - 5
90/5.1	D	90/13.1	4	D - 5	D - 8
90/22.1	E	90/14.1	5	E - 3	E - 4
90/24.1	F	90/17.1	6	F - 7	F - 10
91/3.1	G	90/19.2	7	G - 4	G - 9
91/3.2	H	91/2.2	8	H - 6	H - 10
91/5.1	I	92/4.1	9	I - 2	I - 7
94/32.1	J	92/10.1	10	J - 1	J - 9

^a Las letras y los números indican las combinaciones de las que cada variante de RNAsat entra a formar parte.

Los resultados obtenidos del análisis de la frecuencia de plantas necróticas en campo y de la frecuencia de plantas infectadas con CMV y RNAsat indican que la disminución de la incidencia de necrosis observada en el campo a lo largo de la epidemia debió producirse por la disminución de la frecuencia de las variantes de RNAsat necrogénicas en la población de RNAsat, segunda de las hipótesis enunciadas al principio de este apartado 4.1. En efecto, la inducción de necrosis en tomate sólo depende del fenotipo de las variantes de RNAsat asociadas a CMV y no del aislado que actúe como virus auxiliar, ni de la interacción de las variantes de RNAsat necrogénicas con las no necrogénicas en infecciones mixtas.

La reducción de la frecuencia de los RNAsat necrogénicos refleja la evolución de la población de RNAsat de CMV hacia una menor virulencia. El sistema huésped-patógeno constituido por CMV y su RNAsat en los cultivos de tomate de la costa mediterránea española nos brindó una buena oportunidad para estudiar los factores que pueden determinar la evolución de la virulencia de un virus de plantas en la naturaleza. La primera aproximación al estudio de la evolución de la virulencia de CMV y su RNAsat consistió en el análisis de los factores que pueden determinar su eficacia biológica.

4.2.- FACTORES DE LA EFICACIA BIOLÓGICA DEL RNA SATÉLITE DE CMV RELACIONADOS CON SU CICLO BIOLÓGICO

En este apartado se investigan factores que pueden determinar la eficacia biológica del RNAsat de CMV en tomate al estar asociados con distintas fases de su ciclo biológico. Los cambios en la estructura genética de la población de CMV y su RNAsat hacia formas de menor virulencia sugieren que en condiciones de campo los RNAsat necrogénicos para tomate deberían tener algún tipo de desventaja evolutiva en comparación con los RNAsat no necrogénicos. Por tanto, se analizaron las posibles diferencias entre variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas en cuanto a infectividad, capacidad de acumulación en plantas de tomate, eficacia de encapsidado y probabilidad de ser transmitidas a la descendencia de CMV.

4.2.1.- Infectividad del RNA satélite de CMV

Uno de los factores que puede influir en la eficacia biológica de los RNAsat es su infectividad. Esta se cuantificó analizando la relación entre la frecuencia de infección por CMV y RNAsat en tomate y la concentración de RNAsat en el inóculo para 8 variantes de RNAsat necrogénicas y 8 variantes no necrogénicas de entre las indicadas en la Tabla 4.4. Cada variante de RNAsat se inoculó en tomate a tres concentraciones diferentes con una concentración fija de la cepa Fny de CMV. La concentración del virus auxiliar en el inóculo se eligió de forma que se garantizara la infección por CMV del 100% de las plantas inoculadas. Cada tratamiento (CMV-Fny con una variante de RNAsat a una concentración determinada) se ensayó en 10 plantas de tomate y posteriormente se evaluó la proporción de plantas infectadas por CMV y RNAsat con respecto al número de plantas infectadas por CMV. La infectividad de las variantes de RNAsat se representó a través de rectas de regresión que relacionaban la frecuencia de plantas con RNAsat de entre las infectadas con CMV (F) frente al logaritmo decimal de las distintas concentraciones de RNAsat en el inóculo (C , en $\mu\text{g/ml}$). La Figura 4.3 muestra las rectas de regresión correspondientes a algunas de las variantes de RNAsat ensayadas y las rectas de regresión conjunta para todas las variantes necrogénicas y todas las variantes no necrogénicas. La Tabla 4.5 indica los parámetros de la regresión ($F = a + b \log C$) obtenidos para cada una de las variantes de RNAsat ensayadas. La variación de la infectividad de cada una de las variantes de RNAsat está suficientemente explicada por la variación en la concentración de RNAsat en el inóculo (ver valores del coeficiente de determinación R^2 en la Tabla 4.5), aunque la correlación entre ambas variables no es significativa ($P > 0,05$) debido a que sólo se utilizaron tres valores de concentración para cada una de las variantes de RNAsat. Sin embargo, al considerarse en conjunto todas las variantes de RNAsat necrogénicas y todas las no necrogénicas, la correlación entre infectividad del RNAsat y su concentración en el inóculo sí fue significativa ($P < 0,0001$). En la Figura 4.3 se observa que las variantes de RNAsat mostraron rectas de infectividad diferentes, sin embargo, al comparar en conjunto la infectividad de las variantes de RNAsat necrogénicas con la infectividad de las variantes no necrogénicas, las diferencias no resultaron significativas.

4.2.2.- Acumulación del RNA satélite de CMV

La eficacia biológica de los RNAsat puede depender también de su capacidad para colonizar la planta a la que infecta junto con CMV y acumularse en sus tejidos. Además, cuando en una planta existen infecciones mixtas de varios RNAsat, sus respectivas eficacias biológicas pueden depender de la capacidad de los RNAsat de competir entre ellos por la colonización de la planta. En el experimento que se describe en este apartado se cuantificó la acumulación en tejidos de tomate infectados sistémicamente de 10 variantes de RNAsat necrogénicas y 10 variantes no necrogénicas inoculadas con la cepa Fny de CMV. Cada variante de RNAsat necrogénica o no necrogénica se inoculó por separado (infección individual) o en las dos combinaciones al azar con variantes de RNAsat de fenotipo distinto indicadas en la Tabla 4.4 (infección

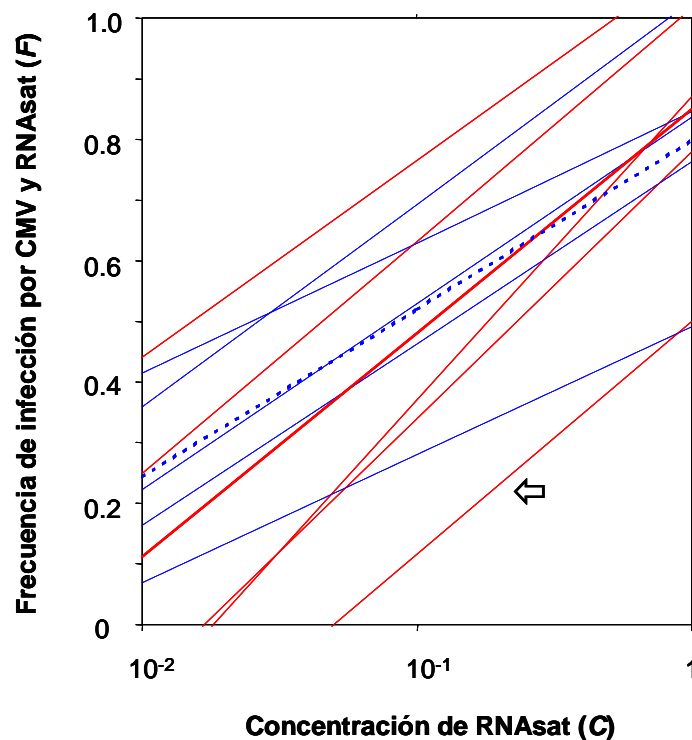


Figura 4.3 Rectas de regresión entre la frecuencia de plantas infectadas con CMV y RNAsat (F) y el logaritmo decimal de la concentración de RNAsat en el inóculo (C) en $\mu\text{g/ml}$, para 5 variantes de RNAsat necrogénicas (—) o no necrogénicas (.....), y para todas las variantes necrogénicas (—) o no necrogénicas (—) en conjunto. La flecha (\nwarrow) señala la recta de infectividad de la variante de RNAsat 91/3.1.

Tabla 4.5 Análisis de regresión entre la frecuencia de plantas infectadas con CMV y RNAsat y la concentración de RNAsat en el inóculo.

Variantes de RNAsat necrogénicas	Parámetros de regresión ^a			R^2 ^b	P^c	Variantes de RNAsat no necrogénicas	Parámetros de regresión ^a			R^2 ^b	P^c
	a	b					a	b			
89/15.1	1,0167	0,3843	0,0367	99,67	0,0367	89/15.2	0,7667	0,3074	75,00	0,3333	
89/42.1	0,8700	0,5000	0,2694	83,14	0,2694	89/20.1	0,6667	0,1000	32,43	0,6143	
89/42.4	0,9500	0,3459	0,1210	96,43	0,1210	89/23.1	0,8583	0,3036	98,11	0,0878	
90/22.1	1,0900	0,3243	0,1924	91,40	0,1924	90/14.1	0,4917	0,2150	98,56	0,0766	
90/24.1	0,7600	0,2900	0,2521	85,12	0,2521	90/17.1	0,7633	0,3000	91,34	0,1902	
91/3.1	0,4998	0,3839	-	-	-	90/19.2	0,4917	0,2114	88,11	0,2242	
91/3.2	0,9500	0,3459	0,1210	96,43	0,1210	91/2.2	1,0283	0,3350	97,90	0,0926	
91/5.1	0,7800	0,4400	0,2387	86,58	0,2387	92/4.1	0,8367	0,3074	66,66	0,3919	
Regresión conjunta	0,8497	0,3693	<10⁻⁴	71,19	<10⁻⁴	Regresión conjunta	0,7983	0,2770	68,93	<10⁻⁴	

^a Parámetros de regresión lineal entre las frecuencias de plantas infectadas con CMV y RNAsat (F) y el logaritmo decimal de la concentración del RNAsat en el inóculo (C) en $\mu\text{g/ml}$: $F = a + b \log C$.

^b Coeficiente de determinación de la regresión (%).

^c Probabilidad en la prueba de significación de la regresión.

^{b,c} Los parámetros a y b correspondientes a la variante de RNAsat 91/3.1 se han calculado con sólo dos puntos, por lo que R^2 y P no se han determinado.

mixta). Cada variante de RNAsat y cada una de sus combinaciones se ensayó en 10 plantas de tomate y la acumulación de RNAsat se cuantificó en extractos de RNA total de la tercera hoja por encima de la inoculada en cada una de las 10 plantas (ver ejemplo en Figura 4.4). La Tabla 4.6 muestra los resultados de acumulación de RNAsat para cada una de las variantes de RNAsat ensayadas. En las infecciones individuales no se observaron diferencias significativas entre la acumulación de las variantes de RNAsat necrogénicas y de las variantes no necrogénicas. Sin embargo, los datos correspondientes a infecciones mixtas indican que mientras la presencia de las variantes de RNAsat no necrogénicas no afectó a la acumulación de las variantes de RNAsat necrogénicas, la presencia de las variantes necrogénicas provocó una disminución de aproximadamente un orden de magnitud en la acumulación de las variantes no necrogénicas. Esta reducción resultó significativa en una prueba de comparación de medias ($P < 0,0001$). Hay que destacar que la acumulación en inoculación mixta de la variante de RNAsat no necrogénica 90/13.1 fue similar a su acumulación en inoculación individual (Tabla 4.6). Esta variante de RNAsat se inoculó en combinación con la variante necrogénica 91/3.1, que no llegó a detectarse en dicha combinación y no indujo necrosis en ninguna de las diez plantas inoculadas. La posible ausencia de acumulación de la variante 91/3.1 pudo deberse a su poca infectividad (ver Tabla 4.5 y Figura 4.3), aunque es importante recordar que dicha variante es una de las pocas variantes de RNAsat necrogénicas que procedían de una planta de campo no necrótica.

4.2.3.- Encapsidado del RNA satélite en las partículas de CMV

El RNAsat de CMV depende del virus auxiliar para su encapsidado. La capacidad del RNAsat de CMV de competir con los RNAs virales por el encapsidado podría influir en la eficacia de transmisión del RNAsat junto con el virus auxiliar. La eficacia de encapsidado de cada una de las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas se estimó cuantificando la proporción del RNAsat con respecto al RNA total contenido en las partículas de CMV purificadas de una mezcla de la cuarta hoja del conjunto de las 10 plantas con infecciones individuales del experimento descrito en el apartado 4.2.2. El RNA encapsidado se analizó por electroforesis en gel de agarosa, y las proporciones relativas de cada RNA se estimaron por densitometría de las bandas

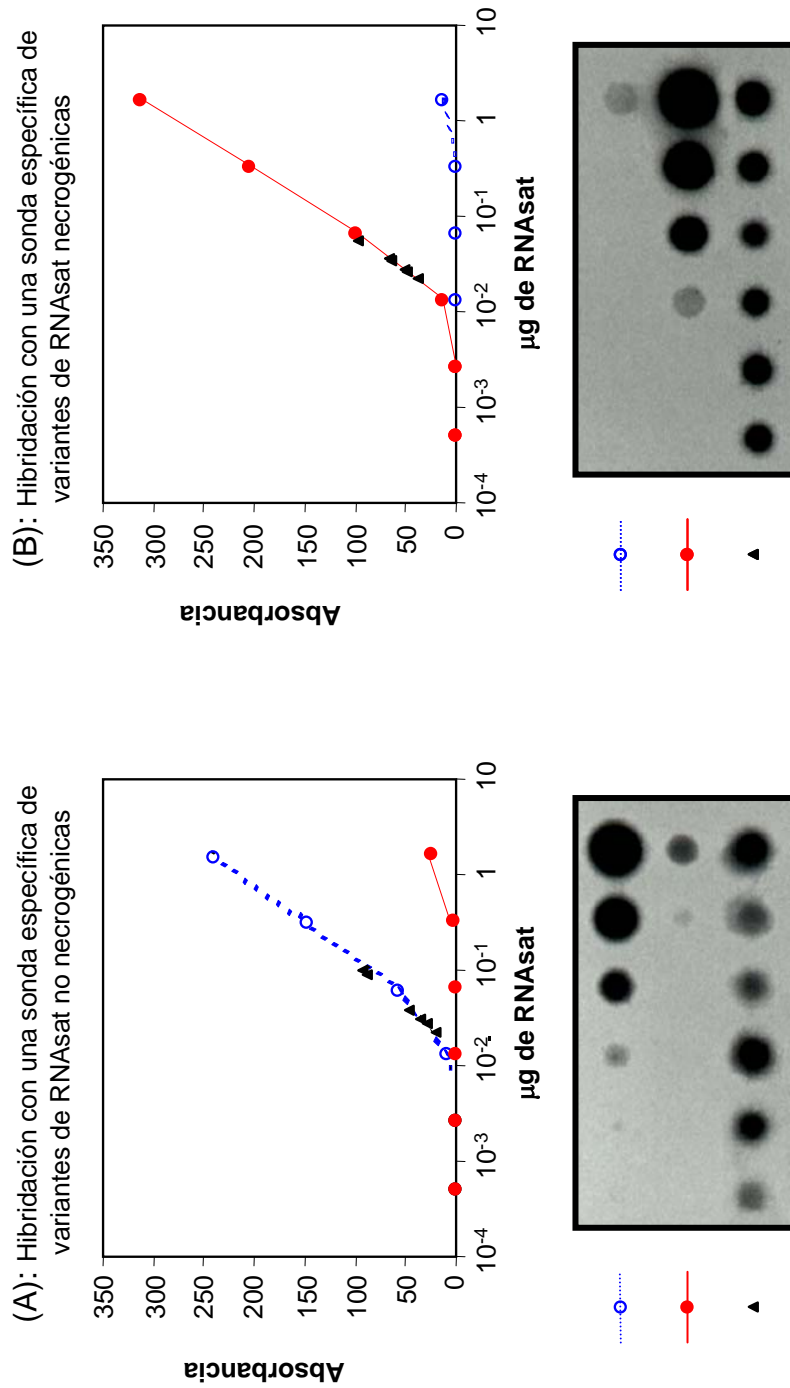


Figura 4.4 Cuantificación del RNAsat por hibridación en filtros de nylon. Los extractos de ácidos nucleicos totales de hoja de 6 plantas infectadas por CMV (cepa Fny) y una mezcla de la variante de RNAsat necrogénica 91/5.1 y de la variante no necrogénica 89/20.1 (▲) se cargaron en filtros de nylon junto con cantidades conocidas (de 2,7 µg a 1,7 µg) de variantes de RNAsat necrogénicas (●) y no necrogénicas (○). Los filtros se hibridaron con oligonucleótidos marcados con ³²P para la detección específica de RNAsat no necrogénico (panel A) o necrogénico (panel B). Los valores de absorbancia de las señales se determinaron por densitometría y se representaron gráficamente frente a las cantidades conocidas de RNAsat. En los filtros se cargaron 25 ml de disolución 1/1 y 1/100 de cada extracto, para garantizar que sus valores de absorbancia quedasen incluidos en el intervalo de variación lineal de las curvas estándar.

Tabla 4.6 Acumulación de RNAsat de CMV en hojas de tomate.

Variantes de RNAsat necrogénicas	Infecciones individuales ^a	Infecciones mixtas ^b	Variantes de RNAsat no necrogénicas	Infecciones individuales ^a	Infecciones mixtas ^b
89/15.1	40,39 ± 8,16	27,03 ± 3,84	89/15.2	10,41 ± 3,96	1,00 ± 0,75
89/42.1	22,31 ± 3,41	16,97 ± 1,58	89/20.1	43,29 ± 7,20	0,91 ± 0,43
89/42.4	29,41 ± 4,60	34,05 ± 5,06	89/23.1	22,84 ± 8,72	0,71 ± 0,40
90/5.1	33,14 ± 6,83	13,99 ± 1,79	90/13.1	10,24 ± 4,44	8,70 ± 3,02
90/22.1	30,48 ± 4,09	27,36 ± 2,58	90/14.1	29,26 ± 5,15	1,46 ± 0,77
90/24.1	37,68 ± 4,73	21,96 ± 5,26	90/17.1	81,94 ± 26,23	0,74 ± 0,39
91/3.1	29,77 ± 6,12	nd.	90/19.2	29,74 ± 11,31	0,32 ± 0,05
91/3.2	39,65 ± 7,76	52,16 ± 8,17	91/2.2	14,77 ± 4,02	4,94 ± 1,33
91/5.1	47,58 ± 8,50	55,10 ± 6,62	92/4.1	23,11 ± 1,38	nd.
94/32.1	31,25 ± 6,43	52,36 ± 6,44	92/10.1	45,87 ± 20,33	nd.
Total ^c	34,93 ± 2,17	31,85 ± 1,97	Total ^c	32,08 ± 4,20	2,23 ± 0,44

^{a,b} Acumulación de RNAsat, medida en μg por g de peso fresco en extracto de ácidos nucleicos de la 3^a hoja sobre la hoja inoculada, cuando cada variante de RNAsat se inoculó individualmente (media \pm error estándar de 10 plantas)^(a) o en combinación con 2 variantes de RNAsat del otro tipo (media \pm error estándar de 20 plantas, 10 en cada combinación)^(b); (nd.) no se ha determinado.

^c Acumulación de RNAsat (media \pm error estándar) para el conjunto de las variantes de RNAsat necrogénicas y de las no necrogénicas.

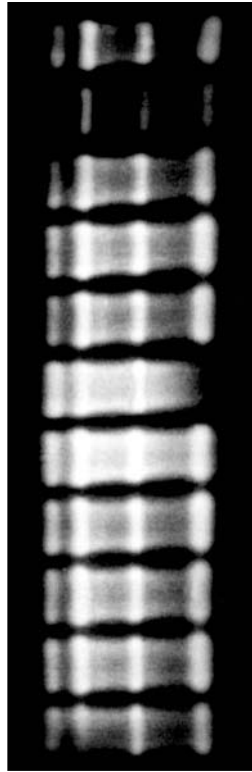
correspondientes teñidas con bromuro de etidio. La Figura 4.5 muestra los geles transiluminados con luz ultravioleta y los porcentajes que cada RNA constituye frente al RNA total encapsidado. La proporción que representa el RNAsat no fue significativamente diferente para las variantes necrogénicas y las no necrogénicas, sin embargo sí existían algunas diferencias en las fracciones de los RNAs virales. La proporción relativa de los RNAs 1 y 2 fue significativamente mayor en los viriones con RNAsat necrogénicos que en aquellos con RNAsat no necrogénicos ($P = 0,01$), mientras que las diferencias de acumulación del RNA 4 fueron en sentido inverso (Figura 4.5). La fracción constituida por el RNA 3 no fue significativamente diferente entre ambos tipos de variantes de RNAsat.

4.2.4.- Transmisión del RNA satélite a la descendencia de CMV

Aunque las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas representan la misma proporción respecto al RNA total encapsidado, sí pueden afectar de forma diferente el encapsidado de los RNAs del virus auxiliar. Además, para el inicio de un nuevo ciclo de infección es necesario un conjunto de al menos tres partículas de CMV que encapsiden los RNAs 1, 2 y 3, respectivamente. Hasta el momento no se conoce si las moléculas de RNAsat se encapsidan en las partículas de CMV junto con los RNAs genómicos del virus o si lo hacen por sí solas en una partícula distinta (Lot y Kaper, 1976). Por tanto, el análisis del RNA encapsidado al que se refiere el apartado 4.2.3 puede no ser suficiente para estimar la probabilidad de transmisión del RNAsat a la descendencia de CMV, que también podría depender de forma importante de la distribución del RNAsat en las distintas partículas de CMV. Para estimar la probabilidad de transmisión del RNAsat a la descendencia de CMV, las preparaciones de partículas virales de CMV con RNAsat utilizadas en el experimento anterior se inocularon en hojas de un huésped de lesión localizada (*Chenopodium quinoa* Willd) para separar la descendencia. Los descendientes se multiplicaron por separado transfiriendo 10 lesiones locales de cada una de las variantes de RNAsat a 10 plantas de tabaco cv. Xanthi nc y posteriormente se determinó el número de plantas infectadas con CMV y con RNAsat. La fracción de plantas infectadas por CMV y por cada uno de los RNAsat ensayados es una estima de su probabilidad de transmisión a la descendencia.

Porcentaje frente al RNA total encapsidado

Variantes de RNAsat Fny Variantes de RNAsat
necrogénicas CMV no necrogénicas



	Variantes de RNAsat necrogénicas	Variantes de RNAsat no necrogénicas
— RNAs 1 + 2	19 ± 0.5	15 ± 1.0
— RNA 3	25 ± 0.6	25 ± 0.6
— RNA 4	21 ± 0.4	24 ± 0.6
— RNAsat	34 ± 0.7	36 ± 1.1

Figura 4.5 Electroforesis en gel de agarosa del RNA encapsidado de las partículas de CMV con RNAsat necrogénicos y no necrogénicos. Cada carril corresponde a 3 µg de RNA de viriones purificados a partir de una mezcla equivalente de la 4ª hoja de 10 plantas de tomate. Los datos son las proporciones (%), media ± error estándar) de cada fracción de RNA con respecto al RNA total encapsidado, determinadas por densitometría de las bandas teñidas con bromuro de etidio.

La Tabla 4.7 muestra que las frecuencias de transmisión varían considerablemente para las distintas variantes de RNAsat, aunque las variantes necrogénicas exhiben, como media, una frecuencia de transmisión significativamente mayor que las variantes no necrogénicas ($P = 0,007$ en una prueba de comparación de frecuencias).

Tabla 4.7 Frecuencia de transmisión del RNAsat a la descendencia de CMV.

Variantes de RNAsat necrogénicas	Frecuencia de infección por CMV y RNAsat ^a	Variantes de RNAsat no necrogénicas	Frecuencia de infección por CMV y RNAsat ^a
89/15.1	0,75	89/15.2	0,10
89/42.1	0,46	89/20.1	0,70
89/42.4	0,90	89/23.1	0,33
90/5.1	0,73	90/13.1	0,60
90/22.1	0,88	90/14.1	0,78
90/24.1	0,56	90/17.1	0,75
91/3.1	1,00	90/19.2	0,67
91/3.2	0,89	91/2.2	0,29
91/5.1	0,90	92/4.1	0,85
94/32.1	0,75	92/10.1	0,40
Total ^b	0,78 ± 0,05	Total ^b	0,55 ± 0,08

^a Frecuencia de plantas infectadas por CMV y RNAsat con respecto al número de plantas infectadas por CMV.

^b Frecuencia de infección por CMV y RNAsat (media ± error estándar) para el conjunto de las variantes de RNAsat necrogénicas y de las no necrogénicas.

Hasta ahora se han analizado varios factores de la eficacia biológica del RNAsat de CMV relacionados con su ciclo biológico. Algunos de estos factores, como la infectividad del RNAsat y su capacidad de acumulación en tomate o la fracción que representa en el RNA encapsidado, no difieren entre las variantes de RNAsat necrogénicas y las no necrogénicas. Otros factores, sin embargo, favorecen a las

primeras frente a las segundas: las variantes necrogénicas compiten favorablemente con las no necrogénicas en infecciones mixtas, y también tienen mayor probabilidad de transmisión a la descendencia con el virus auxiliar. Ninguno de estos factores supone una desventaja evolutiva de los RNAsat necrogénicos en relación con los RNAsat no necrogénicos que explique la evolución de la población del RNAsat hacia una menor virulencia. Por tanto, se analizaron factores de la eficacia biológica de los RNAsat relacionados con su interacción con el virus auxiliar.

4.3.- FACTORES DE LA EFICACIA BIOLÓGICA DEL RNA SATÉLITE DE CMV RELACIONADOS CON SU INTERACCIÓN CON EL VIRUS AUXILIAR

En el experimento descrito en el apartado 4.2.3 se obtuvieron preparaciones de partículas virales de CMV, procedentes de la inoculación en tomate de la cepa Fny de CMV con 10 variantes de RNAsat necrogénicas y 10 variantes de RNAsat no necrogénicas. La cuantificación por espectrofotometría de estas preparaciones mostró que las variantes de RNAsat necrogénicas producían una depresión de la acumulación de CMV significativamente mayor que las variantes no necrogénicas (datos no mostrados). Para comprobar si el efecto del RNAsat en la reducción de la acumulación de CMV era general, se escogieron 10 aislados de campo de CMV, libres de RNAsat, cinco de los cuales representaban el tipo genético 1 y los otros cinco representaban el tipo genético 2 (ver Tabla 3.1 en el capítulo de materiales y métodos). Cada aislado de CMV se inoculó en plantas de tomate de forma individual o en combinación con cada una de cinco variantes de RNAsat necrogénicas y cinco variantes no necrogénicas, escogidas al azar entre las 20 variantes de RNAsat utilizadas en todos los experimentos anteriores. En cada tratamiento se utilizaron cinco plantas, de las que se obtuvieron preparaciones de partículas virales por separado. La concentración de viriones de CMV en estas preparaciones se cuantificó mediante ELISA. Cada una de las variantes de RNAsat ensayadas provocó una reducción significativa en la acumulación de cada uno de los aislados de CMV (no mostrado). La Tabla 4.8 indica la reducción media de la acumulación de CMV, cuando para cada una de las variantes de RNAsat se consideraron en conjunto todos los aislados de CMV utilizados como virus auxiliar. El

efecto de reducción de la acumulación viral fue variable para cada variante de RNAsat, y en conjunto fue significativamente mayor para las variantes necrogénicas que para las variantes no necrogénicas ($P < 0,0001$ en una prueba de comparación de medias).

Los resultados obtenidos indican que la interacción del RNAsat con CMV provoca una reducción de la acumulación del virus auxiliar en los tejidos infectados. Esta disminución de la concentración del virus podría tener consecuencias en la transmisión tanto de CMV como del propio RNAsat, afectando por tanto a la eficacia biológica de ambos. Los factores que pueden influir en la transmisión de CMV y su RNAsat por pulgones se analizan en el apartado siguiente.

4.4.- FACTORES DE LA EFICACIA BIOLÓGICA DE CMV Y SU RNA SATÉLITE RELACIONADOS CON SU TRANSMISION POR VECTORES

4.4.1.- Transmisión de CMV y su RNA satélite por pulgones

En este apartado se analiza el papel de la transmisión vectorial como factor de la eficacia biológica de CMV y su RNAsat. Para examinar si la presencia del RNAsat de CMV tenía algún efecto en la eficacia de transmisión de CMV, si este efecto era el mismo para las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas, y si existían diferencias en la transmisión de los dos tipos de variantes de RNAsat, se diseñó un experimento de transmisión utilizando como vector la especie de pulgón *A. gossypii*. Como plantas "fuente" de inóculo para la adquisición del virus por los pulgones se utilizaron tomates infectados por la cepa Fny de CMV sin RNAsat o en combinación con cinco variantes de RNAsat necrogénicas o seis variantes de RNAsat no necrogénicas. Estas variantes de RNAsat se escogieron al azar entre las 20 utilizadas en los ensayos descritos en apartados anteriores. Los experimentos de transmisión consistieron en tres ensayos diferentes para cada combinación de Fny con una variante de RNAsat, y tres ensayos con la cepa Fny de CMV sin RNAsat que se repitieron tres veces a lo largo del tiempo que duraron los ensayos con RNAsat. La transmisión de

Tabla 4.8 Acumulación de partículas de CMV en hojas de tomate.

Tratamiento	Acumulación viral ^a
CMV	1124,49 ± 326,37
CMV y RNAsat necrogénicos:	
89/15.1	170,21 ± 56,21
89/42.1	116,88 ± 46,31
90/22.1	97,70 ± 14,77
91/5.1	97,59 ± 11,10
94/32.1	81,50 ± 10,90
Total ^b	111,40 ± 7,33
CMV y RNAsat no necrogénicos:	
89/15.2	291,24 ± 56,21
89/20.1	270,66 ± 46,31
90/17.1	219,19 ± 28,03
90/19.2	358,96 ± 70,87
91/2.2	211,20 ± 40,76
Total ^b	265,29 ± 21,75

^a Acumulación de CMV, medida en μg de partículas virales por g de peso fresco, en hojas de infección sistémica cuando 10 aislados distintos de CMV se inocularon individualmente o en combinación con 5 variantes de RNAsat necrogénicas y 5 no necrogénicas. Se analizaron 5 plantas en cada tratamiento y se consideraron sólo aquellas que estaban infectadas por CMV con RNAsat, excepto en las inoculaciones individuales de CMV. Los valores son la media \pm error estándar cuando se consideraron los 10 aislados de CMV en conjunto.

^b Acumulación de CMV (medida \pm error estándar) para el conjunto de tratamientos con variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas.

CMV se realizó desde las plantas "fuente" de inóculo a nuevas plantas de tomate utilizando tres pulgones por planta.

La Tabla 4.9 muestra las frecuencias de transmisión obtenidas para la cepa Fny de CMV por separado y en combinación con cada variante de RNAsat. La presencia de cualquiera de las variantes de RNAsat provocó una reducción de la eficiencia de transmisión de CMV. La reducción media de transmisibilidad considerando todas las variantes de RNAsat en conjunto fue significativa en comparación con la transmisibilidad de CMV en ausencia de RNAsat ($P < 0,0001$ en una prueba de comparación de frecuencias). Esta reducción en la eficacia de transmisión de CMV fue similar para las variantes de RNAsat necrogénicas y las variantes no necrogénicas: reducciones del 24% y 28%, respectivamente, asumiendo un 100% de transmisibilidad para la cepa Fny. En el caso de las variantes de RNAsat no necrogénicas los valores de transmisibilidad de CMV variaron considerablemente (desde un 35% a un 81%) dependiendo de la variante de RNAsat. No ocurrió así en el caso de las variantes de RNAsat necrogénicas, para las que la transmisibilidad de CMV fue mucho más homogénea (64 - 66%).

La Tabla 4.9 también muestra la proporción de plantas infectadas por CMV que además lo estaban con el RNAsat. Esta proporción mide la transmisibilidad del RNAsat junto con el virus auxiliar. La Tabla 4.9 indica que la infección con las variantes de RNAsat necrogénicas fue del 100% en todos los casos, mientras que la infección con las variantes no necrogénicas varió entre un 96% y un 100% (98% como media). Aunque estas diferencias de transmisibilidad son pequeñas, resultaron significativas mediante una prueba de independencia de Fisher ($P = 0,007$). Hay que destacar que los pulgones emplearon aproximadamente el doble de tiempo en alimentarse sobre hojas infectadas con CMV y RNAsat necrogénicos (alrededor de 60 segundos), que en alimentarse sobre hojas infectadas sólo con CMV o con CMV y RNAsat no necrogénicos (alrededor de 30 segundos), a pesar de que las hojas no mostraran síntomas visibles de necrosis.

Tabla 4.9 Eficacia de transmisión por *Aphis gossypii* de CMV con y sin RNAsat.

Tratamiento	Eficacia de transmisión de CMV ^a	Eficacia de transmisión del RNAsat ^b
CMV	369/429 (86%)	
CMV y RNAsat necrogénicos:		
89/15.1	91/140 (65%)	91/ 91 (100%)
89/42.1	62/ 95 (65%)	62/ 62 (100%)
90/22.1	90/136 (66%)	90/ 90 (100%)
91/5.1	91/142 (64%)	91/ 91 (100%)
94/32.1	93/144 (65%)	93/ 93 (100%)
Total ^c	427/657 (65%)	427/427 (100%)
CMV y RNAsat no necrogénicos:		
89/15.2	68/ 95 (72%)	65/ 68 (96%)
89/20.1	114/140 (81%)	114/114 (100%)
90/14.1	80/144 (56%)	79/ 80 (99%)
90/17.1	65/ 94 (69%)	63/ 65 (97%)
90/19.2	77/143 (54%)	76/ 77 (99%)
91/2.2	33/ 93 (35%)	32/ 33 (97%)
Total ^c	437/709 (62%)	429/437 (98%)

^a Eficacia de transmisión de CMV expresada como número de plantas infectadas por CMV (cepa Fny) con respecto al número total de plantas inoculadas, utilizando 3 pulgones por planta. Los porcentajes correspondientes se indican entre paréntesis. Los datos corresponden a la suma de los 3 ensayos de CMV con RNAsat o de los 9 ensayos de CMV sin RNAsat.

^b Eficacia de transmisión del RNAsat expresada como número de plantas infectadas por CMV y RNAsat con respecto al número total de plantas infectadas por CMV. Los porcentajes correspondientes se indican entre paréntesis.

^c Eficacia de transmisión de CMV y de su RNAsat para el conjunto de tratamientos con variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas.

4.4.2.- Relación entre la frecuencia de transmisión de CMV y su acumulación en los tejidos infectados

La reducción de la transmisibilidad de CMV por pulgones asociada a la presencia del RNAsat podía ser el resultado del efecto de éste en la acumulación del virus auxiliar, descrito en el apartado 4.3. Por otro lado, la interacción del RNAsat con CMV podría tener un efecto directo en el mecanismo de transmisión de CMV, interfiriendo por ejemplo en la interacción del virus con el vector. Para comprobar si la reducción de la eficacia de transmisión de CMV asociada al RNAsat estaba o no relacionada con el nivel de acumulación de CMV en las plantas usadas como "fuente" de inóculo, inmediatamente después de realizados los experimentos de transmisión se purificaron los viriones de las hojas en las que los pulgones habían adquirido el virus, y las preparaciones de partículas virales se cuantificaron por ELISA con anticuerpos frente a la proteína de la cápsida de la cepa Fny de CMV. La probabilidad de transmisión de CMV por un único pulgón se estimó a partir de los datos presentados en la Tabla 4.9 mediante la ecuación de Gibbs y Gower (Gibbs y Gower, 1960), y se relacionó con la acumulación de CMV en las hojas "fuente" de inóculo en cada uno de los experimentos de transmisión. La Tabla 4.10 indica que la presencia de las distintas variantes de RNAsat resultó en una disminución significativa de la acumulación de CMV ($P < 0,0001$), y que este efecto de depresión no fue significativamente diferente para las variantes de RNAsat necrogénicas y las variantes de RNAsat no necrogénicas. Los valores de acumulación de CMV en presencia de las variantes no necrogénicas mostraron mayor dispersión que los correspondientes a las variantes necrogénicas, y en algunos casos variaron considerablemente entre ensayos distintos del mismo experimento (ver por ejemplo los valores para la variante de RNAsat 91/2.2 en la Tabla 4.10). En la misma tabla también se observa que la frecuencia de transmisión de CMV por un pulgón parece mantener una correlación con la acumulación de CMV. Esta correlación se observa mejor en la Figura 4.6, que representa la relación entre la frecuencia de transmisión de CMV por un pulgón y la acumulación de CMV para cada una de las plantas *fuentes* de inóculo utilizadas en los experimentos de transmisión. El análisis estadístico de la correlación entre ambas variables se llevó a cabo realizando una transformación logarítmica de los datos de una de las variables, la acumulación de

Tabla 4.10 Acumulación de partículas de CMV en las hojas "fuente" de inóculo y estimación de la frecuencia de transmisión de CMV por un único pulgón.

Tratamiento	Acumulación viral ^a	Frecuencia de transmisión ^b
CMV	1343 ± 163	0,48
CMV y RNAsat necrogénicos:		
89/15.1	356 ± 19	0,30
89/42.1	297 ± 4	0,30
90/22.1	370 ± 37	0,30
91/5.1	258 ± 25	0,29
94/32.1	237 ± 25	0,29
Total ^c	304 ± 18	0,30
CMV y RNAsat no necrogénicos:		
89/15.2	212 ± 156	0,34
89/20.1	328 ± 35	0,43
90/14.1	163 ± 48	0,24
90/17.1	218 ± 113	0,32
90/19.2	165 ± 38	0,23
91/2.2	129 ± 126	0,14
Total ^c	206 ± 31	0,27

^a Acumulación de CMV (cepa Fny), medida en µg de partículas virales por g de peso fresco, en las hojas "fuente" de inóculo (media ± error estándar de los 9 ensayos realizados con CMV o de los 3 ensayos realizados con CMV y cada una de las variantes de RNAsat).

^b Frecuencia de transmisión de CMV por un único pulgón estimada mediante la expresión de Gibbs y Gower (1960): $F = 1 - (1 - R/N)^{1/i}$, donde F es la frecuencia de transmisión estimada, R es el número de plantas infectadas por CMV, N es el número total de plantas inoculadas, e i es el número de pulgones por planta utilizados. R , N e i son los indicados en la Tabla 4.9.

^c Acumulación (media ± error estándar) y frecuencia de transmisión de CMV para el conjunto de tratamientos con las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas.

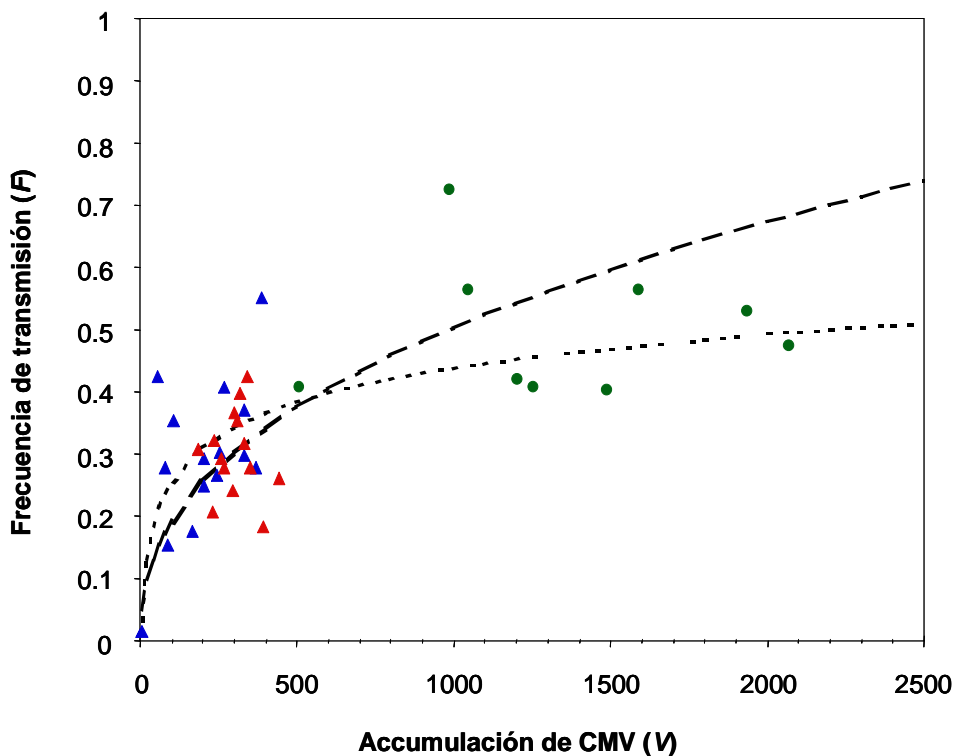


Figura 4.6 Relación entre la frecuencia de transmisión de CMV por un pulgón (F) y la acumulación de sus partículas virales (V , en μg de virus por g de peso fresco), para cada una de las plantas fuente de inóculo infectadas con CMV (cepa Fny) (\bullet), CMV con variantes de RNAsat necrogénicas (\blacktriangle) y CMV con variantes de RNAsat no necrogénicas (\blacktriangle). Se indican las curvas de regresión obtenidas mediante la transformación logarítmica de V : $F = a + b \ln V$ (.....); o de V y F : $F = a V^b$ (----); para el conjunto de plantas fuente de inóculo utilizadas. Los parámetros de regresión a y b , y la significación del test de correlación están indicados en la Tabla 4.11.

CMV, o de las dos variables, acumulación de CMV y frecuencia de transmisión de CMV por un pulgón. Los resultados del análisis de correlación están expuestos en la Tabla 4.11. Cuando se consideraron en conjunto los datos de todas las plantas "fuente" de inóculo utilizadas en el experimento, la correlación entre la frecuencia de transmisión de CMV y la acumulación del virus en los tejidos infectados resultó significativa con cualquiera de las dos transformaciones utilizadas. Cuando sólo se consideraron los datos correspondientes a las plantas infectadas con CMV y RNAsat, la correlación entre las dos variables seguía siendo significativa. Sin embargo, cuando en el análisis de

correlación se consideraron únicamente los datos de las plantas infectadas con CMV sin RNAsat, la correlación entre la eficacia de transmisión y la acumulación de CMV no fue significativa con ninguna de las dos transformaciones. Esta falta de correlación, unida a que los datos de las plantas infectadas por CMV con y sin RNAsat no variaban dentro del mismo intervalo de acumulación viral (Figura 4.6), no permitió analizar el papel de otros factores relacionados con la interacción de CMV y su RNAsat en la transmisibilidad de CMV.

Tabla 4.11 Análisis de la correlación entre la frecuencia de transmisión de CMV y su acumulación en la hoja "fuente" de inóculo.

Correlación ^a	Transformación de datos ^b	Coeficiente de correlación	<i>P</i> ^c	Parámetros de regresión	
				<i>a</i>	<i>b</i>
CMV ●	$F = a + b \ln V$	0,0530	0,8922	0,4034	0,0134
	$F = a V^b$	0,1017	0,7945	0,3462	0,0486
CMV con RNAsat ▲ ▲	$F = a + b \ln V$	0,5163	0,0041	0,0102	0,0541
	$F = a V^b$	0,7945	< 0,0001	0,0170	0,5181
Datos en conjunto ● ▲ ▲	$F = a + b \ln V$	0,6874	< 0,0001	-0,0874	0,0788
	$F = a V^b$	0,7994	< 0,0001	0,0276	0,4203

^a Se ha analizado la correlación entre la frecuencia de transmisión y la acumulación de CMV (cepa Fny) en las plantas "fuente" de inóculo para tres conjuntos de datos: plantas infectadas con CMV, plantas infectadas con CMV y RNAsat, y todas las plantas en conjunto. Los símbolos son los indicados en la Figura 4.6.

^b El análisis de correlación se realizó a través de la transformación logarítmica de la acumulación de CMV (*V*, en µg de virus por g de peso fresco): $F = a + b \ln V$; o de la acumulación de CMV (*V*) y de la frecuencia de transmisión (*F*): $F = a V^b$. En estas expresiones *a* y *b* son los parámetros de regresión.

^c Probabilidad en la prueba de significación de la correlación.

Los resultados expuestos en el apartado 4.4 indican que el RNAsat reduce la eficacia de transmisión de CMV por pulgones, disminuyendo por consiguiente su propia eficacia de transmisión. El efecto del RNAsat en la transmisibilidad de CMV puede

explicarse por la depresión que el primero produce en la acumulación del virus auxiliar, aunque no pueden descartarse otros efectos relacionados con la interacción entre CMV y su RNAsat.

4.5.- VIRULENCIA DE CMV Y SU RNA SATÉLITE EN TOMATE

La virulencia de CMV y su RNAsat en su huésped es un factor más de su eficacia biológica que también puede haber contribuido a la evolución de las poblaciones de RNAsat. La virulencia de un patógeno puede considerarse como la reducción que éste produce en la eficacia biológica de su huésped. Dado que en muchos casos la supervivencia del patógeno puede depender del huésped, una disminución de la eficacia biológica de este último puede suponer a su vez una reducción de la eficacia biológica del patógeno que lo infecta. Los experimentos descritos en este capítulo pretenden cuantificar el efecto de la infección por CMV y su RNAsat en la eficacia biológica de las plantas de tomate, estimando su influencia en el crecimiento y en la senescencia de la masa vegetal. Estos datos permitirán más adelante cuantificar la virulencia de este patógeno en tomate.

4.5.1.- Efecto de CMV y su RNA satélite en el crecimiento de las plantas de tomate

El efecto de la infección por CMV y su RNAsat en el crecimiento de plantas de tomate se analizó por comparación de la masa vegetal producida por plantas no infectadas y por plantas infectadas con la cepa Fny de CMV, y con dicha cepa en combinación con cinco variantes de RNAsat necrogénicas y cinco variantes no necrogénicas. Estas variantes de RNAsat ya habían sido utilizadas para el análisis de otros factores de la eficacia biológica en los apartados anteriores. Cada tratamiento se inoculó en cinco plantas, y 27 días después de la inoculación las plantas se cosecharon y se determinó la masa vegetal de la parte aérea, medida como peso seco. Los resultados obtenidos están indicados en la Tabla 4.12, y muestran que la masa vegetal de las plantas infectadas fue menor en todos los casos que la correspondiente a las plantas no

infectadas. El menor crecimiento correspondió a las plantas infectadas por CMV y RNAsat necrogénicos, seguidas por las plantas infectadas con CMV sin RNAsat, y por las infectadas con CMV y RNAsat no necrogénicos. Las diferencias de masa vegetal entre las plantas sanas y las infectadas con CMV y RNAsat no necrogénicos o con

Tabla 4.12 Masa vegetal de la parte aérea de plantas de tomate.

Tratamiento	Masa vegetal ^a
Plantas sanas	1818,4 ± 80,7
Plantas con CMV	1410,5 ± 210,5
Plantas con CMV y RNAsat necrogénicos:	
89/15.1	997,0 ± 73,0
89/42.1	904,4 ± 148,1
90/22.1	899,4 ± 165,6
90/5.1	786,2 ± 130,1
91/32.1	909,2 ± 171,7
Total ^b	899,2 ± 59,6
Plantas con CMV y RNAsat no necrogénicos:	
89/15.2	1631,4 ± 143,9
89/20.1	1362,0 ± 62,5
90/17.1	1598,6 ± 191,6
91/19.2	1480,4 ± 319,9
94/2.2	1735,6 ± 141,0
Total ^b	1561,6 ± 82,5

^a Masa vegetal (media ± error estándar), medida en mg de peso seco, de la parte aérea de 5 plantas sanas, infectadas por CMV (cepa Fny), e infectadas por CMV con variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas.

^b Masa vegetal (media ± error estándar) para el conjunto de tratamientos con variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas.

CMV sin RNAsat no resultaron significativas. Sin embargo, la masa vegetal de las plantas infectadas con CMV y RNAsat necrogénicos fue significativamente inferior a la de las plantas sanas o infectadas con CMV y RNAsat no necrogénicos ($P < 0.0001$, en una prueba de comparación de medias).

4.5.2.- Efecto de CMV y su RNA satélite en la senescencia de las plantas de tomate

Además del efecto en el crecimiento de las plantas, la infección por CMV y RNAsat podría provocar otros efectos, como por ejemplo una aceleración de la senescencia de las plantas infectadas. Ambos efectos podrían estar o no relacionados. Para analizar la influencia de la infección en la senescencia de las plantas los tratamientos, formados por la cepa Fny de CMV sin RNAsat o en combinación con cinco variantes de RNAsat necrogénicas y cinco variantes no necrogénicas, se inocularon en cinco plantas de tomate 15 días después de su transplante. Las plantas inoculadas se mantuvieron en el invernadero durante un periodo de 75 días desde el transplante, y durante ese tiempo se fueron recogiendo las hojas de cada planta a medida que iban alcanzando el estado de senescencia, identificado por el desarrollo de un color parduzco y porque se desprendían del tallo fácilmente. Según se recogía cada hoja se fue anotando el número de la hoja dentro de la planta (primera, segunda, etc., en orden ascendente de inserción en el tallo a partir de los cotiledones), el tiempo transcurrido desde el momento del transplante, y se determinó su masa medida como peso seco. Al examinar estos datos se observó que el tiempo transcurrido desde el transplante hasta la senescencia de cada hoja (a partir de ahora duración de la hoja) se correlacionaba positivamente con la masa vegetal de dicha hoja para las hojas de la parte baja de la planta (desde la primera hasta aproximadamente la cuarta) pero no para las hojas superiores (datos no mostrados). Para buscar una correlación entre la senescencia y la masa que se mantuviera para todas las hojas de la planta, la duración de cada hoja se relacionó con la suma de la masa vegetal de dicha hoja y de todas las hojas de la misma planta que hubieran alcanzado la senescencia con anterioridad (masa vegetal senescente). Como ejemplo, la Tabla 4.13 muestra para cada tratamiento la duración de la cuarta hoja y la masa vegetal senescente en la planta hasta la senescencia de dicha hoja, y la Figura 4.7 muestra la relación entre ambas variables teniendo en cuenta todas

Tabla 4.13 Duración hasta la senescencia de la cuarta hoja y masa vegetal senescente en las plantas de tomate^a.

Tratamiento	Duración de las hojas	Masa vegetal senescente
Plantas sanas	76,0 ± 5,0	459,8 ± 35,6
Plantas con CMV	63,6 ± 3,9	282,4 ± 34,0
Plantas con CMV y RNAsat necrogénicos:		
89/15.1	34,6 ± 0,4	168,3 ± 8,4
89/42.1	36,2 ± 1,0	174,6 ± 10,8
90/22.1	33,8 ± 0,4	197,4 ± 8,8
90/5.1	33,8 ± 0,4	181,1 ± 5,2
91/32.1	33,0 ± 1,2	177,6 ± 5,3
Total ^b	34,4 ± 0,4	179,5 ± 4,6
Plantas con CMV y RNAsat no necrogénicos:		
89/15.2	67,6 ± 5,4	303,5 ± 33,8
89/20.1	79,0 ± 1,4	253,3 ± 18,1
90/17.1	69,6 ± 2,9	304,4 ± 28,0
91/19.2	69,8 ± 2,3	245,0 ± 17,2
94/2.2	71,2 ± 1,7	271,3 ± 24,0
Total ^b	71,1 ± 1,5	276,4 ± 11,6

^a Los datos muestran la duración de la 4ª hoja de plantas de tomate desde el transplante hasta la senescencia (días) y la suma de su masa vegetal y la de todas las hojas que alcanzaron la senescencia con anterioridad a ella (media ± error estándar, en mg de peso seco).

^b Duración de la 4ª hoja y masa vegetal senescente para el conjunto de tratamientos con variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas.

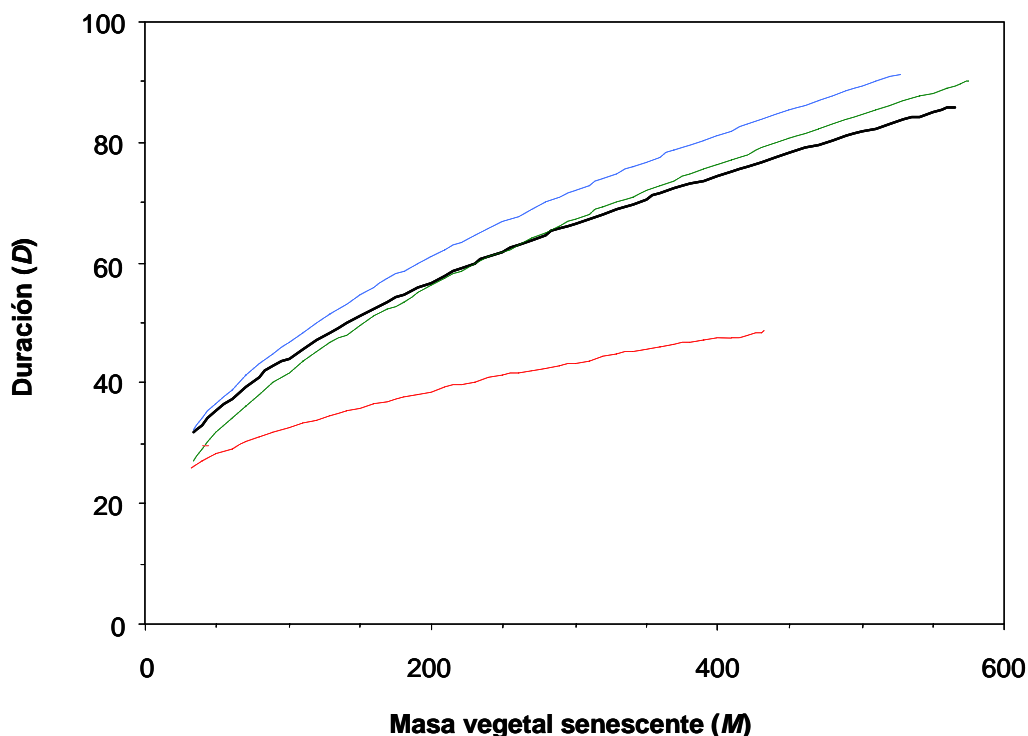


Figura 4.7 Relación entre la duración de las hojas y la masa vegetal senescente. El tiempo de duración de cada hoja desde el transplante hasta su senescencia (D , en días), se relacionó con la suma de su masa vegetal y la de todas las hojas que alcanzaron la senescencia con anterioridad a ella (M , en mg de peso seco). Las curvas indican las regresiones lineales entre D y la raíz cuadrada de M : $D = a + b \sqrt{M}$ para las plantas sanas (—) y las plantas infectadas con CMV (cepa Fny) (---), CMV con variantes de RNAsat necrogénicas (- - -) o CMV con variantes de RNAsat no necrogénicas (- - - -). Los parámetros de regresión a y b y la significación del test de correlación están indicados en la Tabla 4.14.

las hojas senescentes durante el periodo de 75 días, para el tratamiento no infectado, el infectado con CMV sin RNAsat, y el conjunto de tratamientos infectados con CMV con RNAsat necrogénicos y no necrogénicos. La Tabla 4.14 indica que para todos los tratamientos existía una correlación lineal significativa entre la duración de cada hoja (D) y la raíz cuadrada de la masa vegetal senescente en la planta (M) ($P < 0.0001$ en todos los casos). La Tabla 4.14 muestra también los parámetros estadísticos de la correlación de cada uno de los tratamientos y de las correspondientes curvas de

Tabla 4.14 Análisis de la correlación entre la duración de las hojas y la masa vegetal senescente en las plantas de tomate^a.

Tratamiento	Parámetros de regresión ^b		Coeficiente de correlación	<i>P</i> ^c
	<i>a</i>	<i>b</i>		
Plantas sanas	13,9693	3,0303	0,9464	<10 ⁻⁴
Plantas con CMV	7,3080	3,4561	0,9556	<10 ⁻⁴
Plantas con CMV y RNAsat necrogénicos:				
89/15.1	25,6425	0,6250	0,8436	<10 ⁻⁴
89/42.1	12,1372	2,3336	0,8052	<10 ⁻⁴
90/22.1	25,0340	0,5916	0,8463	<10 ⁻⁴
91/5.1	25,7960	0,5671	0,9378	<10 ⁻⁴
94/32.1	26,0815	0,5467	0,7128	<10 ⁻⁴
Total	17,7390	1,4856	0,6490	<10 ⁻⁴
Plantas con CMV y RNAsat no necrogénicos:				
89/15.2	12,3558	3,1272	0,9624	<10 ⁻⁴
89/20.1	8,3580	4,0563	0,9264	<10 ⁻⁴
90/17.1	18,0165	3,0004	0,9525	<10 ⁻⁴
90/19.2	11,3289	3,5824	0,9594	<10 ⁻⁴
91/2.2	7,1472	3,9349	0,9439	<10 ⁻⁴
Total	12,4600	3,4383	0,9317	<10 ⁻⁴

^a Se ha analizado la correlación entre el tiempo de duración de cada hoja desde el transplante hasta su senescencia (*D*, en días), con la suma de su masa vegetal y la de todas las hojas que alcanzaron la senescencia con anterioridad a ella (*M*, en mg de peso seco).

^b Parámetros de la regresión lineal entre *D* y la raíz cuadrada de *M* según la expresión:
 $D = a + b\sqrt{M}$.

^c Probabilidad en la prueba de significación de la correlación.

regresión. El efecto de la infección en la senescencia de la planta en los distintos tratamientos se analizó por comparación de las regresiones conjuntas indicadas en la Tabla 4.14 y en la Figura 4.7. La regresión correspondiente a los tratamientos de CMV con RNAsat necrogénicos mostró una pendiente significativamente diferente al resto de tratamientos ($P < 0,0001$), y éstos últimos sólo resultaron diferentes en el valor de la ordenada en el origen ($P = 0.003$).

Los resultados obtenidos en el apartado 4.5 indican que CMV con RNAsat de fenotipo necrogénico, además de reducir el crecimiento de las plantas infectadas en relación con las sanas, acelera de forma importante la muerte de los tejidos infectados. Sin embargo, CMV sin RNAsat o CMV con RNAsat de fenotipo no necrogénico no afectan de forma significativa el crecimiento de las plantas infectadas pero sí aceleran la senescencia de sus tejidos. En el apartado siguiente se incorporan estos resultados en una estima cuantitativa de la virulencia en tomate de CMV con y sin RNAsat, para realizar un análisis de predicción de la evolución de la virulencia de estos patógenos.

4.6.- EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA DE CMV Y SU RNA SATÉLITE. APLICACIÓN DE MODELOS EPIDEMIOLÓGICOS DE COEVOLUCIÓN HUÉSPED-PATÓGENO

Las conclusiones teóricas de los modelos epidemiológicos de coevolución de huéspedes y patógenos indican que la evolución de la virulencia de un patógeno puede seguir direcciones diferentes que dependen principalmente de la relación que exista entre los factores que determinan la virulencia del patógeno y los que determinan su transmisión. La relación entre virulencia y transmisión puede ser diferente para cada interacción huésped-patógeno y puede además variar en función de las condiciones ambientales. En los apartados anteriores se han analizado algunos factores de la eficacia biológica de CMV y su RNAsat que determinan la relación entre su virulencia y su transmisión. En este apartado se pretende introducir estos resultados en modelos epidemiológicos de coevolución huésped-patógeno para tratar de explicar la evolución

de la población de CMV y RNAsat hacia una menor virulencia. Como se ha visto en la introducción de esta tesis, para aplicar dichos modelos es necesario estimar tres parámetros epidemiológicos fundamentales (ver las Ecuaciones 1.1 y 1.2): la tasa de mortalidad de las plantas en ausencia de la enfermedad (b); la virulencia del patógeno, es decir el incremento de la tasa de mortalidad de las plantas debido a la infección (α); y la tasa de transmisión del patógeno (β). El parámetro b se ha estimado para plantas de tomate sanas y los parámetros α y β se han estimado considerando a CMV sin RNAsat, y CMV con cinco variantes distintas de RNAsat necrogénicos y con cinco variantes distintas de RNAsat no necrogénicos como 11 patógenos distintos.

4.6.1.- Estimación de la virulencia de CMV y de su RNA satélite

La tasa de mortalidad de plantas de tomate sanas b y el incremento de mortalidad α de las plantas infectadas por cada uno de los 11 patógenos considerados pueden calcularse a partir de una estima de las duraciones de un cultivo de tomate sano (D_x) y de cultivos de tomate infectados (D_y) (ver Anderson y May, 1982; y Zhang y col., 2000), según las expresiones:

$$b = 1/D_x \qquad b + \alpha = 1/D_y \qquad \text{Ecuaciones 4.2}$$

Por tanto, los parámetros b y α se expresan en unidades de tiempo⁻¹.

La duración del cultivo sano se estableció en $D_x = 105$ días, que corresponde a la duración estimada para un cultivo de tomate de temporada, tradicional en la zona afectada por la epidemia, desde el transplante a principios de abril hasta mediados de julio, momento en el que la epidemia se detenía a causa de las temperaturas elevadas (Jordá y col., 1992). Esta duración del cultivo también sería válida para los ciclos tempranos de tomate, habituales también en la costa mediterránea, desde el transplante a primeros de febrero hasta la recolección a mediados de mayo (Maroto, 1989). El valor de la tasa de mortalidad en ausencia de infección resultó por tanto:

$$b = 0,00952 \text{ días}^{-1}$$

La duración de los cultivos infectados por cada uno de los 11 patógenos considerados se calculó en relación con la duración de un cultivo sano, al igual que en Zhang y colaboradores (2000), según una expresión del tipo:

$$D_y = d_y \cdot D_x \qquad \text{Ecuación 4.3}$$

donde d_y representa la supervivencia relativa de las plantas infectadas con respecto a las plantas sanas, que depende del grado de virulencia de cada patógeno. En el caso de muchos patógenos de plantas cuya infección no resulta letal, la virulencia puede estimarse en función de la disminución de biomasa debida a la reducción del crecimiento de las plantas infectadas. Los resultados del apartado 4.5 indican que CMV sin RNAsat o con RNAsat necrogénicos y no necrogénicos pueden producir tanto una reducción del crecimiento de las plantas como una reducción de la longevidad de los tejidos infectados. Para la estimación cuantitativa de la virulencia de CMV y su RNAsat se han tenido en cuenta ambos efectos de la infección. En el experimento descrito en el apartado 4.5.1 se recogió una muestra de cinco plantas escogidas al azar de entre todos los tratamientos del experimento en un momento en que las plantas aún no mostraban diferencias de tamaño apreciables y antes de que hubieran aparecido los primeros síntomas de infección. El valor medio de la masa vegetal de la parte aérea de estas plantas, medida en peso seco, fue de $487,4 \pm 102,8$ mg. El crecimiento de las plantas desde este momento hasta su recolección 27 días después de la inoculación se supuso lineal y se calculó por diferencia de los valores de masa vegetal indicados en la Tabla 4.12 con la masa vegetal de la muestra de cinco plantas. Con estos datos se calculó el crecimiento relativo de las plantas infectadas con respecto a las plantas sanas (q) durante el periodo de tiempo mencionado (Tabla 4.15). El parámetro q se utilizó para calcular la supervivencia relativa de las plantas infectadas con respecto a las sanas (d_y) suponiendo la existencia de una relación del tipo:

$$d_y = d_y(q) \qquad \text{Ecuación 4.4}$$

De hecho, a partir de los resultados del experimento descrito en el apartado 4.5.2 se puede deducir una relación experimental para la Ecuación 4.4. La Figura 4.7 y la Tabla 4.14 muestran los parámetros de la regresión lineal: $D = a + b\sqrt{M}$ entre la longevidad de una porción de biomasa (D) y la masa vegetal de dicha porción (M) para cada uno de los 11 patógenos considerados. La pérdida de masa vegetal q de las plantas infectadas con respecto a plantas sanas se utilizó para calcular la masa vegetal M de plantas infectadas por cada patógeno suponiendo una masa vegetal estándar $M = 400$ mg para una planta sana. Estas masas se interpolaron en las correspondientes regresiones indicadas en la Tabla 4.14, y a partir de las duraciones D estimadas por regresión se calculó la supervivencia relativa d_y de las plantas infectadas por cada patógeno con respecto a una planta sana. Con estos valores y la duración de un cultivo

sano ($D_x = 105$ días) se calcularon los incrementos de mortalidad de las plantas α inducidos por cada patógeno a través de las Ecuaciones 4.2 y 4.3. Los valores de q , d_y y α están indicados en la Tabla 4.15 para cada uno de los 11 patógenos considerados. La estimación del parámetro de virulencia (α) muestra que los patógenos más virulentos son CMV con variantes de RNAsat necrogénicas, que CMV sin RNAsat se comporta

Tabla 4.15 Estima de la virulencia en tomate de CMV y de CMV con RNAsat.

Patógeno	Crecimiento relativo ^a (q)	Supervivencia relativa ^a (d_y)	Virulencia ^b (α)
CMV	0,6935	0,8698	0,00142
CMV y RNAsat necrogénicos:			
89/15.1	0,3828	0,4476	0,01174
89/42.1	0,3132	0,5130	0,00903
90/22.1	0,3095	0,4239	0,01294
91/5.1	0,2244	0,4179	0,01326
94/32.1	0,3169	0,4322	0,01250
Total	0,3094	0,4594	0,01120
CMV y RNAsat no necrogénicos:			
89/15.2	0,8595	0,9432	0,00057
89/20.1	0,6570	0,9938	0,00005
90/17.1	0,8348	0,9768	0,00022
90/19.2	0,7460	0,9817	0,00017
91/2.2	0,9377	1,1177	0,00000
Total	0,8070	0,9954	0,00004

^a Crecimiento y supervivencia relativos de las plantas infectadas por CMV (cepa Fny) y por CMV con RNAsat necrogénicos y no necrogénicos con respecto a las plantas sanas.

^b Incremento de mortalidad debido a la infección suponiendo una duración de un cultivo de tomate sano de $D_x = 105$ días.

como un patógeno de virulencia intermedia y que las variantes de RNAsat no necrogénicas reducen la virulencia de CMV a niveles muy bajos, que incluso pueden llegar a ser nulos como en el caso de CMV con la variante de RNAsat 94/32.1.

4.6.2.- Estimación de la tasa de transmisión de CMV y su RNA satélite

La tasa de transmisión de CMV o de CMV con variantes de RNAsat necrogénicas o no necrogénicas representa el número de transmisiones del patógeno por unidad de tiempo y planta (β). En el caso de transmisión por pulgones, el parámetro β puede considerarse como el producto del número de acontecimientos de transmisión por unidad de tiempo (β_1) por la frecuencia o probabilidad de transmisión del patógeno en cada acontecimiento de transmisión (β_2). Tanto el número de acontecimientos de transmisión como la probabilidad de transmisión pueden depender del número de pulgones por planta (i). Estas relaciones entre los parámetros de transmisión pueden expresarse como:

$$\beta(i) = \beta_1(i) \cdot \beta_2(i) \quad \text{Ecuación 4.5}$$

β se expresa en unidades de planta⁻¹ · tiempo⁻¹, β_1 se expresa como tiempo⁻¹ y β_2 es adimensional.

En el apartado 4.4 se describió que la eficacia de transmisión de CMV y su RNAsat dependía principalmente de la acumulación de partículas de CMV en la planta de la que se alimentaban los pulgones, y que esta acumulación se veía reducida considerablemente con la presencia del RNAsat. En el apartado 4.3 se vió que este efecto era más acusado en el caso de las variantes de RNAsat necrogénicas que en el caso de las variantes no necrogénicas. El efecto del RNAsat en la disminución de la acumulación viral fue tenido en cuenta al estimar la frecuencia de transmisión de CMV por un pulgón (F) en función de los datos de acumulación de CMV (V) obtenidos en la Tabla 4.8. El valor de F sirvió para estimar la probabilidad de transmisión del patógeno suponiendo que existe un pulgón por planta $\beta_2(i=1)$. La probabilidad de transmisión de CMV con o sin RNAsat para diferente número de pulgones por planta se estimó mediante la ecuación de Gibbs y Gower (1960):

$$\beta_2(i) = 1 - [1 - \beta_2(i=1)]^i \quad \text{Ecuación 4.6}$$

La Figura 4.8 representa la variación de la probabilidad de transmisión $\beta_2(i)$ en función del número de pulgones por planta i para CMV sin RNAsat, y CMV con el conjunto de RNAsat necrogénicos o no necrogénicos. En esta figura se observa que las mayores diferencias entre las probabilidades de transmisión de CMV sin RNAsat y CMV con RNAsat necrogénicos o no necrogénicos se obtiene para $i = 2$, mientras que entre CMV con RNAsat necrogénicos y CMV con RNAsat no necrogénicos estas diferencias son máximas para $i = 4$. En la Tabla 4.16 se indican los valores de $\beta_2(i)$ para distintos valores de i y para CMV sin RNAsat y CMV con cinco variantes de RNAsat necrogénicas o cinco variantes no necrogénicas.

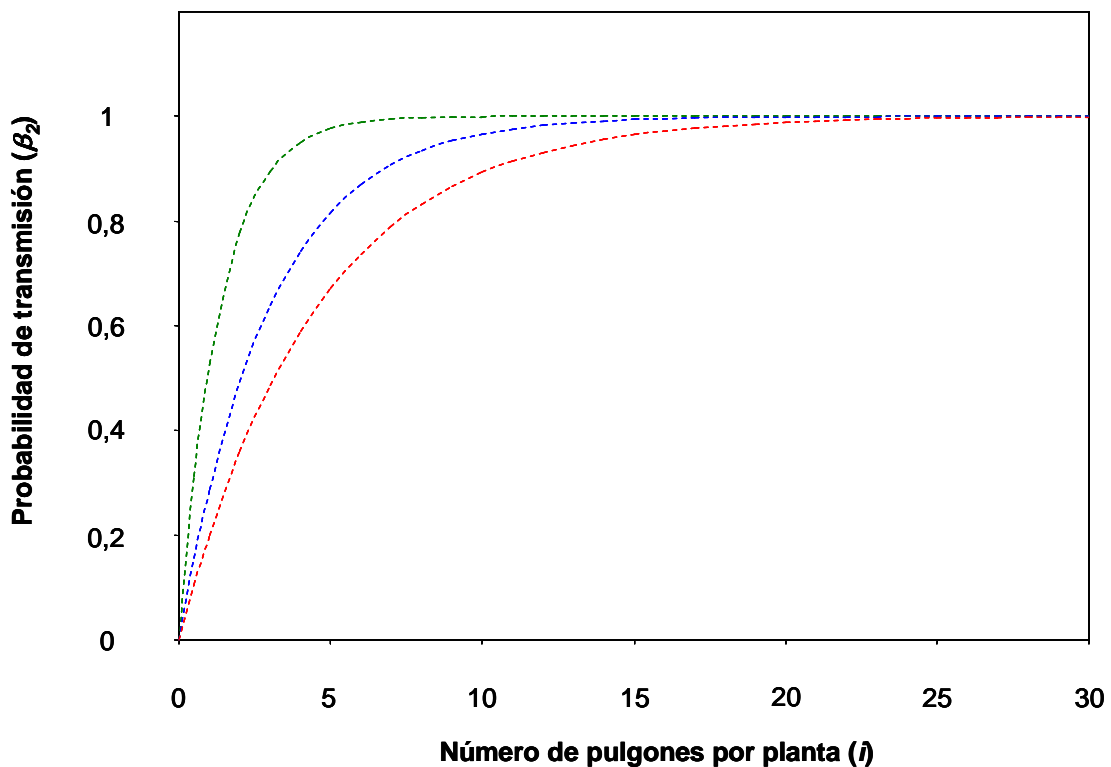


Figura 4.8 Relación entre la probabilidad de transmisión (β_2) y el número de pulgones por planta (i) según la expresión de Gibbs y Gower (1960): $\beta_2(i)=1-[1-\beta_2(i=1)]^i$. Las curvas indican dicha relación para CMV (cepa Fny) (---), y CMV con variantes de RNAsat necrogénicas (---) y no necrogénicas (---).

No se ha obtenido ningún valor experimental del número de acontecimientos de transmisión por unidad de tiempo $\beta_1(i)$, ni se conoce la relación entre este parámetro y el número o densidad de pulgones por planta i . Por eso, los modelos epidemiológicos de evolución de la virulencia se aplicarán utilizando valores diferentes de $\beta_1(i)$ elegidos de forma arbitraria. Dichos valores son: $\beta_1(i) = 0,01$; $\beta_1(i) = 0,05$; $\beta_1(i) = 0,1$.

4.6.3.- Predicciones sobre la evolución de la virulencia de CMV y su RNA satélite

Las predicciones sobre la evolución de la virulencia en las poblaciones de CMV y RNAsat se han realizado utilizando el modelo epidemiológico propuesto por Anderson y May (1982) según la expresión de la tasa neta reproductiva R_0 indicada por la Ecuación 1.2. Esta expresión se ha transformado eliminando el parámetro de recuperación del huésped (ν), ya que en plantas no existe un sistema inmunológico que pueda producir una respuesta defensiva de recuperación frente al patógeno, y las infecciones por virus son en principio sistémicas y crónicas. La expresión resultante para R_0 es:

$$R_0 = \frac{\beta N}{b + \alpha} \quad \text{Ecuación 4.7}$$

donde β , b y α son los parámetros epidemiológicos estimados en los dos apartados anteriores, y N es el tamaño de la población de plantas de tomate. El modelo supone que a largo plazo prevalecerá en la población el patógeno con el mayor R_0 , ya que la tasa neta reproductiva puede considerarse como una estima de la eficacia biológica del patógeno en condiciones de equilibrio. El cálculo de R_0 para CMV sin RNAsat y CMV con cinco variantes de RNAsat necrogénicas o cinco variantes no necrogénicas se realizó según la Ecuación 4.7 teniendo en cuenta los valores de virulencia α de la Tabla 4.15 y los valores de la tasa de transmisión $\beta(i)$ calculados por la Ecuación 4.5 a partir de la probabilidad de transmisión β_2 (Tabla 4.16) y del número de acontecimientos de transmisión, que se tomó de forma arbitraria como $\beta_1 = 0,1$. Los valores de R_0 obtenidos para cada uno de los 11 patógenos considerados se indican en la Tabla 6.1 del anejo y se representan gráficamente en la Figura 4.9, en relación con los correspondientes valores de virulencia α y en función de distintos valores de i . Los

Tabla 4.16 Estima de la probabilidad de transmisión de CMV y de CMV con RNAstat.

Patógeno	Probabilidad de transmisión $[\beta_2(i)]^a$					
	$i = 0,5$	$i = 1$	$i = 2$	$i = 4$	$i = 7$	$i = 30$
CMV	0,312943	0,527953	0,777172	0,950347	0,994777	0,999450
CMV y RNAstat necrogénicos:						
89/15.1	0,127509	0,238760	0,420514	0,664196	0,851867	0,934654
89/42.1	0,107738	0,203868	0,366174	0,598265	0,797281	0,897706
90/22.1	0,099485	0,189074	0,342399	0,567561	0,769395	0,877026
91/5.1	0,099436	0,188984	0,342253	0,567370	0,769216	0,876890
94/32.1	0,091816	0,175201	0,319708	0,537202	0,740322	0,854294
Total	0,105458	0,199795	0,359672	0,589980	0,789908	0,892350
CMV y RNAstat no necrogénicos:						
89/15.2	0,162879	0,299229	0,508920	0,758840	0,917008	0,971439
89/20.1	0,157475	0,290152	0,496117	0,746102	0,909185	0,967517
90/17.1	0,142992	0,265537	0,460565	0,709010	0,884711	0,954323
90/19.2	0,179458	0,326711	0,546683	0,794503	0,937279	0,980857
91/2.2	0,140596	0,261425	0,454507	0,702438	0,880116	0,951700
Total	0,156032	0,287719	0,492656	0,742602	0,906983	0,966386

^a Probabilidad de transmisión para distintos valores del número de pulgones por planta i según la ecuación de Gibbs y Gover (ver Figura 4.8).

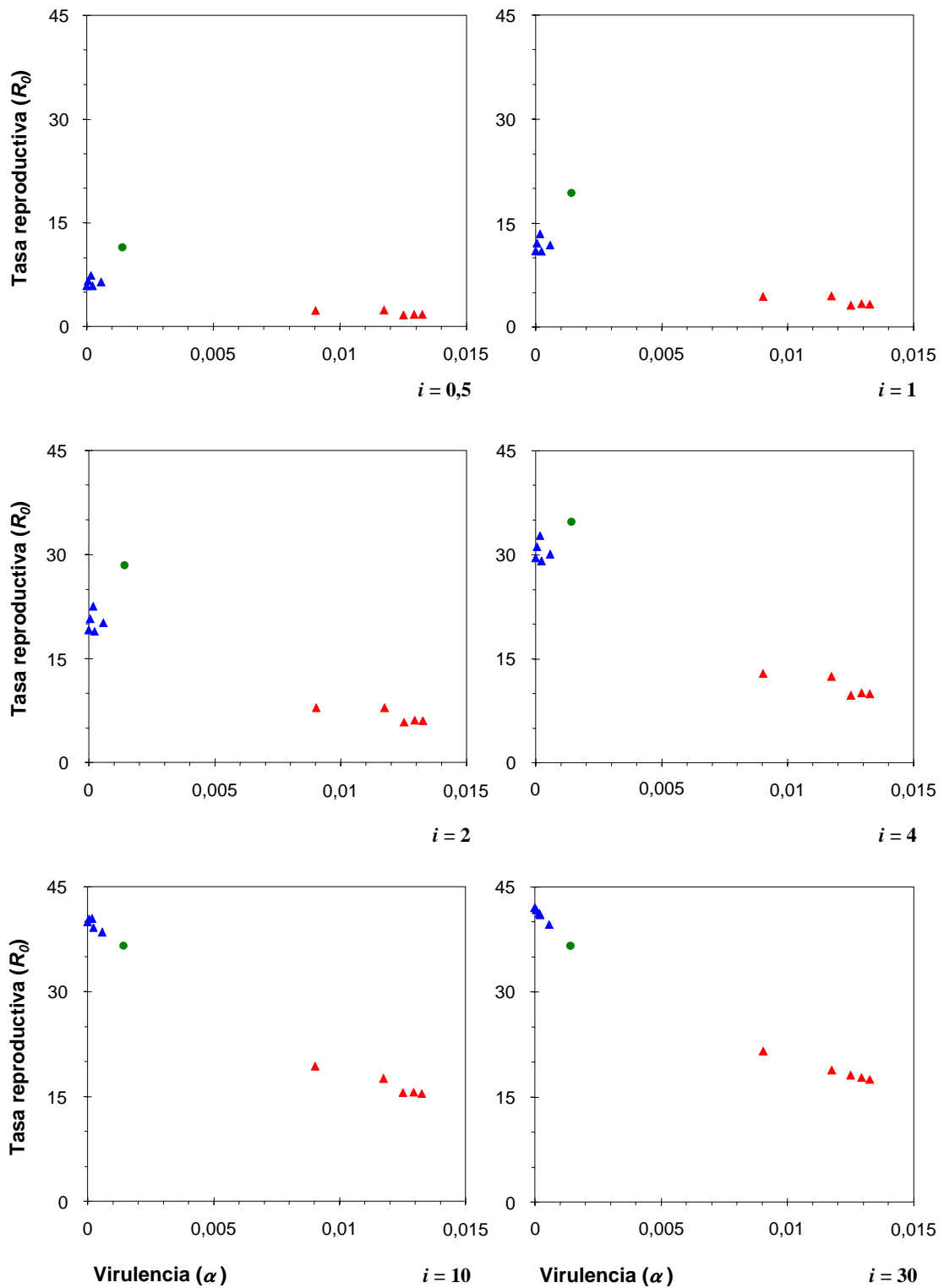


Figura 4.9 Relación entre la tasa neta reproductiva (R_0) y la virulencia (α) de CMV (●), y de CMV con cada una de las variantes de RNAsat necrogénicas (▲) o no necrogénicas (▲), para distintos valores del número de pulgones por planta (i).

resultados indican diferentes predicciones de la evolución de la virulencia dependiendo del número de pulgones por planta i . Para valores bajos e intermedios de i ($i < 10$) los aislados con mayor tasa reproductiva son CMV sin RNAsat, seguidos de CMV con RNAsat no necrogénicos. Para valores altos de i ($i \geq 10$) los aislados de CMV con RNAsat no necrogénicos desplazan a los aislados de CMV sin RNAsat. Para cualquier valor de i la tasa neta reproductiva de los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos es menor que para los otros aislados. Las diferencias máximas en el valor de la tasa neta reproductiva entre CMV sin RNAsat y CMV con RNAsat, o entre CMV con RNAsat necrogénicos y CMV con RNAsat no necrogénicos, se dan para valores de $i = 2$ e $i = 4$, respectivamente, ya que están determinadas por las diferencias observadas para la probabilidad de transmisión β_2 (Figura 4.8). La predicción del modelo de Anderson y May sobre la evolución de CMV y su RNAsat coincide, al menos hasta valores intermedios del número de pulgones por planta, con los resultados del análisis de la epidemia de necrosis de tomate en campo, que indican la desaparición de los RNAsat necrogénicos de las poblaciones de CMV y RNAsat y la desaparición posterior de todos los RNAsat. Sin embargo, este modelo no explica la expansión de los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos durante los primeros años de la epidemia.

La velocidad de expansión de un patógeno en una población de huéspedes en condiciones epidémicas viene dada por su tasa de incremento o dispersión, y no por su tasa neta reproductiva. La tasa de dispersión (E_0) de un patógeno puede calcularse por diferencia entre la aparición de nuevas infecciones y su desaparición por muerte del huésped (Frank, 1996), que en el caso de patógenos de plantas sería:

$$E_0 = \beta N - (b + \alpha) \quad \text{Ecuación 4.8}$$

La tasa de dispersión de CMV sin RNAsat y CMV con RNAsat necrogénicos o no necrogénicos se ha representado en la Figura 4.10 en función de los mismos valores de i usados en el cálculo de la tasa neta reproductiva. En este caso, el valor de la tasa de dispersión de CMV sin RNAsat es siempre mayor a la de cualquier combinación de CMV con RNAsat, como corresponde a su mayor tasa de transmisión, aunque los valores se igualan para densidades altas de pulgones en la planta. La predicción del modelo en condiciones epidémicas no explica la expansión de los RNAsat, especialmente la de los RNAsat necrogénicos, durante los primeros años de la epidemia. Para intentar explicar dicha expansión es necesario tener en cuenta otros supuestos. En el apartado siguiente se analiza la dinámica de las poblaciones de plantas infectadas por

MV con o sin RNAsat, teniendo en cuenta la posibilidad de sobreinfección por RNAsat de plantas previamente infectadas por CMV.

4.6.4.- Dinámica de las poblaciones de plantas infectadas por CMV y su RNA satélite

En este apartado se analiza la dinámica de la epidemia mediante la división de la población total de plantas (N) en las siguientes subpoblaciones: plantas susceptibles no infectadas (X), plantas infectadas sólo por CMV (Y), plantas infectadas por CMV con RNAsat no necrogénicos (U_a), y plantas infectadas por CMV con RNAsat necrogénicos (U_n). La variación de estas subpoblaciones con el tiempo viene dada por cuatro ecuaciones diferenciales que integran los parámetros epidemiológicos β , b y α de cada uno de los patógenos anteriores. La dinámica representada por estas ecuaciones se ha considerado en tres supuestos distintos:

- I) Los aislados de CMV con o sin RNAsat sólo pueden infectar plantas susceptibles (no hay posibilidad de sobreinfección). Las ecuaciones diferenciales correspondientes a este modelo son las siguientes:

$$\frac{dX}{dt} = \theta - \beta_y XY - \beta_a XU_a - \beta_n XU_n - bX$$

$$\frac{dY}{dt} = \beta_y XY - (b + \alpha_y)$$

$$\frac{dU_a}{dt} = \beta_a XU_a - (b + \alpha_a)$$

$$\frac{dU_n}{dt} = \beta_n XU_n - (b + \alpha_n)$$

Ecuaciones 4.9

donde θ es un término que representa el crecimiento de la población de plantas susceptibles; β_y , β_a y β_n son las tasas de transmisión de CMV sin RNAsat, de CMV con el conjunto de variantes de RNAsat no necrogénicas y de CMV con el conjunto de variantes necrogénicas, respectivamente; α_y , α_a y α_n son sus respectivos valores de virulencia; y b es la tasa de mortalidad en ausencia de infección.

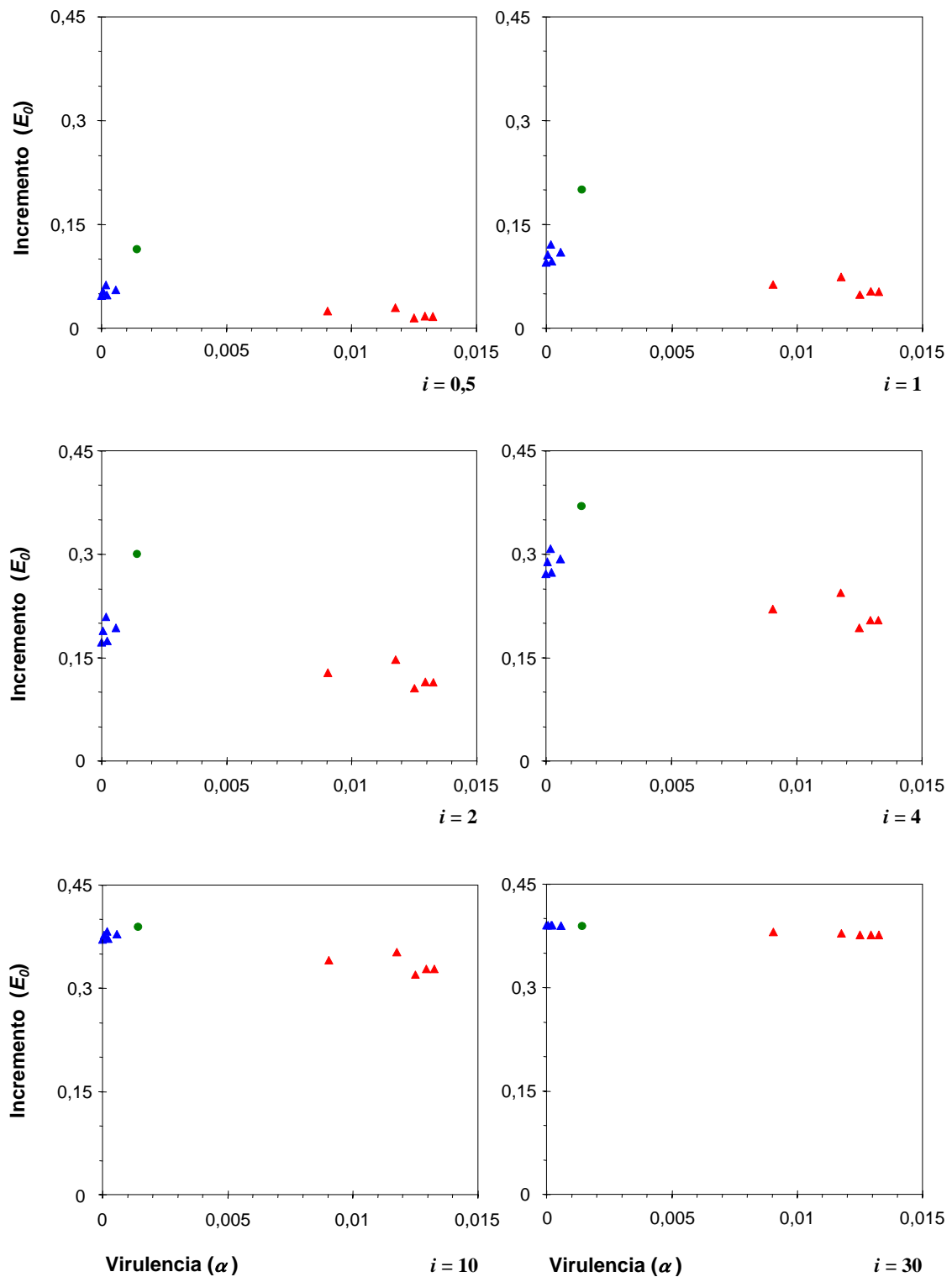


Figura 4.10 Relación entre la tasa de incremento o dispersión (E_0) y la virulencia (α) de CMV (\bullet), y de CMV con cada una de las variantes de RNAsat necrogénicas (\blacktriangle) o no necrogénicas (\blacktriangle), para distintos valores del número de pulgones por planta (i).

II) Los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos y no necrogénicos pueden infectar plantas susceptibles y además pueden sobreinfectar plantas que ya estaban infectadas por CMV. Las ecuaciones diferenciales en este caso son las siguientes:

$$\begin{aligned}
 \frac{dX}{dt} &= \theta - \beta_y XY - \beta_a XU_a - \beta_n XU_n - bX \\
 \frac{dY}{dt} &= \beta_y XY - \beta_a YU_a - \beta_n YU_n - (b + \alpha_y)Y \\
 \frac{dU_a}{dt} &= \beta_a XU_a + \beta_a YU_a - (b + \alpha_a)U_a \\
 \frac{dU_n}{dt} &= \beta_n XU_n + \beta_n YU_n - (b + \alpha_n)U_n
 \end{aligned}$$

Ecuaciones 4.10

donde los parámetros son los mismos que en las Ecuaciones 4.9.

III) Los oilseeds de CMV con RNAsat necrogénicos y no necrogénicos, pueden infectar plantas sanas, pueden sobreinfectar plantas que ya estaban infectadas por CMV, y además los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos pueden sobreinfectar plantas ya infectadas por CMV con RNAsat no necrogénicos. Las ecuaciones diferenciales correspondientes son:

$$\begin{aligned}
 \frac{dX}{dt} &= \theta - \beta_y XY - \beta_a XU_a - \beta_n XU_n - bX \\
 \frac{dY}{dt} &= \beta_y XY - \beta_a YU_a - \beta_n YU_n - (b + \alpha_y)Y \\
 \frac{dU_a}{dt} &= \beta_a XU_a + \beta_a YU_a - \beta_n U_a U_n - (b + \alpha_a)U_a \\
 \frac{dU_n}{dt} &= \beta_n XU_n + \beta_n YU_n + \beta_n U_a U_n - (b + \alpha_n)U_n
 \end{aligned}$$

Ecuaciones 4.11

con los mismos parámetros que en las Ecuaciones 4.9.

En las Ecuaciones 4.9 a 4.11 se ha considerado que la población de plantas susceptibles crece según un término monomolecular del tipo $\theta = r(K-N)$, donde K es la capacidad de carga de la población de plantas, que se ha estimado en 4 plantas/m² (densidad media de plantación para un cultivo de tomate para consumo en fresco: 40.000 plantas/ha), $N = X + Y + U_a + U_n$, y r es una tasa lineal de crecimiento que se ha tomado como $r = 1$ para garantizar que en todo momento $N = K = 4$ plantas/m² (la

población de plantas, es decir, el tamaño del cultivo se mantiene constante con el tiempo).

El supuesto I se corresponde con la dinámica de la situación descrita en el apartado 4.6.3 y se incluye aquí por motivos de comparación con los otros dos supuestos. En la Figura 4.11 se representa la variación con el tiempo de las subpoblaciones de plantas en los supuestos I, II y III, para distintos valores de la probabilidad de transmisión $\beta_2(i)$ en función del número de pulgones por planta ($i = 1, i = 4, i = 7$ e $i = 30$). El número de acontecimientos de transmisión por unidad de tiempo se ha tomado como $\beta_1 = 0,1$. En el supuesto I y para valores bajos de i se mantienen en la población los aislados de CMV sin RNAsat, mientras que para valores de i superiores a un valor entre 6 y 7 los aislados de CMV con RNAsat no necrogénicos desplazan a los aislados sin RNAsat, a pesar de que estos últimos presenten una mayor velocidad de dispersión. Como ya se ha indicado en el apartado anterior, el supuesto I no explica la expansión de CMV con RNAsat necrogénicos observada en el campo durante los primeros años de la epidemia.

En el supuesto II los aislados de CMV con RNAsat no necrogénicos se establecen a largo plazo en la población de plantas, independientemente del valor de i . Las plantas infectadas por CMV sin RNAsat sólo predominan durante un periodo inicial para densidades bajas de pulgones por planta, mientras que las densidades altas de pulgones favorecen la dispersión inicial de los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos.

En el supuesto III los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos son los únicos patógenos que se establecen a largo plazo en la población de plantas. La posibilidad de dispersión inicial de los aislados de CMV sin RNAsat o con RNAsat no necrogénicos va disminuyendo para valores crecientes de la densidad de pulgones por planta.

Como se ha indicado en el apartado 4.6.2, la densidad de pulgones por planta i determina la probabilidad de transmisión del patógeno $\beta_2(i)$ y también puede influir en el número de acontecimientos de transmisión por unidad de tiempo $\beta_1(i)$. Las Figuras 4.12, 4.13 y 4.14 muestran la dinámica de la población de plantas sanas e infectadas en los supuestos I, II y III, respectivamente, en función del número de pulgones por planta i y de distintos valores del número de acontecimientos de transmisión ($\beta_1 = 0,01$; $\beta_1 = 0,05$; $\beta_1 = 0,1$). La Figura 4.12 indica que en el supuesto I, la variación del parámetro β_1 sólo afecta al tamaño en el equilibrio de las tres

poblaciones de plantas infectadas, pero no a cuál es el patógeno que prevalece a largo plazo. La Figura 4.13 muestra que en el supuesto II, el patógeno que prevalece a largo plazo depende del valor de β_1 para $i = 1$ pero no para valores de i superiores. Al crecer β_1 para $i = 1$, los aislados de CMV con RNAsat no necrogénicos desplazan a los aislados sin RNAsat y son los que prevalecen en la población de plantas infectadas en el resto de los casos. Por último, la Figura 4.14 muestra que en el supuesto III, la variación del parámetro β_1 determina cuál es el patógeno que prevalece a largo plazo hasta valores de $i = 4$. Según crecen los valores de i y de β_1 , los aislados de CMV sin RNAsat van siendo desplazados por los aislados con RNAsat no necrogénicos, y éstos por los aislados con RNAsat necrogénicos. Es de destacar el equilibrio para el caso particular de $i = 1$ y $\beta_1 = 0,05$, en el que las tres poblaciones de plantas infectadas coexisten a largo plazo, aunque predominan los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos. Para valores intermedios y altos de la densidad de pulgones por planta ($i > 4$) únicamente se mantienen a largo plazo los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos, y la variación del parámetro β_1 sólo produce cambios cuantitativos en el tamaño de dicha población en relación con la población de plantas susceptibles. Las Figuras 4.12, 4.13 y 4.14 indican que la sensibilidad a la variación del número de acontecimientos de transmisión $\beta_1(i)$, aumenta según aumentan las posibilidades de sobreinfección.

Como resumen de estos análisis hay que destacar que la dinámica de las poblaciones de plantas infectadas es más compleja según aumenta la posibilidad de sobreinfección de unos patógenos por otros. Tanto el aumento de la densidad de pulgones por planta (i) como la posibilidad de sobreinfecciones favorecen el mantenimiento de los aislados de CMV con RNAsat en la población de plantas, y en particular de los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos. La variación del tamaño de las poblaciones de pulgones en el tiempo podría influir de forma global en la transmisión de CMV y de CMV con RNAsat, y tener un papel determinante en los cambios de la composición genética de la población de RNAsat de CMV.

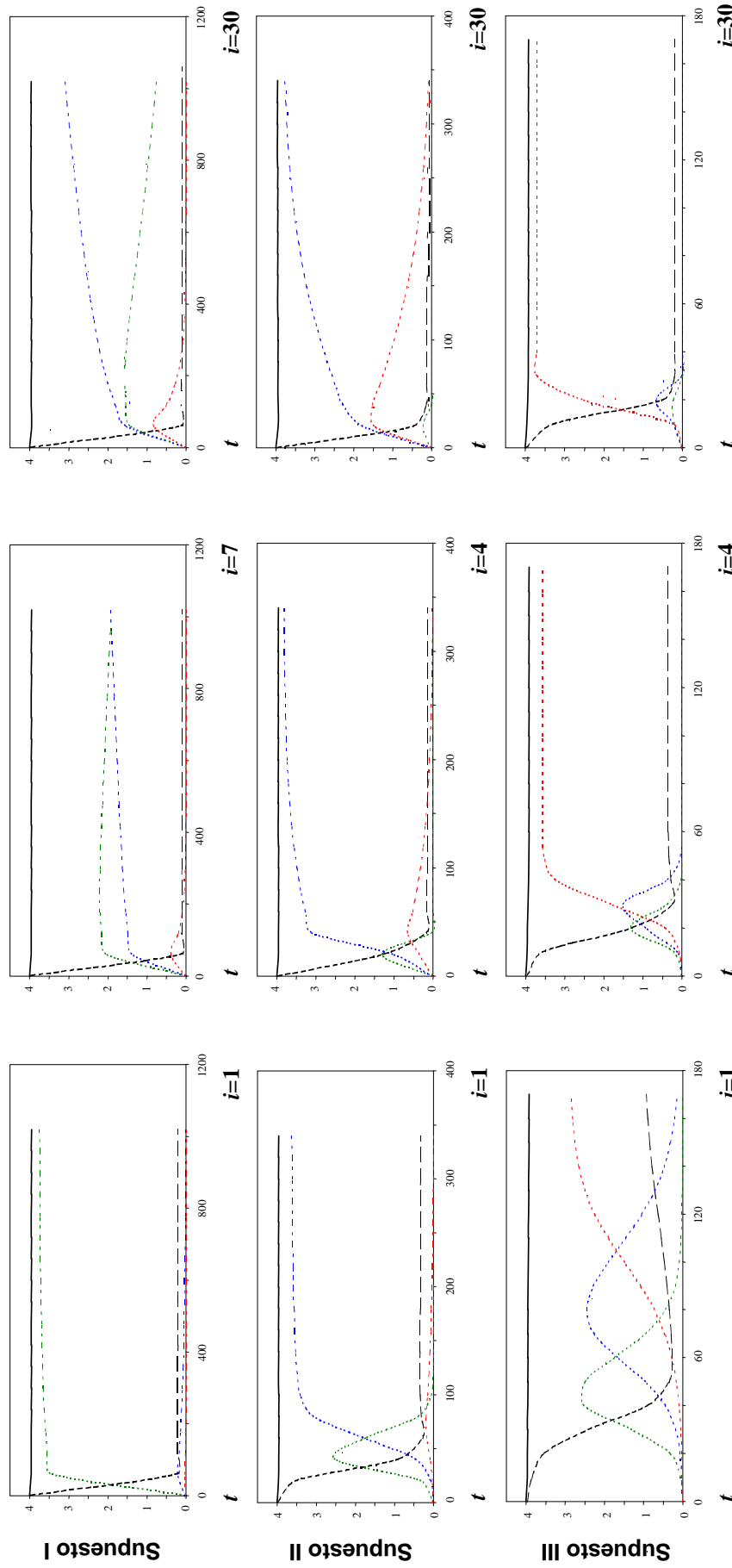


Figura 4.11 Dinámica de las poblaciones de plantas de tomate sanas e infectadas en función del número de pulgones por planta (i) y en tres supuestos, distintos: I) CMV y su RNAse no sobreinfectan plantas ya infectadas; II) CMV con RNAse necrogénicos y no necrogénicos pueden sobreinfectar plantas ya infectadas por CMV; III) Además de las sobreinfecciones del supuesto II, CMV con RNAse necrogénicos puede sobreinfectar plantas ya infectadas por CMV con RNAse no necrogénicos. Las curvas representan la variación con el tiempo (t , en días) de la densidad (número de plantas/m²) de plantas susceptibles (---), infectadas por CMV (---), por CMV con RNAse no necrogénicos (---) y por CMV con RNAse necrogénicos (---). La densidad total de plantas (—) se ha mantenido constante.

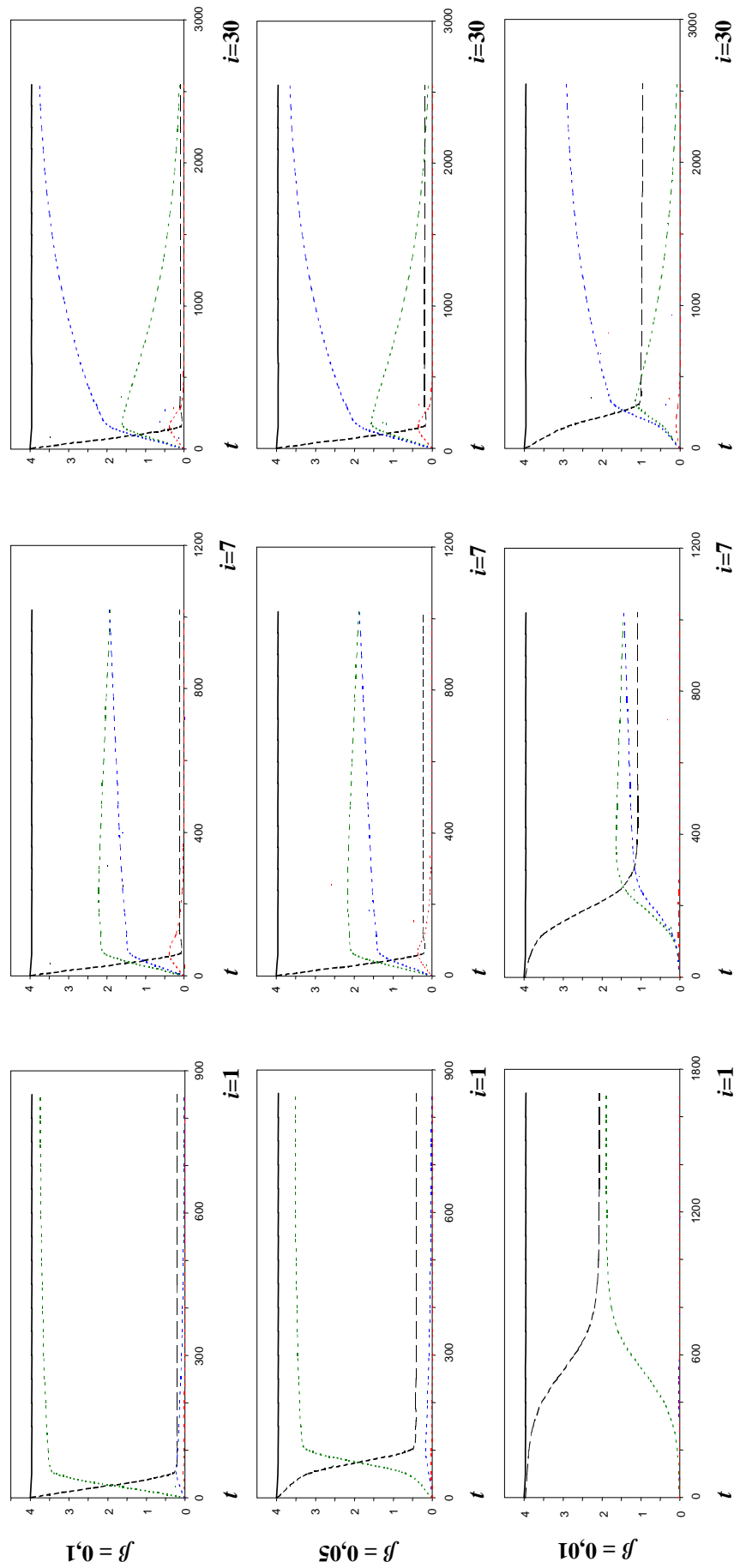


Figura 4.12 Dinámica de las poblaciones de plantas de tomate sanas e infectadas en el supuesto I (ver texto y Fig. 4.11) en función del número de pulgones por planta (i) y del número de acontecimientos de transmisión por unidad de tiempo (β_I). Las curvas representan la variación con el tiempo (t , en días) de la densidad (número de plantas/m²) de plantas susceptibles (---), infectadas por CMV (-.-), por CMV con RNAsat no necrotógicos (-.-) y por CMV con RNAsat necrotógicos (-.-). La densidad total de plantas (—) se ha mantenido constante.

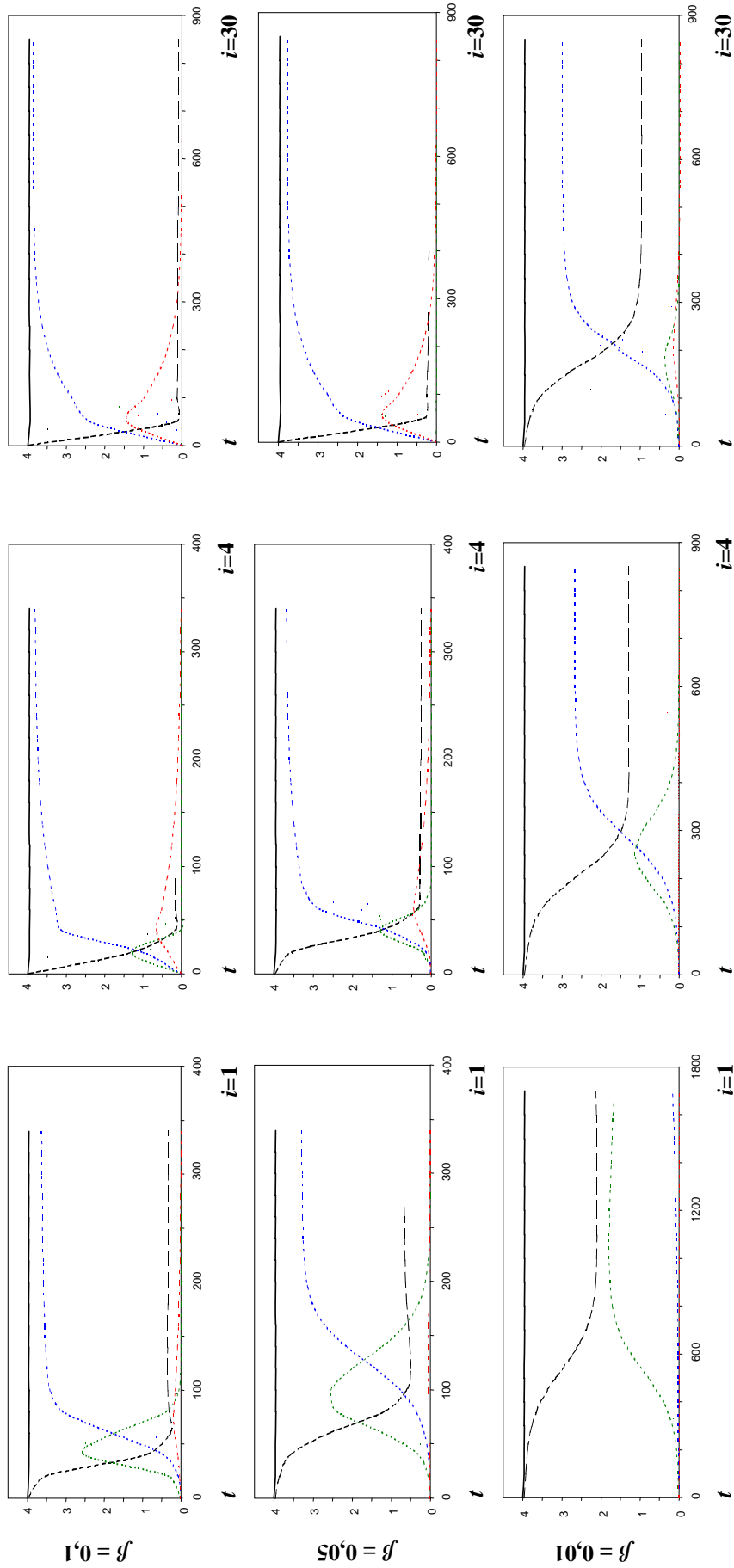


Figura 4.13 Dinámica de las poblaciones de plantas de tomate sanas e infectadas en el supuesto Π (ver texto y Fig. 4.11), en función del número de pulgones por planta (i) y del número de acontecimientos de transmisión por unidad de tiempo (β_T). Las curvas representan la variación con el tiempo (t , en días) de la densidad (número de plantas /m²) de plantas susceptibles (—), infectadas por CMV (---), por CMV con RNA sat no necrogénicos (· · ·) y por CMV con RNA sat de plantas (—). La densidad total de plantas (—) se ha mantenido constante.

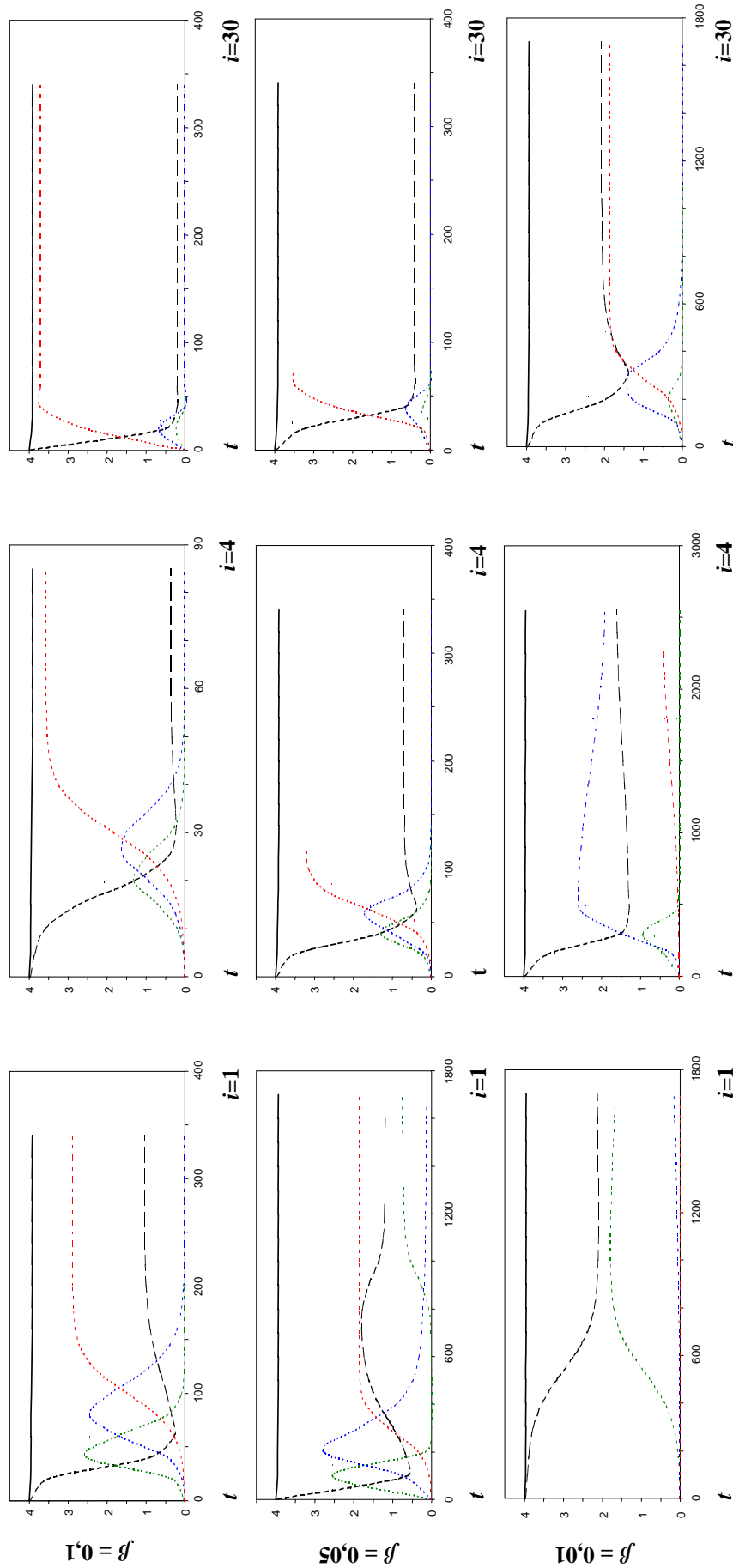


Figura 4.14 Dinámica de las poblaciones de plantas de tomate sanas e infectadas en el supuesto III (ver texto y Fig. 4.11) en función del número de pulgones por planta (i) y del número de acontecimientos de transmisión por unidad de tiempo (β_i). Las curvas representan la variación con el tiempo (t , en días) de la densidad (número de plantas/m²) de plantas susceptibles (—), infectadas (---), por CMV (· · ·), por CMV con RNAse no necrogénicos (— · —) y por CMV con RNAse necrogénicos (— · —). La densidad total de plantas (—) se ha mantenido constante.

5.- DISCUSIÓN

La virulencia es una de las principales características de las que depende la interacción de un patógeno con su huésped, y su evolución en la población del patógeno puede tener importantes consecuencias prácticas en el desarrollo y aplicación de medidas preventivas y de control de las enfermedades. Aunque la evolución de la virulencia se ha analizado experimentalmente en un cierto número de patógenos (Ebert, 1998), existen pocos trabajos que realicen dicho análisis en sus poblaciones naturales. En la presente tesis se ha comprobado que la población de un virus de plantas, CMV y su RNAsat en cultivos de tomate de la costa mediterránea española, evolucionó hacia una menor virulencia, y también se han analizado los factores que podrían explicar los cambios de la estructura genética de dicha población. Dicho análisis ha permitido establecer una relación entre los factores asociados con la virulencia de CMV y su RNAsat y los factores asociados con su transmisión. Según los modelos epidemiológicos de coevolución huésped-patógeno la evolución de la virulencia de un patógeno puede tomar distintas direcciones según sea la relación entre su virulencia y su transmisión (May y Anderson, 1983; May, 1995).

5.1.- EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA EN LA POBLACIÓN DEL RNA SATÉLITE DE CMV

Kaper y colaboradores (1976) describieron por primera vez la asociación de un RNAsat con CMV y demostraron que esta combinación causaba en tomate una necrosis

letal (Kaper y Waterworth, 1977). Desde entonces se han descrito y caracterizado numerosas variantes de RNAsat de CMV. En la actualidad se conoce la secuencia de nucleótidos de más de 100 variantes de RNAsat asociadas originalmente con aproximadamente 65 aislados de CMV procedentes de distintos huéspedes y de áreas geográficas de todo el mundo. Un porcentaje importante de las secuencias de RNAsat corresponde a variantes distintas encontradas en un mismo aislado de campo o que se han generado bajo condiciones experimentales (García-Arenal y Palukaitis, 1999). A pesar de esta amplia distribución de los RNAsat de CMV, la frecuencia de aislados de CMV que mantienen RNAsat es generalmente baja en condiciones naturales (Kearney y col., 1990; Rodríguez-Alvarado y col., 1995; Grieco y col., 1997; Alonso-Prados y col., 1998). La frecuencia de aislados de CMV con RNAsat ha sido elevada sólo en los casos de epidemias de necrosis en cultivos de tomate, que hasta el momento se han descrito en Francia (Marrou y col., 1973), en Italia (Gallitelli y col., 1988), en Japón (Kosaka y col., 1989) y en España (Jordá y col., 1992). En tres de estas epidemias el síndrome de necrosis se extendió durante un periodo de tiempo relativamente corto, tras el cual su incidencia fue disminuyendo paulatinamente hasta desaparecer al cabo de unos pocos años (Marrou y col., 1973; Alonso-Prados y col., 1998).

La epidemia de necrosis española tuvo lugar en los cultivos de tomate de la costa mediterránea entre los años 1986 y 1992, y se inició en un área localizada al norte de la ciudad de Valencia. La necrosis alcanzó su máxima incidencia en esta provincia y se expandió posteriormente a una zona comprendida entre las provincias de Barcelona al Norte y Murcia al Sur. Jordá y colaboradores (1992) confirmaron que el agente causal de la enfermedad era CMV asociado a RNAsat necrogénicos para tomate. CMV es un virus endémico en España en la mayor parte de los cultivos hortícolas y hasta el momento de la aparición del síndrome de necrosis en tomate, no se había detectado la presencia de RNAsat asociados con infecciones por CMV (Luis-Arteaga y col., 1988). A partir del año 1989 la proporción de plantas necróticas en el campo comenzó a disminuir, y en 1992 la necrosis prácticamente había desaparecido. Esta disminución de la necrosis pudiera haber estado producida por la disminución y posterior desaparición de los RNAsat de la población de CMV, sin embargo, durante el desarrollo de la epidemia española también se detectaron plantas que mostraban los síntomas de enanismo, mosaico y filimorfismo, típicos de las infecciones por CMV, y a partir de 1989 comenzaron a aparecer plantas que presentaban un aspecto arpeollado, causado

por un rizado del limbo de las hojas y un acortamiento de los entrenudos. Tales alteraciones morfológicas también se han encontrado acompañando a otras epidemias de necrosis de tomate (Grieco y col., 1992). La disminución de la incidencia de necrosis en el campo fue acompañada por el aumento de la proporción de plantas arrepolladas, de forma que en 1989 sólo un 15 % de las plantas mostraban el síntoma de arrepollado, mientras que en 1990 su proporción había aumentado hasta el 50 %, frente a sólo un 20 % de plantas necróticas. Se pudo detectar la presencia de RNAsat en plantas que mostraban los tres tipos de síntomas descritos, y se confirmó mediante bioensayo la existencia de variantes de RNAsat con fenotipos en tomate que correspondían a estos tres síntomas (Jordá y col., 1992). Aranda y colaboradores (1993) analizaron la variabilidad genética de la población de RNAsat de CMV asociada a la epidemia de necrosis y Alonso-Prados y colaboradores (1998) caracterizaron la estructura genética de las poblaciones de RNAsat en distintas regiones españolas y en distintos huéspedes, realizando un análisis detallado de la frecuencia de aislados de CMV con RNAsat. Las frecuencias correspondientes a las regiones de la costa mediterránea están expuestas en la Tabla 4.1, que además muestra la reducción de la incidencia de necrosis en campo. Estos datos indican que aunque la frecuencia de aislados de CMV con RNAsat fue disminuyendo desde 1990, éstos se siguieron encontrando en el campo hasta el año 1994, mientras que el síndrome de necrosis prácticamente había desaparecido desde 1991. La existencia de RNAsat con distintos fenotipos y el análisis cronológico de la frecuencia de aislados de CMV con RNAsat sugerían que la desaparición de la necrosis en el campo estaba causada por una disminución de la frecuencia de RNAsat de fenotipo necrogénico en las poblaciones de RNAsat, y no por la desaparición del RNAsat de la población de CMV. Los resultados obtenidos en la presente tesis confirman esta suposición.

La Tabla 4.1 indica que pueden encontrarse distintas variantes de RNAsat asociadas con un mismo aislado de CMV y que el número de variantes por aislado fue mayor en los años de máxima expansión de la epidemia de necrosis de tomate. La capacidad de un aislado de CMV para mantener simultáneamente distintas variantes de RNAsat se ha documentado tanto en condiciones experimentales como en el campo (García-Luque y col., 1984; Avila-Rincón y col., 1986; Kaper y col., 1988). La existencia de mezclas de RNAsat en un mismo aislado de CMV ya había sido descrita en las zonas españolas afectadas por la epidemia de necrosis (Aranda y col., 1993). La

separación de los RNAsat asociados a un mismo o a distintos aislados de CMV de la muestra recogida durante la epidemia de necrosis permitió caracterizar un elevado número de variantes de RNAsat por separado, usando una única cepa de CMV como virus auxiliar. Este ensayo mostró que las variantes de RNAsat inducían en tomate los mismos tres tipos de síntomas (necrosis, arropollado y filimorfismo) que se habían descrito previamente (Jordá y col., 1992). Además, el fenotipo necrogénico o no necrogénico de las variantes de RNAsat y los síntomas de las plantas de campo de las que éstas procedían mostró un grado de asociación estadísticamente significativo, y el ensayo de mezclas de variantes de RNAsat con distinto fenotipo indicó una clara dominancia del fenotipo necrogénico sobre el no necrogénico. La dominancia del síntoma de necrosis en tomate en inoculación de mezclas de variantes necrogénicas y no necrogénicas ha sido descrita por otros autores, incluso cuando el RNAsat necrogénico constituía una fracción muy pequeña del RNAsat total en el inóculo (Jacquemond y Lot, 1981; Kaper y col., 1988). Sin embargo, en nuestros análisis la dominancia del síntoma de necrosis en infecciones mixtas está siempre relacionada con la mayor acumulación del RNAsat necrogénico en comparación con el no necrogénico (Tabla 4.6). En el único caso en que plantas con infecciones mixtas no mostraron necrosis, la presencia de la variante necrogénica (91/3.1) no llegó a ser detectada, y la acumulación de la variante no necrogénica (90/13.1) fue similar a la de su inoculación individual (Tabla 4.6).

En algunas ocasiones se ha descrito que la capacidad de las variantes de RNAsat para inducir necrosis en tomate puede depender de la cepa de CMV que esté actuando como virus auxiliar (Wu y Kaper, 1992; Sleat y col., 1994). Nosotros, sin embargo, no hemos detectado ningún efecto del virus auxiliar en el fenotipo necrogénico o no necrogénico de diez variantes de RNAsat ensayadas con diez aislados distintos de CMV. No obstante, estos aislados representan los tipos genéticos mayoritarios en las poblaciones de la zona afectada por la epidemia de necrosis, pertenecientes al subgrupo I de CMV (Fraile y col., 1997a), y están más relacionados entre sí que las cepas usadas por Wu y Kaper (1992) o Sleat y colaboradores (1994), que pertenecían a subgrupos distintos del virus. Según nuestros resultados, los cambios en la proporción relativa de los tipos genéticos de CMV de las poblaciones de la costa mediterránea no deberían afectar a los síntomas inducidos por el RNAsat en tomate.

La existencia en el campo de aislados de CMV con RNAsat con posterioridad a la desaparición de la necrosis, y el hecho de que el fenotipo necrogénico de los RNAsat

en tomate no dependa del aislado de CMV ni de la coexistencia de variantes necrogénicas y no necrogénicas en infecciones mixtas, indican claramente que la disminución de la necrosis en los cultivos de tomate de la costa mediterránea española se produjo por la reducción de la frecuencia de los RNAsat necrogénicos en las poblaciones de RNAsat. De no ser así, la existencia de una pequeña proporción de RNAsat necrogénicos en el campo hubiera sido detectable por la inducción de necrosis en tomate. Este cambio en la estructura genética de la población de RNAsat significó su evolución hacia una menor virulencia.

Se ha asumido frecuentemente la idea de que un patógeno bien adaptado tiende a evolucionar hacia bajos niveles de virulencia, de forma que el perjuicio a su huésped sea mínimo (Holmes, 1982; Palmieri, 1982). Esta suposición se apoya en algunos ejemplos de patógenos poco virulentos que han mantenido una larga relación con su huésped, y de otros patógenos que sólo han mostrado una elevada virulencia en huéspedes con los que han establecido una asociación reciente (Allison, 1982). Sin embargo, estos ejemplos no son más que observaciones y no pueden ser considerados como la base de una teoría general. En efecto, también existen ejemplos de interacciones huésped-patógeno estables en las que la infección produce una reducción importante de la eficacia biológica del huésped (Herre, 1993). La evolución de la virulencia de los patógenos es un tema central en biología evolutiva y tiene importantes consecuencias prácticas. Existe abundante literatura acerca de modelos teóricos que, basándose en consideraciones epidemiológicas, estudian los mecanismos de evolución de la virulencia en los sistemas huésped-patógeno (Bull, 1994; Garnett y Antia, 1994; Read, 1994; May, 1995; Frank, 1996). La conclusión fundamental de estos modelos es que la evolución de la virulencia puede seguir múltiples direcciones dependiendo de la interrelación entre la virulencia del patógeno y su transmisión, y que esta relación puede ser diferente para cada interacción huésped-patógeno (Anderson y May, 1982; May y Anderson, 1983). Aunque algunas observaciones empíricas parecen estar de acuerdo con esta predicción (Bull, 1994; Read, 1994), existen pocos trabajos experimentales que demuestren su validez en condiciones naturales (Anderson y May, 1981; Herre, 1993; Clayton y Tompkins, 1994; Ebert, 1994; Agnew y Koella, 1997). La investigación mejor documentada sobre la evolución de la virulencia de un patógeno en la naturaleza es la realizada con el *Virus de la mixomatosis del conejo* en Australia, que mostró cómo sus poblaciones evolucionaron hacia niveles de virulencia intermedia (Fenner y

Ratcliffe, 1965; Anderson y May, 1982; Fenner, 1995). No tenemos conocimiento de ningún trabajo experimental similar realizado con algún virus de plantas, aunque sí existen algunos ejemplos que podrían ilustrar la existencia de patrones distintos en la evolución de la virulencia de virus de plantas en la naturaleza (Power, 1992). La epidemia de necrosis de tomate en España y su complejo etiológico, CMV y su RNAsat, constituye una excelente oportunidad para estudiar de forma experimental las causas de la evolución de la población de RNAsat hacia una menor virulencia. Los factores que determinan la eficacia biológica del RNAsat, pueden estar relacionados con su ciclo biológico, con su interacción con el virus auxiliar y con la interacción de ambos en el huésped. Este mismo conjunto de factores podría determinar también la evolución de la virulencia de las poblaciones de CMV y su RNAsat, según fuera la interrelación entre aquellos que se asocian con su virulencia y aquellos que se asocian con su transmisión. Para desenmarañar las posibles relaciones entre estos factores es necesario tener una estima cuantitativa de su efecto en la eficacia biológica de los distintos RNAsat. Los resultados obtenidos para dicha estima se discuten en los apartados siguientes. En ellos cabría esperar que los aislados de CMV con variantes de RNAsat no necrogénicas mostraran algún tipo de ventaja evolutiva con respecto a los aislados con variantes necrogénicas, y que ambos tipos de aislado tuvieran desventajas evolutivas en relación con los aislados de CMV sin RNAsat, que acabaron prevaleciendo en el campo.

5.2.- FACTORES DE LA EFICACIA BIOLÓGICA DE CMV Y SU RNA SATÉLITE

La capacidad de infectar a un huésped y multiplicarse en él constituye un primer factor importante de la eficacia biológica de un patógeno. Las variantes de RNAsat de CMV mostraron una variación considerable en su capacidad de infectar plantas de tomate y de acumularse en sus hojas. Sin embargo, ni las diferencias en infectividad ni las diferencias de acumulación fueron significativas cuando las variantes de RNAsat necrogénicas en conjunto se compararon con las variantes no necrogénicas (Figura 4.3 y Tabla 4.6). Cuando la acumulación de RNAsat se midió en inoculaciones mixtas de variantes necrogénicas y no necrogénicas, la presencia de variantes de RNAsat

necrogénicas causó una depresión significativa de la acumulación de las variantes no necrogénicas, mientras que la presencia de variantes no necrogénicas no afectó a la acumulación de las variantes necrogénicas (Tabla 4.6). Este resultado indica que las variantes de RNAsat necrogénicas pueden competir con éxito frente a las variantes no necrogénicas cuando ambas infectan la misma planta.

La capacidad de multiplicación y acumulación de los RNAsat en los tejidos de la planta puede depender además de factores externos al propio RNAsat. Un factor importante puede ser la temperatura. Se ha descrito que las temperaturas elevadas pueden afectar en distinto sentido e intensidad los niveles de acumulación de los RNAsat necrogénicos en función del aislado de CMV que actúe como virus auxiliar (Kaper y col., 1995; White y col., 1995), y que el grado de inducción de la necrosis de tomate puede depender de las condiciones ambientales (Wu y col., 1993). Hay que destacar que este efecto de la temperatura podría estar relacionado con el hecho de que el desarrollo de la necrosis en las plantas de tomate se interrumpiera en el mes de julio, reiniciándose tras el periodo estival, lo que sugiere que las altas temperaturas podrían haber afectado la acumulación de los RNAsat necrogénicos o la expresión de la necrosis (Jordá y col., 1992). La multiplicación del RNAsat en otros huéspedes distintos del tomate podría haber contribuido a alterar la relación ecológica de competición entre las variantes de RNAsat necrogénicas y las no necrogénicas, ya que los RNAsat no se multiplican con igual eficiencia en todos los huéspedes de CMV (Kaper y Tousignant, 1977; Jacquemond y Leroux, 1982). La planta silvestre *Nicotiana glauca* Graham es capaz de mantener la replicación de CMV y su RNAsat, y se ha sugerido que esta especie podría actuar de reservorio de RNAsat en el campo e influir de forma importante en las características de la estructura genética de la población de RNAsat en la región mediterránea donde tuvo lugar la epidemia (Aranda y col., 1993). El efecto de la temperatura y la existencia de huéspedes alternativos para CMV con RNAsat podrían influir en su eficacia biológica y jugar un papel importante en la evolución de su población. El análisis experimental de estos factores no ha sido abordado en este trabajo.

La eficacia de transmisión de un patógeno es un segundo factor de importancia en la determinación de su eficacia biológica. El RNAsat de CMV se encapsida en las partículas de CMV y puede transmitirse desde plantas infectadas a nuevas plantas junto con los RNAs genómicos de su virus auxiliar (Jacquemond, 1982a). Por tanto, su

eficacia de transmisión depende de su propia capacidad para transmitirse a la descendencia de CMV y también de la capacidad de CMV para transmitirse de unas plantas a otras. A su vez, la eficacia de transmisión del RNAsat a la descendencia de CMV podría verse afectada por su capacidad de competir con los RNAs genómicos de CMV por la proteína de la cápsida durante el proceso de encapsidado. El análisis electroforético del RNA de partículas virales de CMV con RNAsat mostró que las variantes de RNAsat necrogénicas y las no necrogénicas representaban proporciones muy similares del RNA total (Figura 4.5). Sin embargo, la probabilidad de transmisión del RNAsat a la descendencia de CMV fue mayor para las variantes necrogénicas que para las no necrogénicas, tanto en un experimento de transmisión a un huésped de lesión local como en un experimento de transmisión por pulgones (Tablas 4.7 y 4.9). La proporción similar con la que las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas se encapsidan en las partículas de CMV parece estar en contradicción con la mayor probabilidad de las variantes necrogénicas de transmitirse a la descendencia de CMV. Aunque ambos efectos podrían influir en las diferencias de eficacia de transmisión de las variantes de RNAsat, su significado es distinto: la frecuencia del RNAsat en la descendencia de CMV proporciona una estima de la probabilidad de que el RNAsat esté presente en el conjunto mínimo de partículas de CMV que encapsidan los RNAs genómicos 1, 2 y 3, y que por tanto son necesarias para iniciar un nuevo ciclo de infección. Dicha probabilidad podría verse afectada por la distribución del RNAsat en las tres partículas de CMV que encapsidan el RNA 1, el RNA 2 y los RNAs 3 y 4, y por la proporción relativa de estas partículas en el inóculo. Lot y Kaper (1976) estudiaron la distribución de los distintos RNAs en las partículas de CMV, incluido su RNAsat, mediante un análisis en gradientes de RbCl. Sin embargo, estos experimentos no llegaron a aclarar si el RNAsat se encapsida preferencialmente junto con alguno o los tres RNAs genómicos de CMV, o lo hace por separado en un cuarto tipo de partícula (Lot y Kaper, 1976). Las diferencias observadas en la probabilidad de transmisión a la descendencia de las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas podrían estar reflejando diferencias en su distribución en las distintas partículas de CMV o en la proporción de estas partículas en el inóculo. Además, los dos tipos de RNAsat afectan de forma diferente a la proporción relativa con que se encapsidan los RNAs genómicos del virus (Figura 4.5). Ambos efectos sugieren que el RNAsat de CMV se encapsida junto con los RNAs del virus y no en partículas distintas.

La eficacia de transmisión por pulgones de CMV y su RNAsat se analizó en un experimento en el que CMV sin RNAsat, o CMV con distintas variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas se transmitieron a nuevas plantas de tomate usando como vector *A. gossypii*. Este experimento mostró que la presencia del RNAsat deprimía de forma significativa la transmisión de CMV (Tabla 4.9) y que el grado de depresión fue similar para las variantes de RNAsat necrogénicas y las no necrogénicas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Jacquemond (1982a), quien observó que las plantas que favorecían la multiplicación del RNAsat se comportaban peor para la adquisición de CMV por pulgones que las plantas que no la favorecían. Así, el porcentaje de transmisión de CMV era menor para tomate y tabaco que para melón, cuando las tres especies habían sido inoculadas con CMV y RNAsat.

El efecto del RNAsat en la transmisibilidad de CMV por pulgones podría estar relacionado con su efecto de reducción de la acumulación viral. La cuantificación por ELISA de la acumulación de partículas de CMV en las hojas "fuente" de virus indicó que las variantes de RNAsat habían producido una reducción de la acumulación de CMV de hasta diez veces (Tabla 4.10). El efecto del RNAsat de CMV en la reducción de la concentración del virus auxiliar ha sido descrito en la literatura en numerosas ocasiones (Kaper y col., 1976; Mossop y Francki, 1979; Takanami, 1981; Gonsalves y col., 1982; Jacquemond y Leroux, 1982). La reducción de la acumulación de CMV producida por el RNAsat en el experimento de transmisión por pulgones, realizado con la cepa Fny de CMV, se observó también con una intensidad similar en otro ensayo en el que se utilizaron diez aislados distintos de CMV como virus auxiliar. En dicho ensayo se observó además que las variantes de RNAsat necrogénicas tuvieron un efecto de depresión en la acumulación de CMV significativamente mayor que las variantes no necrogénicas (Tabla 4.8). Tal efecto no fue observado en el experimento de transmisión por pulgones (Tabla 4.10). Las discrepancias entre ambos resultados podrían deberse a que las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos fueron diferentes. En primer lugar, éstos se realizaron en diferente época del año, y la temperatura podría haber afectado de forma diferente a la acumulación de las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas. En segundo lugar, los experimentos a los que se refiere la Tabla 4.10 se realizaron en el momento en el que las hojas "fuente" de inóculo mostraron el estado y síntomas óptimos para la alimentación de los pulgones, de forma

que la acumulación de CMV con variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas no se cuantificó a un mismo tiempo después de la inoculación.

La eficacia de transmisión de CMV por *A. gossypii* se correlacionó de forma significativa con la acumulación del virus en las hojas "fuente" de inóculo (Tabla 4.10 y Figura 4.6), por lo que el efecto del RNAsat de reducción en la transmisibilidad del virus auxiliar puede explicarse, al menos en parte, por su efecto de depresión en la acumulación viral. La correlación entre la eficacia de transmisión de un virus y su concentración en la fuente de alimentación de los pulgones se ha descrito en varios virus de transmisión no persistente cuando los pulgones los adquirían de suspensiones a través de membranas (Pirone y Megahed, 1966), pero no siempre cuando los pulgones adquirían el virus de tejidos infectados (Pirone y Harris, 1977). Dicha correlación se ha encontrado también en el caso de un *Luteovirus*, de transmisión circulativa no propagativa, en experimentos de adquisición en planta (Gray y col., 1991). En algunos experimentos de transmisión de CMV por *A. gossypii* y *M. persicae* se observó una correlación clara entre la concentración de CMV en la planta y la eficacia de transmisión (Simons, 1958; Normand y Pirone, 1968; Banik y Zitter, 1990). Sin embargo los resultados de estos experimentos son difíciles de comparar con los nuestros, ya que en todos ellos la concentración de virus en la planta se expresó como número de lesiones en ensayos de lesión local o como absorbancias directas de ELISA, sin llegar a realizar una cuantificación precisa de la acumulación de partículas virales. Experimentos realizados por Normand y Pirone (1968) y por Gera y colaboradores (1979) indicaron que la eficacia de transmisión de algunos aislados de CMV sólo se correlacionaba con la concentración viral cuando los pulgones adquirían CMV de suspensiones virales y no cuando lo hacían directamente de los tejidos de la planta. En los casos en los que se ha encontrado una relación entre la concentración del virus y su transmisibilidad, esta relación ha sido clara sólo para valores pequeños de concentración, mientras que para valores mayores la eficacia de transmisión alcanzaba la saturación. En nuestro caso, la relación concentración / transmisibilidad fue clara para valores de concentración de CMV de hasta 500 µg/g de hoja fresca. Los valores de concentración superiores correspondían a plantas infectadas con CMV sin RNAsat, para las que la correlación entre concentración y eficacia de transmisión no fue significativa. Las diferencias entre nuestros resultados y los de los autores mencionados más arriba pueden explicarse por los diferentes valores de concentración para los que la eficacia de

transmisión del virus alcanza su saturación, que podrían depender del aislado de CMV, del huésped, de la especie de pulgón y de las condiciones ambientales.

El RNAsat de CMV, además de reducir la transmisibilidad de CMV por su efecto de depresión en la acumulación viral, podría afectar directamente al mecanismo de transmisión del virus. La transmisibilidad de CMV por pulgones depende de la secuencia de aminoácidos de la CP (Quemada y col., 1989; Owen y col., 1990; Perry y col., 1994), en la que se han encontrado aminoácidos determinantes de la especificidad de transmisión por diferentes especies de pulgones (Perry y col., 1998). La localización de estos aminoácidos en la estructura tridimensional de la partícula del virus, resuelta recientemente mediante cristalografía de rayos X (Wikoff y col., 1997), indica que sólo algunos de ellos se sitúan en la superficie externa de la partícula viral, lo que sugiere que cambios de aminoácido en posiciones no expuestas a la superficie podrían afectar a la transmisibilidad de CMV produciendo cambios en la conformación espacial o en la estabilidad de la partícula (Perry y col., 1998). La presencia del RNAsat en las partículas de CMV podría producir hipotéticamente una distorsión de su estructura, afectando su estabilidad y su capacidad de unión a los receptores en el estilete del pulgón, reduciendo así la eficacia de transmisión de CMV. Los experimentos de transmisión de CMV por *A. gossypii* en presencia o ausencia de su RNAsat no permitieron descartar la posibilidad de que en la depresión de la eficacia de transmisión de CMV asociada a la presencia del RNAsat estuvieran involucrados otros factores, como el hipotético efecto del RNAsat en el mecanismo de transmisión de CMV. La existencia en la Figura 4.6 de distintas relaciones transmisibilidad / concentración en presencia o ausencia del RNAsat hubieran sugerido un efecto de este tipo. Sin embargo, el hecho de que los valores de concentración viral para CMV sin RNAsat y CMV con RNAsat no solaparan en ningún intervalo no ha permitido analizar por métodos estadísticos la existencia de tales correlaciones.

Un tercer factor a tener en cuenta en el análisis de la eficacia biológica de un patógeno es su propia virulencia. La virulencia de un patógeno puede considerarse como la reducción de la eficacia biológica del huésped producida por la infección, efecto que generalmente es difícil de cuantificar (Read, 1994). En los modelos epidemiológicos de coevolución huésped-patógeno la virulencia se representa por el incremento en la tasa de mortalidad del huésped debido a la enfermedad. Cuando el patógeno no es letal, como es el caso de muchos patógenos de plantas, la virulencia

puede estimarse cuantificando la reducción de masa vegetal debida a la disminución del crecimiento de las plantas infectadas. Este tipo de estima de la virulencia se ha empleado en un trabajo sobre los complejos víricos causantes de las enfermedades de la roseta del cacahuete y del tungro del arroz, donde la pérdida de masa vegetal de las plantas infectadas en relación con las plantas sanas se estimó según la gravedad de los síntomas inducidos por el patógeno (Zhang y col., 2000). En nuestro trabajo la virulencia se ha estimado en función del crecimiento relativo y de la longevidad relativa de los tejidos infectados con respecto a los tejidos sanos, obteniendo una correlación experimental entre la masa vegetal de una porción de tejido y su longevidad o duración hasta alcanzar la senescencia. Los resultados obtenidos indicaron que los aislados de CMV sin RNAsat presentan una virulencia intermedia entre un valor elevado, correspondiente a los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos, que agravan los síntomas inducidos por CMV en tomate, y un valor muy bajo correspondiente a los aislados de CMV con RNAsat no necrogénicos, que atenúan los síntomas inducidos por CMV. Estas estimas cuantitativas se corresponden con las observaciones cualitativas descritas para numerosas combinaciones de CMV y RNAsat (García-Arenal y Palukaitis, 1999).

5.3- PREDICCIONES SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA DE CMV Y SU RNA SATÉLITE

Los modelos teóricos de evolución de la virulencia predicen que las poblaciones de patógenos pueden evolucionar hacia distintos niveles de virulencia dependiendo de los beneficios y los costes asociados a ella. La posibilidad de situaciones de equilibrio está determinada por la relación entre la virulencia y la transmisión del patógeno. Según las consideraciones teóricas de los modelos epidemiológicos la virulencia y la transmisión de un patógeno mantienen una correlación positiva a través de la eficacia de multiplicación del patógeno en el huésped. Así, estos modelos suponen que los patógenos con alta capacidad de multiplicación en el huésped son generalmente virulentos y poseen una alta tasa de transmisión (Anderson y May, 1982; Bull, 1994). La correlación entre la tasa de multiplicación del patógeno, su virulencia y su

transmisión fue descrita por ejemplo para el *Virus de la mixomatosis del conejo*, en el que las tasas elevadas de multiplicación asociadas a niveles altos de virulencia iban acompañadas de la formación de un mayor número de lesiones en el conejo, facilitando el contacto entre el virus y el vector, mosquitos en Australia y Francia y moscas en Gran Bretaña, aumentando así la probabilidad de transmisión del virus (Fenner, 1995; Anderson y May, 1982). Aunque no existen trabajos así de detallados en virus de plantas, sí existen observaciones empíricas que apoyan la existencia de una correlación positiva entre la capacidad de mutiplicación de un virus, su virulencia y su transmisibilidad (Power, 1992). Los resultados obtenidos en esta tesis están de acuerdo sólo en parte con estas observaciones empíricas y con las consideraciones teóricas de los modelos epidemiológicos, debido a la superposición de dos sistemas huésped-patógeno que no son independientes: tomate y CMV por un lado, y CMV y su RNAsat por otro. Así, cuando se considera el segundo de estos dos sistemas huésped-patógeno, CMV y su RNAsat, las variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas no muestran diferencias significativas en su capacidad de acumulación en el huésped, aunque la elevada virulencia de las variantes necrogénicas se correlaciona con su mayor capacidad de acumulación y competición en infecciones mixtas con las variantes no necrogénicas. Por otra parte, las variantes de RNAsat necrogénicas también se transmiten con mayor eficacia que las variantes de RNAsat no necrogénicas a la descendencia de CMV. Para el sistema CMV y planta huésped hay datos en la literatura que sugieren la existencia de correlación entre niveles altos de multiplicación (y posiblemente de virulencia) y niveles altos de transmisión vectorial (Simons, 1957; Banik y Zitter, 1990). Sin embargo los resultados de esta tesis demuestran que cuando se considera el sistema conjunto CMV, su RNAsat y la planta huésped, la correlación entre la virulencia y la probabilidad de transmisión vectorial resulta ser la inversa. De hecho las variantes de RNAsat necrogénicas producen una depresión mayor en la acumulación de CMV que las variantes no necrogénicas, a la vez que se acumulan mejor y resultan más virulentas en tomate. Como muestra la Figura 4.6, la menor acumulación del virus auxiliar supone una reducción en la eficacia de transmisión de CMV y del propio RNAsat. Esta interrelación concreta entre la virulencia y la transmisión de CMV y su RNAsat, pone de manifiesto la importancia epidemiológica de una interacción trilateral entre un huésped (tomate), su patógeno (CMV) y un hiperparásito del patógeno (RNAsat).

Los modelos teóricos de evolución de la virulencia indican que en la población de un patógeno predomina la virulencia de aquellos individuos con la mayor eficacia biológica. La eficacia biológica está determinada por la relación entre la virulencia del patógeno y su transmisión a través de la expresión de la tasa neta reproductiva de Fisher R_0 (Ecuación 1.2). Los valores de la tasa neta reproductiva de CMV sin RNAsat y de CMV con variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas están representados en la Figura 4.9 y predicen la existencia de dos líneas diferentes de evolución de la virulencia, dependiendo del número de pulgones por planta (i), que determina la probabilidad de transmisión de cada patógeno. Para valores pequeños e intermedios del número de pulgones por planta ($i < 10$), los aislados de CMV que no mantienen RNAsat prevalecen en la población en detrimento de los aislados que mantienen variantes de RNAsat necrogénicas en primer lugar y de los aislados que mantienen variantes no necrogénicas en segundo lugar. Esta predicción de la evolución de la virulencia de CMV y su RNAsat está de acuerdo con la evolución de su estructura genética observada en condiciones naturales: en la población de CMV y RNAsat de la costa mediterránea se han mantenido los aislados de CMV sin RNAsat, siendo los aislados con RNAsat necrogénicos los primeros en disminuir su frecuencia y desaparecer de la población, seguidos por los aislados con RNAsat no necrogénicos (Alonso-Prados y col., 1998). Para valores superiores del número de pulgones por planta ($i \geq 10$), los aislados de CMV con RNAsat no necrogénicos se establecerían en la población de CMV y RNAsat, desplazando en primer lugar a los aislados con RNAsat necrogénicos y en segundo lugar a los aislados sin RNAsat. Estas dos situaciones distintas de evolución de la virulencia ilustran bien la predicción de que la evolución de la virulencia de un patógeno puede seguir direcciones distintas según sea la interrelación entre su virulencia y su transmisión (Anderson y May, 1982; May y Anderson, 1983). En nuestro caso, las distintas relaciones entre la virulencia y la transmisión de CMV y su RNAsat vienen determinadas por la variación de la probabilidad de transmisión de cada patógeno (β_2) en función del número de pulgones por planta (i).

Aunque la predicción del modelo de Anderson y May (1982) coincide con la evolución de la población de CMV y su RNAsat a largo plazo, los valores obtenidos para la tasa neta reproductiva no explican la aparición y posterior expansión de los aislados de CMV con RNAsat causantes de la epidemia de necrosis observada entre los años 1986 y 1989 (Jordá y col., 1992). La evolución de la virulencia de un patógeno en

condiciones epidémicas viene determinada por su tasa de incremento o dispersión E_0 . Los valores de E_0 para CMV sin RNAsat y CMV con variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas indican que la mayor velocidad de dispersión en tomate corresponde a los aislados de CMV sin RNAsat, seguidos de los aislados que mantienen variantes de RNAsat no necrogénicas y de los aislados de CMV con variantes de RNAsat necrogénicas, independientemente del número de pulgones por planta, aunque este parámetro modula las diferencias entre las tasas de dispersión de los distintos patógenos (Figura 4.10). El comportamiento de la tasa de dispersión E_0 tampoco explica la expansión de los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos durante los primeros años de la epidemia de necrosis. Las razones de tal expansión se han tratado de buscar usando modelos que tienen en cuenta factores no considerados en el de Anderson y May (1982).

Zhang y colaboradores (2000) han propuesto recientemente modelos matemáticos que examinan las dinámicas epidemiológicas de los complejos virales compuestos por un virus auxiliar y un virus dependiente. Este tipo de interacción es relativamente frecuente entre los virus de plantas y puede influir de forma importante en la epidemiología de la enfermedad, al permitir distintas vías para la transmisión del virus dependiente. El análisis de la dinámica de las poblaciones de plantas sanas y plantas infectadas por CMV sin RNAsat y CMV con variantes de RNAsat necrogénicas y no necrogénicas se realizó teniendo en cuenta tres supuestos distintos de sobreinfección de los aislados de CMV con RNAsat sobre los aislados de CMV, o de los aislados con RNAsat necrogénicos sobre los aislados con RNAsat no necrogénicos (ver supuestos I, II y III en las Figuras 4.11, 4.12, 4.13 y 4.14). En cada supuesto de sobreinfección se ha examinado el papel del número de pulgones por planta (i) y del número de acontecimientos de transmisión por unidad de tiempo (β_I). Este análisis de la dinámica de las poblaciones de plantas con las distintas infecciones posibles predice dos situaciones nuevas con respecto a las descritas por los modelos que no consideran la posibilidad de sobreinfección: primero, el mantenimiento a largo plazo de los aislados de CMV con RNAsat no necrogénicos incluso para valores bajos del número de pulgones por planta; segundo, el mantenimiento a largo plazo de los aislados con RNAsat necrogénicos (Figura 4.11). Tres líneas de evidencia apoyan la suposición de que las sobreinfecciones con aislados de CMV con RNAsat son posibles en la naturaleza. En primer lugar, la elevada infectividad de los RNAsat puede llevar a

menudo a la infección por RNAsat de aislados de CMV libres de ellos (García-Arenal y Palukaitis, 1999). En segundo lugar, no parece haber fenómenos de protección cruzada entre RNAsat necrogénicos y no necrogénicos, ya que sus infecciones mixtas son frecuentes en la naturaleza y se han descrito en los cultivos de tomate de la costa mediterránea (Jacquemond y Lot, 1981; Avila-Rincón y col., 1986; Aranda y col., 1993). En tercer lugar, el análisis de la estructura genética de las poblaciones de CMV y su RNAsat en España muestra que los RNAsat se han expandido de forma epidémica sobre la población de CMV, y no en asociación con determinados aislados del virus (Alonso-Prados y col., 1998).

El número de acontecimientos de transmisión (β_i) y el número de pulgones por planta (i), así como la probabilidad de que se produzcan eventos de sobreinfección en el campo, son factores epidemiológicos que pueden depender directamente del tamaño de las poblaciones de pulgones. Por tanto, es muy probable que las distintas situaciones descritas por los modelos epidemiológicos puedan corresponderse con momentos distintos a lo largo del desarrollo de la epidemia de necrosis de tomate, en los que la predominancia de los aislados de CMV sin RNAsat, o con RNAsat necrogénicos y no necrogénicos responda a cambios en el tamaño de las poblaciones de pulgones. De hecho, tales cambios cuantitativos se han descrito en la región mediterránea a partir de datos de capturas de pulgones en vuelo en localidades de la provincia de Valencia. Los resultados de estas prospecciones indican un aumento considerable del número total de capturas de pulgones en la primavera de 1986, coincidiendo con el año de inicio de la epidemia de necrosis de tomate. El aumento de las poblaciones de pulgones fue acompañado por un aumento de la importancia relativa de *A. gossypii* en detrimento de otras especies como *M. persicae* o *Aphis citricola* (Van der Goot), que habían sido más abundantes que *A. gossypii* en las prospecciones realizadas con anterioridad a 1985 (Hermoso de Mendoza y Moreno, 1989; Melia, 1989). En una prospección realizada en la provincia de Castellón entre 1985 y 1994, se detectó un aumento importante de las capturas de *A. gossypii* en el periodo comprendido entre 1986 y 1992, con niveles ligeramente más bajos entre 1988-1990. A partir de 1992 las capturas volvieron a descender, estabilizándose a niveles algo superiores a los detectados antes de 1986 (Melia, 1995). Aunque estas prospecciones se realizaron en cultivos de cítricos, la coincidencia de los resultados en diferentes localidades podría reflejar un aumento general del tamaño de las poblaciones de pulgones en la región, en especial de las

poblaciones de *A. gossypii*. Teniendo en cuenta que esta especie es un vector más eficaz que *M. persicae* en la transmisión de CMV (Kennedy y col., 1962; Raccah y col., 1985; Perry, 2000; Fereres, comunicación personal), el aumento del tamaño de sus poblaciones en 1986 y su posterior disminución a partir de 1992-1993 podría haber influido notablemente en la expansión y posterior desaparición de los aislados de CMV con RNAsat necrogénicos. No hemos encontrado datos del tamaño de las poblaciones de pulgones en la región con posterioridad a 1994, por lo que no podemos especular sobre su posible influencia en la desaparición de los RNAsat de la población de CMV.

Por último, cabe destacar que otro factor no analizado en este trabajo podría haber contribuido a los cambios de la estructura genética de la población de CMV y su RNAsat. La permanencia en la población de un huésped de patógenos con elevados índices de virulencia puede ser el resultado de la mutación y posterior selección de aquellos mutantes con mayor capacidad de multiplicación en el huésped, aunque su elevada virulencia pueda suponer desventajas evolutivas a largo plazo asociadas a la inducción en él de una alta tasa de mortalidad. Levin y Bull (1994) propusieron que este tipo de selección podría contribuir a la evolución de la virulencia de la meningitis bacteriana, la poliomielitis y el SIDA. Los RNAsat de CMV de la costa mediterránea han evolucionado por la acumulación secuencial de mutaciones, siguiendo dos líneas evolutivas distintas (Aranda y col., 1993; Aranda y col., 1997). El hecho de que los RNAsat necrogénicos y no necrogénicos para tomate no evolucionen de forma totalmente separada según estas dos líneas evolutivas, y que además entre ellas puedan darse acontecimientos de recombinación con cierta frecuencia (Aranda y col., 1997; García-Arenal y Palukaitis, 1999), apoyaría la posibilidad de que los RNAsat necrogénicos fueran seleccionados a corto plazo frente a los no necrogénicos por su elevada capacidad de multiplicación y competición en plantas con infecciones mixtas de ambos, a pesar de las desventajas asociadas con su virulencia.

El trabajo desarrollado en esta tesis muestra que la población de CMV con RNAsat en cultivos de tomate de la costa mediterránea española evolucionó hacia una menor virulencia. El análisis de los factores que determinan la eficacia biológica de este patógeno ha servido para realizar predicciones sobre la evolución de la virulencia de CMV y su RNAsat, basadas en consideraciones estrictamente teóricas. El análisis de la

virulencia de este patógeno en condiciones naturales ha permitido contrastar experimentalmente tales predicciones indicando la validez de los modelos epidemiológicos sobre evolución de la virulencia aplicados a un virus de plantas. En el caso de CMV y su RNAsat, estos modelos epidemiológicos han servido para investigar el importante papel en la evolución de este patógeno de algunos factores ecológicos difíciles de analizar de forma experimental, como es la interacción entre las poblaciones de un huésped, de un patógeno y de sus vectores.

Los resultados de esta tesis son además relevantes en cuanto a la utilización racional de las variantes de RNAsat atenuantes en programas de control biológico de CMV, ya sea en programas de protección cruzada o mediante su expresión transgénica en plantas (Tien y Wu, 1991; Gallitelli, 1998). Los ensayos de protección cruzada en campo han rendido resultados prometedores y en ellos no se han detectado cambios de patogenicidad de las variantes de RNAsat atenuantes utilizadas (Gallitelli y col., 1997). Sin embargo, la gran influencia que los factores ecológicos pueden tener en la evolución de la virulencia de CMV y su RNAsat en condiciones naturales implica riesgos importantes en la utilización de estas estrategias como método generalizado de control de las enfermedades producidas por CMV.

6.- CONCLUSIONES

Entre 1986 y 1992 se produjo una epidemia de necrosis sistémica en los cultivos de tomate de la costa mediterránea española causada por CMV con RNAsat. La incidencia de la necrosis disminuyó progresivamente desde 1989 hasta desaparecer a partir de 1992. En esta tesis se ha realizado el estudio de la evolución de la virulencia de CMV y su RNAsat en los cultivos de tomate de la costa mediterránea y se han analizado los factores que determinaron dicha evolución. Los resultados obtenidos pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

- 1^a** Los cambios de incidencia del síndrome de necrosis de tomate observados en la zona afectada por la epidemia pueden explicarse por la evolución de la población de CMV y su RNAsat hacia una menor virulencia.
- 2^a** El análisis de los factores de la eficacia biológica del RNAsat en el sistema huésped-patógeno formado por CMV y su RNAsat muestra que las variantes necrogénicas compiten favorablemente en infecciones mixtas frente a las variantes no necrogénicas, se transmiten con mayor probabilidad a la descendencia de CMV, y deprimen con más intensidad que las variantes no necrogénicas la acumulación de CMV en los tejidos infectados.
- 3^a** Cuando se considera el sistema huésped-patógeno formado por CMV y su RNAsat en tomate, la mayor eficacia biológica corresponde a los aislados de CMV libres de RNAsat, que presentan mayor probabilidad de transmisión que los aislados con RNAsat no necrogénicos, y éstos a su vez, se transmiten más eficazmente que los aislados con RNAsat necrogénicos.

- 4^a El análisis de los factores de la eficacia biológica del patógeno en el sistema formado por CMV y su RNAsat en tomate ha permitido encontrar una relación experimental entre los parámetros epidemiológicos de virulencia y transmisión de este patógeno, que determinan la evolución de su virulencia. Ambos parámetros se correlacionan de forma negativa para valores altos de la virulencia, es decir, cuando los RNAsat necrogénicos se asocian con CMV.

- 5^a Los modelos epidemiológicos de coevolución huésped-patógeno predicen que la evolución de la virulencia de CMV y su RNAsat puede depender además del tamaño de las poblaciones de pulgones. Así, los cambios de tamaño de estas poblaciones pueden explicar tanto la evolución observada en condiciones naturales hacia un menor grado de virulencia como la expansión epidémica de los RNAsat, en especial de los necrogénicos, en la población de CMV.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Agnew, P. y Koella, J.C. 1997.** Virulence parasite mode of transmission, and host fluctuating asymmetry. *Proceedings of the Royal Society of London B* 264, 9-15.
- Aldaoud, R., Dawson, W.O. y Jones, G.E. 1989.** Rapid, random evolution of the genetic structure of replicating tobacco mosaic virus populations. *Intervirolgy* 30, 227-233.
- Allison, A.C. 1982.** Coevolution between host and infectious disease agents, and its effects on virulence . En: Population biology of infectious diseases, Anderson, R.M. y May, R.M.(eds.), pp.245-268. Springer-Verlag, New York.
- Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Malpica, J.M., García-Arenal, F. y Fraile, A. 1998.** Satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus spreads epidemically in natural populations of its helper virus. *Phytopathology* 88, 520-524.
- Altschuh, D., Lesk, A.M., Bloomer, A.L. y Klug, A. 1987.** Correlation of co-ordinated aminoacid substitutions with function in viruses related to tobacco mosaic virus. *Journal of Molecular Biology* 193, 693-707.
- Ambros, S., Hernandez, C., Desvignes, J.C. y Flores, R. 1998.** Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasispecies. *Journal of Virology* 72, 7397-7406.
- Anderson, R.M. y May, R.M. 1979.** Population biology of infectious diseases: part I. *Nature* 280, 361-367.
- Anderson, R.M. y May, R.M. 1981.** The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 291, 451-524.
- Anderson, R.M. y May, R.M. 1982.** Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* 85, 411-426.
- Aranda, M.A., Fraile, A., Dopazo, J., Malpica, J.M. y García-Arenal, F. 1997.** Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. *Journal of Molecular Evolution* 44, 81-88.
- Aranda, M.A., Fraile, A. y García-Arenal, F. 1993.** Genetic variability and evolution of the satellite RNA of cucumber mosaic virus during natural epidemics. *Journal of Virology* 67, 5896-5901.
- Argüello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L. y Rivera-Bustamante, R. 1994.** Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology* 26, 553-556.
- Atabekov, J.G. y Dorokhov, Y.L. 1984.** Plant virus specific transport function and resistance of plants to viruses. *Advances in Virus Research* 29, 313-364.
- Avila-Rincón, M.J., Collmer, C.W. y Kaper, J.M. 1986.** *In vitro* translation of cucumoviral satellites. I. Purification and nucleotide sequence of cucumber mosaic virus-associated RNA 5 from cucumber mosaic virus strain S. *Virology* 152, 446-454.

- Bacher, J.W., Warkentin, D., Ramsdell, D. y Hancock, F. 1994.** Selection *versus* recombinaton: what is maintaining identity in the 3' termini of blueberry leaf mottle nepovirus RNA1 and RNA2?. *Journal of General Virology* 75, 2133-2137.
- Badami, R.S. 1958.** Changes in the transmissibility by aphids of a strain of cucumber mosaic virus. *Annals of Applied Biology* 46, 554-562.
- Banik, M.T. y Zitter, T.A. 1990.** Determination of cucumber mosaic virus titer in muskmelon by enzyme-linked immunosorbent assay correlation with aphid transmission. *Plant Disease* 74, 857-859.
- Baulcombe, D.C. 1996.** Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell* 8, 1833-1844.
- Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A. y Harrison, B.D. 1986.** Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321, 446-449.
- Bernal, J.J. y García-Arenal, F. 1994.** Analysis of the determinants of the satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus for high accumulation in squash. *Virology* 205, 262-268.
- Bernal, J.J. y García-Arenal, F. 1997.** Analysis of the *in vitro* secondary structure of cucumber mosaic virus satellite RNA. *RNA* 3, 1052-1067.
- Boccard, F. y Baulcombe, D.C. 1993.** Multinational analysis of *cis* acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology* 193, 563-578.
- Boccardo, G., Lisa, V., Luisoni, E. y Milne, R.G. 1987.** Cryptic plant viruses. *Advances in Virus Research* 32, 171-214.
- Bremermann, H.J. 1980.** Sex and polymorphism as strategies in host-pathogen interactions. *Journal of Theoretical Biology* 87, 671-702.
- Bremermann, H.J. 1983.** Theory of catastrophic diseases of cultivated plants. *Journal of Theoretical Biology* 100, 255-274.
- Bremermann, H.J. y Pickering, J. 1983.** A game-theoretical model of parasite virulence. *Journal of Theoretical Biology* 100, 411-426.
- Bujarski, J.J. 1999.** Molecular basis of genetic variability in RNA viruses. En: *Molecular biology of plant viruses*, Mandahar, C.L.(ed.), pp.121-141. Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts.
- Bull, J.J. 1994.** Perspective virulence. *Evolution* 48, 1423-1437.
- Bull, J.J., Molineux, I.J. y Rice, W.R. 1991.** Selection of benevolence in a host-parasite system. *Evolution* 45, 875-882.
- Burdon, J.J. 1987.** Diseases and plant population biology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Burdon, J.J. 1993.** The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annual Review of Phytopathology* 31, 305-323.

- Burdon, J.J., Brown, A.H.D. y Jarosz, A.M. 1990.** The spatial scale of genetic interactions in host-pathogen coevolved systems. En: Pests, pathogens and plant communities, Burdon, J.J. y Leather, S.R.(eds.), pp.233-247. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Burdon, J.J y Jarosz, A.M. 1991.** Host-pathogen interactions in natural populations of *Linum marginale* and *Melampsora lini*: I. Patterns of resistance and racial variation in a large host population. *Evolution* 45, 205-217.
- Canto, T., Prior, D.A.M., Hellwald, K., Oparka, K.J. y Palukaitis, P. 1997.** Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology* 237, 237-248.
- Chao, L. 1990.** Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* 348, 454-455.
- Chen, B. y Francki, R.I.B. 1990.** Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology* 71, 939-944.
- Clarke, D.D., Campbell, F.S. y Bevan, J.R. 1990.** Genetic interactions between *Senecio vulgaris* and the powdery mildew fungus *Erysiphe fischeri*. En: Pest, pathogens and plant communities, Burdon, J.J. y Leather, S.R.(eds.), pp.189-201. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Clayton, D.H. y Tompkins, D.N. 1994.** Ectoparasite virulence is linked to mode of transmission. *Proceedings of the Royal Society of London B* 256, 211-217.
- Copeland, R. 1998.** Assaying levels of plant virus by ELISA. En: Plant virology protocols. From virus isolation to transgenic resistance, Foster G. D. y Taylor, S.C.(eds.), pp.455-460. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Crescenzi, A., Barbarossa, L., Gallitelli, D. y Martelli, G.P. 1993.** Cucumber mosaic cucumovirus populations in Italy under natural epidemic conditions and after a satellite-mediated protection test. *Plant Disease* 77, 28-33.
- Davies, C. y Symons, R.H. 1988.** Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA 3. *Virology* 165, 216-224.
- Devic, M., Jaegle, M. y Baulcombe, D. 1989.** Symptom production on tobacco and tomato is determined by two distinct domains of the satellite RNA of cucumber mosaic virus (strain Y). *Journal of General Virology* 70, 2765-2774.
- Devic, M., Jaegle, M. y Baulcombe, D. 1990.** Cucumber mosaic virus satellite RNA (strain Y): analysis of sequences which affect systemic necrosis on tomato. *Journal of General Virology* 71, 1443-1449.
- Dietz, K. 1975.** Transmission and control of arbovirus diseases. En: Epidemiology, Ludwin, D. y Cooke, K.L.(eds.), pp.104-121. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, New Jersey.
- Ding, S.W., Anderson, B.J., Haase, H.R. y Symons, R.H. 1994.** New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology* 198, 593-601.

- Dinoor, A. y Eshed, N. 1987.** The analysis of host and pathogen populations in natural ecosystems. En: Populations of plant pathogens. Their dynamics and genetics, Wolfe, M.S. y Caten, C.E.(eds.), pp.75-88. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Donis-Keller, H., Browning, K.S. y Clarck, J.M. 1981.** Sequence heterogeneity in satellite tobacco necrosis virus RNA. *Virology* 110, 43-54.
- Duarte, E.A., Clarke, D.K., Moya, A., Domingo, E. y Holland, J.J. 1992.** Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proceedings of Natural Academy of Sciences USA* 89, 6015-6019.
- Ebert, D. 1994.** Virulence and local adaptation of a horizontally transmitted parasite. *Science* 265, 1084-1086.
- Ebert, D. 1998.** Experimental evolution of parasites. *Science* 282, 1432-1435.
- Edwardson y Christie. 1991.** CRC Handbook of viruses infecting legumes. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Fenner, F. 1995.** Classical studies of virus evolution. En: Molecular basis of virus evolution, Gibbs, A.J., Calisher, C.H., y García-Arenal, F.(eds.), pp.13-30. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fenner, F., Day, M.F. y Woodroffe, G.M. 1956.** Epidemiological consequences of mechanical transmission of myxomatosis by mosquitoes. *Journal of Hygiene* 54, 284-303.
- Fenner, F. y Ratcliffe, F.N. 1965.** Myxomatosis. Cambridge University Press. Cambridge.
- Finch, J.T., Klug, A. y Van Regenmortel, M.H.V. 1967.** The structure of cucumber mosaic virus. *Journal of Molecular Biology* 24, 303-305.
- Fine, P.E.M. 1975.** Vectors and vertical transmission: an epidemiological perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences* 266, 173-194.
- Fitch, W.M., Leiter, J.M.E., Li, X. y Palese, P. 1991.** Positive darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proceedings of Natural Academy of Sciences USA* 88, 4270-4274.
- Flor, H.H. 1955.** Host-parasite infection in flax rust-its genetics and other implications. *Phytopathology* 45, 680-685.
- Flor, H.H. 1971.** Current status of the gen-for-gen concept. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275-296.
- Fraile, A., Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Bernal, J.J., Malpica, J.M. y García-Arenal, F. 1997a.** Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. *Journal of Virology* 71, 934-940.
- Fraile, A., Escriu, F., Aranda, M.A., Malpica, J.M., Gibbs, A.J. y García-Arenal, F. 1997b.** A century of tobamovirus evolution in an australian population of *Nicotiana glauca*. *Journal of Virology* 71, 8316-8320.
- Fraile, A. y García-Arenal, F. 1991.** Secondary structure as a constraint on the evolution of a plant viral satellite RNA. *Journal of Molecular Biology* 221, 1065-1069.

- Fraile, A., García-Arenal, F. y Palukaitis, P. 1993.** *In vitro* interactions between cucumoviral satellite RNAs and RNAs of helper and non-helper viruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42, 195-204.
- Fraile, A., Malpica, J.M., Aranda, M.A., Rodríguez-Cerezo, E. y García-Arenal, F. 1996.** Genetic diversity in tobacco mild green mosaic tobamovirus infecting the wild plant *Nicotiana glauca*. *Virology* 223, 148-155.
- Francki, R.I.B., Mossop, D.W. y Hatta, T. 1979.** Cucumber mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* N° 213.
- Frank, S.A. 1992a.** A kin selection model for the evolution of virulence. *Proceedings of the Royal Society of London B* 250, 195-197.
- Frank, S.A. 1992b.** Models of plant-pathogen coevolution. *Trends in Genetics* 8, 213-219.
- Frank, S.A. 1996.** Models of parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology* 71, 37-78.
- Fraser, R.S.S. 1998.** Biochemistry of resistance to plant viruses. En: Plant virus disease control, Hadidi, A., Khetarpal, R.K., y Koganezawa, H.(eds.), pp.56-64. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Gallitelli, D. 1998.** Present status of controlling cucumber mosaic virus. En: Plant virus disease control, Hadidi, A., Khetarpal, R.K., y Koganezawa, H.(eds.), pp.507-523. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Gallitelli, D., Franco, A.D., Vovlas, C. y Kaper, J.M. 1988.** Infezioni miste del virus del mosaico del centriolo (CMV) e di potyvirus in colture ortive di Puglia e Basilicata. *Informatore Fitopatologico* 38, 57-64.
- Gallitelli, D., Grieco, F. y Cillo, F. 1997.** The potential of beneficial satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus to acquire deleterious functions: nature *versus* greenhouses. En: Virus-resistant transgenic plants: potencial ecological impact, Tepfer, M. y Balázs, E.(eds.), pp.100-106. Springer-Verlag, Berlín.
- Gallitelli, D., Vovlas, C., Martelli, G., Montasser, M.S., Tousignant, M.E. y Kaper, J.M. 1991.** Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus. II. Field test under natural epidemic conditions in southern Italy. *Plant Disease* 75, 93-95.
- García-Arenal, F., Fraile, A. y Malpica, J.M. 1999.** Genetic variability and evolution. En: Molecular biology of plant viruses, Mandahar, C.L.(ed.), pp.143-159. Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts.
- García-Arenal, F. y Palukaitis, P. 1999.** Structure and functional relationships of satellite RNAs of cucumber mosaic virus. En: Current topics in microbiology and immunology, Vogt, P.K. y Jackson, A.O.(eds.), Vol. 239, pp.37-63. Springer-Verlag, Berlín.
- García-Luque, I., Kaper, J.M., Díaz-Ruíz, J.R. y Rubio-Huertos, M. 1984.** Emergence and characterization of satellite RNAs associated with Spanish cucumber mosaic virus isolates. *Journal of General Virology* 65, 539-547.
- Garnett, G.P. y Antia, R. 1994.** Population biology of virus-host interactions. En: The evolutionary biology of viruses, Morse, S.S.(ed.), pp.51-73. Raven Press, New York.

- Gera, A., Loebenstein, G. y Raccach, B. 1979.** Protein coats of two strains of cucumber mosaic virus affect transmission by *Aphis gossypii*. *Phytopathology* 69, 396-399.
- Gerlach, W.L. y Bedbrook, J.R. 1979.** Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7, 1869-1885.
- Gibbs, A.J. 1999.** Evolution and origins of tobamoviruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 354, 593-602.
- Gibbs, A.J. y Gower, J.C. 1960.** The use of a multiple-transfer method in plant virus transmission studies. Some statistical point arising in the analysis of results. *Annals of applied Biology* 48, 75-83.
- Gibbs, A.J., Keese, P.L., Gibbs, M.J. y García-Arenal, F. 1999.** Plant virus evolution: past, present and future. En: Origin and evolution of viruses, Domingo, E., Webster, R., y Holland, J.(eds.), pp.263-285. Academic Press, San Diego, California.
- Gibbs, M.J., Armstrong, J., Weiler, G.F. y Gibbs, A.J. 1997.** Virus evolution: the past, a window on the future? En: Virus-resistant transgenic plants: potential ecological impact, Tepfer, M. y Balázs, E.(eds.), pp.1-19. Springer-Verlag, Berlín.
- Gillespie, J.H. 1975.** Natural selection for resistance to epidemics. *Ecology* 56, 493-495.
- Gojobori, T., Moriyama, E.N. y Kimura, M. 1990.** Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Proceedings of Natural Academy of Sciences USA* 87, 10015-10018.
- Gonsalves, D., Provvidenti, R. y Edwards, M.C. 1982.** Tomato white leaf: the relation of an apparent satellite RNA and cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 72, 1533-1538.
- Gordon, K.H.J. y Symons, R.H. 1983.** Satellite RNA of cucumber mosaic virus forms a secondary structure with partial 3'-terminal homology to genomic RNA. *Nucleic Acids Research* 11, 947-960.
- Gray, S.M. y Banerjee, N. 1999.** Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 128-148.
- Gray, S.M., Power, A.G., Smith, D.M., Seaman, A.J. y Altman, N.S. 1991.** Aphid transmission of barley yellow dwarf virus: acquisition access periods and virus concentration requirements. *Phytopathology* 81, 539-545.
- Grieco, F., Cillo, F., Barbarossa, L. y Gallitelli, D. 1992.** Nucleotide sequence of a cucumber mosaic virus satellite RNA associated with a tomato top stunting. *Nucleic Acids Research* 20, 6733.
- Grieco, F., Lanave, C. y Gallitelli, D. 1997.** Evolutionary dynamics of cucumber mosaic virus satellite RNA during natural epidemics in Italy. *Virology* 229, 166-174.
- Habili, N. y Kaper, J.M. 1981.** Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. VII. Double-stranded form accumulation and disease attenuation in tobacco. *Virology* 112, 250-261.
- Hamilton, W.D. 1972.** Altruism and related phenomena, mainly in social insects. *Annual Review of Ecology and Systematics* 3, 193-232.
- Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.

- Harrison, B.D., Mayo, M.A. y Baulcombe, D.C. 1987.** Virus resistance in transgenic plants express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328, 799-802.
- Hayes, R.J. y Buck, K.W. 1990.** Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63, 363-368.
- Hermoso de Mendoza, A. y Moreno, P. 1989.** Cambios cuantitativos en la fauna afídica de los cítricos valencianos. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 15, 139-142.
- Herre, E.A. 1993.** Population structure and the evolution of virulence in nematode parasites of fig wasps. *Science* 259, 1442-1445.
- Hillman, B.I., Anzola, J.V., Halpern, B.T., Cavileer, T.D. y Nuss, D.L. 1991.** First field isolation of wound tumor virus from a plant host: minimal sequence divergence from the type strain isolated from an insect vector. *Virology* 185, 896-900.
- Holmes, J.C. 1982.** Impact of infectious disease agents on the population growth and geographical distribution of animals. En: Population biology of infectious diseases, Anderson, R.M. y May, R.M.(eds.), pp.37-51. Springer-Verlag, Berlín.
- Jacquemond, M. 1982a.** L'ARN satellite du virus de la mosaïque du concombre IV. Transmission expérimentale de la maladie nécrotique de la tomate par pucerons. *Agronomie* 2, 641-646.
- Jacquemond, M. 1982b.** Phénomènes d'interférences entre les deux types d'ARN satellite du virus de la mosaïque du concombre. Protection des tomates vis-à-vis de la nécrose létale. *C.R. Académie des Sciences*. 294, 991-994.
- Jacquemond, M. y Leroux, J.P. 1982.** L'ARN satellite du virus de la mosaïque du concombre II. Etude de la relation virus-ARN satellite chez divers hôtes. *Agronomie* 2, 55-62.
- Jacquemond, M. y Lot, H. 1981.** L'ARN satellite du virus de la mosaïque du concombre I. Comparaison de l'aptitude à induire la nécrose de la tomate d'ARN satellite isolés de plusieurs souches du virus. *Agronomie* 1, 927-932.
- Jacquemond, M. y Tepfer, M. 1998.** Satellite RNA-mediated resistance to plant viruses: are the ecological risks well assessed? En: Plant virus disease control, Hadidi, A., Khetarpal, R.K., y Koganezawa, H.(eds.), pp. 94-120. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Jakab, G., Vaistij, F.E., Droz, E. y Malnoë, P. 1997.** Transgenic plants expressing viral sequences create a favourable environment for recombination between viral sequences. En: Virus-resistant transgenic plants: potential ecological impact, Tepfer, M. y Balázs, E.(eds.), pp.45-51. Springer-Verlag, Berlín.
- Jordá, C., Alfaro, A., Aranda, M.A., Moriones, E. y García-Arenal, F. 1992.** Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes in eastern Spain. *Plant Disease* 76, 363-366.
- Kaper, J.M. y Geelen, J.M.L.C. 1971.** Studies on the stabilizing forces of simple RNA viruses.II. Stability, dissociation and reassembly of cucumber mosaic virus. *Journal of Molecular Biology* 56, 277-294.

- Kaper, J.M., Geletka, L.M., Wu, G.S. y Tousignant, M.E. 1995.** Effect of temperature on cucumber mosaic virus satellite-induced lethal tomato necrosis is helper virus strain dependent. *Archives of Virology* 140, 65-74.
- Kaper, J.M. y Tousignant, M.E. 1977.** Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. I. Role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA 5 with virions. *Virology* 80, 186-195.
- Kaper, J.M., Tousignant, M.E. y Lot, H. 1976.** A low molecular weight replicating RNA associated with a divided genome plant virus: defective or satellite RNA?. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 72, 1237-1243.
- Kaper, J.M., Tousignant, M.E. y Steen, M.T. 1988.** Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. XI. Comparison of 14 CARNA 5 variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence. *Virology* 163, 284-292.
- Kaper, J.M. y Waterworth, H.E. 1977.** Cucumber mosaic virus-associated RNA 5: causal agent for tomato necrosis. *Science* 196, 429-431.
- Kaplan, I.B. y Palukaitis, P. 1998.** Characterization of cucumber mosaic virus VI. Generation of deletions in defective RNA 3s during passage in transgenic tobacco expressing the 3a gene. *Virology* 251, 279-287.
- Kaplan, I.B., Shintaku, M.H., Li, Q., Zhang, L., Marsh, L.E. y Palukaitis, P. 1995.** Complementation of virus movement in transgenic tobacco expressing the cucumber mosaic virus 3a gene. *Virology* 209, 188-199.
- Kataoka, J., Masuya, C. y Takanami, Y. 1990a.** Complete nucleotide sequence of RNA 1 of cucumber mosaic virus Y strain and evolutionary relationships among genome RNAs of the virus strains. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 56, 501-507.
- Kataoka, J., Masuya, C. y Takanami, Y. 1990b.** Complete nucleotide sequence of RNA 2 of cucumber mosaic virus Y strain. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 56, 495-500.
- Kearney, C.M., Zitter, T.A. y Gonsalves, D. 1990.** A field survey for serogroups and the satellite RNA of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 80, 1238-1243.
- Kennedy, J.S., Day, M.F. y Eastop, V.F. 1962.** A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Agricultural Bureaux, London.
- Kimura, M. 1968.** Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217, 624-626.
- Kofalvi, S.A., Marcos, J.F., Cañizares, M.C., Pallás, V. y Candresse, T. 1997.** Hop stunt viroid (HSVd) sequence variants from *Prunus* species: evidence for recombination between HSVd isolates. *Journal of General Virology* 78, 3177-3186.
- Kosaka, Y., Hanada, K., Fukunishi, T. y Tochiyama, H. 1989.** Cucumber mosaic virus isolate causing tomato necrosis disease in Kyoto Prefecture. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55, 229-232.
- Kurath, G. y Dodds, J.A. 1995.** Mutation analyses of molecularly cloned satellite tobacco mosaic virus during serial passage in plants: evidence for hotspots of genetic change. *RNA* 1, 491-500.

- Kurath, G., Heick, J.A. y Dodds, J.A. 1993.** RNase protection analyses show high genetic diversity among field isolates of satellite tobacco mosaic virus. *Virology* 194, 414-418.
- Kurath, G. y Palukaitis, P. 1989a.** RNA sequence heterogeneity in natural populations of three satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology* 173, 231-240.
- Kurath, G. y Palukaitis, P. 1989b.** Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: recombinants constructed in vitro reveal independent functional domains for chlorosis and necrosis in tomato. *Molecular Plant Microbe Interactions* 2, 91-96.
- Kurath, G. y Palukaitis, P. 1990.** Serial passage of infectious transcripts of a cucumber mosaic virus satellite RNA clone results in sequence heterogeneity. *Virology* 176, 8-15.
- Lartey, R.T., Voss, T.C. y Melcher, U. 1996.** Tobamovirus evolution: gene overlaps recombination, and taxonomic implications. *Molecular and Biological Evolution*. 13, 1327-1338.
- Lecoq, H. 1998.** Control plant virus diseases by cross-protection. En: Plant virus disease control, Hadidi, A., Khetarpal, R.K., y Koganezawa, H.(eds.), pp.33-40. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Lennard, P.R. 1990.** Image analysis for all. *Nature* 347, 103-104.
- Lenski, R.E. 1988.** Evolution of plague virulence. *Nature* 334, 473-474.
- Lenski, R.E. y May, R.M. 1994.** The evolution of virulence in parasites and pathogens: reconciliation between two competing hypotheses. *Journal of Theoretical Biology* 169, 253-265.
- Leonard, K.J. y Czocho, R.J. 1980.** Theory of genetic interactions among populations of plants and their pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 18, 237-258.
- Levin, B.R. y Bull, J.J. 1994.** Short-sighted evolution and the virulence of pathogenic microorganisms. *Trends in Microbiology* 2, 76-81.
- Levin, S. y Pimentel, D. 1981.** Selection of intermediate rates of increase in parasite-host systems. *The American Naturalist* 117, 308-315.
- Li, H.W., Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., Ji, L.H., Wong, S.M. y Ding, S.W. 1999.** Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *The EMBO Journal* 18, 2683-2691.
- Lipsitch, M., Herre, E.A. y Nowak, M.A. 1995.** Host population structure and evolution of virulence: a law of diminishing returns. *Evolution* 49, 743-748.
- Loebenstein, G. y Raccach, B. 1980.** Control of non-persistently transmitted aphid-borne viruses. *Phytoparasitica* 59, 49-62.
- Lot, H. y Kaper, J.M. 1976.** Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus. *Virology* 74, 223-226.
- Lot, H., Marrou, J., Quiot, J.B. y Esvan, C. 1972.** Contribution à l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). Méthode de purification rapide du virus. *Annales de Phytopathologie* 4, 25-38.

- Luis-Arteaga, M., Alvarez, J.M., Alonso-Prados, J.L., Bernal, J.J., García-Arenal, F., Laviña, A., Batlle, A. y Moriones, E. 1998.** Occurrence, distribution, and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. *Plant Disease* 82, 979-982.
- Luis-Arteaga, M., Rodríguez-Cerezo, E., Maestro, C. y García-Arenal, F. 1988.** Detection and characterization of an isolate of cucumber mosaic virus (CMV) infecting borage (*Borago officinalis*) in Spain. *Plant Disease* 72, 265-267.
- Lynch, M.R., Burger, R., Butcher, D. y Gabriel, W. 1993.** The mutational meltdown in asexual populations. *Journal of Heredity* 84, 339-344.
- Mackinnon, M.J. y Read, A.F. 1999.** Genetic relationships between parasite virulence and transmission in the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Evolution* 53, 689-703.
- Maroto, J.V. 1989.** Horticultura herbacea especial. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.
- Marrou, J., Duteil, M., Lot, H. y Clerjeau, H. 1973.** La nécrose de la tomate: une grave virosedes tomates cultivées en plein champ. *Pepinières Horticulture Maraichère* 137, 37-41.
- Masuta, J. y Takanami, Y. 1989.** Determination sequence and structural requirements for pathogenicity of a cucumber mosaic virus satellite RNA (Y-satellite RNA). *Plant Cell* 1, 1165-1173.
- May R.M. 1993.** Resisting resistance. *Nature* 361, 593-594.
- May, R.M. 1995.** The co-evolutionary dynamics of viruses and their hosts. En: Molecular basis of virus evolution, Gibbs, A.J., Calisher, C.H., y García-Arenal, F.(eds.), pp.192-212. Cambridge University Press, Cambridge.
- May, R.M. y Anderson, R.M. 1983.** Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proceedings of the Royal Society of London B* 219, 281-313.
- May, R.M. y Anderson, R.M. 1990.** Parasite-host coevolution. *Parasitology* 100, S89-S101.
- Maynard Smith, J. 1989.** Evolutionary genetics. Oxford University Press, Oxford.
- Mayr, E. 1994.** Driving forces in evolution:an analysis of natural selection. En: The evolutionary biology of viruses, Morse, S.S.(ed.), pp.29-48. Raven Press, Ltd., New York.
- McGarvey, P.B., Kaper, J.M., Ávila-Rincón, M.J., Peña, L y Díaz-Ruíz, J.R. 1990.** Transformed tomato plants express a satellite RNA of cucumber mosaic virus and produce lethal necrosis upon infection with viral RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 170, 548-555.
- McGarvey, P.B., Montasser, M.S. y Kaper, J.M. 1994.** Transgenic tomato plants expressing satellite RNA are tolerant to some strains of cucumber mosaic virus. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences.* 119, 642-647.
- McKenzie, J.A. y Batterham, P. 1994.** The genetic, molecular and phenotypic cosequences of selection for insecticide resistance. *Tree* 9, 166-170.

- McKinney, H.H. 1935.** Evidence of virus mutation in the common mosaic of tobacco. *Journal of Agricultural Research* 51, 951-981.
- Melia, A. 1989.** Utilización de trampas amarillas en el control de los pulgones (*Homoptera, Aphididae*) de los cítricos. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 15, 175-185.
- Melia, A. 1995.** Muestreo de poblaciones y actividad de vuelo de *Aphis frangulae gossypii* Glover (*Homoptera, Aphididae*) y otros pulgones sobre cítricos en Castellón. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 21, 601-610.
- Messenger, S.L., Molineux, I.J. y Bull, J.J. 1999.** Virulence evolution in a virus obeys a trade-off. *Proceedings of the Royal Society of London B* 266, 397-404.
- Montasser, M.S., Tousignant, M.E. y Kaper, J.M. 1991.** Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: I. Greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. *Plant Disease* 75, 86-92.
- Monti, M.M., Valanzuolo, S., Cassani, G. y Colombo, M. 1999.** Transgenic tomatoes expressing a cucumber mosaic virus satellite RNA: field testing and analysis of satellite RNA spread. *Journal of Plant Pathology* 81, 113-122.
- Moreno, I.M., Bernal, J.J., García de Blas, B., Rodríguez-Cerezo, E. y García-Arenal, F. 1997.** The expression level of the 3a movement protein determines differences in severity of symptoms between two strains of tomato aspermy cucumovirus. *Molecular Plant Microbe Interactions* 10, 171-179.
- Moriones, E., Díaz, I., Rodríguez-Cerezo, E., Fraile, A. y García-Arenal, F. 1992.** Differential interactions among strains of tomato aspermy virus and satellites RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology* 186, 475-480.
- Moriones, E., Fraile, A. y García-Arenal, F. 1991.** Host-associated selection of sequence variants from a satellite RNA of cucumber mosaic virus. *Virology* 184, 465-468.
- Moriones, E. y Luis, M. 1996.** Métodos de control de las virosis. En: Patología vegetal, Llácer, G., López, M.M., Trapero, A., y Bello, A.(eds.), Vol. I, pp.333-377. Sociedad Española de Fitopatología, M.V. Phytoma-España S.L.
- Morse, S.S. 1994.** Toward an evolutionary biology of viruses. En: The evolutionary biology of viruses, Morse, S.S.(ed.), pp.1-28. Raven Press, Ltd., New York.
- Mossop, D.W. y Francki, R.I.B. 1977.** Association of RNA 3 with aphid transmission of cucumber mosaic virus. *Virology* 81, 177-181.
- Mossop, D.W. y Francki, R.I.B. 1979.** Comparative studies on two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology* 95, 395-404.
- Moya, A., Rodríguez-Cerezo, E. y García-Arenal, F. 1993.** Genetic structure of natural populations of the plant RNA virus tobacco mild green mosaic virus. *Mol. Biol. Evol.* 10, 449-456.
- Muller, H.J. 1964.** The relation of recombination to mutational advance. *Mutational Research* 1, 2-9.
- Nei, M. 1987.** Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

- Ng, J. y Perry, K.L. 1999.** Stability of the aphid transmission phenotype in cucumber mosaic virus. *Plant Pathology* 48, 388-394.
- Nitta, N., Takanami, Y., Kuwata, S. y Kubo, S. 1988.** Comparative studies on the nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 3 between Y strain and Q strain. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 54, 516-522.
- Normand, R.A. y Pirone, T.P. 1968.** Differential transmission of strains of cucumber mosaic virus by aphids. *Virology* 36, 538-544.
- Novella, I.S., Duarte, E.A., Elena, S.F., Moya, A., Domingo, E. y Holland, J.J. 1995.** Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proceedings of Natural Academy of Sciences USA* 92, 5841-5844.
- Nowak, M.A. y May, R.M. 1994.** Superinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society of London B* 255, 81-89.
- Owen, J. y Palukaitis, P. 1988.** Characterization of cucumber mosaic virus: I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166, 495-502.
- Owen, J., Shintaku, M., Aeschleman, P., Ben Tahar, S. y Palukaitis, P. 1990.** Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA3. *Journal of General Virology* 71, 2243-2249.
- Palmieri, J.R. 1982.** Be fair to parasites. *Nature* 298, 220.
- Palukaitis, P. 1988.** Pathogenicity regulation by satellite RNAs of cucumber mosaic virus: minor nucleotide sequence changes alter host responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1, 175-181.
- Palukaitis, P. y García-Arenal, F. 1999.** Cucumber mosaic virus. En: Descriptions of plant viruses on CD-ROM, Adams, M.J., Antoni, J.F., Baker, W.H., Jones, A.T., Murant, A.F., y Robinson, D.J.(eds.). Association of Applied Biologists, Wellesbourne, United Kingdom.
- Palukaitis, P. y Roossinck, M.J. 1995.** Variation in the hypervariable region of cucumber mosaic virus satellite RNAs is affected by the helper virus and the initial sequence context. *Virology* 206, 765-768.
- Palukaitis, P. y Roossinck, M.J. 1996.** Spontaneous change of a benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotechnology* 14, 1264-1268.
- Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. y Francki, R.I.B. 1992.** Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research* 41, 281-348.
- Palukaitis, P. y Zaitlin, M. 1984.** Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: Characterization of two new satellites. *Virology* 132, 426-435.
- Palukaitis, P. y Zaitlin, M. 1997.** Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Advances in Virus Research* 48, 349-377.
- Perry, K.L. 2000.** Cucumoviruses. En: Virus-insect-plant interactions, Harris, K.F., Duffus, J.E., Smith, O.P. (eds.). Academic Press (en prensa).

- Perry, K.L. y Francki, R.I.B. 1992.** Insect-mediated transmission of mixed and reassorted cucumovirus genomic RNAs. *Journal of General Virology* 73, 2105-2114.
- Perry, K.L., Zhang, L. y Palukaitis, P. 1998.** Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology* 242, 204-210.
- Perry, K.L., Zhang, L., Shintaku, M.H. y Palukaitis, P. 1994.** Mapping determinants in cucumber mosaic virus for transmission by *Aphis gossypii*. *Virology* 205, 591-595.
- Piazzolla, P., Tousignant, M.E. y Kaper, J.M. 1982.** Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. IX. The overtaking of viral RNA synthesis by CARNA 5 and dsCARNA 5 in tobacco. *Virology* 122, 147-157.
- Pirone, T.P. y Blanc, S. 1996.** Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 34, 227-247.
- Pirone, T.P. y Harris, K.F. 1977.** Nonpersistent transmission of plant viruses by insects. *Annual Review of Phytopathology* 15, 55-73.
- Pirone, T.P. y Megahed, E. 1966.** Aphid transmissibility of some purified viruses and viral RNA's. *Virology* 30, 631-637.
- Power, A.G. 1992.** Patterns of virulence and benevolence in insect-borne pathogens of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11, 351-372.
- Qiu, W.P., Geske, S.M., Hickey, C.M. y Moyer, J.W. 1998.** Tomato spotted wilt *Tospovirus* genome reassortment and genome segment-specific adaptation. *Virology* 244, 186-194.
- Queller, D.C. 1992.** A general model for kin selection. *Evolution* 46, 376-380.
- Quemada, H., Kearney, C., Gonsalves, D. y Slightom, J.L. 1989.** Nucleotide sequences of the coat protein genes and flanking regions of cucumber mosaic virus strains C and WL RNA 3. *Journal of General Virology* 70, 1065-1073.
- Racah, B., Gal-On, A. y Eastop, V.F. 1985.** The role of flying aphid vectors in the transmission of cucumber mosaic virus and potato virus Y to peppers in Israel. *Annals of Applied Biology* 106, 451-460.
- Read, A.F. 1994.** The evolution of virulence. *Trends in Microbiology* 2, 73-81.
- Reddy, D.V.R. y Black, L.M. 1977.** Isolation and replication of mutant populations of wound tumour virions lacking certain genome segments. *Virology* 80, 336-346.
- Rezaian, M.A. y Symons, R.H. 1986.** Anti-sense regions in satellite RNA of cucumber mosaic virus from stable complexes with the viral coat protein gene. *Nucleic Acids Research* 14, 3229-3239.
- Rezaian, M.A., Williams, R.H. y Symons, R.H. 1985.** Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 1. Presence of a sequence complementary to part of the viral satellite RNA and homologies with other viral RNAs. *European Journal of Biochemistry* 150, 331-339.
- Richards, K.E., Jonard, G., Jacquemond, M. y Lot, H. 1978.** Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus-associated RNA 5. *Virology* 89, 395-408.

- Rizzo, T.M. y Palukaitis, P. 1988.** Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 2. *Journal of General Virology* 69, 1777-1787.
- Rizzo, T.M. y Palukaitis, P. 1989.** Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 1. *Journal of General Virology* 70, 1-11.
- Rizzo, T.M. y Palukaitis, P. 1990.** Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3: generation of infectious RNA transcripts. *Molecular and General Genetics* 222, 249-256.
- Rodriguez-Alvarado, G., Kurath, G. y Dodds, J.A. 1995.** Heterogeneity in pepper isolates of cucumber mosaic virus. *Plant Disease* 79, 450-455.
- Rodriguez-Alvarado, G. y Roossinck, M.J. 1997.** Structural analysis of a necrogenic strain of cucumber mosaic cucumovirus satellite RNA *in planta*. *Virology* 236, 155-166.
- Roossinck, M.J. 1997.** Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* 35, 191-209.
- Roossinck, M.J. y Palukaitis, P. 1995.** Genetic analysis of helper virus-specific selective amplification of cucumber mosaic virus satellite RNA. *Journal of Molecular Evolution* 40, 25-29.
- Roossinck, M.J., Zhang, L. y Hellwald, K. 1999.** Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology* 73, 6752-6758.
- Ryabov, E.V., Roberts, I.M., Palukaitis, P. y Taliansky, M. 1999.** Host-specific cell-to-cell and long-distance movements of cucumber mosaic virus are facilitated by the movement protein of Groundnut Rossette virus. *Virology* 260, 98-108.
- Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. y Takanami, Y. 1992.** Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theoretical Applied Genetics* 83, 679-683.
- Sala, M. y Wain-Hobson, S. 1999.** Drift and conservatism in RNA virus evolution: are they adapting or merely changing? En: Origin and evolution of viruses, Domingo, E., Webster, R., y Holland, J.(eds.), pp.115-140. Academic Press, San Diego, California.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977.** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of Natural Academy of Sciences USA* 74, 5463-5467.
- Sanz, A.I., Fraile, A., Gallego, J.M., Malpica, J.M. y García-Arenal, F. 1999.** Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. *Journal of Molecular Evolution* 49, 672-681.
- Satapathy, M.K. 1998.** Chemical control of insect and nematode vectors of plant viruses. En: Plant virus disease control, Hadidi, A., Khetarpal, R.K., y Koganezawa, H.(eds.), pp.188-195. APS Press, St. Paul, Minnesota.

- Sayama, H., Sato, T., Kominato, M., Natsuaki, T. y Kaper, J.M. 1993.** Field testing of a satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology* 83, 405-410.
- Schwinghamer, M.W. y Symons, R.H. 1975.** Fractionation of cucumber mosaic virus RNA and its translation in a wheat embryo cell-free system. *Virology* 63, 252-262.
- Simons, J.N. 1957.** Three strains of cucumber mosaic virus affecting bell pepper in the everglades area of south Florida. *Phytopathology* 47, 145-150.
- Simons, J.N. 1958.** Titers of three non-persistent aphid-borne viruses affecting pepper in South Florida. *Phytopathology* 48, 265-268.
- Skotnicki, M.L., Mackenzie, A.M., Ding, S.W., MO, J.Q. y Gibbs, A.J. 1993.** RNA hybrid mismatch polymorphisms in Australian populations of turnip yellow mosaic tymovirus. *Archives of Virology* 132, 83-99.
- Skotnicki, M.L., Mackenzie, A.M. y Gibbs, A.J. 1996.** Genetic variation in populations of kennedy yellow mosaic tymovirus. *Archives of Virology* 141, 99-110.
- Sleat, D.E. y Palukaitis, P. 1990.** Site-directed mutagenesis of a plant viral satellite RNA changes its phenotype from ameliorative to necrogenic. *Proceedings of Natural Academy of Sciences USA* 87, 2946-2950.
- Sleat, D.E., Zhang, L. y Palukaitis, P. 1994.** Mapping determinants within cucumber mosaic virus and its satellite RNAs for the induction of necrosis in tomato plants. *Molecular Plant Microbe Interactions* 7, 189-195.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. 1981.** Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. W.H. Freeman and Company, New York.
- Takanami, Y. 1981.** A striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology* 109, 120-126.
- Thompson, J.R. y García-Arenal, F. 1998.** The bundle sheath-phloem interface of *Cucumis sativus* is a boundary to systemic infection by tomato aspermy virus. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11, 109-114.
- Tien, P. y Wu, G. 1991.** Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. *Advances in Virus Research* 39, 321-339.
- Tomlinson, J.A. 1987.** Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals of Applied Biology* 110, 661-681.
- Turner, P.E., Cooper, V.S. y Lenski, R.E. 1998.** Tradeoff between horizontal and vertical modes of transmission in bacterial plasmids. *Evolution* 52, 315-329.
- Van Baalen, M. y Sabelis, M.W. 1995.** The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *American Naturalist* 146, 880-910.
- Van Regenmortel, M.H.V. 1999.** Virus taxonomy: seventh report of the international committee on the taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, California.

- Walsh, J.A. 1998.** Chemical control of fungal vectors of plant viruses. En: Plant virus disease control, Hadidi, A., Khetarpal, R.K., y Koganezawa, H.(eds.), pp. 196-207. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- White, J.L., Tousignant, M.E., Geletka, L.M. y Kaper, J.M. 1995.** The replication of a necrogenic cucumber mosaic virus satellite is temperature-sensitive in tomato. *Archives of Virology* 140, 53-63.
- Wikoff, W.R., Tsai, C.J., Wang, G., Baker, T.S. y Johnson, J.E. 1997.** The structure of cucumber mosaic virus-cryoelectron microscopy, x-ray crystallography and sequence analysis. *Virology* 232, 91-97.
- Wu, G., Kang, L. y Tien, P. 1989.** The effect of satellite RNA on cross-protection among cucumber mosaic virus strains. *Annals of Applied Biology* 114, 489-496.
- Wu, G. y Kaper, J.M. 1992.** Widely separated sequence elements within cucumber mosaic virus satellites contribute to their ability to induce lethal tomato necrosis. *Journal of General Virology* 73, 2805-2812.
- Wu, G., Kaper, J.M., Tousignant, M.E., Masuta, C., Kuwata, S., Takanami, Y., Peña, L. y Díaz-Ruíz, J.R. 1993.** Tomato necrosis and the 369 nucleotide Y satellite of cucumber mosaic virus: factors affecting satellite biological expression. *Journal of General Virology* 74, 161-168.
- Yie, Y. y Tien, P. 1993.** Plant virus satellite RNAs and their role in engineering resistance to virus diseases. *Seminars in Virology* 4, 363-368.
- Yorke, J.A., Nathanson, N., Pianigiani, G. y Martin, J. 1979.** Seasonality and the requirements for perpetuation and eradication of viruses in populations. *American Journal of Epidemiology* 109, 103-123.
- Yoshida, K., Gotto, T. y Iizuka, N. 1985.** Attenuated isolates of cucumber mosaic virus produced by satellite RNA and cross-protection between attenuated isolates and virulent ones. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 51, 238-242.
- Zhang, X.-S., Holt, J. y Colvin, J. 2000.** Mathematical models of host plant infection by helper-dependent virus complexes: why are helper viruses always avirulent?. *Phytopathology* 90, 85-93.

ANEJO

Tabla 6.1 Valores de la tasa neta reproductiva de CMV y de CMV con RNAsat.

Patógeno	Tasa neta reproductiva (R_0) ^a						
	$i = 0,5$	$i = 1$	$i = 2$	$i = 4$	$i = 7$	$i = 10$	$i = 30$
CMV	11,433480	19,28892	28,394190	34,721202	36,344446	36,515186	36,535257
CMV y RNAsat necrogénicos:							
89/15.2	2,397591	4,489466	7,907025	12,489035	16,017865	17,574529	18,797984
89/20.1	2,321555	4,392991	7,890390	12,891517	17,179942	19,343916	21,525083
90/17.1	1,771472	3,366708	6,096860	10,106161	13,700080	15,616593	17,773185
90/19.2	1,745555	3,317540	6,008116	9,9599316	13,503263	15,393426	17,521804
91/2.2	1,666953	3,180854	5,804417	9,7531163	13,440835	15,510027	18,099208
Total	2,035189	3,855751	6,941142	11,385749	15,244069	17,221046	19,274445
CMV y RNAsat no necrogénicos:							
89/15.1	6,452423	11,853888	20,160733	30,061262	36,327048	38,483320	39,613799
89/42.1	6,573614	12,112043	20,709741	31,145023	37,952733	40,387712	41,742214
90/22.1	5,866430	10,894006	18,895243	29,087997	36,296358	39,152272	41,022306
91/5.1	7,399731	13,471517	22,541728	32,760270	38,647444	40,444284	41,233328
94/32.1	5,905051	10,979874	19,089328	29,502407	36,964887	39,971420	41,995267
Total	6,523655	12,029406	20,59772	31,047843	37,920556	40,404156	41,807924

^a Tasa neta reproductiva para distintos valores del número de pulgones por planta i , según los valores de la tasa de transmisión $\beta_2(i)$ indicados en la Tabla 4.16.

Tabla 6.2 Valores de la tasa de dispersión de CMV y CMV con RNAsat.

Patógeno	Tasa de dispersión (E_0) ^a						
	$i = 0,5$	$i = 1$	$i = 2$	$i = 4$	$i = 7$	$i = 10$	$i = 30$
CMV	0,114229	0,200233	0,299920	0,369190	0,386962	0,388831	0,389051
CMV y RNAsat necrogénicos:							
89/15.2	0,029730	0,074231	0,146932	0,244405	0,319474	0,352588	0,378615
89/20.1	0,024532	0,062984	0,127906	0,220743	0,300349	0,340519	0,381008
90/17.1	0,017330	0,053165	0,114495	0,204560	0,285294	0,328346	0,376792
90/19.2	0,016988	0,052807	0,114115	0,204161	0,284900	0,327970	0,376467
91/2.2	0,014694	0,048048	0,105851	0,192849	0,274097	0,319685	0,376730
Total	0,021456	0,059191	0,123141	0,215265	0,295236	0,336213	0,378774
CMV y RNAsat no necrogénicos:							
89/15.1	0,055054	0,109594	0,193470	0,293439	0,356706	0,378478	0,389893
89/42.1	0,053408	0,106478	0,188864	0,288858	0,354092	0,377424	0,390403
90/22.1	0,047447	0,096465	0,174476	0,273854	0,344134	0,371979	0,390212
91/5.1	0,062082	0,120983	0,208972	0,308100	0,365211	0,382642	0,390296
94/32.1	0,046714	0,095046	0,172279	0,271451	0,342522	0,371156	0,390431
Total	0,052845	0,105552	0,299920	0,287473	0,353226	0,376987	0,390417

^a Tasa de dispersión para distintos valores del número de pulgones por planta i , según los valores de la tasa de transmisión $\beta_2(i)$ indicados en la Tabla 4.16.