



**Detección de enfermedades virales en la judía
(Phaseolus vulgaris L. y Phaseolus coccineus L.) de El
Barco de Ávila (IGP), mediante técnicas
inmunoenzimáticas**

Autor: Diana Arribas Ares

Institución: Universidad Católica de Ávila

Otros autores: Alicia Tabasco Pérez (Universidad Católica de Ávila); Guillermo Pérez Andueza (Universidad Católica de Ávila); Cristina Lucini Baquero (Universidad Católica de Ávila)

Resumen

Dado que España es el principal país productor europeo de judía de grano (*Phaseolus vulgaris* L.) y judión (*Phaseolus coccineus* L.); y Castilla y León como Comunidad Autónoma posee más de un 50% de la producción total española, se estima necesario realizar el presente estudio con la intención de mejorar la calidad de dichos cultivos.

Nuestro estudio se encuentra más concretamente ubicado en la comarca de El Barco de Ávila-Piedrahíta, lugar de procedencia de un cultivo de gran importancia económica, social y agronómica: las "Judías de El Barco", avaladas con su sello de calidad IGP que celebra este año 2014 su 25 aniversario.

En la actualidad, plagas y enfermedades merman cada año la producción de estas judías, afectando a su calidad y teniendo graves repercusiones económicas.

Se han estudiado las cinco variedades más comúnmente cultivadas de judía en esta zona: Blanca Arrocina, Blanca Redonda, Blanca Riñón y Morada Larga pertenecientes todas ellas a la especie *Phaseolus vulgaris* L. y Judión de El Barco (*Phaseolus coccineus* L.)

El presente trabajo se centra en el estudio de las virosis que afectan a estos cultivos. Se han seleccionado para su análisis los dos potyvirus con mayor incidencia histórica ("virus del mosaico común de la judía" (BCMV) y "virus del mosaico común necrótico de la judía" (BCMNV)) y dos virus más, no tan estudiados, pero de reciente relevancia en nuestro país (el cucumovirus "virus del mosaico del pepino" (CMV) y el Tospovirus "virus del bronceado del tomate" (TSWV)).

Para la detección de la infectividad de estos virus se ha puesto a punto la técnica ELISA, con el objetivo de determinar y estudiar la influencia e importancia de cada una de estas enfermedades víricas en el cultivo de la judía bajo la IGP "El Barco de Ávila".

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L.; IGP Judías de El Barco; calidad nutricional

1. INTRODUCCIÓN

1.1 JUSTIFICACIÓN

El alto contenido en proteínas, minerales, fibra y vitaminas que posee la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) hace que esta sea una de las leguminosas más consumidas en el mundo, sólo por detrás de la soja y el cacahuete. Su consumo, bien sea como hortaliza (vainas) o en forma de grano seco, satisface en gran medida las necesidades básicas del organismo. Cabe destacar que la calidad de las proteínas vegetales aportadas por la judía es muy similar a la de las proteínas animales y de un coste mucho menor, por lo que es una alternativa muy favorable a las mismas. Además, sus restos son comunmente utilizados como abono o alimento para el ganado (SINGH, 2001).

Otro punto a favor de este cultivo es su acción fertilizante, ya que fija nitrógeno por simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, característica que le aporta gran interés agronómico, disminuyendo el uso de fertilizantes dañinos para el medio ambiente.

Desde que el consumo de judías en Europa está basado principalmente en las importaciones (NEGRI y TOSTI, 2002), varios países europeos están centrados en la promoción de productos con certificación de origen, ya que los consumidores solicitan cada vez más productos sanos y saludables dotados de unas características de calidad determinadas (ESCRIBANO et al., 1997; PIERGIOVANNI et al., 2000).

Según datos de ESYRCE 2013, aunque viene observándose un descenso en los dos últimos años, actualmente existen 4287 ha dedicadas al cultivo de judías secas en España. De éstas, 2872 ha pertenecen a la Comunidad Autónoma de Castilla y León, primera de España en producción de esta legumbre y en posesión de dos Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP), siendo una de ellas “El Barco de Ávila”.

Centrándonos en la provincia de Ávila podemos decir que existen dos zonas productoras: “La Moraña” y “El Barco de Ávila-Piedrahíta”, siendo esta segunda de mayor importancia, por volumen de producción y por poseer Indicación Geográfica Protegida (IGP). Localizado en el extremo suroccidental de la provincia de Ávila posee una superficie de 86 ha dedicadas al cultivo de judía con IGP, figura bajo la cual se encuentran protegidas siete variedades: blanca redonda, blanca riñón, morada larga, morada redonda, arrocina, planchada (todas ellas *Phaseolus vulgaris* L.) y judión de Barco (*Phaseolus coccineus* L.). En nuestro estudio hemos incluido las cinco variedades de mayor implantación e interés comercial, excluyendo la morada redonda y la blanca planchada.

Una limitación en el cultivo de las judías es la gran cantidad de enfermedades y plagas de artrópodos capaces de causar daño a esta leguminosa, no sólo en nuestra zona de estudio sino en todo el mundo (BIDDLE y CATTILIN, 2007). Entre los agentes causales de enfermedad en este cultivo, se encuentran representantes de los principales grupos de patógenos (MESSIAEN et al., 1991) incluyendo micosis, bacteriosis y virosis.

Se ha estudiado cuatro de las principales enfermedades virales que afectan a la judía, causadas por los siguientes virus: virus del mosaico común de la judía (BCMV), virus de la necrosis del mosaico común de la judía (BCMNV), cucumovirus o virus del mosaico del pepino (CMV), y el virus del bronceado del tomate (TSWV). Los virus del mosaico común (BCMV) y necrótico (BCMNV) de la judía, ambos del género Potyvirus, se encuentran ampliamente distribuidos a escala mundial, son transmitidos por homópteros de forma no

persistente y rápida, sin necesidad de colonización, por lo que no pueden controlarse mediante el uso de insecticidas.

Además de los potyvirus mencionados, se han descrito otros virus en la judía, entre ellos destacan el polífago cucumovirus o virus del mosaico del pepino (CMV) (DOUINE et al., 1979), transmitido por pulgones y por semilla; y el TSWV (virus del bronceado del tomate) transmitido por trips (*Frankliniella occidentalis* P.), que empiezan a adquirir importancia en algunas regiones españolas.

Mediante el presente estudio se pretende ampliar el conocimiento sobre estas enfermedades víricas que afectan a los cultivos de nuestra región para poder conseguir un producto de mayor calidad que pueda ampliar fronteras en su comercialización, dado el valor añadido de sanidad y calidad del producto final.

1.2 OBJETIVOS

Identificar las enfermedades virales de un cultivo de máxima importancia para el sector agroalimentario de la región de Castilla y León, más concretamente de la provincia de Ávila como es la “Judía de El Barco”, tanto por su importancia económica y social, avalada por su sello de calidad de “Indicación Geográfica Protegida” (IGP), como por su importante papel agronómico al tratarse de una leguminosa que se consume como legumbre seca, cultivos estos de extraordinaria importancia en un contexto de Agricultura Sostenible, ya que son enriquecedores del suelo, con poca necesidad de insumos externos y no excedentarios, acorde con las propuestas de la PAC.

Objetivos específicos:

1. Detección de los virus del mosaico común de la judía (BCMV), virus de la necrosis del mosaico común de la judía (BCMNV), cucumovirus o virus del mosaico del pepino (CMV), y virus del bronceado del tomate (TSWV), en la judía (*Phaseolus vulgaris* L. y *Ph. Coccineus* L.) de el Barco de Ávila, mediante técnicas inmunoenzimáticas.
2. Análisis del comportamiento de las variedades de judía de El Barco de Ávila frente a la infección viral de BCMV, BCMNV, CMV y TSWV.

2. ENFERMEDADES VIRICAS.

Entre los patógenos de plantas los virus son, después de los hongos, los causantes de las mayores pérdidas en cultivos agrícolas, esto se traduce en unas pérdidas de cosecha importantes a nivel mundial, con sus consiguientes pérdidas económicas.

Los virus pueden deben penetrar en la célula vegetal a través de la cutícula y pared de celulosa, por ello la mayor parte se asocian para su transmisión con insectos, nemátodos, u otros organismos que produzcan las heridas necesarias. Algunos virus son también transmitidos a través del polen y transferidos a las semillas.

Los síntomas comunes de la infección viral son manchas decoloradas o marrones sobre las hojas y los frutos, crecimiento interrumpido y daño a las flores o a las raíces, todos tendientes a disminuir el rendimiento y la calidad de las cosechas (CAMPBELL y REECE, 2007).

En España han sido descritos numerosos virus que pueden afectar a *Phaseolus vulgaris* L., con diferente grado de incidencia, expresión e importancia. La judía es susceptible a

más de 270 virus y se han descrito infecciones naturales de al menos 35 de ellos (BRUNT et al 1996). Los síntomas inducidos por estos virus son variables, ya que están influenciados por las condiciones ambientales, la cepa particular del virus, infecciones mixtas con otros virus, la diversidad genética y las prácticas agronómicas. En un estudio llevado a cabo en 2000-2005 se detectaron en campos de cultivo españoles BCMV, BCMNV (ambos potyvirus son los predominantes), BYMV, CMV, TSWV y TYLCV. (SEGUNDO et al., 2008).

Entre ellos encontramos los 4 virus objeto de estudio de este trabajo, escogidos para el mismo por ser los más frecuentemente detectados y que mayores pérdidas provocan.

2.1. VIRUS DEL MOSAICO COMÚN DE LA JUDÍA (BCMV, BEAN COMMON MOSAIC VIRUS)

Taxonomía: Familia: *Potyviridae*; Género: *Potyvirus*

Pertenece al género *potyvirus*, el mayor grupo de virus de plantas conocido (VERMA, P. y GUPTA, U.P., 2010) y uno de los más distribuidos y económicamente importantes (K.I. IVANOV et. al, 2014). Se encuentra presente en todas las zonas de cultivo de judía españolas (SAIZ et al., 1995, GONZÁLEZ, 2004) siendo entre ellos el más frecuentemente detectado. Es un patógeno destructivo ampliamente distribuido en *Phaseolus vulgaris* L.

De todas las familias de virus vegetales la familia *Potyviridae* es la más numerosa en especies y dentro de sus 6 géneros, el *potyvirus* es el que presenta mayor número de especies: 91 definitivas y 88 posibles, y algunas de gran importancia económica como PVY, PPV, PRSV y BYRV (HULL, 2002). Hasta 1992, BCMV y BCMNV fueron considerados como los serotipos B y A, respectivamente, del mismo virus dentro de la especie BCMV. Después se reclasificaron como dos especies virales distintas.

Sintomatología: Los síntomas iniciales de infección aparecen una vez las hojas trifoliadas comienzan a desarrollarse. (VERMA, P. y GUPTA, U.P., 2010). Las hojas presentan en su superficie áreas de color verde claro y oscuro con formas irregulares (abullonamientos). Se puede desarrollar un patrón de mosaico, pero lo más común es que las hojas sufran enrollamientos hacia abajo pudiendo crecer incluso más que otras sanas. También pueden aparecer necrosis en los nervios de las hojas, tallos, vainas y ocasionalmente, las raíces pueden ennegrecerse.

Ciclo de la enfermedad: En *Phaseolus vulgaris* L., se conocen cuatro genes recesivos y uno dominante que controlan la infección por BCMV. (NADERPOUR, M. y JOHANSEN, I.E. 2011). Este virus puede sobrevivir en malezas hospedantes y en semillas infectadas y se transmite a una frecuencia alta a través de semillas (VERMA, P. 2010). Se transmite mediante la semilla, pero también de forma mecánica experimental y por áfidos que actúan como vectores: *Acyrtosiphon pisum* H., *Macrosiphum euphorbiae* T., *Myzus persicae* L., y *Aphis fabae* S. (SAIZ et al., 1995; GONZÁLEZ, 2004, ZITTER et al., 2004)

El BCMV es transmitido por áfidos en forma no persistente, es decir, el insecto vector puede adquirirlo en 15 a 60 segundos de una planta infectada mediante su estilete y transmitirlo rápidamente a plantas sanas mediante picadura. (FLORES-ESTÉVEZ, N. 2003). La infección por potyvirus implica un complejo proceso molecular que tiene lugar en varios compartimentos celulares y que requiere la participación de muchos genes y proteínas (K. I. IVANOV et. al, 2014)

Importancia económica: Es un virus extendido a todas las zonas productoras de judía en todo el mundo. En algunas zonas donde se cultivan variedades susceptibles, la enfermedad puede provocar disminución de rendimientos, mal desarrollo de la vaina y semillas de tamaño muy pequeño. Se han datado hasta un 98% de pérdidas de rendimiento debido a la infección por BCMV. (VERMA, P. y GUPTA, U.P., 2010).

Prevención y control: La mayoría de variedades comerciales de judía verde son resistentes a este virus, pero la judía seca es más susceptible. El control precoz y eficaz de los pulgones, así como unas fechas de siembra previas al inicio de la actividad de estos insectos, reduce considerablemente el riesgo de infección.

2.1 VIRUS DEL MOSAICO COMÚN NECRÓTICO DE LA JUDÍA (BCMNV, BEAN COMMON MOSAIC NECROTIC VIRUS).

Taxonomía: Familia: *Potyviridae*; Género: *Potyvirus*

Pertenece, junto al BCMV, al grupo *Potyvirus*, el mayor grupo de virus de plantas conocido. (VERMA, P. y GUPTA, U.P., 2010). Al igual que BCMV consta de una partícula filamentosa y flexible de 750 x 14 nm, con una única molécula lineal de ARN de cadena sencilla y de sentido positivo de 10 kb. El ácido nucleico supone el 5% del virión. (FLORES-ESTEVEZ et al. 2003)

Sintomatología: Ocasiona la denominada “necrosis sistémica” en huéspedes portadores de un gen dominante denominado I, esta enfermedad produce la muerte de la planta comenzando los daños de la zona apical hacia la parte inferior de la planta, sin embargo, en judías que no llevan este gen, los síntomas producidos por este virus son indistinguibles de los producidos por BCMV. (GONZÁLEZ, 2004). En la planta aparecen decoloraciones, malformaciones y rugosidad en las hojas, así como necrosis de venas y de raíz, pudiendo llegar a producir la muerte de la planta. Se puede desarrollar un patrón de mosaico.

Ciclo de la enfermedad: Se transmite por pulgones, siendo los más eficientes distintas especies de áfidos, entre las que destacan *Acyrtosiphon pisum* H., *Aphis craccivora* K., *Aphis fabae* S. y *Myzus persicae* S. También se transmite por semilla. Al igual que ocurre con BCMV es transmitido por áfidos en forma no persistente.

Importancia económica: Junto con el BCMV es uno de los virus más presentes en el cultivo de la judía a lo largo de todo el mundo. Puede provocar pérdidas importantes de cosecha en campos muy infectados. También su presencia interfiere en la calidad de la semilla. Sus huéspedes se encuentran limitados a las especies del género *Phaseolus*, principalmente *P. vulgaris* L., y ocasionalmente, a *Lupinus luteus* L. (altramuz amarillo). Los datos del estudio llevado a cabo por SEGUNDO et al. (2008) muestran que BCMV y BCMNV son poco comunes en los invernaderos de plástico, probablemente debido a las recientes mejoras en los controles físicos y químicos que pueden eliminar los pulgones que transmiten los virus y las semillas comerciales están certificados como libres de virus o un virus resistente. (SEGUNDO et al., 2008), es por ello que se considera esencial el uso de buenas prácticas agrícolas para los cultivos de exterior que son los que actualmente resultan más afectados.

Prevención y control: El tratamiento de los vectores de este virus mediante el uso de insecticidas de diversos tipos y otras trampas, el uso de semilla certificada y por lo tanto

libre de infección, así como unas tareas en campo adecuadas que eviten las fuentes de inóculo son las prácticas que disminuirán o eliminarán la presencia de este virus.

2.2 VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV, CUCUMBER MOSAIC VIRUS).

Taxonomía: Virus perteneciente al grupo de los cucumovirus, dentro de éstos es el más distribuido por el mundo y el más estudiado. Fue descrito por primera vez como el causante de una enfermedad tipo mosaico en el pepino (DOOLITTLE, 1916; JAGGER, 1916)

Sintomatología: El síntoma más común inducido por CMV es el mosaico. Sin embargo, la gravedad de la enfermedad puede variar desde no mostrar síntomas en algunos cultivos (como por ejemplo en las malas hierbas *Portulaca oleracea L.* y *Stellaria media L.*, que juegan un importante papel epidemiológico como reservorios naturales del virus), hasta la muerte de la planta huésped. Los síntomas pueden aparecer desde el momento en que la primera hoja trifoliada se desarrolla. Entre los síntomas foliares se incluyen: estrechamiento, deformación, necrosis, manchas verdes o cloróticas y manchas verdes a lo largo de los nervios principales. Las hojas también desarrollan ampollas de un color verde oscuro. Las vainas son pequeñas, deformes, con manchas y rizadas. Cuando la infección es tardía los síntomas foliares pueden no desarrollarse, aunque los síntomas en las vainas sí lo harán. También puede existir enanismo y cambios cromáticos en frutos o lignificación de los mismos.

Ciclo de la enfermedad: Algunas cepas de CMV se pueden transmitir por semilla, pero habitualmente la enfermedad se transmite por pulgones. Se transmite por numerosas especies de áfidos, siendo los más comunes *Aphis gossypii G.* y *Myzus persicae S.* Los cucumovirus se transmiten en general de forma no persistente (MATTHEWS, 1991): los áfidos, al hacer breves pruebas en la hoja, introducen el estilete en las células epidérmicas adquiriendo así el virus (PALUKAITIS et al., 1992). En sucesivas pruebas, el áfido inyecta el virus en plantas sanas, siendo este tiempo de transmisión muy corto. Los áfidos retienen el virus menos de 4 horas, y no se transmite a la progenie. Presenta una gama de huéspedes naturales muy amplia, afecta tanto a mono como a dicotiledóneas, principalmente a Crucíferas, Solanáceas, Compuestas, Papilionáceas y Cucurbitáceas. También se incluyen entre sus hospedantes especies perennes. Se encuentra presente en altos porcentajes en las principales hortalizas españolas: melón, pimiento, tomate, calabacín, judía y pepino. También se han detectado malas hierbas (*datuna*, *nicotiana alba*, *bledo*) infectadas. (C.DE BLAS et al., 1993)

Importancia económica: Esta enfermedad está presente en muchos países de Europa y del Lejano Oriente. Las pérdidas económicas varían en función del momento de infección. Sin embargo, incluso cuando la infección es tardía, los defectos de la vaina pueden dar lugar a una cosecha inservible para su procesado. CMV ha sido descrito como un virus importante en los cultivos hortalizas en España (PEÑA-IGLESIAS et al., 1979; GARCÍA-LUQUE et al., 1983, 1984; LUIS-ARTEAGA et al., 1989; MURANT et al., 1990; JORDA et al., 1992). Los porcentajes de infección del 28% encontrados en diferentes regiones españolas y distintos cultivos en el estudio de DE BLAS et al., 1993 durante 1991 y 1992, indican una alta y constante presencia del virus en el campo, así como un porcentaje de infección semejante al del 30% encontrado por GARCÍA-LUQUE et al., (1983) en una prospección realizada en varias regiones españolas durante los años 79-82.

Prevención y control: El uso de semilla sana es un método útil de prevención, pero cuando las plantaciones de judía son regulares y próximas, es fácil que los áfidos vectores transmitan el virus a poblaciones sanas cercanas. Por esto la gestión de los áfidos o pulgones es un punto fundamental cuando la enfermedad es un problema localizado. Algunas variedades comerciales son tolerantes a CMV, y se están realizando investigaciones para encontrar variedades resistentes.

2.3. VIRUS DEL BRONCEADO DEL TOMATE (TSWV, TOMATO SPOTTED WILT VIRUS)

Taxonomía: Virus perteneciente a la familia: *Bunyaviridae* y más en concreto al género: *Tospovirus*. Es el único de la familia que infecta a plantas y es el miembro tipo del grupo de *Tospovirus* (PLYUSNIN et. al, 2011). Está presente en los cinco continentes, tanto de la zona templada como subtropical. TSWV es uno de los más económicamente significativos virus de plantas causando daño a diversos vegetales cultivados y ornamentales (ADKINS, 2000; PAPPU et. al, 2009.). Tiene una muy amplia gama de huéspedes que incluye más de 1090 especies de plantas, desde helechos (Pteropsidae) a monocotiledóneas y dicotiledóneas (PARELLA et. al, 2003, HANSSEN et. al, 2010). Los vectores de trips y malezas hospederas juegan un papel importante en la difusión y supervivencia de TSWV (ABAD et. al, 2005). Se ha observado que la tasa de transmisión se relaciona con la cantidad de virus acumulado en los trips, pero no a la acumulación de virus en las plantas que actúan como fuente del virus (D.E. DEBRECZENI et. al, 2013). Al tratarse de un virus muy polífago en muchos países europeos representa una limitación importante para la producción de tomate, pimiento, lechuga, tabaco y plantas ornamentales (TERRALIA, 2004, KAZINCZI et. al, 2007; PAPPU et. al, 2009). Esta enfermedad se incluye entre las enfermedades de cuarentena en Europa y la EPPO-OEPP (Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas) la tiene incluida en la Lista A2, lo que significa que está presente en España, pero no ampliamente distribuida.

Sintomatología: TSWV puede inducir una amplia variedad de síntomas en económicamente importantes plantas ornamentales, hortalizas y cultivos industriales (EPPO / CABI, 1997). Las variables que afectan a la expresión de los síntomas incluyen la variedad de cultivo, la cepa del virus, la edad de la planta y las condiciones ambientales (luminosidad, humedad y temperatura) (OEPP / EPPO, 1999), en todos los casos las infecciones más tempranas son más graves. Los síntomas más comunes son enanismo, manchas necróticas perinerviales de las hojas primarias y amarilleamiento de las nerviaciones de las secundarias, depresiones de color oscuro en las vainas, así como anillos de color bronce en hojas y frutos acompañados de una generalizada tonalidad bronceada. Arrepollamiento del brote y necrosis, decoloración del tallo, deformaciones foliares muy acusadas y reducción drástica en la producción de vainas, de forma que la producción es nula o escasa, en algunas de las plantas afectadas no existen semillas. Plantas infectadas por TSWV mostraron los siguientes síntomas después de la alta infestación de trips: deformación de hojas, deformación de hojas medio-lateral ocasional, manchas anulares, color amarillento en hojas y los nervios rojizos, necrosis del tallo. (SEGUNDO et al., 2008)

Ciclo de la enfermedad: Su transmisión es llevada a cabo fundamentalmente por trips (*Frankliniella occidentalis* P., *Frankliniella schultzei* T., *Frankliniella fusca* H., *Thrips setosus* M. y *Scirtothrips dorsalis* H.). La principal fuente de inóculo la constituyen los

cultivos infectados en parcelas próximas. La transmisión es del tipo persistente circulativo, con replicación del virus dentro del insecto (TERRALIA, 2004). Las larvas al alimentarse de tejidos vegetales infectados absorben las partículas virales; las cuales pasan del intestino a la cavidad bucal donde se replican (WIJKAMP et al., 1993), siendo inyectadas en otro tejido vegetal cuando el insecto vuelve a alimentarse. El virus sólo puede ser adquirido por larvas y transmitido por adultos.

Importancia económica: El impacto económico del TSWV es enorme, debido sobre todo a su amplia distribución geográfica, su amplio rango de plantas hospedadoras y sus devastadores efectos sobre las plantas infectadas. Es uno de los virus más destructivos de plantas que causan graves pérdidas económicas en muchos cultivos agrícolas en todo el mundo (ADKINS, 2000). La enfermedad provocada por el TSWV fue observada por primera vez en el año 1906 (SAKIMURA, 1962). SAMUEL et al. fueron los primeros que determinaron que el agente causal de la enfermedad era un virus y lo llamaron "Tomato Spotted Wilt Virus". Desde entonces esta virosis ha sido reportada en numerosos países de los cinco continentes, situados en la zona templada y subtropical (TERRALIA, 2004). En España hay constancia de esta enfermedad desde los años 80 y desde entonces ha producido y produce numerosos daños en algunas zonas llegando incluso a impedir el cultivo de especies sensibles a este virus. Ocasiona grandes pérdidas económicas, siendo la zona mediterránea la más afectada. Se trata de un virus que afecta a los vegetales pero en ningún caso al consumidor del producto. En la zona mediterránea española se han registrado daños arrasadores en tomate, pimiento y lechuga, así como pérdidas de consideración en berenjena, apio, melón, judía, col y otros tantos cultivos (JORDÁ Y OSCA, 1991)

Prevención y control: En la actualidad no existe cura para las plantas enfermas por lo que, además del uso de variedades resistentes, los esfuerzos deben ir dirigidos a prevenir o limitar la actividad de los trips, deben extremarse las precauciones dada su facilidad de contagio. Esto puede conseguirse mediante el uso de insecticidas, la utilización de trampas cromáticas... La presencia de *F. occidentalis* es elevada durante toda la primavera y se mantiene alta durante el verano hasta el final del otoño. Se ha demostrado en patata el nivel de transmisión de TSWV de follaje infectado a tubérculos y de tubérculos infectados a las plantas de la progenie (A. R. BULAJIĆ ET. AL, 2013), por lo cual la eliminación de malas hierbas y restos de cosecha que puedan servir de inóculo para futuros vectores resulta fundamental. Los agricultores deben vigilar atentamente sus parcelas para controlar si aparecen en sus cultivos síntomas propios de esta enfermedad: plantas enanizadas, plantas secas, hojas con decoloraciones o bordes de diferente tonalidad, frutos con decoloraciones más o menos severas, frutos con arabescos (círculos concéntricos) (GARNICA et al., 2007)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTREOS.

El ensayo experimental fue llevado a cabo en 2010 gracias a la cesión, por parte de la Cooperativa Campesina Tormes, de cinco de sus parcelas para su uso como objeto de estudio. Cuatro de ellas estaban situadas en el municipio de los Llanos del Tormes y la quinta en La Carrera. De las parcelas seleccionadas cada una estaba sembrada con una variedad excepto la parcela 5, que tenía dos especies diferentes sembradas y fue tenida en cuenta como dos unidades diferentes. Todas las parcelas fueron sometidas a una serie de **labores agrícolas** comunes y la recolección fue llevada a cabo en distintas

fechas según la variedad. Se realizaron 7 visitas a las parcelas para realizar los muestreos separadas aproximadamente por 15 días, comenzando el 23 de Junio de 2010, las cuales fueron adaptadas a los días post siembra (dps) de cada especie. Una vez allí, primer lugar se llevó a cabo una selección al azar de 10 plantas de cada parcela y variedad que fueron identificadas, se cortaron dos hojas de cada planta, una asintomática y otra con algún síntoma de infección que son transportadas al laboratorio donde fueron fotografiadas y preparadas para realizar los ensayos ELISA.

3.2 TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS:ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Técnica desarrollada por el grupo de investigación liderado por EVA ENGVALL y PETER PERLMANN en la Universidad de Estocolmo en Suecia, cuyo término fue acuñado en el año 1971. Es un método analítico basado en las reacciones antígeno (Ag) – anticuerpo (Ac), que detecta proteínas virales para poder confirmar la presencia o ausencia de infección. La técnica ELISA posee gran sensibilidad y especificidad y ha sido uno de los métodos más utilizados para la detección e identificación rutinaria de virus vegetales en diferentes huéspedes, por ser fiable, rápido, sensible, y fácilmente aplicable a gran número de muestras (CLARK y BAR-JOSEPH, 1984; TORRANCE y JONES, 1981). Posee una gran aplicación en análisis biomédicos, sobre todo en los campos de parasitología, virología y bacteriología (VAN WEEMEN, 2005). Existen varios tipos de ELISA, los utilizados en este proyecto son los siguientes:

- **Protocolo ELISA-DAS** (usado para BCMV, BCMNV, CMV y TSWV); El ELISA-DAS (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) usa anticuerpos que se fijan a la superficie de la placa Nunc PolySorp para capturar los antígenos. La presencia del antígeno se detecta usando anticuerpos dobles con fosfatasa alcalina. Finalmente, la adición del sustrato de la enzima (pNPP) induce un producto amarillo, detectable en las lecturas a 405 nm, siempre y cuando el antígeno esté presente.
- **Protocolo ELISA indirecto TAS** (Triple Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Usado para BCMV)

Detecta la presencia de antígenos mediante el uso de anticuerpos específicos que se unen a la superficie de la placa. Una vez unidos forman el complejo Inmunológico, el cual se revela por la adición de un anticuerpo anti-especie acoplado con la fosfatasa alcalina (este anticuerpo es específico para las especies para las cuales el anticuerpo específico previo se ha detectado). Finalmente, la adición del sustrato de la enzima (fosfatasa alcalina: pNPP) induce un producto amarillo, detectable en las lecturas a 405 nm, siempre y cuando el antígeno esté presente.

3.2.1 Selección de muestras

En el presente proyecto de investigación se ha analizado todo el material recogido en campo, un total de **614 muestras** con duplicados en diferentes ensayos. Se han utilizado controles positivos y negativos tanto internos como del kit comercial. Las muestras duplicadas se prepararon de nuevo en eppendorf distintos y con placas diferentes para que los resultados no fuesen debidos al proceso de preparación. Se lleva a cabo la técnica ELISA y a continuación se medirá, a diferentes tiempos, la absorbancia a 405nm.

3.2.2 Interpretación de resultados

Una vez registradas todas las medidas de absorbancia, observamos la progresión de las mismas y, usando como referencia la plantilla de carga de muestras elaborada para esa placa, procedemos a la interpretación de cuales de ellas deben considerarse positivas. Consideraremos como positivos aquellos pocillos cuyo valor de absorbancia a 405nm sea igual o superior al de los controles positivos de esa misma placa. Del mismo modo consideraremos negativos todos aquellos pocillos cuyo valor de absorbancia se encuentre por debajo del valor de los controles positivos y aquellos cuya lectura a lo largo del periodo de incubación se mantenga constante. A la hora de interpretar estos resultados tenemos en cuenta la progresión de la absorbancia en las sucesivas medidas con el lector, así como la ubicación de cada uno de los pocillos en la placa ya que esta puede afectar al valor de absorbancia (los más precisos son aquellos ubicados en el centro).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS VARIETAL

Variedad Arrocina (*Phaseolus vulgaris* var. Arrocina L.)

Porcentaje de infección Los porcentajes de infección de cada virus en las plantas de judía de la variedad arrocina se muestran en la figura 4.1.

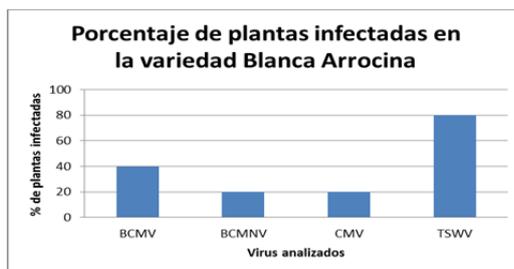


Figura 4.1: Gráfica de porcentaje de infectividad de los distintos virus en la variedad arrocina.

La mayor incidencia se observa en el virus del bronceado del tomate (TSWV) con un 80% de plantas infectadas. Aun siendo un porcentaje elevado queda por debajo del observado para las variedades blanca riñón y judión. Le sigue el virus del mosaico común de la judía (BCMV) con un 40% de incidencia, dato es el menor registrado de BCMV, junto con la especie judión de Barco. Por último tanto el virus del mosaico del pepino (CMV) como el virus de la necrosis del mosaico común de la judía (BCMNV) poseen tan solo un 20% de infección. Esta variedad es, después de la blanca riñón, la de menor incidencia de CMV. Esta presencia leve de infección de cucumovirus en judía coincide con datos de infección de cultivos de judía en Asturias (GONZÁLEZ, 2004), en Madrid, León y Pontevedra (SÁIZ, 1994). Sin embargo el BCMNV se sitúa en esta variedad en tercer lugar en el ranking de las variedades más infectadas. En la figura 4.2, en la que en la hoja derecha se aprecian los síntomas típicos de infección por BCMNV: decoloraciones, cierta malformación y puntos necróticos (círculo rojo, detallado y ampliado).



Figura 4.2: Hojas de la variedad arrocina de una planta infectada a 45 días post-siembra con síntomas de infección de BCMNV (hoja izquierda, asintomática; hoja derecha, sintomática).

Evolución de los distintos virus:

El BCMV presenta una infectividad media sobre esta variedad, existiendo 4/10 plantas infectadas. Su infectividad es tardía. No se ha detectado en ninguna planta al principio, se ha detectado en sólo una desde la mitad del ciclo (59 dps) hasta el final, otra a los 80 dps y las dos últimas al final del ciclo (100 dps). El BCMNV posee baja infectividad sobre la variedad arrocina, ya que sólo 2 de las 10 plantas estudiadas presentan síntomas. Se detecta por primera vez en una planta a los 45 dps y hasta el final y en la otra a los 80 dps y hasta el final.

El CMV tiene infectividad baja, se detecta exclusivamente a mitad de ciclo, a 59 dps, cuando 2 de las 10 plantas analizadas muestran un resultado positivo al virus. En el resto de fechas no es detectado. Cabe destacar que en el caso del virus CMV las dos plantas que dan positivo para esta variedad arrocina lo hacen únicamente en uno de los muestreos realizados en una sola fecha concreta.

El TSWV posee infectividad alta ante esta variedad, ya que 8 de las 10 plantas son infectadas. Es detectado por vez primera a los 45 dps, con 4 de las 10 plantas infectadas que mantienen la infección hasta el final del ciclo. A los 80 dps aparecen 2 nuevas plantas infectadas y al final del ciclo, a los 100 dps aparecen otras dos.

Incidencia de los distintos virus en relación a la infección total en judía

En la siguiente gráfica de la figura 4.3 se puede observar el porcentaje de incidencia de los distintos virus en la variedad arrocina respecto al porcentaje total de incidencia de los mismos en el cultivo de la judía en general.

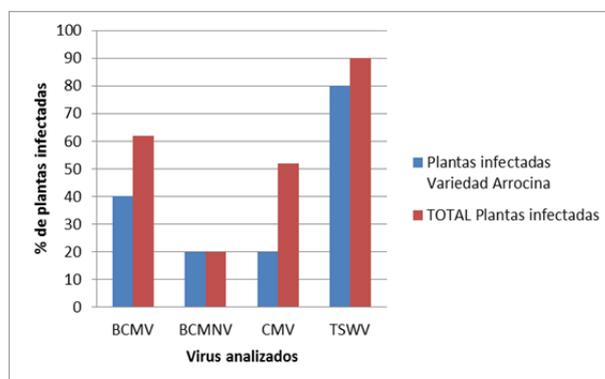


Figura 4.3: Gráfica comparativa del porcentaje de infectividad de los distintos virus en la variedad arrocina respecto al porcentaje de infectividad total en judía en distintas variedades.

La variedad arrocina presenta un porcentaje de infección inferior a la media para todos los virus analizados excepto para el BCMNV en la que es igual a la media (20%). Los resultados van desde una diferencia de 10 puntos en el TSWV, hasta unas diferencias de 22 puntos y 32 puntos para el BCMV y CMV respectivamente.

Variedad Blanca Redonda (*Phaseolus vulgaris* var. *Blanca redonda* L.)

Porcentaje de infección

Los porcentajes de infección de cada virus en las plantas de judía de la variedad blanca redonda se muestran en la figura 4.4.

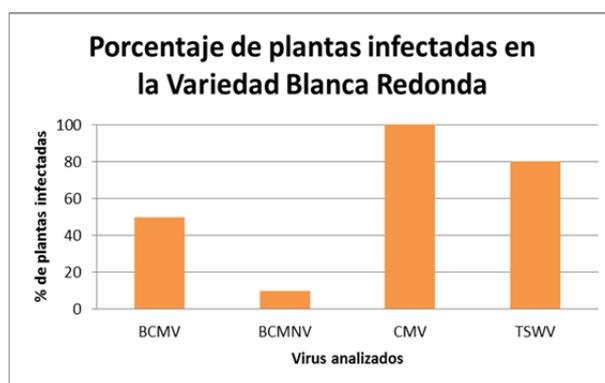


Figura 4.4: Gráfica del porcentaje de infectividad de los distintos virus en la variedad blanca redonda.

El virus con mayor prevalencia en esta variedad es el cucumovirus CMV con un porcentaje del 100% todas las plantas analizadas de esta variedad resultaron infectadas para este virus. Este porcentaje supera con creces los porcentajes de infección de CMV del 28% anteriormente descritos en España por DE BLAS et.al (1993) en distintas regiones y cultivos, así como el 30% encontrado por GARCÍA-LUQUE et. al., (1983). Si observamos el 52% medio de infección por CMV en las diferentes variedades vemos que es más próximo a estudios anteriores que el caso de la variedad blanca redonda, por lo que podría tratarse de un caso aislado. Cabe destacar que el cultivo adyacente (variedad arrocina) tan solo presenta un 20% de infección y las variedad blanca riñón, a escasos 50 metros, un 0% de infección por CMV. Seguidamente está el tospovirus TSWV con un 80% de infección. A pesar de ser muy elevado, se encuentra 10 puntos por debajo de la media para todas las variedades analizadas. Por su parte, los dos potyvirus analizados, BCMNV y BCMV, presentan una infección del 50 y del 10% respectivamente. El hecho de que, aun tratándose de semillas certificadas, en principio libres de enfermedades, sigan estando presentes puede ser debido a una gran existencia de los vectores transmisores en la zona de estudio, hipótesis apoyada por el hecho de que la parcela colindante, sembrada con la variedad arrocina, posee unos porcentajes de infección muy similares (50% y 10% respectivamente). Esta variedad presenta un alto porcentaje en la mayor parte de los virus analizados y una gran sensibilidad al virus CMV. Del virus más destacable en esta variedad, es decir, del CMV, se han podido observar plantas en campo que mostraban sintomatología. Una de ellas es la que se muestra en la figura 4.5. En la hoja izquierda, sintomática, se distinguen manchas de color verde claro siguiendo un patrón de mosaico, manchas cloróticas y abollonaduras de color verde oscuro; síntomas típicos del virus del mosaico del pepino.



Figura 4.5: Hojas de la variedad blanca redonda de una planta infectada a 80 dps con síntomas de infección por CMV (hoja izquierda, sintomática; hoja derecha, asintomática).

Evolución de los distintos virus

El BCMV tiene incidencia media, ya que infecta a 5 de las 10 plantas analizadas y posee una distribución homogénea, detectándose su presencia a lo largo de todo el ciclo vegetativo de la planta. A los 17 dps comienza a detectarse la infección y permanece hasta el final. El BCMNV tiene una incidencia muy baja, ya que sólo infecta a una de las 10 plantas analizadas. Su detección comienza a los 59 dps y se mantiene hasta el final del ciclo vegetativo de la planta. Podemos decir entonces que BCMNV aparece más tarde que el otro Potyvirus (BCMV). El CMV ha conseguido infectar al 100% de las plantas de esta variedad blanca redonda lo que demuestra su alta sensibilidad a este virus. La infección de las plantas es detectada por primera vez a los 45 dps en 4/10 plantas y en el esto a los 59 dps. Se mantiene hasta el final del ciclo vegetativo. El TSWV posee incidencia alta y una distribución homogénea, detectándose su presencia en todos los días de muestreo analizados. Destacar que el mayor porcentaje de infección se da al final del ciclo vegetativo, a los 100 dps, cuando 8 de las 10 plantas analizadas mostraron infección.

Incidencia de los distintos virus en relación a la infección total en judía

En la siguiente gráfica de la figura 4.6 se puede observar el porcentaje de incidencia de los distintos virus en la variedad blanca redonda, respecto al porcentaje total de incidencia de los mismos en el cultivo de la judía en general. La variedad blanca redonda es una variedad mucho más afectada por el virus CMV que la media del resto, situándose a 48 puntos por encima de la media. Para el resto de virus su porcentaje de infección es sensiblemente menor que la media (12, 10 y 10 puntos por encima para BCMV, BCMNV y TSWV, respectivamente). Se puede afirmar que la variedad blanca redonda es una variedad sensible, ya que muestra un gran porcentaje de infección para 3 de los 4 virus estudiados. **Variedad Blanca Riñón (*Phaseolus vulgaris* var. *Blanca riñón* L.)**

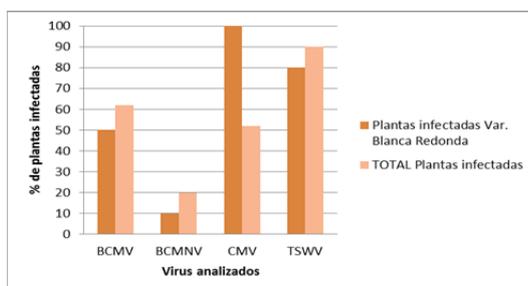


Figura 4.6: Gráfica comparativa del porcentaje de infectividad de los distintos virus en la variedad redonda respecto al porcentaje de infectividad total en judía.

Porcentaje de infección

Los porcentajes de infección de cada virus en las plantas de judía de la variedad blanca riñón se muestran en la figura 4.7. El virus que prevalece en esta variedad es el TSWV con un porcentaje del 90%, seguido por el BCMV con incidencia de 80% y el BCMNV con 30%. Es destacable el 0% de infección del cucumovirus CMV. En este proyecto de investigación sólo se han dado dos casos de 0% de infección: aquí y en la variedad morada larga con el virus BCMNV. De todas las muestras analizadas de la variedad blanca riñón para el CMV, ninguna ha dado positivo al virus. Nos encontramos ante una posible resistencia a CMV, hecho muy destacable, ya que hasta ahora se pensaba que era un patógeno muy común y efectivo, capaz de infectar muchas especies silvestres y cultivadas y son muy escasas o inexistentes las resistencias mayores en especies cultivadas de gran importancia económica como melón, calabacín, tomate o pimiento (POCHARD y DAUBÈZE, 1989)

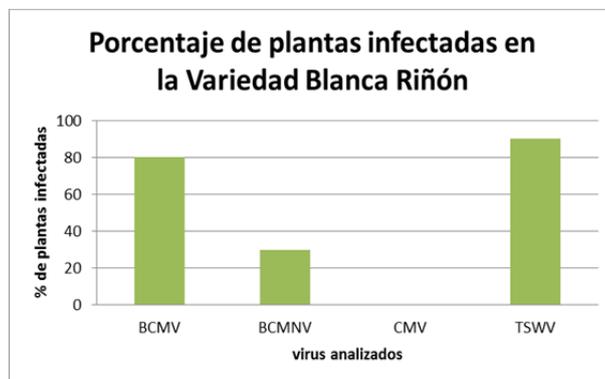


Figura 4.7. Gráfica de porcentaje de infectividad de los distintos virus en la variedad blanca riñón.

Han podido desarrollar también un papel importante las condiciones ambientales del cultivo, así como la dinámica de las poblaciones vectores. Anteriormente se han observado otras resistencias a CMV, de las que se sabe poco en general, en *Vigna unguiculata*, la cual presenta una reacción de hipersensibilidad al virus (DEZEEUW y CRUM, 1963) y en especies del género *Phaseolis* como *P.aureus* y *P. limensis* (EDWARSON y CHRISTIE, 1991)

En el caso de la elevada incidencia del BCMV ya se tuvo constancia de ello al observar las muestras recogidas en campo que presentaban claros síntomas de la infección. Como ejemplo ilustrativo se expone la fotografía de la figura 4.8. Son hojas de la variedad blanca riñón de una planta infectada y que fueron recogidas a los 45 dps. En ella pueden observarse dos hojas, izquierda asintomática y derecha sintomática. Ésta última muestra síntomas de infección característicos del virus del mosaico común de la judía (BCMV) tales como las manchas de color verde claro siguiendo un ligero patrón de mosaico, así como áreas necróticas.



Figura 4.8: Hojas de la variedad blanca riñón de una planta infectada a 45 días post-siembra con síntomas de infección por BCMV (hoja izquierda, asintomática; hoja derecha, sintomática).

Evolución de los distintos virus

BCMV presenta un ciclo completo, es detectado desde el primer día de muestreo, a los 17 dps, y permanece presente durante todo el ciclo vegetativo de la planta, el mayor porcentaje de infección es detectado al final del ciclo (100 dps). Su incidencia es alta, ya que consigue afectar a 8 de cada 10 plantas analizadas. Estos datos son contrarios a lo que ocurre en la judía tipo granja asturiana (*Phaseolus vulgaris* L.), cuyo mayor porcentaje de infección para BCMV se da a principios de ciclo, disminuyendo los síntomas a medida que las temperaturas aumentan en Julio y Agosto (GONZÁLEZ, 2004)

BCMNV en cambio posee una incidencia baja, ya que solo logra infectar a 3 de las 10 plantas analizadas. Su evolución es similar a la de BCMV, ya que se mantiene presente desde el primer día de muestreo (17 dps) hasta finalizar el ciclo vegetativo de la planta.

CMV presenta 0% infección, asegurándose los negativos a lo largo de todo el ciclo vegetativo de la planta. No hay duda de este porcentaje nulo, ya que todas las muestras analizadas salieron claramente negativas en los ensayos de laboratorio.

El virus del género tospovirus TSWV tiene una marcada incidencia durante todo el ciclo vegetativo de la planta, infectando a 9 de cada 10 plantas estudiadas. Es detectado al principio del ciclo Vegetativo (17 dps) y permanece constante durante todo el periodo que dura el mismo.

Incidencia de los distintos virus en relación a la infección total en judía

En la figura 4.9 se puede observar el porcentaje de incidencia de los distintos virus en la variedad blanca riñón respecto al porcentaje total de incidencia de los mismos en el cultivo de la judía en general.

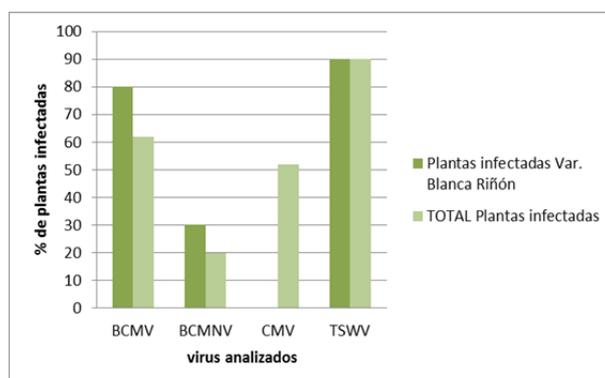


Figura 4.9: Gráfica comparativa del porcentaje de infectividad de los distintos virus en la variedad blanca riñón respecto al porcentaje de infectividad total en judía.

Nos encontramos ante una variedad más afectada que la media respecto a los dos potyvirus analizados, BCMV y BCMNV (18 y 10 puntos por encima, respectivamente). El TSWV se presenta en igual proporción que la media y el cucumovirus CMV no está presente. Es muy importante resaltar que la nula infección de CMV en la variedad blanca riñón nos hace pensar que podríamos encontrarnos ante una resistencia natural de la planta a este tipo de enfermedad vírica.

Judión De Barco (*Phaseolus coccineus* L.)

Porcentaje de infección

Los porcentajes de infección de cada virus en las plantas de judión de Barco se muestran en la figura 4.10.

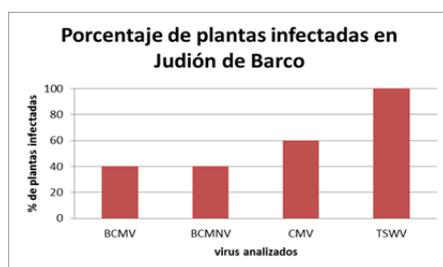


Figura 4.10. Gráfica del porcentaje de infectividad de los distintos virus en judión de Barco de Ávila.

El virus más destacable es el TSWV con un 100% de infección, seguido del CMV con un 60% y un 40% para ambos potyvirus (BCMV y BCMNV). Esta especie es la más sensible al TSWV, con el mayor número de plantas infectadas, de hecho sólo son tres los casos en este estudio en que la totalidad de las plantas de una variedad sean infectadas y este es uno de ellos. Al realizar los muestreos de campo ya se observaron ciertos síntomas correspondientes a la infección por TSWV en la especie judión de Barco. No obstante, cabe mencionar que es un virus de difícil detección en campo en el caso de la judía, ya que uno de sus principales síntomas, como son los anillos de color bronce en hojas y frutos; no ha sido observado en ninguna de las plantas de judía infectadas. Sin embargo sí que se ha observado, cierta tonalidad bronceada en plantas de judión infectadas, otro síntoma de esta enfermedad vírica. Éste hecho se muestra en la hoja izquierda (sintomática) de la figura 4.11.



Figura 4.11. Hojas de la variedad judión de Barco de una planta infectada a 80 días post síntomas de infección de TSWV (hoja izquierda, sintomática; hoja derecha, asintomática).

Un 60% de infección por CMV es bastante elevado, en contraposición con la baja infección observada en cultivos de judía en Asturias (GONZÁLEZ, 2004). El 40% de infección por BCMV puede ser debido a la presencia de áfidos vectores (*Acyrtosiphon pisum*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Aphis fabae*), ya que esta especie comparte parcela con la variedad morada larga, la cual sufre un 100% de infección por este virus. Al contrario ocurre con BCMNV, el cual logra infectar al 40% de las plantas de especie judión pero a ninguna de la morada larga. El hecho de que la presencia del potyvirus necrótico (BCMNV) sea media en el judión de Barco sitúa esta comarca en un punto intermedio entre zonas productoras de judía de Asturias, con porcentaje muy bajo, y zonas de País Vasco, donde la necrosis sistémica si es un problema importante (Berra, comunicación personal; DÍEZ, 2002). El hecho de que la especie judión de Barco y la variedad morada larga compartan parcela se ve reflejado en los resultados obtenidos, ya que ninguna de las dos se encuentra libre de virosis, lo cual certifica la presencia de vectores en la parcela compartida.

Evolución de los distintos virus

El virus del mosaico común de la judía (BCMV) presenta incidencia media, ya que logra infectar a 4 de las 10 plantas objeto de estudio. Se detecta por primera vez al principio del ciclo vegetativo (38 dps) y se mantiene durante el mismo, aunque su máxima infectividad es al final del mismo (138 dps). Debemos recordar que se trata del judión, el cual se recoge también el día 1 de Octubre de 2010).

El potyvirus necrótico (BCMNV) muestra también incidencia media, afectando a 4 de cada 10 plantas estudiadas. Se detecta por primera vez a los 66 dps en una sola planta y se mantiene, aunque su valor más positivo se presenta, al igual que en BCMV, al final del ciclo (138 dps).

El cucumovirus CMV muestra una incidencia media-alta, afectando a 6 de cada 10 plantas objeto de estudio. Su infección es detectada por primera vez a mitad del ciclo (80 dps), alcanzando su máximo valor al final del ciclo vegetativo (138 dps).

El tospovirus TSWV presenta una incidencia máxima, ya que al finalizar el ciclo (138 dps) todas las plantas se encuentran infectadas. Es detectado por vez primera a los 66 dps con 5 plantas infectadas y va aumentando a medida que avanza el ciclo vegetativo.

Incidencia de los distintos virus en relación a la infección total en judía

En la siguiente gráfica se puede observar el porcentaje de incidencia de los distintos virus en la variedad judión de Barco de Ávila con respecto al porcentaje total de incidencia de los mismos en el cultivo de la judía en general.

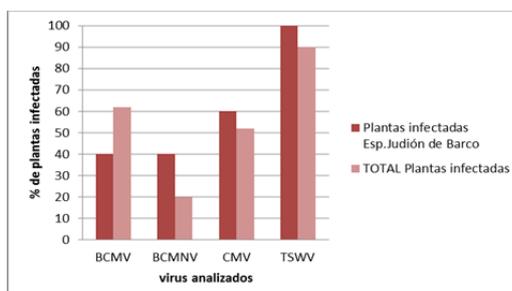


Figura 4.12. Gráfica comparativa del porcentaje de infectividad de los distintos virus en la variedad judión de Barco respecto al porcentaje de infectividad total en judía.

En el caso del BCMV la especie judión de Barco se encuentra, junto con la variedad blanca arrocina, mucho menos afectada que la media (22 puntos por debajo), en el caso del resto de virus (BCMNV, CMV y TSWV) esta especie está más afectada (20, 8 y 10 puntos por encima, respectivamente).

Variedad Morada Larga (*Phaseolus vulgaris* var. *Morada larga* L.)

Porcentaje de infección

Los porcentajes de infección de cada virus en las plantas de judía de la variedad morada larga se muestran en la figura 4.13.

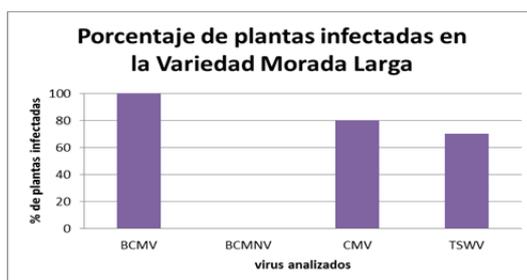


Figura 4.13. Gráfica del porcentaje de infectividad de los distintos virus en la variedad morada larga.

Esta variedad no se encuentra afectada por el virus BCMNV. Nos encontramos ante el segundo caso de una posible resistencia ante uno de los virus objeto de estudio. Respecto al resto de virus se está en general bastante afectada. La enfermedad más importante en esta variedad es la del mosaico común (BCMV), con un 100% de infectividad, la siguiente en importancia es el CMV, con un 80% y por último el TSWV con un 70%. El hecho de que se haya encontrado un porcentaje de infección del 100% para BCMV coincide, aunque no siendo tan elevado, con otros estudios como el de SÁIZ (1994) en los que detecta un 61.13% en las provincias de León, Valladolid y Madrid. Los síntomas de BCMV ya fueron apreciados durante los ensayos en campo. En la figura 4.14 aparecen dos hojas, la de la izquierda asintomática y la de la derecha sintomática. En ésta última pueden detectarse síntomas tan claros de infección como las áreas de color verde claro y oscuro con formas irregulares (en ocasiones también pueden aparecer en forma de mosaico).



Figura 4.14. Hojas de la variedad morada larga de una planta infectada a 66 días post-siembra con síntomas de infección por BCMV (hoja izquierda, asintomática; hoja derecha, sintomática).

Evolución de los distintos virus

El virus más importante que afecta a esta variedad es el BCMV, ya que posee una incidencia del 100%. Dicho virus se detecta en todos los momentos del ciclo vegetativo de la planta que han sido analizados. Sin embargo, la mayor virulencia y el mayor

porcentaje de infección se dan al final del ciclo vegetativo (121 dps). El potyvirus BCMNV, muestra una incidencia del 0%, no afectando a ninguna planta objeto de estudio. El cucumovirus presenta una incidencia alta, ya que logra infectar a 8 de cada 10 plantas objeto de estudio. Sus primeras infecciones son detectadas a los 66 dps, pero es al finalizar el ciclo vegetativo de esta variedad morada larga (101 y 121 dps) cuando se da el mayor porcentaje de infección. TSWV posee una incidencia media-alta, ya que es capaz de infectar a 7 de cada 10 plantas observadas. Es detectado por vez primera a los 66 dps y continua durante todo el ciclo vegetativo de la planta, aunque su mayor porcentaje de infección coincide con el final del mismo (121 dps).

Incidencia de los distintos virus en relación a la infección total en judía

En la siguiente figura se puede observar el porcentaje de incidencia de los distintos virus en la variedad morada larga respecto al porcentaje total de incidencia de los mismos en el cultivo de la judía en general.

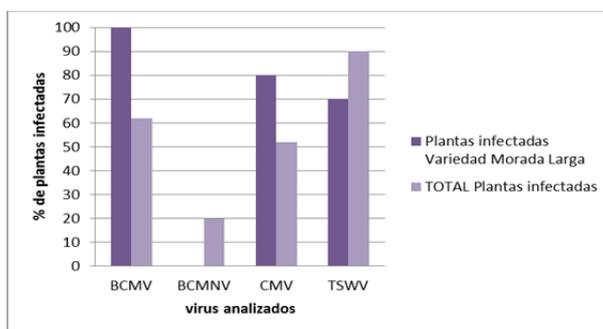


Figura 4.15. Gráfica comparativa del porcentaje de infectividad de los distintos virus en la variedad morada larga respecto al porcentaje de infectividad total en judía.

Podemos concluir que la variedad morada larga es mucho más susceptible que el resto a sufrir infección por el virus BCMV (38 puntos por encima), en el caso del BCMNV no existe infección en esta variedad, en CMV también existe una elevada diferencia con respecto a la media, situándose esta variedad 28 puntos por encima de la misma. En el TSWV la variedad morada larga se encuentra 20 puntos por debajo de la media, por lo que se demuestra que es menos sensible al mismo que el resto de variedades estudiadas.

Para finalizar este apartado en la gráfica de la figura 4.16 se observa la infección de cada virus sobre cada una de las variedades.

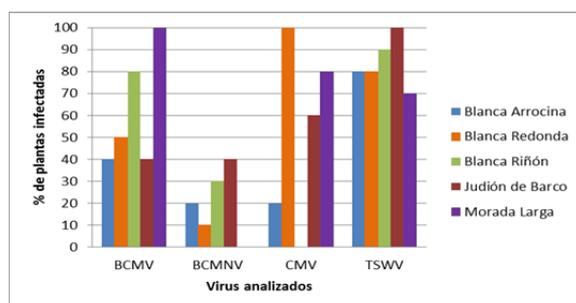


Figura 4.16: Gráfica comparativa de la infección de cada virus sobre cada una de las variedades de judía de El Barco.

Se aprecia claramente como la variedad Morada Larga es la más afectada por BCMV, el Judi3n de Barco la m3s afectada por BCMNV, la Blanca Redonda por CMV y por 3ltimo de nuevo el Judi3n es la m3s afectada por TSWV. En cuanto a las variedades menos afectadas podemos observar que por BCMV las menos afectadas son la Blanca Arrocina y Judi3n, por BCMNV la Blanca Redonda, por CMV Blanca Ri3n3n y por 3ltimo por TSWV la Morada Larga. En la gr3fica tambi3n se observa claramente como BCMNV es el virus que menos afecta y TSWV el que m3s, seguido por BCMV.

4.2 INFECCI3N VIRAL EN LAS VARIEDADES DE JUD3A DE EL BARCO DE 3VILA

Analizamos el comportamiento de cada virus ante cada una de las variedades de jud3a de El Barco estudiadas y con el objetivo de recopilar toda la informaci3n anteriormente expuesta para poder tener una imagen m3s clara de los resultados clasificados en funci3n de los virus en lugar de las variedades como anteriormente.

BCMV

La gr3fica de la figura 4.17 muestra la incidencia de virus del mosaico com3n de la jud3a (BCMV) en las distintas variedades de jud3a analizadas. La variedad morada larga es sin duda, la m3s afectada por este virus, con un 100% de plantas infectadas. Le sigue en importancia la variedad blanca ri3n3n con un 80% y la variedad redonda con un 50%. Las m3s resistentes al virus BCMV son la variedad blanca arrocina y la especie judi3n de Barco, ambas poseen un 40% de infectividad v3rica. Cabe destacar el hecho de que el Judi3n y la variedad Morada Larga compartan parcela y aun as3 los resultados ante este virus son sorprendentemente diferentes. El hecho de que en el caso de estar todas las plantas afectadas por BCMV no exista ninguna afectada por el otro potyvirus podr3a demostrarnos la posible competencia que existe entre ambos en el momento de la infecci3n.

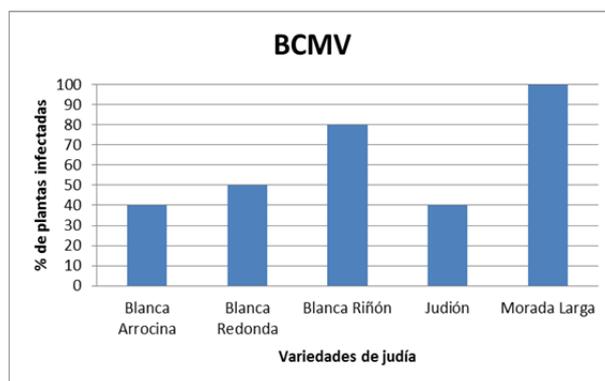


Figura 4.17: Gr3fica comparativa de la infecci3n de BCMV en las distintas variedades analizadas.

El hecho de que en el caso de estar todas las plantas afectadas por BCMV no exista ninguna afectada por el otro potyvirus podr3a demostrarnos la posible competencia que existe entre ambos en el momento de la infecci3n. En cuanto al momento de aparici3n del virus BCMV en cada una de las variedades se observa que en las variedades Blanca Ri3n3n y Morada Larga se encuentra presente desde el inicio del ciclo vegetativo (17 dps y 38 dps respectivamente), a continuaci3n aparece en la variedad Blanca Redonda, despu3s en la Blanca Arrocina y en la 3ltima que aparece es en el Judi3n de Barco. En todas las variedades el virus permanece hasta el final de su ciclo vegetativo. BCMV es

considerado uno de los patógenos más comunes e importantes que afectan el cultivo de la judía a nivel mundial, su distribución abarca los cinco continentes (MORALES y BOS, 1988) y es, de los virus transmitidos por semilla, el de mayor incidencia en gran parte de las áreas de producción de judía (MORALES y SING, 1997; SANTALLA et. al, 1998), estando presente en todas las zonas de cultivo de judía españolas (SAÍZ et. al, 1995; GONZÁLEZ, 2004). Las pérdidas económicas se deben a la reducción del rendimiento (hasta en un 80%) y a la baja calidad del producto cosechado (SÁIZ, 1994). Este virus es, junto a TSWV, el que más afecta a los cultivos de judía en esta comarca del El Barco de Ávila-Piedrahíta.

BCMNV

La siguiente gráfica de la figura 4.18 muestra la incidencia del virus necrótico de la judía (BCMNV) en las distintas variedades de judía analizadas. La especie judión de Barco es la más afectada por este virus, con un 40% de infección, le sigue la variedad blanca riñón con un 30% y la variedad blanca arrocina con un 20%. Las variedades menos afectadas por el BCMNV son la blanca redonda, con un escaso 10% y la morada larga que no se ve afectada por este virus. En los últimos años se están llevando a cabo diversos estudios para estudiar la posible resistencia a potyvirus (I. YEAM et. al, 2007; G. PASEV et. al, 2013). El Judión y la variedad Morada Larga, a pesar de compartir parcela, tienen estos resultados tan sorprendentemente distintos, sumando estos datos a los obtenidos en BCMV parece que el virus BCMV tiene preferencia por la variedad Morada Larga y BCMNV por el Judión de Barco. Podemos decir que este virus, BCMNV, es el que menos afecta a la media de todas las plantas de judía objeto de estudio. Este virus presenta la menor incidencia de los cuatro analizados.

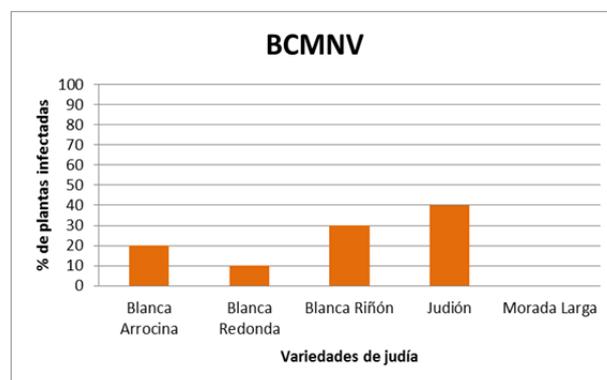


Figura 4.18. Gráfica comparativa de la infección de BCMNV en las distintas variedades analizadas.

En cuanto al momento de aparición de BCMNV en cada una de las variedades se observa que en la variedad Blanca Riñón es en la que primero aparece (a los 17 dps), a continuación aparece en las variedades Blanca Arrocina y Judión (45 y 66 dps respectivamente) y en la última que aparece es en la Blanca Redonda (59 dps). No existe infección por BCMV en la variedad Morada Larga. En todas las variedades permanece hasta el final del ciclo vegetativo. Los datos sobre los dos potyvirus obtenidos en este proyecto coinciden con los estudios realizados por FLORES-ESTÉVEZ et. al, (2003) en México en los que el BCMV resultó más abundante (63%) que BCMNV (45%), así como con los estudios llevados a cabo por GILBERTSON et. al, 2001 en la judía en California y más concreto en España, BCMV también resultó predominante sobre BCMNV en zonas productoras de judía en los estudios de SAÍZ, 1994 y CIFUENTES, 2001.

CMV

La figura 4.19 muestra la incidencia de virus del mosaico del pepino (CMV) en las distintas variedades de judía analizadas.

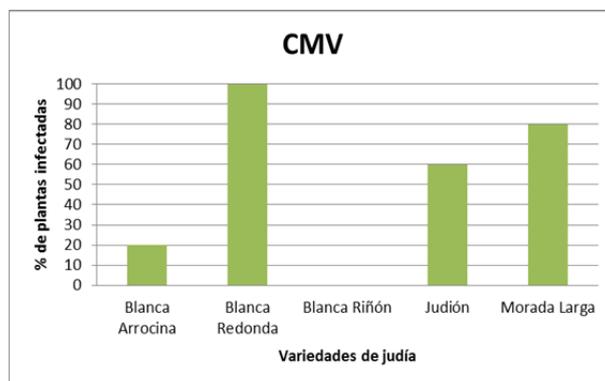


Figura 4.19. Gráfica comparativa de la infección de CMV en las distintas variedades analizadas.

La variedad blanca redonda es la más afectada por este virus, con un 100% de plantas infectadas. Le sigue en importancia la variedad morada larga con un 80% de plantas infectadas seguida de la especie judi3n de Barco con un 60%. Las variedades menos afectadas son la blanca arrocina, con un 20% de plantas infectadas y por supuesto la variedad más resistente es la blanca riñ3n que no posee ninguna de sus plantas afectadas por el cucumovirus CMV. Este virus ha resultado ser, por orden descendente de infectividad, el tercero de los cuatro estudiados. Este resultado es algo verdaderamente positivo, puesto que este virus es un auténtico problema al tener un rango de huésped amplísimo, lo que dificulta su control (GONZÁLEZ, 2004), afecta a más de 775 especies de 365 géneros pertenecientes a 85 familias de mono y dicotiledóneas, sobre todo en regiones templadas (DOUINE et. al, 1979) y es a nivel mundial el primer causante de pérdidas económicas en hortícolas y ornamentales cultivadas al aire libre (TOMLINSON, 1987). CMV es, dentro del grupo de los cucumovirus, es el más distribuido por el mundo y el más estudiado. De nuevo observamos la sorprendente diferencia que existe entre el Judi3n y la variedad Morada Larga a pesar de que ambas comparten parcela. En cuanto al momento de aparición del virus en las diferentes variedades se observa que en las variedades Blanca Redonda y Morada Larga es en las primeras en que se detecta al virus (a los 45 y 66 dps respectivamente), a continuación aparece ya en la variedad Blanca Arrocina y Judi3n (a los 59 y 80 dps respectivamente). No existe infección por CMV en la variedad Blanca Riñ3n. Excepto en la variedad Blanca Arrocina, en la cual la infección es puntual, el virus se mantiene hasta el final del ciclo vegetativo de la planta.

TSWV

Para finalizar, la gráfica de la figura 4.20 muestra la incidencia de virus del bronceado del tomate (TSWV) en las distintas variedades de judía analizadas.

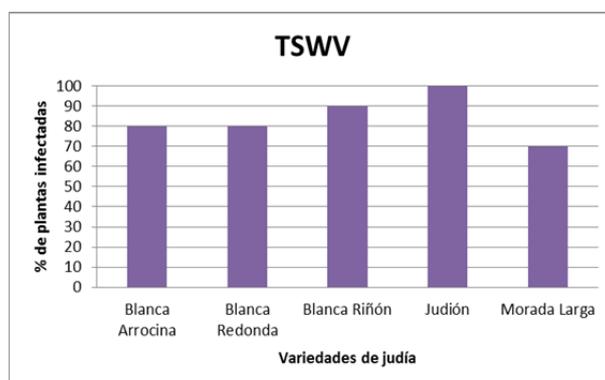


Figura 4.20: Gráfica comparativa de la infección de TSWV en las distintas variedades analizadas.

La especie judión de Barco es la más afectada por este virus, con un 100% de sus plantas infectadas, le sigue la variedad blanca riñón con un 90% y las variedades blanca redonda y blanca arrocina, ambas con un 80% de sus plantas afectadas por el TSWV. El TSWV ha resultado ser el virus más infectivo de los cuatro analizados para estas variedades de judía, con gran diferencia con respecto al segundo, el BCMV. Aunque este virus afecta en gran medida a todas las variedades de judía objeto de estudio, podríamos decir que la más resistente es la variedad morada larga, aunque posee un significativo 70% de infección. Su detección en este proyecto coincide con otros estudios de detección en judía en Asturias en las campañas de 1994 y 1995 (GONZÁLEZ, 2004) y en la provincia de Almería (SÁIZ, 1994). Al igual que hemos observado en el resto de virus existe una sorprendente diferencia entre el Judión de Barco y la Variedad Morada Larga a pesar de que ambas comparten parcela. En cuanto al momento de aparición del virus en cada una de las variedades se observa que la variedad que primero resulta afectada es la Blanca Riñón (17 dps) y el resto de variedades se ven afectadas a continuación de esta, la Blanca Redonda y Blanca Arrocina a los 45 dps y el Judión y la Morada Larga a los 66 dps. El virus se mantiene hasta el final del ciclo vegetativo de la planta. Es el único de los virus estudiados que se transmite por trips en lugar de áfidos, esto, junto con el hecho de que es un virus “olvidado” en su prevención, podría ser una razón para su alta incidencia en el cultivo de la judía en la comarca de El Barco de Ávila-Piedrahíta. Además es un virus de difícil detección en el campo debido a la amplia variedad de síntomas en función de la especie, el aislamiento del virus...Hasta ahora el tospovirus había sido citado en cultivos de leguminosas en España, pero principalmente en haba (FRESNO et. al, 1997), sin embargo, comienza a ser un virus de importante detección en judía (GONZÁLEZ, 2004; DE RON et. al, 2010). Su primera detección en Castilla y León fue en el cultivo de la lechuga de variedad brassica (MORENO et. al, 2003), no teniendo constancia de haberse detectado en el cultivo de esta comunidad hasta el presente trabajo de investigación. Su difusión no parece estar muy controlada en esta comarca, ya que es el virus con mayor incidencia, tanto en parcelas cercanas como en otras separadas entre sí hasta 5 kilómetros.

Finalmente, en la gráfica de la figura 4.21 se muestra la infección de los 4 virus estudiados en cada una de las variedades de judía.

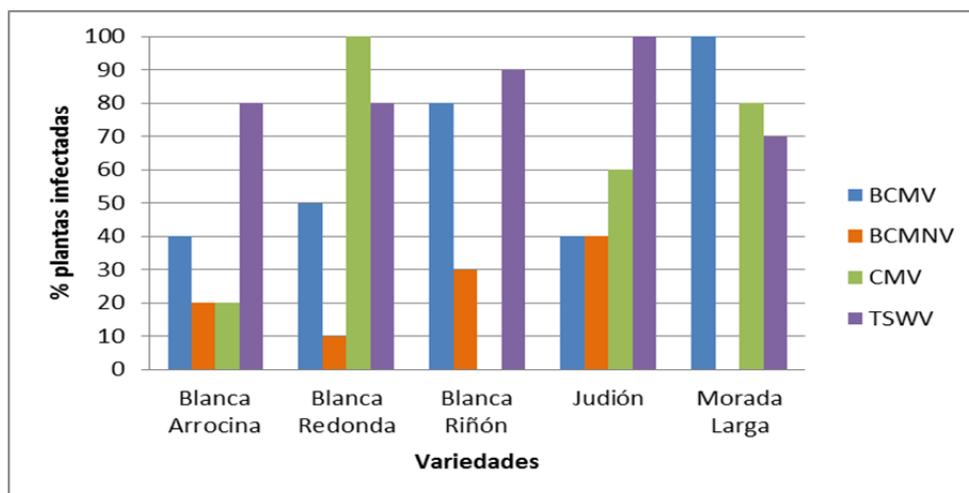


Figura 4.21: Gráfica comparativa de la incidencia de cada uno de los virus estudiados en cada una de las variedades de judía de El Barco de Ávila.

El Judión de Barco y las variedades Morada Larga y Blanca Redonda son las más afectadas y la Blanca Arrocina la menos afectada

5. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en las diferentes fases de este proyecto de investigación (fase de campo y fase de laboratorio) se pueden deducir las siguientes conclusiones: El cultivo de la judía enmarcado dentro de la "I.G.P: El Barco de Ávila" es un cultivo medianamente afectado por determinadas enfermedades víricas.

Respecto a las enfermedades víricas:

- Los porcentajes de infección encontrados son muy variables, desde un 90% en el caso del tospovirus TSWV, a un 62% en el potyvirus BCMV, 51% para CMV y por último, el menos infectivo ha resultado ser el potyvirus BCMNV con solo un 20% de infectividad.
- TSWV es el virus que más daños causa en esta comarca y BCMNV el que menos.
- TSWV ha sido capaz de infectar al 100% de las plantas de Judión.
- CMV ha sido capaz de infectar al 100% de las plantas de Blanca Redonda.
- CMV posee un 0% de infección en Blanca Riñón
- BCMNV posee un 0% de infección en Morada Larga.
- BCMV parece preferir la variedad morada larga y BCMNV el judión, ya que ambas comparten parcela y existen unos datos de infección muy distintos.
- CMV y TSWV también poseen datos diferentes en las dos variedades que comparten parcela, CMV infecta más a la variedad morada larga y TSWV al judión.

Respecto a las variedades de judía:

- **La variedad morada larga** es la más afectada, con 25 del total de 40 plantas infectadas.
- La variedad **blanca redonda** es una de las variedades estudiadas más afectadas, situándose en el segundo puesto junto al judión.
- El **judión de Barco** se sitúa en el segundo puesto de variedades más susceptibles a las enfermedades analizadas, con 24 de sus 40 ejemplares afectados por al menos uno de los 4 virus. Presenta un porcentaje de infección superior a la media en todos los casos excepto BCMNV.
- **Blanca riñón** presenta 0% de infección por CMV y está a escasos 60 metros de la blanca redonda (la cual presenta un 100%). Presenta porcentaje de infección medio.
- La **variedad arrocina** la menos afectada por estas 4 infecciones víricas.

AGRADECIMIENTOS

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (2005-2007)

Institución Gran Duque de Alba (Diputación Provincial de Ávila) (2005)

Caja de Ahorros de Ávila (2005-2007 y 2008-2010)

Consejo Regulador de la Denominación Específica Judías de El Barco (25 aniversario de su creación en 2014)

Cooperativa Campesina Tormes.

Grupo de Investigación en Producción Vegetal y Calidad Agroalimentaria de la Universidad Católica de Ávila.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- ABAD, J.A., J.W. MOYER, G.G. KENNEDY, G.A. HOLMES, AND M.A. CUBETA. 2005. "Tomato spotted wilt virus on potato in eastern North Carolina". *American Journal of Potato Research* 82: 255–261.
- ADKINS S., 2000. "Tomato spotted wilt virus – positive steps towards negative success". *Molecular Plant Pathology*, 1, 151–157.
- BIDDLE, A. J., CATTILIN, N. D, 2007. "Colour handbook of pests and diseases of peas and beans". Academic Press.
- CAMPBELL, N.A., REECE, J., 2007. *Biología*. Editorial Médica Panamericana. pp 345-345.
- BULAJIĆ, A.R. , STANKOVIĆ, I.M., & VUČUROVIĆ, A.B., RISTIĆ, D.T; MILOJEVIĆ, K.; IVANOVIĆ, M.S; KRSTIĆ, B.B. "Tomato Spotted Wilt Virus – Potato Cultivar Susceptibility and Tuber Transmission".2013. *Am. J. Potato Research*. DOI 10.1007/s12230-013-9337-9.
- CIFUENTES, Z.G., 2001. "Epidemiología de los potyvirus que infectan el cultivo de judía grano". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid
- CLARK, M.F., BAR-JOSEPH, M., 1984. "Enzyme immunosorbent assays in plant virology". *Methods in Virology* 7: 51-85.
- CONTI, M., GALLITELLI, D., LISA, V., LOVISOLO, O., MARTELLI, G.P., RAGOZZINO, A., RANA, G.L., VOVLAS, C., 2000. "Principales virus de las plantas hortícolas". Ediciones Mundi-Prensa. pp. 188.
- DE BLAS, C., 1992. "Estudios sobre técnicas de detección de virus y patógenos subvirales vegetales y búsqueda de resistencia al virus del mosaico del pepino (CMV) en germoplasma de pimiento". Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 166 pp.
- DEBRECZENI, D.E; RUBIO, L.; ARAMBURU, J.; LÓPEZ, C.; GALIPIENSO, L.; SOLER, S. Y BELLIUERE, B. 2013. "Transmission of *Tomato spotted wilt virus* isolates able and unable to overcome tomato or pepper resistance by its vector *Frankliniella occidentalis*" *Annals of Applied Biology* ISSN 0003-4746.
- DE RON, A.M., GONZÁLEZ, A.M., DE LA FUENTE, M., RODIÑO, A.P., MANSILLA J.P., SABURIDO, M.S., SANTALLA, M., 2010. "Catálogo de germoplasma de Phaseolus de la Misión Biológica de Galicia-CSIC". Misión biológica de Galicia-CSIC, Asociación Española de Leguminosas (AEL). 148pp.
- DEZEEUW, D.J., CRUM, R.A., 1963. "Inheritance of resistance to tobacco ringspot and cucumber mosaic viruses in black cowpea crosses". *Phytopathology* 53: 337-340.
- DOOLITTLE, SP., 1916. "A new infectious mosaic disease of Cucumber". *Phytopathology* 6: 145-147.
- DOUINE, L., QUIOT, J. B., MARCHOUX, G. y ARCHANGE, P., 1979. "Recensement des espèces vegetales sensibles au virus de la Mosaique du Concombre (CMV)". Etude bibliographique. *Ann. Phytopathol.*, 11: 439-475.
- EDWARDSON, J.R., CHRISTIE, R.G., 1991. Cucumoviruses. En "CRC handbook of viruses infecting legumes". 293-319. CRC Press Boca Raton.
- ESCRIBANO, M.R., SANTALLA, M., DE RON, A.M., 1997. "Genetic diversity in pod and seed quality traits of common bean populations from Northwestern Spain". *Euphytica* 93, 71-81.

- FLORES-ESTÉVEZ, N., ACOSTA-GALLEGOS, J.A., SILVA-ROSALES, L., 2003. "Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus in Mexico". *Plant Disease*, 87: 21-25.
- FRESNO, J., CASTRO, S., BABIN, M., CARAZO, G., MOLINA, A., DE BLAS, C., ROMERO, J., 1997. "Virus diseases of Broad bean in Spain". *Plant Disease* 81(1): 112.
- GARCÍA-LUQUE, I., DÍAZ-RUIZ, J.R., RUBIO-HUERTOS, M., KAPER, J.M., 1983. "Cucumovirus survey in Spanish economically important crops". *Phytopatholog. Mediterr.*, 22: 127-132.
- GARCÍA-LUQUE, I., KAPER, J.M., DÍAZ-RUIZ, J.R. RUBIO-HUERTOS, M., 1984. "Emergence and characterization of satellite RNAs associated with Spanish cucumber mosaic virus isolates". *J. Gen. Virol.* , 65:539-547.
- GARNICA, I., YANGUAS, R., LEZÁUN, J.A. y SOLA, D. 2007. "Virus del bronceado del tomate: una enfermedad bajo vigilancia". *ITG Agrícola. Navarra Agraria Mayo-Junio 2007*: Pp 5-10.
- GONZÁLEZ, A.J., 2004. "Virus fitopatógenos transmisibles por semilla en judía tipo "granja asturiana". *Bol. San. Veg. Plagas*, 30:595-603.
- HANSEN I.M., LAPIDOT M., THOMMA B.P. 2010. "Emerging viral diseases of tomato crops". *Molecular Plant – Microbe Interactions*, **23**, 539–548.
- HULL, R. 2002. *Mattheus Plant Virology*. Academic Press.
- IVANOV,K.I.; ESKELIN,K.; LOHMUS, A Y MÄKINEN,K. 2014. "Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection" *Journal of General Virology*, 95, 1415–1429. DOI 10.1099/vir.0.064220-0
- JAGGER, I.C., 1916. "Experiments with the cucumber mosaic disease". *Phytopathology* 6: 148-151.
- JORDA, D., OSCA, J.M., 1991. "Un nuevo virus en España: el TSWV". *Estudios de Fitopatología. Sociedad Española de Fitopatología. Ed. Consejería de Agricultura, Industria y Comercio de Bodajoy*: p. 35-40.
- JORDA, C., ALFARO, A., ARANDA, M.A., MORIONES, E., GARCÍA-ARENAL, F., 1992. "Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes in Eastern Spain". *Plant Dis*, 76: 363-366.
- KAZINCZI, G.;HORVÁTH,J. y TAKÁCS, A. 2007. "Tospoviruses on Ornamentals". *Plant Viruses* 1: 142–162.
- LUIS-ARTEAGA, M., 1989. "Virosis y micoplasmosis del pimiento cultivado al aire libre en España. Identificación de virus y caracterización de cepas". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- MATTHEWS, R.E.F., 1991. "Plant Virology. 3th Edition". Academic Press Inc, New York, 835 pp.
- MESSIAEN, C.M., BLANCARD, D., ROUXEL, F., LAFON, R., 1991. "Les maladies des plantes maraîchères. 3e Edition". INRA, Paris.
- MILLS, L.J., SILBERNAGEL, M.J., 1992. "A rapid screening technique to combine resistance to halo blight and bean common mosaic virus in *Phaseolus vulgaris* L." *Euphytica* 58:201-208.
- MORALES, F.J., BOS, L., 1988. "Bean common mosaic virus, AAB descriptions of plant viruses" No. 337, 6pp.
- MORALES, F.J., SINGH, S.P. 1997. "Inheritance of the mosaic and necrosis reactions induced by bean severe mosaic comoviruses in *Phaseolus vulgaris* L". *Euphytica* 93: 223-226.

- MURANT, E., PONZ, F., ROMERO, J., HARRISON, B., 1990. "Búsqueda del virus del mosaico del pepino y de sus RNAs satélites en cultivos hortícolas de diferentes regiones españolas". II Congreso Nacional de Virología. Valladolid: 175.
- NADERPOUR, M. y JOHANSEN, I.E. 2011. "Visualization of resistance responses in *Phaseolus vulgaris* using reported tagged clones of *Bean Common mosaic virus*". Virus Research. 159. Pp: 1-8.
- NEGRI, V., TOSTI, N., 2002. "Phaseolus genetic diversity maintained on farm in central Italy". Gen Resour Crop Evol 47, 141-146.
- PAPPU, H.R.; JONES, R.A.C y JAIN, R.K. 2009. "Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead". Virus Research 141: 219–236.
- PALUKAITIS, P., ROOSSINCK, M.J., DIETZGEN, R.G., FRANCKI, R.I.B., 1992. "Cucumber mosaic virus". Advances in virus research 41: 281-348.
- PARELLA, G., GOGNALONS, P.; GEBRE-SELASSIE, K.; VOLVAS, C. y MARCHOUX, G. 2003. "An update of the host range of Tomato Spotted wilt virus". Journal of Plant Pathology 85: 227–264.
- PASEV, G; KOSTOVA, D. y SOFKOVA, S. 2014 "Identification of Genes for resistance to Bean Common Mosaic Virus and Bean Common Mosaic Necrosis Virus in Snap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Breeding Lines Using Conventional and Molecular Methods" Journal of Phytopathology 162. doi: 10.1111/jph.12149
- PEÑA-IGLESIAS, A., FISAC, R., ROMERO, J., FRESNO, J., CARAZO, G., 1979. "El mosaico de la platanera canaria: I. Caracterización biológica, serológica, molecular y ultraestructural de una estirpe (de serotipo To) del virus del mosaico del pepino". Anales INIA, 12: 155-179.
- PIERGIOVANNI, A.R., CERBINO, D., GATTA, C.D., 2000. "Diversity in seed quality of common bean populations from Basilicata (Southern Italy)". Plant Breeding 119, 513-516.
- PLYUSNIN, A., B.J.; BEATY, R.M.; ELLIOTT, R.; GOLDBACH, R.; KORMELINK, Å.; LUNDKVIST, C.S.; SCHMALJOHN Y TESH, R.B. 2011. "Bunyaviridae. In Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses", Ed. A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, and E.J. Lefkowitz, 725–741. San Diego: Elsevier Academic Press.
- POCHARD, E., DAUBÈZE, A.M., 1989. "Progressive construction of a polygenic resistance to cucumber mosaic virus in the pepper". Proceedings of the 7 Th EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Capsicum and Eggplant, Kragujevac-Yugoslavia, pp 187-191.
- SAIZ, M., 1994. "El virus del mosaico común de la judía. Caracterización biológica, serológica y molecular de aislados españoles". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 141pp.
- SAKIMURA, K., 1962. The present status of thrips-borne viruses. In: "Maramorosh, K. (Ed). Biological transmission of disease agents. New York: Academic Press", 33-40.
- SANTALLA, M., RODIÑO, A.P., DE RON, A.M., ABELLEIRA, A., MANSILLA, P., 1998. "Estudio preliminar de la incidencia del virus del mosaico común en variedades autóctonas de judía común". Actas de Horticultura 22: 228-232.
- SEGUNDO et al. 2008. "Occurrence and incidence of viruses infecting green beans in south-eastern Spain". European Journal of Plant Pathology. 122. Pp: 579-591.
- SINGH, P.S., 2001. "Broadening the genetic base of common bean cultivars". Crop Sci 41, 1659-1675.

- TERRALIA, 2004. "Tospovirus". (On line <http://www.terralia.com/revista22/pág.66.asp>.)
- TOMLINSON, J.A., 1987. "Epidemiology and control of virus diseases of vegetables". *Annals of Applied Biology* 110: 661-681.
- TORRANCE, L., JONES, R. A. C., 1981. "Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses". *Plant Pathology* 30: 1-24.
- VAN WEEMEN, B.K. 2005. "The rise of EIA/ELISA". *Clinical Chemistry*. 51:12.
- VERMA, P. y GUPTA, U.P., 2010. "Immunological detection of bean common mosaic virus in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves". *Indian Journal of Microbiology*. 50. Pp: 263–265.
- WIJKAMP, I.; GOLDBACH, R. y PETERS, D., 1996. "Propagation of tomato spotted wilt virus in *Frankliniella occidentalis* does neither result in pathological effects nor in transovarial passage of the virus". *Entomología Experimentalis et Applicata*. 81. pp: 285-292.
- YEAM, I.; CAVATORTA, J.R.; RIPOLL, D.R.; BYOUNG-CHEORL KANG y JAHNA, M.M. 2007. "Functional Dissection of Naturally Occurring Amino Acid Substitutions in eIF4E That Confers Recessive Potyvirus Resistance in Plants" *The Plant Cell*, Vol. 19: 2913–2928.