



Agrociencia

ISSN: 1405-3195

agrocien@colpos.mx

Colegio de Postgraduados

México

Rodríguez Alvarado, Gerardo; Kurath, Gael; Dodds, J. Allan
Cross protection between and within subgrups I and II of cucumber mosaic virus isolates from pepper
Agrociencia, vol. 35, núm. 5, septiembre-octubre, 2001, pp. 563-573
Colegio de Postgraduados
Texcoco, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30235510>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

CROSS PROTECTION BETWEEN AND WITHIN SUBGROUPS I AND II OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS ISOLATES FROM PEPPER

PROTECCIÓN CRUZADA CON AISLAMIENTOS DEL SUBGRUPO I Y II DEL VIRUS MOSAICO DEL PEPINO AISLADOS EN CHILE

Gerardo Rodríguez-Alvarado¹, Gael Kurath², and J. Allan Dodds³

¹Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Apartado Postal 128, La Paz, B. C. S. México 23090. ²National Biological Service, NW Biological Science Center, 6505 NE 65th St. Seattle, WA 98115. ³Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, CA 92521. (gralvara@cibnor.mx)

ABSTRACT

In a study of cross protection between plant viruses, two severe cucumber mosaic virus (CMV) isolates from field grown pepper plants, CMV-SD2 (subgroup I) and CMV-35 (subgroup II), did not elicit disease symptoms when inoculated to pepper plants previously infected with a mild CMV strain, CMV-S (subgroup II). To investigate the mechanism of this protection, replication of the RNA of each specific strain was assessed in various tissues of cross-protected and singly-infected pepper plants. DsRNA analysis was used for specific detection of the RNA of CMV-SD2 and CMV-S strains, which belong to different CMV subgroups. In plants cross-protected with CMV-S and challenged with CMV-SD2, DsRNA analysis showed no detectable replication of CMV-SD2 RNA in either challenge inoculated or systemically infected leaves. Because CMV-S and CMV-35 belong to the same CMV subgroup and have identical dsRNA patterns, an RNase protection assay based on the coat protein gene of RNA 3 was used to detect and distinguish the RNA of each strain. RNase protection analysis showed the absence of any detectable RNA of the challenge strain, CMV-35, in not inoculated and systemically-infected leaf tissue of protected and challenged plants. These results indicate that cross protection in pepper plants involved a lack of any detectable replication of the CMV challenge strain. This is the first report of a cross protection study involving CMV strains in which the protective strain prevented replication of challenge strains from both subgroups I and II.

Key words: Cross protection, DsRNA analysis, pepper viral diseases, RNase protection assay.

INTRODUCTION

Cross protection has been described as a phenomenon whereby a plant previously infected with one mild (protective) strain of a virus is protected against the effects of a second

Recibido: Abril, 2000. Aprobado: Octubre, 2001.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 35: 563-573. 2001.

RESUMEN

En experimentos de protección cruzada con virus vegetales, dos aislamientos severos del virus mosaico del pepino (CMV) obtenidos en cultivos de chile, CMV-SD2 (subgrupo I) y CMV-35 (subgrupo II), no produjeron síntomas al ser inoculados en plantas de chile infectadas previamente con la variante benigna CMV-S (subgrupo II). Para investigar el mecanismo de protección observado, se analizó la replicación del ARN de cada variante viral en varios tejidos de las plantas protegidas con la variante benigna y de las plantas control. Análisis de dsARN se llevó a cabo para detectar específicamente el ARN de las variantes CMV-SD2 y CMV-S, las cuales pertenecen a diferentes subgrupos. En las plantas protegidas con CMV-S e inoculadas posteriormente con CMV-SD2, el análisis de dsARN no detectó replicación del ARN de CMV-SD2 en las hojas inoculadas o en hojas superiores. Debido a que CMV-S y CMV-35 pertenecen al mismo subgrupo y tienen patrones de bandas electroforéticas de dsARN idénticas, se usaron ensayos de protección con ARNasas basados en el gen de la cubierta viral proteínica del ARN 3, para detectar y distinguir el ARN de cada variante. El análisis de protección con ARNasas no detectó ARN de la variante agresiva, CMV-35, en tejido de hojas inoculadas y hojas superiores de plantas protegidas con CMV-S e inoculadas con CMV-35. Estos resultados indican que la protección cruzada en plantas de chile involucra la ausencia de replicación detectable de la variante retadora (challenge). Este es el primer reporte de un estudio de protección cruzada que involucra variantes de CMV, en el cual la variante protectora previno la replicación de las variantes retadoras de los subgrupos I y II.

Palabras clave: Protección cruzada, análisis de dsARN, enfermedades virales en chile, ensayos de protección con ARNasas.

INTRODUCCIÓN

La protección cruzada se ha descrito como un proceso donde una planta infectada con una variante benigna (protectora) de un virus se ve protegida contra los efectos de una segunda variante (desafiante) de ese virus. Normalmente, la variante protectora produce síntomas ligeros y la variante desafiante síntomas severos cuando una u otra se presentan en una infección,

(challenge) strain of that virus. Typically, the protective strain induces mild symptoms and the challenge strain induces more severe symptoms when present in single infections, but it is also expected that a severe strain will interfere with a mild one (Dodds, 1982). Cross protection has been used for commercial purposes to protect crops against infection with severe virus strains. Examples have involved the following host/virus combinations: citrus/citrus tristeza virus (Costa and Müller, 1980), papaya/papaya ringspot virus (Yeh *et al.*, 1988), tomato/tomato mosaic virus (Broadbent, 1976), and tomato, pepper, and tobacco/cucumber mosaic virus (CMV) plus satellite RNA (Tien and Wu, 1991). This small number of examples is due to at least two factors. One is the belief that this method of disease management should be used only in extreme situations because it involves intentional spread of a live virus as the cross protecting strain (Matthews, 1991). The second factor is the lack of mild strains for many viruses.

Previous studies of CMV cross protection have been carried out using strains from the two CMV subgroups (Dodds *et al.*, 1985; Montasser *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1989). In those studies, ELISA (Montasser *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1989) and dot blot hybridization (Wu *et al.*, 1989) methodologies were used to detect and distinguish the protective and the challenge strains. Analysis of double-stranded RNA (dsRNA) and electrophoresis of virions have also been used in studies of cross protection (Dodds, 1982; Dodds *et al.*, 1985) but, again, these procedures are restricted to analysis of strains from different subgroups or are based on exceptional characteristics of an individual strain.

Replication of the protective and challenge virus strains for other virushosts combinations during cross protection experiments has also been analyzed by serology (Rezende and Sherwood, 1991; Wen *et al.*, 1991), dot blot hybridization (Wen *et al.*, 1991), and return-polyacrylamide gel electrophoresis (Singh *et al.*, 1990). More recently, an RNase protection assay was used to verify reciprocal cross protection between two variants of satellite tobacco mosaic virus (STMV). The variants differed by only 5 of 1059 nucleotides, and had no discernible differences in their biological properties (Kurath and Dodds, 1994).

We report here results of cross protection experiments and a comparison of methodologies to evaluate replication of the protective and challenge strains in a California grown pepper type. This work provides new information on the mechanism of cross protection by addressing the question of whether the RNA of challenge strains from two CMV subgroups were actively replicating in inoculated and systemically-infected leaves of protected and challenged pepper plants.

pero también se espera que la variante severa interferirá en la infección de una variante benigna (Dodds, 1982). La protección cruzada se ha usado comercialmente para proteger a los cultivos contra la infección de variantes virales severas. Hay ejemplos que han involucrado las siguientes combinaciones de hospedero/virus: cítricos/virus tristeza de los cítricos (Costa y Müller, 1980), papaya/virus de la mancha anular del papayo (Yeh *et al.*, 1988), tomate/virus del mosaico del tomate (Broadbent, 1976), y tomate, chile y tabaco/virus del mosaico del pepino (CMV) con el satélite ARN (Tien y Wu, 1991). Este numero pequeño de ejemplos se debe por lo menos a dos factores. El primero es la creencia de que este método de manejo de enfermedades se debe usar solamente en situaciones extremas, porque involucra la diseminación intencional de un virus activo que actúa como la variante protectora (Matthews, 1991). El segundo es la ausencia de variantes benignas para muchos virus.

Los estudios previos de protección cruzada del CMV se han hecho con variantes pertenecientes a los dos subgrupos de CMV (Dodds *et al.*, 1985; Montasser *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1989). En esos estudios, las metodologías de ELISA (Montasser *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1989) e hibridación por "dot blot" (Wu *et al.*, 1989) se usaron para detectar y distinguir las variantes protectora y desafiante. El análisis de ARN de doble cadena (dsARN) y la electroforesis de viriones también se han usado en estudios de protección cruzada (Dodds, 1982; Dodds *et al.*, 1985) pero, otra vez, dichos procedimientos se han limitado al análisis de variantes de subgrupos diferentes o están basados en características excepcionales de una variante individual.

La replicación de las variantes virales protectora y desafiante para otras combinaciones de hospedero/virus durante experimentos de protección cruzada también ha sido analizado por serología (Rezende y Sherwood, 1991; Wen *et al.*, 1991), hibridación por "dot blot" (Wen *et al.*, 1991) y electroforesis con geles de poliacrilamida (Singh *et al.*, 1990). Recientemente, un ensayo de protección con ARNasas fue usado para verificar la protección cruzada reciproca entre dos variantes del virus satélite del virus mosaico del tabaco (STMV). Dichas variantes difirieron solamente en 5 de 1059 nucleótidos, sin tener diferencias apreciables en sus propiedades biológicas (Kurath y Dodds, 1994).

Aquí reportamos los resultados de experimentos de protección cruzada y una comparación de metodologías para evaluar la replicación de las variantes protectora y desafiante en un tipo de chile que se cultiva en California. Este trabajo provee información nueva sobre el mecanismo de protección cruzada, al indagar si el ARN de variantes desafiantes de los dos subgrupos del CMV se replicaban activamente en hojas inoculadas y sistémicamente infectadas de plantas de chile protegidas y desafiadas.

MATERIALS AND METHODS

CMV strains and isolates, hosts, and growth conditions

CMV-S, which belongs to subgroup II (Owen and Palukaitis, 1988), was obtained from J. M. Kaper (originally isolated from *Cucurbita pepo* L. by M. H. V. Regenmortel). CMV-SD2 (subgroup I) and CMV-35 (subgroup II) were described previously (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995). The three CMV strains were maintained in *Nicotiana tabacum* L. Xanthi nc in the greenhouse or as dry tissue at 4 °C. *Capsicum annuum* L. type Anaheim (Petoseed, Saticoy, CA) was the host used for this study because it is commonly grown in California. All plants were grown in a greenhouse as previously described (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995).

Selection of protective and challenge CMV strains

CMV-S was selected as the protective strain because it has been used previously as a protective strain in cross protection experiments, it induces mild symptoms in several hosts, and it has a well characterized dsRNA pattern (Dodds, 1982; Dodds *et al.*, 1985). CMV-SD2 and CMV-35 were selected as challenge strains because they were isolated from peppers in California, and they induce severe symptoms in many pepper cultivars, including the pepper type *Capsicum annuum* L. Anaheim (G. Rodríguez-Alvarado and J. A. Dodds, unpublished). In Anaheim pepper CMV-SD2 and CMV-35 cause stunting, strong mosaic with general chlorosis, and leaf deformation. CMV-35 also induces a shoestring-like distortion at the apex of young leaves. CMV-S induces mild mosaic with no stunting or leaf deformation in Anaheim pepper plants.

Inoculations

Inocula were prepared by grinding 1 g of young, systemically-infected leaves from tobacco plants 6 to 10 days after inoculation in 5 mL of inoculation buffer (0.02 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.1% sodium thioglycollate, 0.3% sodium diethylthiocarbamate, and 0.1% celite). Inoculum of the protective CMV isolate was rubbed onto cotyledons of Anaheim pepper plants 12 days after planting. Eight days after the protective inoculation, the cotyledons and the first two leaves were rubbed with the challenge CMV inoculum using a cotton swab. CMV-S was used as the protective strain, and CMV-SD2 and CMV-35 were used as the challenge strains. In order to ensure the infectivity of each viral inoculum used they were also inoculated onto leaves of *Chenopodium quinoa* Willd, where they each produced numerous local lesions. Based on symptomatology and dsRNA analysis, infection rates of the protective strain CMV-S were 100% for each treatment in the two challenge experiments.

Challenge experiments and sampling

CMV cross protection experiments in Anaheim pepper were done using CMV-S as the protective strain and CMV-SD2 and CMV-35 as

MATERIALES Y MÉTODOS

Variantes y asilamientos de CMV, hospedantes y condiciones de crecimiento

El CMV-S, que pertenece al subgrupo II (Owen y Palukaitis, 1988), fue obtenido de J. M. Kaper (aislado originalmente de *Cucurbita pepo* L. por M. H. V. Regenmortel). El CMV-SD2 (subgrupo I) y CMV-35 (subgrupo II) fueron descritos previamente (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995). Las tres variantes de CMV fueron mantenidas en *Nicotiana tabacum* L. Xanthi nc en invernadero o como tejido seco a 4 °C. *Capsicum annuum* L. del tipo Anaheim (Petoseed, Saticoy, CA) fue el hospedero usado en el estudio porque es ampliamente cultivado en California. Todas las plantas fueron desarrolladas en invernadero como se describió previamente por Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995.

Selección de las variantes protectora y retadora del CMV

El CMV-S fue seleccionado como la variante protectora porque se ha usado previamente como tal en experimentos de protección cruzada, induce síntomas ligeros en varios hospederos y tiene un patrón de dsARN bien caracterizado (Dodds, 1982; Dodds *et al.*, 1985). El CMV-SD2 y el CMV-35 fueron seleccionados como variantes desafiantes porque fueron aislados de chiles en California e inducen síntomas severos en muchos cultivos de *Capsicum annuum* L. Anaheim (G. Rodríguez-Alvarado and J. A. Dodds, información no publicada). El CMV-SD2 y el CMV-35 causan achaparramiento, mosaico fuerte con clorosis general y deformación de hojas en chile Anaheim. El CMV-35 también induce una distorsión, en forma de agujeta, del ápice de hojas jóvenes. El CMV-S induce un mosaico ligero sin achaparramiento o deformación de hojas en plantas de chile Anaheim.

Inoculaciones

El inóculo se preparó moliendo 1 g de hojas jóvenes de plantas de tabaco que tenían de 6 a 10 días de haber sido infectadas de forma sistémica, en 5 mL de solución amortiguadora para inoculación (solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.02 M, pH 7.0, thioglicolato de sodio 0.1%, diethildithiocarbamato de sodio 0.3%, y celite 0.1%). El inóculo de la variante CMV protectora se frotó, mediante un hisopo, sobre los cotiledones de plantas de chile Anaheim de 12 días de edad. Ocho días después de la inoculación protectora, los cotiledones y las primeras dos hojas se frotaron con inóculo de la variante CMV desafiante. El CMV-S fue usado como la variante protectora y el CMV-SD2 y el CMV-35 fueron las variantes desafiantes. Para asegurar la infectividad de cada inóculo viral usado, los mismos fueron también inoculados sobre hojas de *Chenopodium quinoa* Willd, donde cada inóculo produjo numerosas lesiones locales. Con base en la sintomatología y el análisis de dsARN, las tasas de infección de la variante protectora CMV-S fueron 100% para cada tratamiento en los dos experimentos con las variantes desafiantes.

the challenge strains. The entire experiment consisted of six sets of ten Anaheim pepper plants each, comprising six different treatments: 1) A CMV-S protective inoculation followed by a CMV-SD2 challenge inoculation; 2) A CMV-S protective inoculation followed by a CMV-35 challenge inoculation; 3) A CMV-S protective inoculation followed by buffer inoculation; 4) A buffer inoculation followed by a CMV-SD2 challenge inoculation; 5) A buffer inoculation followed by a CMV-35 challenge inoculation; and, 6) A buffer treatment only at both protective and challenge inoculation times. The entire experiment was carried out twice.

Leaves for analysis were harvested at two different times, 20 d and 40 d post challenge inoculation (dpc). Harvested leaves from individual plants were divided into two or three different samples, and stored at 4 °C prior to analysis. For the harvest at 20 dpc, sample 1 consisted of one cotyledon and the first leaf (challenge inoculated tissue), and sample 2 consisted of the sixth and eighth systemically-infected leaves. For the harvest at 40 dpc, sample 1 consisted of the remaining cotyledon and the second inoculated leaf, sample 2 consisted of the fifth and seventh systemically-infected leaves, and sample 3 consisted of two systemically-infected leaves from the third branch above the cotyledons. For RNase protection assays, 100-200 mg of leaf tissue from individual plant samples were placed into microcentrifuge tubes and kept at 4 °C for no more than two hours prior to extraction. For dsRNA analyses, the remaining leaf tissue from individual plants in each of six treatments were pooled to form a total of 12 samples (6 each for samples 1 and 2) for the harvest at 20 dpc, and 18 samples (6 each for samples 1, 2, and 3) for the harvest at 40 dpc.

DsRNA analyses

DsRNA extraction and analysis were made as described previously (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995). Extraction of dsRNAs was from 2 g of leaf tissue from each sample. DsRNAs were suspended in 50 µL of TAE electrophoresis buffer (40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.8), and 10 µL were loaded per well onto 6% polyacrylamide gels. Although Anaheim cultivars are known to contain a small number of specific endogenous dsRNAs (Valverde and Fontenot, 1991; our unpublished results), these did not appear to interfere with the analysis of CMV dsRNAs in the cross protection experiments.

RNase protection assay

A hybridization probe to distinguish CMV isolates by genetic differences within RNA 3 was prepared by synthesizing minus sense radioactively labeled RNA transcripts of recombinant clone pBS51IIIX4-6 (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995). The probe (1202 nt) contained sequences representing the entire coat protein gene plus 223 nt upstream of the start codon, and the entire downstream 3' nontranslated region of CMV-S RNA 3. The probe was annealed to approximately 2 µg of total RNA extracted from plants. Total RNA from pepper plants was suspended in 10 µL of 0.1 mM EDTA, pH 8.0. Hybrids were digested with RNase A and RNase T1, and the products

Experimentos con las variantes desafiantes y muestreo

Los experimentos de protección cruzada con el CMV en chile Anaheim se llevaron a cabo usando el CMV-S como la variante protectora y el CMV-SD2 y el CMV-35 como las variantes desafiantes. El experimento completo consistió de seis grupos, cada uno con 10 plantas de chile Anaheim, y seis tratamientos diferentes: 1) Una inoculación protectora con el CMV-S seguida de una inoculación desafiante con el CMV-SD2; 2) Una inoculación protectora con el CMV-S seguida de una inoculación desafiante con el CMV-35; 3) Una inoculación protectora con el CMV-S seguida de una inoculación con solución amortiguadora; 4) Una inoculación con solución amortiguadora seguida por una inoculación desafiante con el CMV-SD2; 5) Una inoculación con solución amortiguadora seguida de una inoculación desafiante con el CMV-35; y 6) Un tratamiento con solución amortiguadora cuando otros tratamientos fueron inoculados con variantes protectoras o desafiantes. El experimento completo fue llevado a cabo dos veces.

Las hojas para el análisis fueron colectadas en dos períodos diferentes: 20 y 40 días después de la inoculación desafiante (dpc). Las hojas colectadas de plantas individuales fueron divididas en dos o tres muestras diferentes y mantenidas a 4 °C antes del análisis. Para la colecta a 20 dpc, la muestra 1 consistió de un cotiledón y la primera hoja (tejido inoculado con la variante desafiante), y la muestra 2 consistió de la sexta y octava hojas (infección sistémica de hojas superiores a las inoculadas). Para la colecta a 40 dpc, la muestra 1 consistió del cotiledón restante y la segunda hoja inoculada (tejido inoculado con la variante desafiante), la muestra 2 consistió de la quinta y séptima hojas (infección sistémica de hojas superiores a las inoculadas), y la muestra 3 consistió de dos hojas de la tercera ramaficación arriba de los cotiledones. Para los ensayos de protección con ARNas, 100-200 mg de tejido foliar de muestras de plantas individuales se colocaron en tubos de microcentrifugación y se mantuvieron a 4 °C por no más de dos horas antes de la extracción de dsARN. Para los análisis de dsARN, el resto del tejido foliar de las plantas individuales en cada uno de los seis tratamientos, se juntó para formar un total de 12 muestras (6 para cada una de las muestras 1 y 2) para la colecta a 20 dpc, y 18 muestras (6 para cada una de las muestras 1, 2, y 3) para la colecta a 40 dpc.

Análisis de dsARN

La extracción y análisis de dsARN se hicieron como se describió previamente por Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995. La extracción de dsARN se hizo a partir de 2 g de tejido foliar de cada muestra. Los dsARNs se resuspendieron en 50 µL de solución amortiguadora TAE (Tris 40 mM, acetato de sodio 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.8), y 10 µL fueron cargados por cada línea en geles de poliacrilamida al 6%. Aunque en los cultivares Anaheim es común detectar un número pequeño de dsARNs endógenos específicos (Valverde y Fontenot, 1991; resultados nuestros no publicados), estos al parecer no interfirieron con el análisis de dsRNAs de CMV en los experimentos de protección cruzada.

were analyzed in a denaturing polyacrylamide gel. Total RNA extraction, *in vitro* transcription, and the RNase protection assay were as described previously (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995).

RESULTS AND DISCUSSION

DsRNA analysis was used to determine whether the RNA of CMV-SD2 (subgroup I) was replicating in inoculated and systemic leaves of protected and challenged pepper plants. DsRNA 1 of CMV-S (subgroup II) had a faster electrophoretic mobility than dsRNA 1 of CMV-SD2 (subgroup I), allowing these two strains to be distinguished by dsRNA profile. This difference in electrophoretic mobility can be observed in Figure 1 (lane 2 shows CMV-S, and lane 3 shows CMV-SD2). Figure 1 presents results obtained at 20 dpc in inoculated (panel A) and systemically infected leaves (panel B). Plants either protected with CMV-S and not challenged (Figure 1A,B; lane 2) or protected with CMV-S and challenged with CMV-SD2 (Figure 1A,B; lane 5) showed dsRNA CMV bands that corresponded only to those of CMV-S. The complete absence of detectable CMV-SD2 dsRNAs in both inoculated and systemically infected leaves of protected plants indicated that cross protection involved inhibition of any detectable replication of CMV-SD2 RNA. This lack of detectable CMV-SD2 dsRNA was also clearly observed in the samples harvested at 40 dpc, and was reproduced at both time points in the replication of

Ensayos de protección con ARNasas

Una sonda de hibridación para distinguir aislamientos de CMV por sus diferencias genéticas dentro del ARN 3, se preparó sintetizando transcriptos de ARN, de sentido negativo y marcados radiactivamente, a partir del clón recombinante pBS51IIIX4-6 (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995). La sonda (1202 nt) contenía secuencias que representaban el gen completo de la cubierta proteínica más 223 nt anteriores al codón inicial, y toda la región no traducida hacia el extremo 3' del ARN 3 del CMV-S. La sonda fue hibridizada con aproximadamente 2 µg de ARN total extraído de plantas. El ARN total obtenido de plantas de chile fue resuspendido en 10 µL de EDTA 0.1 mM, pH 8.0. Los híbridos resultantes fueron digeridos con ARNasa A y ARNasa T1, los productos fueron analizados en geles de poliacrilamida desnaturizantes. La extracción de ARN total, la transcripción *in vitro*, y el ensayo de protección con ARNasas se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de dsARN fue usado para determinar si el ARN de CMV-SD2 (subgrupo I) se estaba replicando tanto en hojas inoculadas como en las sistémicamente infectadas de plantas de chile protegidas e inoculadas con una variante desafiante. El dsARN 1 del CMV-S (subgrupo II) tuvo una movilidad electroforética más rápida que el dsARN 1 de CMV-SD2 (subgrupo I), lo que

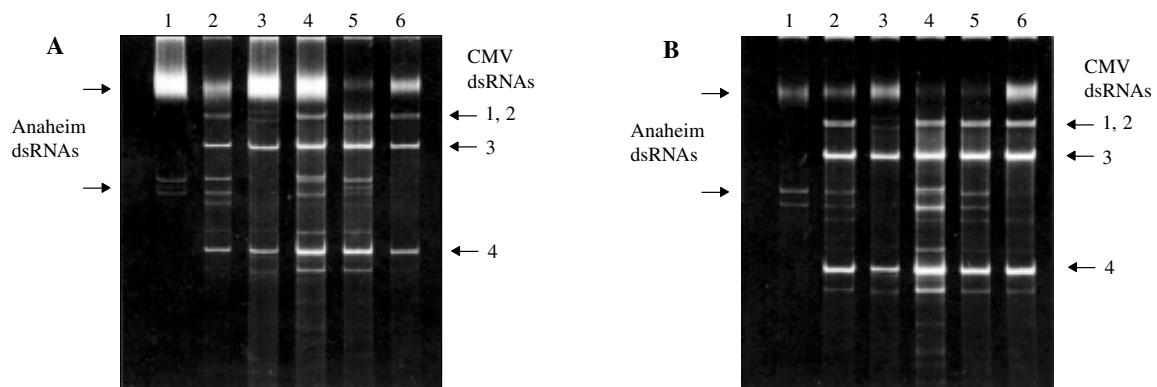
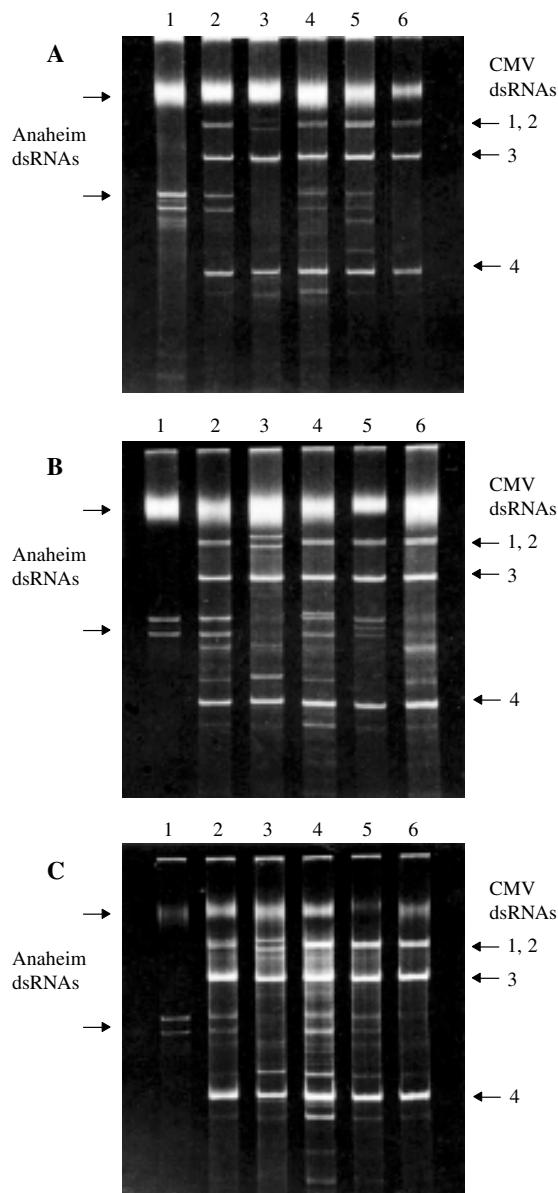


Figure 1. DsRNAs extracted from pepper plants at 20 dpc and visualized by electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel. A. Leaves analyzed were from sample 1 which represents challenge inoculated leaves. B. Leaves analyzed were from sample 2 which represents the sixth and eighth leaves systemically-infected with the challenge or protective viruses. Note the dsRNAs endogenous to this Anaheim pepper seed lot. Lanes are: (1) Mock protected and mock challenged; (2) CMV-S protected and mock challenged; (3) Mock protected and challenged with CMV-SD2; (4) Mock protected and challenged with CMV-35; (5) CMV-S protected and challenged with CMV-SD2; (6) CMV-S protected and challenged with CMV-35.

Figura 1. DsARNs extraídos de plantas de chile a 20 dpc y visualizados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. A. Las hojas analizadas fueron de la muestra 1, la cual representa hojas inoculadas con la variante desafiante. B. Las hojas analizadas fueron de la muestra 2, la cual representa las hojas sexta y octava infectadas sistémicamente con las variantes virales protectora o desafiante. Nótense los dsARNs endógenos en este lote de semilla de chile Anaheim. Los carriles son: (1) Protección y desafío simulados (ambos con solución amortiguadora); (2) Protección con el CMV-S y desafío simulado; (3) Protección simulada y desafío con el CMV-SD2; (4) Protección simulada y desafío con el CMV-35; (5) Protección con el CMV-S y desafío con el CMV-SD2; (6) Protección con el CMV-S y desafío con el CMV-35.

the entire experiment (Figure 2A,B,C; lanes 2 and 5). The detection in the gels of a small number of endogenous pepper dsRNAs and fragments of subgenomic or genomic CMV RNAs appeared to mask the results of the dsRNA analysis.

Plants protected with CMV-S and challenged with CMV-35 (Figure 1A,B; lane 6) showed dsRNA bands that could correspond to either strain, as they are not distinguishable by this method (Figure 1A,B; lanes 2 and 4). Buffer inoculated plants did not show dsRNA bands that correspond to CMV (Figure 1A,B; lane 1). Again, identical results for each treatment were obtained with samples harvested at 40 dpc (Figure 2A,B,C).



permitió que estas dos variantes fueran distinguidas por su patrón de bandas de dsARN. Esta diferencia en movilidad electroforética puede ser observada en la Figura 1 (el carril 2 muestra el CMV-S, y el carril 3 muestra el CMV-SD2). La Figura 1 presenta los resultados obtenidos a 20 dpc en hojas inoculadas (panel A) y en hojas sistémicamente infectadas (panel B). Las plantas protegidas con CMV-S y no inoculadas con la variante retadora (Figura 1A,B; línea 2) o protegidas con CMV-S e inoculadas con la variante retadora CMV-SD2 (Figura 1A,B; línea 5) mostraron bandas de CMV dsARN que correspondieron solamente a aquellas de CMV-S. La ausencia completa de CMV-SD2 dsARNs detectables en hojas inoculadas y superiores de plantas protegidas indica que la protección cruzada involucró la inhibición en la replicación de CMV-SD2 ARN. Esta ausencia de dsARN detectable del CMV-SD2 también fue claramente observada en las muestras colectadas a 40 dpc, y se repitió en ambos períodos de muestreo durante la repetición del experimento (Figura 2A,B,C; carriles 2 y 5). La detección en los geles de un número pequeño de dsARNs endógenos en chile y los fragmentos de ARNs genómicos o subgenómicos del CMV parecieron enmascarar los resultados del análisis de dsARN.

Figure 2. DsRNAs extracted from pepper plants at 40 dpc and visualized by electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel. A. Leaves analyzed were from sample 1, which represents challenge inoculated leaves. B. Leaves analyzed were from sample 2 which represents the fifth and seventh leaves systemically-infected with the challenge or protective viruses. C. Leaves analyzed were from sample 3 which represents leaves systemically-infected with the challenge or protective viruses from the third branch above the cotyledons. Note the dsRNAs endogenous to this Anaheim pepper seed lot. Lanes are: (1) Mock protected and mock challenged; (2) CMV-S protected and mock challenged; (3) Mock protected and challenged with CMV-SD2; (4) Mock protected and challenged with CMV-35; (5) CMV-S protected and challenged with CMV-SD2; (6) CMV-S protected and challenged with CMV-35.

Figura 2. DsARNs extraídos de plantas de chile a 40 dpc y visualizados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. A. Las hojas analizadas fueron de la muestra 1, la cual representa hojas inoculadas con la variante desafiante. B. Las hojas analizadas fueron de la muestra 2, la cual representa las hojas quinta y séptima infectadas sistémicamente con las variantes virales protectora o desafiante. C. Las hojas analizadas fueron de la muestra 3, la cual representa hojas de la tercera ramificación arriba de los cotiledones e infectadas sistémicamente con las variantes virales protectora o desafiante. Noténsese los dsARNs endógenos en este lote de semilla de chile Anaheim. Los carriles son: (1) Protección y desafío simulados (ambos con solución amortiguadora); (2) Protección con el CMV-S y desafío simulado; (3) Protección simulada y desafío con el CMV-SD2; (4) Protección simulada y desafío con el CMV-35; (5) Protección con el CMV-S y desafío con el CMV-SD2; (6) Protección con el CMV-S y desafío con CMV-35.

The control plants inoculated with buffer at both inoculation times remained healthy throughout the experiments. Plants that were protected with CMV-S and not challenged, showed typical mild symptoms of CMV-S. Plants that were not protected and challenged with CMV-SD2 or CMV-35 showed severe symptoms typical for those viruses in single infections. Plants protected with CMV-S and challenged with CMV-SD2 or CMV-35 showed mild mosaic symptoms typical of those induced by CMV-S. The plants were kept for 60 days after challenge inoculation and no change in symptomatology was observed.

Because strains CMV-S and CMV-35 are both in subgroup II and their dsRNA patterns are identical, RNase protection analyses were used to detect their respective replication in cross protected plants. For this assay, four individual plants from each treatment were selected. RNA from plants protected with CMV-S and not challenged, produced patterns of protected RNA fragments characteristic for CMV-S (Figure 3A,B; lanes 5-8). RNA from plants not protected and challenged with CMV-35

Las plantas protegidas con el CMV-S y desafiadas con CMV-35 (Figura 1A,B; carril 6) mostraron bandas de dsARN que pudieron corresponder a cualquiera de las dos variantes, ya que no fue posible distinguirlas por este método (Figura 1A,B; carriles 2 y 4). Las plantas inoculadas con solución amortiguadora no mostraron bandas de dsARN que correspondieran al CMV (Figura 1A,B; carril 1). Nuevamente, se obtuvieron resultados idénticos para cada tratamiento con muestras colectadas a 40 dpc (Figura 2A,B,C).

Las plantas testigo, inoculadas con solución amortiguadora a los dos tiempos de la inoculación permanecieron sanas durante todo el experimento. Las plantas protegidas con el CMV-S que no fueron desafiadas mostraron síntomas ligeros típicos del CMV-S. Las plantas que no estuvieron protegidas y que fueron desafiadas con las variantes CMV-SD2 o CMV-35 mostraron los síntomas severos típicos causados por dichos virus cuando uno de ellos causa una infección de manera individual. Las plantas protegidas con el CMV-S y desafiadas con las variantes CMV-SD2 o CMV-35 mostraron los

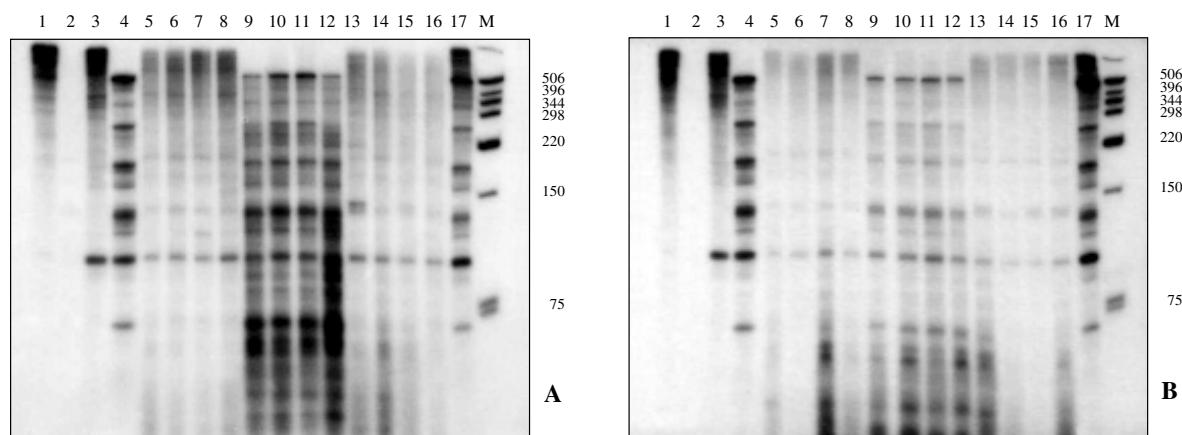


Figure 3. RNase protection pattern analysis of cross protection within subgroup II CMV strains in leaves from sample 1 which represents challenge inoculated leaves (A), or leaves from sample 2 which represents the sixth and eighth leaves systemically-infected with the challenge or protective viruses (B) of pepper plants at 20 dpc. The minus-sense probe was transcribed from a clone of the CMV-S coat protein gene (pBS51IIIX4-6) and annealed to target RNAs indicated at the top of each lane as follows: (1) Full length plus-sense transcript RNA of pBS51IIIX4-6 (no mismatch); (2) No RNA; (3) Total RNA from CMV-S infected tobacco; (4) Total RNA from CMV-35 infected tobacco; (5,6,7,8) Total RNA from CMV-S protected and mock challenged pepper plants; (9,10,11,12) Total RNA from mock protected and CMV-35 challenged pepper plants; (13,14,15,16) Total RNA from CMV-S protected and CMV-35 challenged pepper plants; (17) Artificial mix of CMV-S and CMV-35 protected RNA fragments; (M) pBR322 x Hinf I DNA marker fragments with sizes in nucleotides shown at the right margin.

Figura 3. Análisis del patrón de protección con ARNasas de protección cruzada con variantes del CMV del subgrupo II en hojas de la muestra 1, la cual representa hojas inoculadas con la variante retadora (A), u hojas de la muestra 2, la cual representa las hojas sexta y octava infectadas sistémicamente con las variantes virales protectora o desafiante (B) de plantas de chile a 20 dpc. La sonda con sentido negativo fue transcrita a partir de un clon del gen de la cubierta proteínica del CMV-S (pBS51IIIX4-6) e hibridizado a los ARNs indicados en la parte superior de cada carril en el gel, tal como sigue: (1) Transcripción completa de ARN con sentido positivo de pBS51IIIX4-6 (hibridación completa); (2) Sin ARN; (3) ARN total de tabaco infectado con CMV-S; (4) ARN total de tabaco infectado con CMV-35; (5,6,7,8) ARN total de plantas de chile protegidas con CMV-S y desafío simulado (solución amortiguadora); (9,10,11,12) ARN total de plantas de chile con protección simulada y desafiadas con el CMV-35; (13,14,15,16) ARN total de plantas de chile protegidas con el CMV-S y desafiadas con el CMV-35; (17) Mezcla artificial de fragmentos de ARN protegidos del CMV-S y el CMV-35; (M) fragmentos marcadores de ADN pBR322 x Hinf I con tamaños, en nucleótidos, mostrados en el margen derecho.

produced a different pattern characteristic of CMV-35 (Figure 3A,B; lanes 9-12). Total RNA from plants protected with CMV-S and challenged with CMV-35 produced the pattern characteristic of only CMV-S, and the fragment of approximately 500 nt, which is diagnostic for CMV-35, was clearly absent (Figure 3A,B; lanes 13-16). This result was obtained for inoculated and systemically infected leaves from all plants at both 20 dpc (Figure 3A,B) and 40 dpc (Figure 4A,B,C), indicating the absence of any detectable CMV-35 RNA in these plants.

The patterns of protected fragments for CMV-S and CMV-35 observed in Figure 3 (lanes 3 and 4, respectively) were obtained using total RNA from infected tobacco plants. The patterns of protected fragments for the same CMV strains infecting pepper plants appear to be weaker, (Figure 3; lanes 5-16) when compared to those in lanes 3 and 4. The total RNA preparations obtained from CMV infected pepper plants were of lower quality and yield compared to those preparations obtained from CMV infected tobacco plants (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995). The lower intensity of the RNase protected fragments extracted from peppers may be a reflection of the quality of the RNA preparations or of different levels of virus replication in these two hosts. The intensity of the RNase protected fragments is stronger for CMV-35 (Figures 3A,B; lanes 9-12) than for CMV-S (Figures 3A,B; lanes 5-8), and this seems to correlate with the severity of the symptoms induced by these strains in several hosts including pepper (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995). Identical results were obtained with samples harvested from inoculated and upper leaves at 20 dpc and 40 dpc (Figure 4A,C,B).

The lack of detectable replication of the challenge strains, even in inoculated tissue, indicated that the protection was not by inhibition of movement of the challenge strains, but by inhibition at some earlier step after the challenge inoculation, resulting in a blockage to the establishment of the challenge virus. Our results seem to indicate that most cells in inoculated leaves were already infected when the challenge inoculation took place eight days later. Complete inhibition of replication of challenge strains in inoculated tissue was also observed for variants of STMV (Kurath and Dodds, 1994) when the challenge inoculation was carried out three days after the protective inoculation.

Studies with transgenic plants expressing the coat protein (cp) gene of CMV have shown a variable spectrum of resistance against homologous or heterologous CMV strains, which depended on the strain origin of the cp used to transform the plants (Namba *et al.*, 1991; Quemada *et al.*, 1991). Some transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) lines expressing the cp gene of

síntomas ligeros típicos de aquellos inducidos por el CMV-S. Las plantas fueron mantenidas por 60 días después de la inoculación con la variante desafiante y no se observaron cambios en la sintomatología.

Debido a que las variantes CMV-S y CMV-35 pertenecen al subgrupo II y sus patrones de dsARN son idénticos, se usó un análisis de protección con ARNasas para detectar la replicación de estas variantes en las plantas de protección cruzada. Para este ensayo seleccionamos cuatro plantas individuales en cada tratamiento. El ARN de las plantas protegidas con el CMV-S y no desafiadas, produjo patrones de fragmentos protegidos de ARN característicos del CMV-S (Figura 3A,B; carriles 5-8). El ARN de plantas no protegidas y desafiadas con el CMV-35 produjeron un patrón diferente característico del CMV-35 (Figura 3A,B; carriles 9-12). El ARN total de plantas protegidas con CMV-S y desafiadas con el CMV-35 produjó solamente el patrón característico del CMV-S; estuvo claramente ausente un fragmento de aproximadamente 500 nt, el cual diagnostica al CMV-35, (Figura 3A,B; carriles 13-16). Este resultado se obtuvo tanto para hojas inoculadas como para las sistémicamente infectadas en todas las plantas tanto a 20 dpc (Figura 3A,B) como a 40 dpc (Figura 4A,B,C), lo cual indicó la ausencia de ARN detectable del CMV-35 en esas plantas.

Los patrones de los fragmentos protegidos para el CMV-S y CMV-35 que se observan en la Figura 3 (carriles 3 y 4, respectivamente) fueron obtenidos usando ARN total de plantas de tabaco infectadas. Los patrones de fragmentos protegidos para las mismas variantes del CMV de infecciones de plantas de chile parecen ser más tenues, (Figura 3; carriles 5-16) al compararlos con los fragmentos en carriles 3 y 4. Las preparaciones de ARN total obtenidas de plantas de chile infectadas con el CMV fueron inferiores en calidad y cantidad a las preparaciones obtenidas de plantas de tabaco infectadas con el CMV (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995). La intensidad menor de los fragmentos protegidos de ARNasa extraídos de chiles puede ser un reflejo de la calidad de las preparaciones de ARN o de diferentes niveles de replicación viral en estos dos hospederos. La intensidad de los fragmentos protegidos de ARNasa fue más fuerte para el CMV-35 (Figuras 3A,B; carriles 9-12) que para el CMV-S (Figuras 3A,B; carriles 5-8), y esto parece estar correlacionado con la severidad de los síntomas inducidos por dichas variantes en varios hospederos, entre los que se incluye el chile (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 1995). Se obtuvieron resultados idénticos con muestras colectadas de hojas inoculadas y superiores a 20 dpc y 40 dpc (Figura 4A,C,B).

La ausencia de replicación detectable de las variantes desafiantes, aun en tejido inoculado, indicó que la protección no fue por la inhibición del movimiento de las

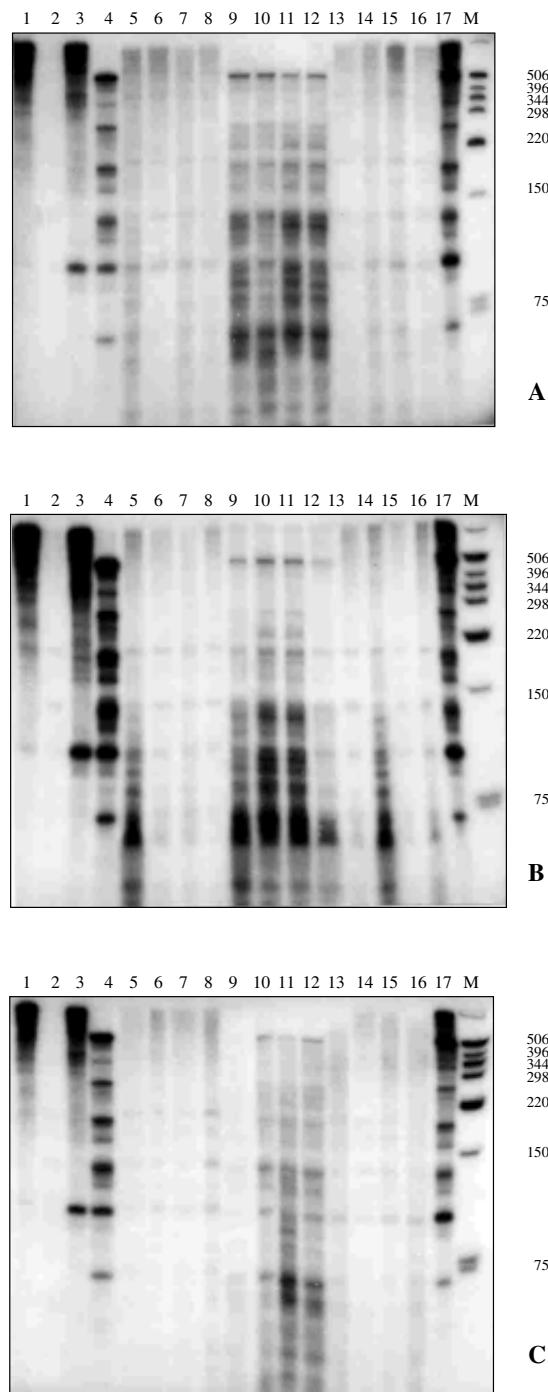


Figure 4. RNase protection pattern analysis of cross protection within subgroup II CMV strains in leaves from sample 1 which represents challenge inoculated leaves (A), leaves from sample 2 which represents the fifth and seventh leaves systemically-infected with the challenge or protective viruses (B), or leaves from sample 3 which represents leaves systemically-infected with the challenge or protective viruses from the third branch above the cotyledons (C) of pepper plants at 40 dpc. The minus-sense probe was transcribed from a clone of the CMV-S coat protein gene (pBS51IIIX4-6) and annealed to target RNAs indicated at the top of each lane as follows; (1) Full length plus-sense transcript RNA of pBS51IIIX4-6 (no mismatch); (2) No RNA; (3) Total RNA from CMV-S infected tobacco; (4) Total RNA from CMV-35 infected tobacco; (5,6,7,8) Total RNA from CMV-S protected and mock challenged pepper plants; (9,10,11,12) Total RNA from mock protected and CMV-35 challenged pepper plants; (13,14,15,16) Total RNA from CMV-S protected and CMV-35 challenged pepper plants; (17) Artificial mix of CMV-S and CMV-35 protected RNA fragments; (M) pBR322 x Hinf I DNA marker fragments with sizes in nucleotides shown at the right margin.

Figura 4. Análisis del patrón de protección con ARNasas de protección cruzada con variantes del CMV del subgrupo II en hojas de la muestra 1, la cual representa hojas inoculadas con la variante desafiante (A), hojas de la muestra 2, la cual representa las hojas quinta y séptima infectadas sistémicamente con las variantes virales protectora o retadora (B), u hojas de la muestra 3, la cual representa las hojas de la tercera ramificación arriba de los cotiledones infectadas sistémicamente con las variantes virales protectora o desafiante de plantas de chile a 40 dpc. La sonda con sentido negativo fue transcrita a partir de un clon del gen de la cubierta proteínica de CMV-S (pBS51IIIX4-6) e hibridizado a los ARNs indicados en la parte superior de cada línea en el gel, tal como sigue: (1) Transcripción completa de ARN con sentido positivo de pBS51IIIX4-6 (hibridación completa); (2) Sin ARN; (3) ARN total de tabaco infectado con el CMV-S; (4) ARN total de tabaco infectado con el CMV-35; (5,6,7,8) ARN total de plantas de chile protegidas con el CMV-S desafío simulado (solución amortiguadora); (9,10,11,12) ARN total de plantas de chile protegidas con solución amortiguadora y desafío con CMV-35; (13,14,15,16) ARN total de plantas de chile protegidas con CMV-S y desafiadas con CMV-35; (17) Mezcla artificial de fragmentos de ARN protegidos del CMV-S y CMV-35; (M) Fragmentos marcadores de ADN pBR322 x Hinf I con tamaños, en nucleótidos, mostrados en el margen derecho.

CMV-WL (a subgroup II strain) were shown to have high levels of resistance to systemic infection by CMV strains from both subgroups I and II (Namba *et al.*, 1991; Xue *et al.*, 1994). However, some transgenic tobacco lines expressing the cp gene of CMV-C (a subgroup I strain) were less resistant to CMV-WL than to CMV-C

variantes desafiantes, sino por la inhibición en alguna etapa inicial después de la inoculación de la variante desafiante, que resultó en un bloqueo contra el establecimiento de la variante desafiante. Nuestros resultados parecen indicar que la mayoría de las células en las hojas inoculadas estaban ya infectadas cuando la inoculación con la variante desafiante ocurrió ocho días después. La inhibición completa de la replicación de las variantes desafiantes en tejido inoculado también fue observada para variantes del STMV (Kurath y Dodds, 1994) cuando la inoculación con la variante desafiante se llevó a cabo tres días después de la inoculación protectora.

(Quemada *et al.*, 1991). The finding that the cp gene of a subgroup II CMV strain (CMV-WL) provided a better source of resistance against infection by CMV strains from both subgroups (Namba *et al.*, 1991) is similar to results from our cross protection experiments using a mild subgroup II CMV strain (CMV-S).

CONCLUSIONS

Pepper plants protected with CMV-S (subgroup II) and challenged with severe CMV strains belonging to subgroups I and II, developed symptoms in upper leaves typical of CMV-S, but not symptoms typical of the challenge strains. DsRNA analysis showed no detectable replication of challenge strain CMV-SD2 (subgroup I) RNA in inoculated or systemic leaves, confirming that cross protection occurred between strains from different subgroups. RNase protection assay showed no detectable replication of challenge strain CMV-35 (subgroup II) RNA in inoculated leaves or systemic leaves, confirming also that cross protection occurred between strains from subgroup II. Due to the presence of endogenous dsRNAs in some plants, inconsistent CMV dsRNAs fragments from genomic or subgenomic viral molecules, and reliance on the small difference in the migration of dsRNA1 and dsRNA2 of CMV, the RNase protection assay is a more reliable method for analysis of cross protection experiments with CMV. To our knowledge this is the first report of a cross protection study involving CMV strains in which the protective strain prevented infection of challenge strains from both subgroups I and II.

LITERATURE CITED

- Broadbent, L. 1976. Epidemiology and control of tomato mosaic virus. Annu. Rev. Phytopathol. 14: 75-95.
- Costa, A. S., and G. W. Müller. 1980. Tristeza control by cross protection: An U. S.-Brazil cooperative success. Plant Dis. 64: 538-541.
- Dodds, J. A. 1982. Cross-protection and interference between electrophoretically distinct strains of cucumber mosaic virus in tomato. Virology 118: 235-240.
- Dodds, J. A., S. Q. Lee, and M. Tiffany. 1985. Cross protection between strains of cucumber mosaic virus: Effect of host and type of inoculum on accumulation of virions and double-stranded RNA of the challenge strain. Virology 144: 301-309.
- Kurath, G., and J. A. Dodds. 1994. Satellite tobacco mosaic virus sequence variants with only five nucleotides differences can interfere with each other in a cross protection-like phenomenon in plants. Virology 202: 1065-1069.
- Matthews, R. E. F. 1991. Plant Virology. Pages 628-629. Third Edition. Academic Press. San Diego, CA.
- Montasser, M. S., M. E. Tousignant, and J. M. Kaper. 1991. Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: I. Greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. Plant Dis. 75: 86-92.
- Namba, S., K. Ling, C. Gonsalves, D. Gonsalves, and J. L. Slightom. 1991. Expression of the gene encoding the coat protein of cucumber mosaic virus (CMV) strain WL appears to provide

Los estudios con plantas transgénicas que expresan el gen de la cubierta proteínica (cp) del CMV han mostrado un espectro variable de resistencia contra variantes del CMV homólogas o heterólogas, lo cual dependió del origen de la variante del gen cp utilizado para transformar las plantas (Namba *et al.*, 1991; Quemada *et al.*, 1991). Algunas líneas transgénicas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que expresan el gen cp de CMV-WL (una variante del subgrupo II) mostraron tener altos niveles de resistencia a la infección sistémica de variantes del CMV de ambos subgrupos I y II (Namba *et al.*, 1991; Xue *et al.*, 1994). Sin embargo, algunas líneas transgénicas de tabaco que expresan el gen cp de CMV-C (una variante del subgrupo I) fueron menos resistentes a CMV-WL que al CMV-C (Quemada *et al.*, 1991). El hallazgo de que el gen cp de una variante CMV del subgrupo II (CMV-WL) proveyó una mejor fuente de resistencia a la infección por variantes CMV de ambos subgrupos (Namba *et al.*, 1991) es similar a los resultados de nuestros experimentos de protección cruzada usando una variante benigna del CMV del subgrupo II (CMV-S).

CONCLUSIONES

Las plantas de chile protegidas con el CMV-S (subgrupo II) y desafiadas con variantes severas del CMV pertenecientes a subgrupos I y II, desarrollaron síntomas en hojas superiores típicos del CMV-S, pero no síntomas típicos de las variantes desafiantes. El análisis de dsARN no mostró una replicación detectable del ARN de la variante desafiante CMV-SD2 (subgrupo I) en hojas inoculadas o sistémicas, lo que confirmó que la protección cruzada ocurrió entre variantes de subgrupos diferentes. El ensayo de protección con ARNasas no mostró replicación detectable del ARN de la variante desafiante CMV-35 (subgrupo II) en hojas inoculadas o sistémicas, lo que también confirmó que la protección cruzada ocurrió entre variantes del subgrupo II. Debido a la presencia de dsARNs endógenos en algunas plantas, fragmentos inconsistentes de dsARNs de CMV de moléculas virales genómicas y subgenómicas y a la pequeña diferencia en la migración de dsARN1 y dsARN2 de CMV, el ensayo de protección con ARNasas fue un método más confiable para el análisis de experimentos de protección cruzada con el CMV. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de un estudio de protección cruzada que involucra variantes del CMV en el cual la variante protectora previno la infección por variantes desafiantes de ambos subgrupos I y II.

—Fin de la versión en Español—



- protection to tobacco plants against infection by several different CMV strains. *Gene* 107: 181-188.
- Owen, J., and P. Palukaitis. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 495-502.
- Quemada, H. D., D. Gonsalves, and J. L. Slightom. 1991. Expression of coat protein gene from cucumber mosaic virus strain C in tobacco: protection against infections by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. *Phytopathology* 81: 794-802.
- Rezende, J. A. M., and J. L. Sherwood. 1991. Breakdown of cross protection between strains of tobacco mosaic virus due to susceptibility of dark green areas to superinfection. *Phytopathology* 81: 1490-1496.
- Rodríguez-Alvarado, G., G. Kurath, and J. A. Dodds. 1995. Heterogeneity in pepper isolates of cucumber mosaic virus. *Plant Dis.* 79: 450-455.
- Singh, R. P., A. Boucher, and T. H. Somerville. 1990. Cross-protection with strains of potato spindle tuber viroid in the potato plant and other solanaceous hosts. *Phytopathology* 80: 246-250.
- Tien, P., and G. Wu. 1991. Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. *Adv. Virus Res.* 39: 321-339.
- Valverde, R., and J. F. Fontenot. 1991. Variation in double-stranded ribonucleic acid among pepper cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 903-905.
- Wen, F., R. M. Lister, and F. A. Fattouh. 1991. Cross-protection among strains of barley yellow dwarf virus. *J. Gen. Virol.* 72: 791-799.
- Wu, G.-S., L.-Y. Kang, and P. Tien. 1989. The effect of satellite RNA on cross-protection among cucumber mosaic virus strains. *Ann. Appl. Biol.* 114: 489-496.
- Xue, B., C. Gonsalves, R. Provvidenti, J. L. Slightom, M. Fuchs, and D. Gonsalves. 1994. Development of transgenic tomato expressing a high level of resistance to cucumber mosaic virus strains of subgroups I and II. *Plant Dis.* 78: 1038-1041.
- Yeh, S.-D., D. Gonsalves, H.-L. Wang, R. Namba, and R.-J. Chiu. 1988. Control of papaya ringspot virus by cross protection. *Plant Dis.* 72: 375-380.