

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterización genética de aislamientos de  
*Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV) e  
impacto de la enfermedad en el cultivo de  
frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) en  
Argentina**

**Biól. Ada Karina Torrico Ramallo**

**Directora: Dra. Vilma C. Conci**

**Instituto de Patología Vegetal (IPAVE)  
Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) – INTA**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Córdoba, Argentina**

**-2015-**

## COMISIÓN ASESORA

**Dra. Vilma Cecilia Conci**

Instituto de Patología Vegetal, Centro de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Córdoba.

**Dr. Juan Alberto Argüello**

Facultad de ciencias Agropecuarias,  
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.

**Dr. Alejandro Mentaberry**

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular y Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Buenos Aires.

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

### TRIBUNAL EVALUADOR

Firma:..... Aclaración:.....

Firma:..... Aclaración:.....

Firma:..... Aclaración:.....

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Sergio F. Lenardón, director del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) del INTA.

A la Dra. Vilma Conci, por la oportunidad de realizar este doctorado, brindándome su orientación y estímulo constante.

A los Dres. Juan Argüello, Alejandro Mentaberry, miembros de mi comisión asesora de tesis, por sus aportes científicos a esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET) por la beca de postgrado otorgada para la realización de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias de la Exactas Físicas y Naturales Universidad Nacional de Córdoba (FCEFN-UNC).

A los Dres. Daniel Kirschbaum y Sergio Salazar (INTA, Famaillá, Tucumán) porque gracias a ellos se pudieron realizar los ensayos de rendimiento.

A La Dra. Natalia Meneguzzi, Dr. Luis Conci, Biól. Franco Fernández, Ing. Ana María Borquez, Ing. María del Huerto Sordo, Ing. Roberto Pacheco, Ing. Antonio Ishikawa, Ing. Verónica Obregón por su colaboración en los muestreos a campo.

A la Dra. Liliana Di Feo por la corrección de esta tesis.

A la Dra. Claudia Nome por brindarme sus conocimientos en microscopía electrónica.

A la Dra. Eva Cafrune por enseñarme a trabajar en el laboratorio y brindarme su amistad y su apoyo durante todo este recorrido.

A mis compañeros del grupo de trabajo Ceci, Vale, Gisela, Marcos, Flor y Ceci, gracias por su buena onda y colaboración para que esta tesis se concrete.

A Patricia Tolocka, Amalia Saavedra Pons, Valeria Quevedo, Mariana Quiroga, Fabiana Guzmán, Carolina Rubiolo, Vanina Alemandri, Edgardo Carloni, Eliana López Colomba, Daniela Gómez, Walter Arce, Gabriela Melchiorre, muchas gracias por sus sugerencias, su apoyo, contención, paciencia en los momentos más difíciles y por los buenos momentos compartidos.

A mi tío Remberto por sus consejos, a mis sobrinos Rocío, Mateo, Thiago y León que son las personas que me hacen reír y llenan de alegría mi corazón.

Y por sobre todas las cosas, quiero agradecer a mis padres Segundo y Cecilia y a mis hermanas Claudia y Paula por su comprensión y apoyo constante.

## TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS .....	4
RESUMEN .....	7
SUMMARY .....	7
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	9
Producción de plantines de frutilla en viveros.....	9
Virosis en frutilla .....	10
Formas de transmisión y dispersión del patógeno.....	13
Problemática del cultivo de frutilla .....	13
Manejo de virus en frutilla.....	14
- Vectores virales .....	14
- Material de plantación .....	15
HIPÓTESIS GENERAL .....	15
OBJETIVO GENERAL .....	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	15
CAPÍTULO 1 .....	17
IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS, ASPECTOS BIOLÓGICOS Y SECUENCIA GENÓMICA COMPLETA DE UN AISLAMIENTO DE SMYEV .....	17
INTRODUCCIÓN.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Identificación serológica y puesta a punto de la técnica molecular .....	19
- Material biológico .....	19
- Identificación serológica .....	20
- Identificación molecular de virus en plantas con y sin síntomas .....	20
Morfología de las partículas virales y alteraciones citopatológicas producidas.....	22
- Leaf dip .....	23
- Alteraciones citopatológicas .....	23
- Selección del material vegetal y verificación de la presencia de virus .....	23
- Fijación e inclusión del material vegetal.....	24
Cortes ultrafinos y contraste de secciones para microscopía electrónica.....	24
Secuencia genómica completa de un aislamiento de SMYEV .....	24
- Material biológico .....	24
- Purificación del ARN viral.....	25
- Obtención y análisis de la secuencia completa del SMYEV .....	25
RESULTADOS .....	27
Identificación serológica y puesta a punto de la técnica molecular .....	27
- Detección serológica del virus .....	27
- Detección molecular de virus en plantas con y sin síntomas .....	27
Morfología de las partículas virales y alteraciones citológicas producidas.....	29
- <i>Leaf dip</i> .....	29
- Alteraciones citopatológicas .....	30
Secuencia genómica completa de un aislamiento de SMYEV .....	33
- Purificación del ARN viral.....	33
DISCUSIÓN.....	40



Análisis estadístico .....	92
RESULTADOS .....	92
Ensayo I (ciclo de cultivo 2009).....	92
Ensayo II (ciclo de cultivo 2010) .....	94
DISCUSIÓN.....	95
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	99
BIBLIOGRAFÍA .....	103
ANEXOS .....	115
Anexo 1: Protocolo DAS-ELISA (modificado de Clark & Adams 1977) .....	115
Anexo 2: Protocolo extracción de ARN viral <i>kit de extracción Qiagen</i> .....	117
Anexo 3: <i>Leaf dip</i> (Kitajima & Nome, 1999).....	118
Anexo 4: Fijación e inclusión del material vegetal (Kitajima 1997).....	118
Anexo 5: Medio de cultivo para bacterias .....	119
Anexo 6: Protocolo purificación del ADN plasmídico kit Qiagen.....	119
Anexo 7: Tabla con porcentajes de identidad de nucleótidos. ....	121
Anexo 8: Tabla con porcentajes de identidad de aminoácidos.....	122

## ABREVIATURAS

**aa:** aminoácidos

**Abs:** Absorbancia

**ADN:** Ácido Desoxiribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**AMV:** Avian myeloblastosis virus

**ANOVA:** Análisis de la varianza

**ARN:** Acido Ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**ARNsc:** ARN simple cadena

**As:** Antisuero

**BGAF:** Banco de Germoplasma Activo de Frutilla

**BrEt:** Bromuro de etidio

**°C:** grado centígrado

**CP:** Proteína de la cápside viral

**CTAB:** Bromuro de cetil-trimetil amonio

**DAS – ELISA:** sándwich doble de anticuerpos - ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

**dNTP:** deoxinucleótido trifosfato

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**Fw:** *Forward*

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and Agriculture Organization*)

**G:** *Gap*

**g:** gramos

**g/l:** gramos/litro

**ha:** hectáreas

**Hel:** helicasa

**I:** Incidencia

**IC:** Inmunocaptura

**ICTV:** Comité Internacional de Taxonomía de Virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)

**Ig:** Inmunoglobulina  
**INDEC:** Instituto Nacional de Estadísticas y Censo  
**INDEAR:** Instituto de Agrobiotecnología de Rosario  
**INTA-IPAVE:** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Instituto de Patología Vegetal  
**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-tiogalacto-piranosido  
**kDa:** Kilodaltons  
**l:** litro  
**LB:** Luria-Bertani  
**M:** Marcador de peso molecular  
**mg:** miligramo  
**mg/ml:** miligramos/microlitro  
**Mi:** mitocôndria  
**min:** minuto  
**MINAGRI:** Ministerio de agricultura  
**ml:** mililitro  
**mM:** miliMolar  
**Mtr:** metiltransferasa  
**N°:** número  
**NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)  
**ng:** nanogramos  
**ng/ $\mu$ l:** nanogramos/microlitros  
**nm:** nanómetros  
**nt:** nucleótido  
**NTR:** región no traducible (*NonTranslated Region*)  
**ORF:** marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)  
**P:** Prevalencia  
**pb:** pares de bases  
**PBS:** tampón fosfato salino  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)  
**pH:** potencial hidrogeno  
**p/v:** peso/volumen  
**PVP:** Polivinil pirrolidona

**PVPP:** Polivinil polipirrolidona

**PVX:** *Potato virus X*

**Rv:** *Reverse*

**RdRp:** ARN polimerasa dependiente de ARN (*RNA dependent RNA polymerase*)

**RNasa:** Ribonucleasa

**RNasin:** Inhibidor de ribonucleasas (*Ribonuclease inhibitor*)

**RT:** Transcripción Reversa (*Reverse Transcription*)

**SD:** desvío estándar (*Standard Deviation*)

**seg:** segundo

**SMYEV:** *Strawberry mild yellow edge virus*

**t:** toneladas

**T.a:** Temperatura ambiente

**TAE:** Tris acetato EDTA

**TBG:** Triple Bloque de Genes

**TBGp:** TBG proteína

**Th:** Temperatura de hibridación

**U:** Unidades

**μl:** microlitros

**μM:** micromolar

**U/μl:** Unidades/microlitro

**USA:** Estados Unidos de América

**v:** volumen

**v/v:** volumen/volumen

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

## RESUMEN

El *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV, género *Potexvirus*, familia *Alphaflexiviridae*), es uno de los principales virus que afectan al cultivo de frutilla en la actualidad. En Argentina, la aparición de sintomatología severa en hojas en los campos de frutilla de las principales regiones productoras dio pie al estudio del patógeno que lo produce. Los objetivos de la presente tesis fueron caracterizar el SMYEV detectado en Argentina y conocer su diversidad genética, establecer la importancia del patógeno a través de estudios de incidencia y prevalencia, y evaluar las pérdidas que ocasiona en el rendimiento del cultivo de frutilla. Un aislamiento de SMYEV de Argentina fue secuenciado completamente utilizando la técnica de pirosecuenciación y el análisis filogenético lo ubicó cercano a un aislamiento del virus proveniente de Alemania. Se obtuvieron 12 secuencias del gen de la cápside proteica de aislamientos de SMYEV de Argentina y se compararon con otras 32 de otros países. Esto reveló que SMYEV posee una gran variabilidad de aminoácidos en toda su cápside proteica, pero, principalmente, en la región 5´terminal del gen. También se detectó la presencia de dos aislamientos recombinantes, una entre aislamientos de Argentina y otra entre un aislamiento de Chile y otro de origen desconocido. Tucumán, Santa Fe, Corrientes, son las principales provincias productoras de frutilla en el país. La presencia de gran cantidad de plantas con síntomas en esas regiones llevó a investigar la ocurrencia de SMYEV en cultivares de frutilla difundidos en las regiones mencionadas. Se tomaron muestras en las tres regiones durante las campañas 2009 y 2010, y se detectó un porcentaje variable de infección dependiendo del año analizado, registrándose 4 y 20% de incidencia y 59 y 90 de prevalencia, respectivamente. El virus fue detectado en los cv Camino Real, Festival, Albion y Camarosa siendo los dos últimos, los de mayor incidencia en las tres regiones. De la misma manera se evaluaron, durante cuatro años, muestras de plantas de frutilla provenientes de viveros que propagan el material vegetal para ser distribuido a los productores, y se detectó la presencia del virus en 14 de los 27 cultivares evaluados. Cabe destacar que Earlibrite fue el único cultivar, muestreado en vivero y a campo, en el cual no se detectó SMYEV. Por primera vez se realizó un estudio de los daños ocasionados por este virus en plantas con infecciones simples (plantas asintomáticas). Se detectó una disminución del número de frutos comerciales y totales de hasta 40% y la reducción del peso de los frutos comerciales y totales de hasta un 36% respecto a las plantas sanas pudiendo ser esto significativo para la producción de fruta cuando la incidencia del virus es alta.

## SUMMARY

*Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV, genus *Potexvirus*, family *Alphaflexiviridae*) is one of the main viruses affecting strawberry crops today. In Argentina, the onset of severe symptoms on leaves in strawberry fields in the main producing regions led to the study of the causing pathogen. The aims of this thesis were to characterize the SMYEV detected in Argentina and determine its genetic diversity, establish the importance of the pathogen through incidence and prevalence studies, and assess the yield losses caused to strawberry crop. An Argentine SMYEV isolate was completely sequenced using the pyrosequencing technique, and the phylogenetic analysis revealed a close relationship with a virus isolate from Germany. Twelve sequences of the capsid protein gene of SMYEV isolates from Argentina were obtained and compared with the CP gene of 32 isolates from other countries. The results showed that SMYEV exhibits great amino acid variability all throughout the capsid protein, but mainly in the 5`terminal region, In addition, the presence of two recombinant isolates was detected, one between Argentine SMYEV isolates, and the other between an isolate from Chile and another one of unknown origin.. Tucumán, Santa Fe, and Corrientes, among others, are the main strawberry producing provinces in the country. The presence of large number of symptomatic strawberry plants in these regions has prompted studies on the occurrence of SMYEV in strawberry cultivars disseminated in those provinces. Samples were taken from the three regions in the 2009 and 2010 crop cycles; a variable percentage of infection was detected, depending on the year analyzed, showing 4 and 20% of incidence and 59 and 90% of prevalence, respectively. The virus was found in cultivars Festival, Camino Real, Camarosa and Albion, the latter two being, the highest incidence in all three regions. Similarly, samples of strawberry plants from nurseries that propagate plant material for distribution to producers were evaluated for 4 years, and the virus was also detected in 14 of 27 tested cultivars. Notably Earlibrite was the only cultivar, sampled in the nursery and field uninfected with SMYEV. For the first time a study of the damage caused by this virus in plants with simple infections was carried out. Infected plants exhibited decreases in total number of marketable fruits of up to 40% and up to 36% weight reduction of marketable and total fruits compared to healthy plants, this may be significant for fruit production when virus incidence is high.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

La frutilla cultivada (*Fragaria x ananassa* Duch.) es un híbrido octoploide derivado de la cruce de *Fragaria chiloensis* y *F. virginiana*, de la familia *Rosaceae* (Staudt, 1989; Hummer *et al.*, 2011). La taxonomía actual de *Fragaria* incluye 20 especies silvestres, tres especies híbridas naturales y dos especies híbridas cultivadas que son importantes comercialmente (Hummer *et al.*, 2011), los cultivares de frutillas más difundidos se han originado a partir de especies de Europa, América del Norte y Chile.

A nivel mundial, el principal país productor de frutilla es Estados Unidos (1.366.850 t), seguido de México, Turquía, España, Egipto, Corea, Japón, Rusia y Alemania. Argentina, con aproximadamente 13.200 t anuales ocupa el octavo lugar en Latinoamérica (FAO, 2012). El área plantada en el año 2012 fue de aproximadamente 1.700 ha distribuidas principalmente en las provincias de Tucumán, Santa Fe, Buenos Aires, y Corrientes en forma comercial; y en Mendoza, Tucumán y la Patagonia en viveros (D. Kirschbaum, comunicación personal).

Una importante parte de la producción de frutilla se destina al mercado externo, que se exporta congelada a los países del hemisferio norte y el resto es vendido como fruta fresca (MINAGRI, 2011). La exportación Argentina de frutilla congelada durante 2012 fue un 46% inferior en volumen respecto al año 2011 (4.955 t), de acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censo (INDEC). El principal destino de la frutilla congelada fue Estados Unidos, con una participación del 47,1% (2.333 t). Otros destinos importantes fueron Brasil y Canadá. El destino para la frutilla fresca continúa siendo Francia que concentra el 98% del volumen exportado, los volúmenes por la Argentina corresponden a los meses de primavera-verano y, según el INDEC, disminuyeron un 46% entre 2011 y 2012 (Rodríguez & Pérez, 2013).

## **Producción de plantines de frutilla en viveros**

Los plantines de frutillas utilizados en las zonas productoras provienen de los viveros que los multiplican en el sur del país. Las plantas madres, certificadas para calidad y sanidad, provienen de programas de producción de Estados Unidos y Europa.

La frutilla comercial se propaga de forma agámica mediante la emisión de estolones que dan origen a nuevas plantas. Existen distintos tipos de cultivares (cv.) según su respuesta al fotoperiodo. En Argentina solo se usan los de día corto y los de día neutro.

Los plantines pertenecientes a cultivares de día corto (inducen su floración cuando la duración del día es menor a 13 h), como por ejemplo cv. Camarosa, Ventana, Earlibrite y Camino Real, son producidos en viveros ubicados en Patagonia. Allí se multiplican desde septiembre hasta abril, y se comercializan a partir de su cosecha en otoño como plantines frescos con frío. Las plantas frescas responden con fruta aproximadamente a los 60 días (Saccone, 2004; Miserendino, 2010).

Por otro lado los cultivares de día neutro (florecen cualquiera sea el fotoperiodo), como por ejemplo, cv. Selva, Diamante, Aromas y Albión, son producidos en viveros ubicados en tierras de menor latitud como Mendoza y Neuquén. Se multiplican desde octubre hasta junio. Estas plantas denominadas “frigo” son cosechadas y se las guarda en cámaras frigoríficas a -2°C. Pueden almacenarse a esa temperatura hasta 9 meses para ser comercializadas en época de plantación en la primavera (Saccone, 2004; Miserendino, 2010).

### **Virosis en frutilla**

La producción de frutilla está limitada por factores abióticos y bióticos. Los primeros incluyen sequía, salinidad, deficiencias nutricionales y daños por fertilizantes y herbicidas. Entre los segundos, pueden mencionarse arañuela roja, y pulgones como plagas, enfermedades ocasionadas por hongos que atacan el fruto, hojas y corona, y enfermedades sistémicas como virus, fitoplasmas y distintos tipos de bacterias.

Los virus son uno de los principales problemas en la producción de frutilla. Estos agentes infecciosos poseen genoma formado por una o varias moléculas de ácido nucleico, normalmente encapsidado en una cubierta de proteína, o de lipoproteína, y son capaces de organizar su propia replicación en el interior de las células hospedantes (Hull, 2002).

Algunos de ellos inducen lesiones necróticas locales en los tejidos donde las partículas virales quedan confinadas y no logran difundirse. En otros casos, las infecciones se hacen sistémicas y pueden alterar el metabolismo normal del hospedante sin llegar a matarlo o bien pueden causar su muerte. Algunas especies vegetales se liberan de los virus en forma natural ya que muchos de estos patógenos no pasan a la semilla (Hull, 2009).

En frutilla, los virus forman parte de complejos virales de los que son difíciles de separar e identificar. La bibliografía existente a nivel mundial menciona que la frutilla es infectada por innumerables patógenos sistémicos, entre ellos 24 virus y numerosos fitoplasmas, proteobacterias, y otros procariotes (Martin & Tzanetakis, 2006; Tzanetakis & Martin, 2013). La mayoría de los virus identificados no producen síntomas en las

variedades comerciales cuando están en infecciones simples, pero, en infecciones mixtas, éstos se hacen notables.

Se han detectado varios virus transmitidos por nematodos, entre los que se menciona a, *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV) (Tzanetakis & Martin, 2013) y *Tomato black ring virus* (TBRV) (Rymelska *et al.*, 2013) y *Tomato black ring virus* (TBRV) del género *Nepovirus* y el *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), un posible miembro del género *Sadwavirus* (Martin & Tzanetakis, 2006; Tzanetakis & Martin, 2013).

Otro grupo de virus son los transmitidos por moscas blancas; estos son un problema emergente en la agricultura mundial debido al incremento de las poblaciones del vector y al movimiento de germoplasma de plantas (Tzanetakis & Martin, 2013). Se conocen cuatro *Crinivirus* asociados con la enfermedad conocida como “palidosis de la frutilla” y un quinto virus pertenecientes a los *Geminivirus* denominado *Strawberry leaf curl virus* (StLCV) que fue citado en Egipto (El-gaied *et al.*, 2008; Tzanetakis & Martin, 2013). Dos de los agentes asociados a la palidosis son *Strawberry pallidosis associated virus* (SPaV) y *Beet pseudo-yellow virus* (BPYV) y pueden ser asintomáticos en infección simple o mixta en los cv. Hood y Noreaster (Tzanetakis *et al.*, 2004). Estudios de incidencia de estos patógenos en cultivos de frutilla señalaron que la presencia de SPaV fue más alta comparada con la de BPYV (Tzanetakis *et al.*, 2013). Ambos se transmiten exclusivamente por la mosca blanca de invernadero (*Trialeurodes vaporariorum*) de manera semipersistente (Tzanetakis *et al.*, 2006). Otros dos *Crinivirus* están parcialmente caracterizados y son denominados *Strawberry crini -3* (SCrV-3) y *Strawberry crini -4* (SCrV-4) (Tzanetakis & Martin, 2013).

Los virus de mayor importancia, por los daños que producen, en el cultivo de frutilla son los transmitidos por áfidos: *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV), *Strawberry crinkle virus* (SCV), *Strawberry mottle virus* (SMoV), *Strawberry vein banding virus* (SVBV), *Strawberry pseudo mild yellow edge virus* (SPMYEV), *Strawberry chlorotic fleck virus* (SCFV), *Strawberry latent C virus* (SLCV) (Martin & Tzanetakis, 2006; Hanzliková-Vašková *et al.*, 2006; Wei & Clover, 2008). De estos virus, en Argentina ha sido identificado SMoV (Nome & Yossen, 1980; Asinari *et al.*, 2013) y el SCV (Perotto *et al.*, 2010).

Estudios realizados en el IPAVE permitieron establecer la presencia en el país de SMYEV *Potexvirus* (Familia *Alphaflexiviridae*) mediante pruebas serológicas y amplificación de un fragmento genómico mediante IC-RT-PCR semianidado

respectivamente (Conci *et al.*, 2009). La identidad del patógeno se confirmó a través de amplificación, clonado y comparación de la secuencia del gen que codifica la CP con otras secuencias publicadas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Torrice *et al.*, 2011). En las primeras investigaciones del SMYEV realizadas por Converse (1987), se mencionó a un *Luteovirus* como agente causal involucrado en la sintomatología observada en frutillas (Converse, 1987); posteriormente Jelkmann *et al.* (1990) clonaron y secuenciaron un *Potexvirus* (el SMYEV) que fue asociado a la patología (Jelkmann *et al.*, 1990; Jelkmann *et al.*, 1992; Thompson & Jelkmann, 2004; Martelli *et al.*, 2007).

La mayoría de los virus que infectan frutilla están pobremente caracterizados, se conoce poco respecto a su etiología, sólo pueden ser transmitidos por injerto a plantas indicadoras y, en general, se encuentran en bajas concentraciones en la planta, lo que dificulta las tareas de aislamiento y producción de antisueros de calidad. En muchos casos, sus vectores son desconocidos y poseen escasos datos respecto a su epidemiología.

En las últimas campañas hortícolas, se detectó, en lotes de producción comercial de frutilla del país, la presencia de plantas enanas, achaparradas, con deformación de hojas, mosaico y marcada reducción en la producción de fruta. Si bien hasta el presente no se ha podido establecer la totalidad de los patógenos involucrados, fue posible detectar SMYEV y se sospecha la presencia de otros virus constituyentes de un complejo.

El SMYEV está mundialmente distribuido y es responsable de pérdidas en los rendimientos, aunque esta información no está debidamente documentada. En infecciones simples no causa síntomas visibles pero se observó que, cuando se asocia con SMOV, SCV y/o SVBV, éstos son notables (enanismo, amarillamiento, deformación de hojas con importantes disminuciones en la producción) (Maas, 1998).

La presencia en la planta de frutilla de metabolitos secundarios como polifenoles y polisacáridos hace difícil el aislamiento de la partícula viral y su observación al microscopio electrónico. En plantas con infecciones simples con SMYEV no hubo expresión de síntomas, en cambio cuando el mencionado patógeno se encontró mezclado con otros virus formando un complejo, la sintomatología fue notable detectándose enanismo severo, plantas achaparradas, deformación de hojas, mosaico, moteado y epinastia. En el género *Potexvirus*, al cual pertenece SMYEV, se han detectado alteraciones de cloroplastos, mitocondrias, y otras organelas; y formación de inclusiones virales, entre otras alteraciones intracelulares (Kitajima & Nome, 1999; Martelli *et al.*, 2007).

## **Formas de transmisión y dispersión del patógeno**

Los virus son parásitos obligados, por lo tanto para poder sobrevivir en condiciones naturales, se ven forzados a trasladarse de un hospedante a otro. Para ello utilizan diferentes mecanismos entre los cuales se encuentra la transmisión por vectores (áfidos, ácaros, nematodos, etc.) polen, semilla, órganos de reproducción vegetativa, entre otros. En el caso de la frutilla comercial, su propagación es exclusivamente agámica, a través de estolones, por lo cual el éxito de supervivencia de los virus es altamente efectivo. La dispersión del patógeno es a partir de plantines de frutilla infectados con virus, principal forma de introducción de estos patógenos en otras áreas geográficas, de allí se desprende la necesidad de usar plantas libres de virus para obtener una buena producción comercial de fruta. En el caso particular de SMYEV, su transmisión también es llevada a cabo por medio de áfidos del género *Chaetosiphon sp.* y en especial *C. fragaefolii* (Cockerell) (*Homoptera: Aphididae*). Este pulgón ha sido citado en Argentina y es muy frecuente en el cultivo de frutilla (Nome & Yossen, 1980; Delfino *et al.*, 2007; Cédola & Greco, 2010). El mismo transmite a SMYEV de manera circulativa no propagativa (el virus no se replica en el vector). El insecto puede adquirir el virus dentro de las 24 horas siguientes a su nacimiento. Después de un período de latencia de 10 a 19 días, es capaz de transmitir el virus durante un máximo de dos semanas (Mellow & Frazier, 1970) y con una alta eficiencia de transmisión en la frutilla (Krczal, 1982).

Una característica de este virus es que su infección está limitada a plantas silvestres y a cultivares comerciales del género *Fragaria* (Rondon & Cantliffe, 2004).

## **Problemática del cultivo de frutilla**

La frutilla, además de ser económicamente importante, también lo es desde el punto de vista social, pues genera gran cantidad de puestos de trabajo, ya que las medidas de labranza y cosecha son manuales involucrando alrededor de 1.000 jornales por hectárea (ha) cultivada (Kirschbaum, 2014). En muchos casos es una actividad familiar y la mayoría son pequeños productores que se reúnen en cooperativas para la comercialización de su cosecha. Este cultivo permite el ingreso de divisas al país a través de las exportaciones y se puede industrializar, generando productos de mayor valor agregado. El consumo de frutilla *per cápita* en Argentina es de 650 g/año. Durante el año 2006, se comenzó con un proyecto en el IPAVE para actualizar el conocimiento del estado fitosanitario de este cultivo en el país, realizando inventarios, identificación y estudios de dinámica poblacional de factores

bióticos adversos. Los avances logrados permitieron identificar un nuevo problema: presencia creciente de enfermedades causadas por virus desconocidos.

En nuestro país se cultivan exclusivamente cultivares de frutilla provenientes de programas de producción de Estados Unidos y de Europa. Ellos son los obtentores de las variedades comerciales y, además, producen las plantas madres de sanidad certificada que luego se venden a los viveristas, o productores de plantines del país. Estos viveros están distribuidos en regiones aisladas de las áreas de producción de frutilla comercial, en las provincias de Tucumán, Mendoza, Neuquén, Chubut y Santa Cruz. Las plantas certificadas son multiplicadas por un período no mayor a dos ciclos de cultivo y luego se venden a los productores de toda Argentina. Estos viveros no sólo abastecen la demanda interna de plantines de frutilla para la producción comercial de fruto sino que también exportan plantines a otros países de América del Sur, Central, Europa, norte de África y Asia (Saccone, 2004).

Desde hace algunos años se presentaron serios problemas en las regiones productoras de frutilla comercial por la aparición de síntomas muy marcados como mosaico, moteado, hojas deformes y plantas achaparradas, que fueron remitidas al IPAVE-INTA y analizadas para identificar la posible presencia de virus.

Estudios previos indicaron la presencia de SMYEV en algunas áreas productoras de frutilla en el país. Por esta razón, se consideró de suma importancia conocer la relevancia de este patógeno y, para ello, se estudió la identidad del virus detectado en Argentina, su diversidad genética, aspectos biológicos y epidemiológicos como su distribución e incidencia en el país y su efecto en el rendimiento. Estos aspectos constituyen un paso fundamental para planificar estrategias de manejo de la enfermedad.

## **Manejo de virus en frutilla**

### *- Vectores virales*

El manejo de los virus se basa en el conocimiento de la biología y ecología de los vectores de virus; para ello es necesario el conocimiento del modo de transmisión, las interacciones virus – vector, la presión del vector y la presión del virus en la región (Tzanetakis & Martin, 2013; Martin *et al.*, 2013). Dado que la frutilla normalmente está infectada por un conjunto de virus que forman un complejo con numerosas entidades, es muy difícil eliminar todos los patógenos y sus vectores del sistema, conocer que virus en un complejo son fundamentales para el desarrollo de la enfermedad sirve para aplicar una estrategia eficaz para el control de la misma (Martin *et al.*, 2013).

### - *Material de plantación*

Es muy importante la utilización de material de plantación multiplicado a partir de plantas madres libre de virus. Muy pocos virus producen síntomas característicos que pueden ser detectados visualmente en viveros y eliminados del *stock* de plantas, muchos de ellos se encuentran en estado latente o en infección simple y no producen síntomas (Martin & Tzanetakis, 2006), esto hace a la planta propensa a una disminución de la cantidad y calidad de frutos. El desarrollo de pruebas para determinar la presencia de virus son necesarias sobre todo para monitorear el material entrante a los viveros y el que se multiplica en el campo (Rondon & Cantliffe, 2004; Martin & Tzanetakis, 2006) y de esta manera evitar la posterior dispersión de los virus en las zonas de producción.

Una forma de control, con alta seguridad alimentaria y sin impacto ambiental es obtener plantas certificadas como libres de virus obtenidas a partir del cultivo de meristema (Biswas *et al.*, 2007; Moisaner, 2006; Foundation Plant Services, 2008).

## **HIPÓTESIS GENERAL**

El virus detectado en cultivos de frutilla en Argentina es el SMYEV que presenta diferentes razas, o variantes que causan alteraciones celulares e importantes daños en el rendimiento y está ampliamente distribuido en las diferentes regiones productoras.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el SMYEV detectado en Argentina y conocer su diversidad genética, establecer la importancia del patógeno a través de estudios de incidencia, prevalencia y evaluar las pérdidas que ocasiona en el rendimiento del cultivo de frutilla.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1- Identificar el virus aislado de frutilla y detectar las alteraciones citopatológicas producidas.
- 2- Obtener la secuencia genómica completa de un aislamiento de SMYEV de Argentina.
- 3- Detectar la variabilidad intraespecífica del gen que codifica la CP para determinar la presencia de posibles variantes del virus en el país.

- 4- Determinar la incidencia y prevalencia del SMYEV en diferentes regiones productoras de Argentina.
- 5- Establecer el efecto del SMYEV en el rendimiento de plantas asintomáticas de frutilla.

# CAPÍTULO 1

## **Identificación del virus, aspectos biológicos y secuencia genómica completa de un aislamiento de SMYEV**

### **INTRODUCCIÓN**

SMYEV tiene un escaso rango de hospedantes que está restringido principalmente a especies del género *Fragaria spp.*, sin embargo el virus no produce los mismos síntomas en cada una de las especies susceptibles. *F. virginiana* y *F. vesca* son utilizadas como plantas indicadoras de la presencia de virus (FERA, 2008), e igual que algunos clones de *F. chiloensis*, mientras que, *F. ovalis* es portadora asintomático.

Muchos de los cultivares comerciales de frutilla tienen igual comportamiento que *F. ovalis*, dando infecciones latentes (EPPO/CABI, 1996; Brunt *et al.*, 1996).

El SMYEV ha sido transmitido experimentalmente por medio de injerto a *Rubus rosaefolius* (Jelkmann *et al.*, 1990). El primer aislamiento de SMYEV fue reportado en California, Estados Unidos en *Fragaria vesca* (Horne, 1922) que expresó manchas cloróticas en las hojas jóvenes, pérdida progresiva de vigor, moteado clorótico y necrosis internerval en las hojas más viejas. Los síntomas aparecen a los 8-10 días después de la inoculación, en el caso de cepas severas, mientras que en las suaves estos pueden manifestarse después de 15 semanas. Cuando *F. vesca* se infectó con SMYEV y SCV fueron observados: epinastia en hojas nuevas, manchas cloróticas y clorosis que afectó gradualmente al tejido, que luego se necrosó (necrosis internerval y eventualmente colapso de la hoja entera) (Maas, 1998).

La técnica más usada para la identificación de SMYEV es sándwich doble de anticuerpos - ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (DAS-ELISA), con el empleo de antisueros comerciales, aunque ésta no permite la detección del virus cuando está presente en muy bajas concentraciones. La implementación de pruebas moleculares como PCR y sus variantes permite sortear esta dificultad; sin embargo en *Fragaria spp.* la extracción de ácidos nucleicos y purificación de viriones, se ve limitada por la presencia de

una gran cantidad de metabolitos secundarios como taninos, polifenoles y polisacáridos (Thompson *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2011). Estos compuestos pueden dañar los ácidos nucleicos e interferir en las reacciones enzimáticas.

Existe escasa información respecto a las alteraciones citopatológicas que producen los virus en la planta de frutilla. El análisis de las alteraciones citopatológicas inducidas por el proceso de infección se puede realizar a partir de la observación al microscopio electrónico de secciones ultrafinas de material vegetal. Es posible ver alteración en la organización de los tejidos, morfología general de la célula y en las organelas celulares (Francki *et al.*, 1985; Kitajima & Nome, 1999; Truol, 2007).

Algunos géneros virales forman inclusiones cristalinas típicas que ayudan en su identificación, como es el caso de los *Potyvirus*, que constituyen inclusiones cilíndricas citoplasmáticas en forma de molinete y láminas (Shukla *et al.*, 1994; King *et al.*, 2012).

En los *Potexvirus* (familia *Alphaflexiviridae*) no se han detectado alteraciones citopatológicas específicas para el diagnóstico mediante cuerpos de inclusión; sin embargo, la excepción dentro de este género la establece *Potato virus X* (PVX). Se encontró que este patógeno produce un único tipo de inclusión celular que ha sido descrito como componentes laminados o *beaded sheets* (Allison & Shalla, 1974; King *et al.*, 2012). Los mismos están usualmente confinados al citoplasma, pero también han sido detectados en el núcleo (Francki *et al.*, 1985). En otras especies pertenecientes al género *Potexvirus* como *Caladium virus X* y *Bamboo mosaic virus* se detectaron alteraciones que fueron propuestas como inclusiones cristalinas electrodensas (Kitajima *et al.*, 1977; Rivas *et al.*, 2004).

SMYEV es una especie viral perteneciente al género *Potexvirus*, orden *Tymovirales* y familia *Alphaflexiviridae* (King *et al.*, 2012). Los virus de este género se caracterizan por tener viriones filamentosos y flexuosos de menos de 700 nm de longitud, con cápside sin envoltura formada por 1000 a 1500 subunidades de proteína de 18-27 kD y ARN de cadena única y sentido positivo. Sólo se conocen dos secuencias completas de este virus, una proveniente de Estados Unidos (USA) SMYEV-USA (Nº acceso NC003794) y otra de Alemania SMYEV-AL (Nº acceso AJ577359), pero nunca se obtuvo la secuencia completa de aislamientos de Latinoamérica. El genoma de SMYEV codifica cinco marcos abiertos de lectura (ORFs) (Fig. 2.1). La región 5' terminal posee un CAP de metilguanósina y la 3' terminal, una cola poli (A) (Huisman *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2004). La región 5' no traducible (NTR), como ocurre con otros *Potexvirus*, se inicia con el pentámero 5' GAAAA y regula la síntesis y encapsidación del ARN genómico y subgenómico, como también el transporte del virus por los plasmodesmos. El primer ORF codifica la replicasa

viral, proteína de 150-250 kDa que contiene tres dominios conservados propios de otros *Potexvirus*, que están involucrados en la replicación viral: metiltransferasa (Mtr) localizado cerca de la región N-terminal; ARN helicasa de la superfamilia 1 (Hel) y el dominio ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) con un motivo característico S/TGx3Tx3NS/Tx22GDD que se ubica cerca de la región C-terminal. La Mtr está involucrada en la formación de la CAP de 7 metil guanosina del ARN; la Hel en el desenrollado del ARN, y la RdRp, en la síntesis del ARN (King *et al.*, 2012). La región central del genoma codifica tres ORFs superpuestos, conocidos como “triple bloque de genes” (TBG) que codifican tres proteínas (p1, p2 y p3). Estas son requeridas por el virus para el movimiento de célula a célula junto con la CP. La TBGp1 es una proteína multifuncional que tiene una actividad de ARN helicasa, promueve la traducción de los ARN virales, aumenta el límite de exclusión plasmodesmal, y suprime el silenciamiento del ARN. TBGp2 y TBGp3 son proteínas unidas a la membrana (Verchot-Lubicz, 2005; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). El último ORF corresponde a la CP, la cual es requerida para el ensamblaje del virión y para el movimiento del virus de célula a célula. La CP es necesaria para la encapsidación del genoma y forma un complejo de ribonucleoproteínas junto con el TBGp1 y el ARN viral (Huisman *et al.*, 1988; Santa Cruz *et al.*, 1998; Verchot-Lubicz, 2005). Finalmente la 3' NTR regula la síntesis de la cadena de ARN positiva y negativa.

El objetivo de este capítulo fue ajustar la detección molecular del virus, detectar alteraciones celulares producidas en plantas de frutilla infectadas naturalmente con SMYEV y analizar molecularmente el genoma completo de un aislamiento de SMYEV detectado en el país.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Identificación serológica y puesta a punto de la técnica molecular**

#### *- Material biológico*

Se trabajó con plantas de frutilla cv. Camarosa y Albión provenientes de zonas de producción de Tucumán y Corrientes. Las plantas con síntomas de virus fueron mantenidas en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y humedad para posteriores

estudios. También se utilizaron muestras de hojas del cv. Camarosa provenientes de lotes de Tucumán, que fueron conservadas a 4°C hasta su análisis en el laboratorio.

*- Identificación serológica*

El material biológico con síntomas de mosaico, enanismo, achaparramiento y deformación de hojas (75 plantas), fue probado con antisuero específico (BIOREBA SRL, Latin América) para SMYEV y para *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Arabid mosaic virus* (ArMV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Tomato black ring virus* (TBRV) y *Tobacco necrosis virus* (TNV), mediante DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977) (Anexo 1). Un total de 454 plantas de frutilla asintomáticas proveniente de diferentes regiones de cultivo de Argentina se analizaron para SMYEV. Las que resultaron positivas según la prueba serológica fueron analizadas posteriormente para los otros virus mencionados.

*- Identificación molecular de virus en plantas con y sin síntomas*

Para detectar la presencia de SMYEV se calibraron dos variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): inmunocaptura (IC)-transcripción reversa (RT) -PCR anidado y RT-PCR multiplex en plantas que fueron positivas para SMYEV en DAS-ELISA. En la IC-RT-PCR-anidado, se utilizó inmunoglobulina (Ig) del kit comercial Agdia (Inc. USA), e iniciadores específicos denominados A, B y C (Kaden-Kreuziger *et al.*, 1995) (Tabla 1.1).

Para el desarrollo de la prueba se usaron tubos de microcentrífuga de 500 µl que se sensibilizaron durante 4 h a 37°C con 30 µl de Ig diluida 1:200 en tampón de cobertura (Anexo 1). Los mismos fueron lavados tres veces con PBS-tween y se adicionaron 30 µl de jugo de hojas de frutilla macerado 1:20 (p/v) en tampón de extracción (Anexo 1) conteniendo 5% de polivinilpirrolidona (PVPP). Luego de clarificar a 5.000 rpm 4°C se incubó durante la noche a 4°C. Al día siguiente, tras lavados, a cada tubo, se agregaron 25 µl de una mezcla de reacción de RT-PCR en un solo paso, realizada según instrucciones del fabricante (Promega), a la que se le añadieron 0,2 µM de los iniciadores A y C. El programa de ciclado consistió en 35 ciclos de 95°C por 1 min (desnaturalización), 55°C por 1 min (hibridación) y 68°C por 2 min (extensión). Para la etapa de anidado, se ensayaron alícuotas de 1 µl de la reacción pura de RT-PCR y diluida 1:50 respectivamente; éstas se adicionaron a los tubos conteniendo una nueva mezcla de reacción de PCR más 0,2 µM de los iniciadores B y C. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente: 35 ciclos de

95°C, 1 min; 55°C, 1 min y 72°C, 2 min. Alícuotas de productos de PCR de 7 µl fueron analizadas y visualizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE.

Otra técnica molecular probada fue RT-PCR *multiplex*, para el diagnóstico simultáneo de dos virus de frutilla: SMYEV y SMoV (Chang *et al.*, 2007) y PCR anidado para el diagnóstico de SCV (Posthuma *et al.*, 2002). A tal fin se usaron iniciadores específicos que se detallan en la Tabla 1.1. y plantas sintomáticas de frutilla positivas para SMYEV por serología y plantas sin síntomas, provenientes de diferentes regiones productoras de Argentina.

La presencia de SMYEV en muestras sintomáticas de hojas de frutilla positivas al virus por serología, fue probada por RT-PCR. Para ello, en primer lugar, se extrajeron los ácidos nucleicos totales siguiendo dos métodos: *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen Valencia, CA) (Anexo 2) y el método CTAB modificado (Chang *et al.*, 2007). Para verificar la calidad de extracción del ARN y con el fin de comprobar la correcta aplicación del protocolo de RT-PCR, se realizó un PCR en el que se usaron como control interno iniciadores específicos que hibridan en el gen conservado de planta, NADH dehidrogenasa, subunidad ND2 (*ndhB* gene) (Tabla 1.2). Este gen contiene dos exones separados por un intrón, por lo que, el tamaño del amplicón revela si el ARN (188 pb) o ADN (571 pb) es el origen del templado y en varios casos se encuentran presentes en el gel las dos bandas.

Luego se sintetizó la cadena de ADN copia (ADNc) para lo cual se tomaron 2 µl de ARN, 1µl de dNTP'S (2,5 mM), 0,5 µl *random primer* (Promega), 1 µl de iniciador oligo *dt* (Promega), 10 µl de agua libre de nucleasas, y se incubó a 65°C por 5 minutos para luego, inmediatamente, pasar a hielo. Posteriormente, se agregaron los componentes restantes: 4 µl de tampón M-MLV (5x) (Promega), 1µl de enzima M-MLV (Promega) y 0,5 µl de RNAsin (Promega). La mezcla se colocó en termociclador con las siguientes condiciones: 37°C por 2,5 horas y luego 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima. La mezcla de reacción de PCR consistió en: 4 µl tampón de reacción 5X; 1,6 µl dNTP'S (2,5 mM); 0,4 µl iniciadores específicos que hibridan por fuera de la CP YT1 y Y2 (Tabla 1.1); 0,2 µl de enzima *Go Taq* polimerasa, ADNc 1µl y agua hasta completar un volumen final de 20µl.

Las condiciones de ciclado fueron: 94°C, 30 seg; 55°C, 40 seg y 72°C, 2,5 min y una extensión final de 25 min a 72°C. Además, las muestras se analizaron por medio de una PCR *multiplex* para detectar la presencia de SMYEV y SMoV, y por PCR anidada para detectar SCV (Posthuma *et al.*, 2002), utilizando los iniciadores que se detallan en la tabla 1.1. La mezcla de reacción para la PCR *multiplex* fue: tampón 5X, dNTP'S 2,5 mM,

iniciadores YT1 y Y2 (0,15  $\mu\text{M}$ ), D1 y D3 (0,17  $\mu\text{M}$ ), I2 y SM2 (0,25  $\mu\text{M}$ ), 0,2  $\mu\text{l}$  *Go Taq* polimerasa, 1 $\mu\text{l}$  ADNc y agua hasta completar un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . La mezcla de reacción para la PCR anidada fue: tampón 5X, dNTP'S 10 mM, iniciadores SCD1 y SCD5 (10  $\mu\text{M}$ ) para la primera PCR y los iniciadores SCD1 y SCD2 (10  $\mu\text{M}$ ) para la PCR anidada, *Go Taq* polimerasa, ADNc 1  $\mu\text{l}$  y agua hasta completar un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ .

Las condiciones de ciclado para la *multiplex* fueron: 94°C, 30 seg; 55°C, 40 seg y 72°C, 2,5 min, con una extensión de 72° por 25 min. Las condiciones de ciclado para la PCR anidada fueron 35 ciclos de 94°C, 30 seg; 54°C, 30 seg y 72°C, 1 min. Los productos de amplificación de PCR se corrieron electroforéticamente en gel de agarosa al 2% en tampón TAE.

Tabla 1.1. Iniciadores utilizados en la amplificación de SMYEV, SMoV, y SCV

Iniciador	Secuencia (5' a 3')	Virus	Fragmento (pb)	Referencia
A	GCCAACAGCAAGAATCCTAT	SMYEV	A+C 866	(Kaden-Kreuziger <i>et al.</i> , 1995)
B	GATACTCGTCTACGAAGGCT		B+C 406	
C	TGCACTCTGTGTTGACCTTC			
YT1	CCGCTGCAGTTGTAGGGTA	SMYEV	861	(Thompson & Jelkmann, 2004)
Y2	CATGGCACTCATTGGAGCTGGG			(Thompson <i>et al.</i> , 2003)
D1	TAAGCGACCACGACTGTGACAAAG	SMoV	219	(Thompson <i>et al.</i> , 2003)
D3	TCTTGGGCTTGATCGTCACCTG			
SCD1- FW	ACTGTAATGTCACCAGAGAAG	SCV	573	(Posthuma <i>et al.</i> , 2002)
SCD5-RV	TATACATAGGCTGTTGATGAGG			
SCD1-RV	TTCTGACACTAGTAGATCTCC			
SCD2- FW	ACTGTAATGTCACCAGAGAAGAGAAGAGG			

Tabla 1.2. Iniciadores utilizados como control interno para la detección del gen *ndhB* de planta.

Iniciador	Secuencia 5' a 3'	Fragmento (pb)	Referencia
AtropaNad2.1 <sup>a</sup>	GGACTCCTGACGTATAACGAAGGATC	571	(Thompson <i>et al.</i> , 2003)
AtropaNad2.1b	AAACAACGCTTGTAAGGAGTCC		
AtropaNad2.1 <sup>a</sup>	GGACTCCTGACGTATAACGAAGGATC	188	
AtropaNad2.2b	AGCAATGAGATTCCCCAATATCAT		

## Morfología de las partículas virales y alteraciones citopatológicas producidas

- *Leaf dip*

La observación de partículas virales mediante preparaciones rápidas fue realizada por el método *leaf dip* (Anexo 3). Posteriormente las preparaciones se observaron al microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1220 EXII).

- *Alteraciones citopatológicas*

Para determinar las alteraciones citopatológicas (detección de inclusiones celulares producidas por la presencia de los virus y/o deformaciones de los organelas y componentes celulares) inducidas por la presencia de SMYEV en frutilla, se observaron cortes ultrafinos de tejido de plantas infectadas con virus (frutilla con infecciones simples con SMYEV y mixtas: SMYEV, SCV, SMoV y SLRSV). Las observaciones fueron comparadas con la de cortes realizados a partir de tejido de plantas sanas. Se observaron y analizaron células del mesófilo, parénquima, epidermis y haces vasculares.

A continuación se describe el procedimiento seguido para realizar los cortes ultrafinos del tejido vegetal.

- *Selección del material vegetal y verificación de la presencia de virus*

Se seleccionaron plantas de frutilla cv. Camarosa y Albión que se probaron por DAS-ELISA para determinar la presencia de SMYEV y SLRSV y por RT-PCR para determinar y/o confirmar la de SMoV, SCV y SMYEV.

Tabla 1.3. Plantas de frutilla sanas y enfermas seleccionadas para observar alteraciones citopatológicas al microscopio electrónico de transmisión

<b>Denominación de las plantas</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Virus detectados</b>
Berra 2	Camarosa	SCV SMYEV, SMoV
Chonco 4	Camarosa	SMYEV
Chonco 20	Camarosa	SMYEV
MDP 4	Camarosa	Sana
Albión 36	Albión	SMYEV
Albión 73	Albión	SMYEV
UC-12 Fl	<i>Fragaria vesca</i> clon UC-12	Sana
Coronda L3	Camarosa	Sana
EE-F4	Camarosa	Sana
Bianchio 1	Camarosa	SMYEV, SLRSV
Chonco 27	Camarosa	SMYEV, SLRSV

#### *- Fijación e inclusión del material vegetal*

Se cortaron fragmentos de aproximadamente 3x2 mm de la lámina foliar de hojas con síntomas y sin síntomas. Las muestras fueron fijadas en solución de Karnovsky (2% paraformaldehído / 2,5% glutaraldehído). Luego se posfijaron en tetróxido de osmio (en 1% en tampón fosfato) durante 2 h a temperatura ambiente (T.a.). Posteriormente, los tejidos fueron incubados toda la noche en solución de acetato de uranilo 0,5% a T.a.

Entre cada paso, se realizaron tres lavados de 5 min con agua destilada. A continuación, las secciones de tejido fueron deshidratadas en una serie creciente de acetona (50%, 70%, 90%, 100%) a T.a. durante 10 min en cada una de ellas y seguidamente fueron infiltradas, mediante incubación, en solución de resina Epoxi Spurr Low Viscosity (en acetona en una proporción 1:1) a T.a. toda la noche; en este paso los solventes orgánicos se reemplazaron gradualmente por la resina.

Luego las muestras se colocaron en moldes de silicona donde se incluyeron con resina pura toda la noche a T.a. La polimerización se realizó en estufa 70°C (Kitajima & Nome, 1999) (Anexo 4).

#### **Cortes ultrafinos y contraste de secciones para microscopía electrónica**

Los tacos obtenidos se tallaron para eliminar la resina sobrante hasta la aparición del tejido. Los bloques fueron cortados con cuchilla de diamante en ultramicrotomo (Leica Ultracut R, Viena, Austria) y se obtuvieron secciones de 70-90 nm de espesor, que fueron montadas en grillas de cobre recubiertas con membrana de colodión. El material se contrastó con una solución de acetato de uranilo 2% y posteriormente con citrato de plomo (Reynolds), en caja de Petri con perlas de hidróxido de sodio para evitar las precipitaciones de sales de este metal. Luego de lavar y secarlas los cortes se observaron al microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1220 EXII) (Kitajima & Nome, 1999).

#### **Secuencia genómica completa de un aislamiento de SMYEV**

##### *- Material biológico*

Para la obtención del genoma completo de SMYEV se trabajó con plantas de frutilla del cv. Camarosa, recogidas de lotes de la provincia de Tucumán, que fueron mantenidas en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y humedad.

Estas plantas presentaban síntomas de achaparramiento, clorosis y deformación de las hojas, por lo que se presumió que estaban infectadas naturalmente con una mezcla de

virus. Para comprobarlo se analizaron mediante DAS-ELISA y/o RT-PCR para SMYEV, SCV, SMOV, SLRSV, TBRV, TNV, ApMV, ArMV, ToRSV y RpRSV.

#### - *Purificación del ARN viral*

El virus fue purificado a partir de las hojas de dos plantas de frutillas infectadas con SMYEV (Berra y José 5). Se trabajó con cada una de ellas por separado y luego se seleccionó la que poseía ARN de mayor concentración y pureza para pirosecuenciar. A continuación se detalla el protocolo de purificación viral utilizado.

Se homogeneizaron 5 g de hoja en 25 ml tampón borato 0,5 M, pH 8,1; 50 µl ácido tioglicólico; 12,5 ml cloroformo; 12,5 ml tetracloruro de carbono; 1 g de PVP y 0,1 g sulfito de sodio.

Todos los pasos de homogenización se realizaron en campana de extracción a 4°C. El homogenato se coló utilizando gasa y se clarificó mediante centrifugación con rotor JA-14 a 10.000 g a 4°C por 10 minutos. Se recogió la fase acuosa en campana de extracción que se sembró en colchón de sacarosa al 20% en tampón borato 0,05 M pH 8,1, con 0,05 g de urea por cada 100 ml. Se centrifugó con rotor 45 Ti a 40.000 rpm a 4°C por 2,5 h. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de tampón borato 0,05M pH 8,1, luego se centrifugó a 45.000 rpm a 4°C durante 1,5 h utilizando el rotor 90 Ti.

El precipitado fue resuspendido en 500 µl de tampón borato 0,05 M pH 8,1 y 100 µl se pasaron por las columnas de *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen Valencia, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para determinar la concentración y pureza del ARN total extraído se efectuaron lecturas de absorbancia (Abs) a 260 nm y 280 nm.

#### - *Obtención y análisis de la secuencia completa del SMYEV*

Para la pirosecuenciación, el ARN total obtenido de la purificación viral se envió al Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR), el cual cuenta con una plataforma de genómica y bioinformática equipada con el sistema de secuenciación 454 GF-FLX Life Sciences, de Roche.

En INDEAR el ARNm, fue tratado con una solución de fragmentación para ARN (0,1 M Tris-HCl, pH 7,0 y 0,1 M de cloruro de zinc). Luego construyeron una librería de ADNc de acuerdo al protocolo de Roche. Las lecturas *reads* (pequeños segmentos de bases consecutivas de ADN identificados mediante un instrumento de secuenciación) se filtraron para determinar las de mejor calidad y luego se ensamblaron en *contig* (una secuencia continua de ADN reconstruida a partir de un conjunto de lecturas), utilizando el programa

Newbler Assembly v2.5.3 (Roche). Con un *script* especial (programa que ejecuta un comando), se realizó la normalización, que consiste en dividir por un factor las lecturas obtenidas para cada *isotig* (variantes alternativas del ensamblaje de *contig*), es decir el largo total del *isotig* sobre factor equivalente a la longitud en 600 pares de bases en que se fragmenta el ARN. Así fue posible comparar cuáles fueron aquellos *isotigs* que se encontraron más concentrados, independientemente de la longitud que tenían.

Las *contig* e *isotig* se analizaron con *BLASTn* y *BLASTx* (de la base de datos pública *GenBank*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En el caso de los *singletons* (secuencias no ensambladas) fueron analizados usando el programa CD-HIT, con un umbral de 100%, lo que implica eliminar sólo aquellos duplicados exactos, posibles artefactos de la secuenciación.

Para completar la secuencia del virus se diseñaron iniciadores específicos para cada región con *gap* (espacios en blanco) utilizando el programa *AmplifX* (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/index.html>) y se determinaron las temperaturas de hibridación para cada iniciador en la reacción de PCR. Las secuencias amplificadas de cada una de las regiones fueron clonadas en el plásmido *pGEM Easy Vector Systems* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizaron los transformantes positivos mediante PCR a partir de colonia y se seleccionaron tres clones de cada región amplificada del genoma del virus, que fueron enviadas a secuenciar a la unidad de genómica del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar, con iniciadores específicos e iniciadores universales M13 (-21) forward y M13/pUC reverse (-29).

Las secuencias obtenidas se analizaron con los programas del paquete bioinformático Lasergene 8.0.2 *DNA STAR* Inc. (Madison, WI EUA), se obtuvo el consenso de los clones y luego fueron ensambladas con el programa *CAP3 Sequence Assembly Program* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>).

La secuencia completa de SMYEV se comparó con dos secuencias completas de aislamientos de Alemania (Nº acceso AJ577359) y Estados Unidos (Nº acceso NC003794) que se obtuvieron de la base de datos del *GenBank*. Los programas bioinformáticos que se utilizaron en estos análisis fueron: para calcular el peso molecular de las regiones codificantes del genoma de SMYEV y % de identidad de nucleótidos y aminoácidos (aa) programa *DNA STAR* Inc. (Madison, WI EUA); para el alineamiento de secuencias y construcción de árbol filogenético Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011); para la detección de los marcos de lectura ORF finder: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Además, se realizó una búsqueda de los motivos conservados con el programa

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> y <http://pfam.sanger.ac.uk/>. Se calculó, para cada región del genoma de SMYEV, el número de sitios polimórficos, sitios monomórficos, variantes simples, haplotipos y la diversidad genética de las cinco regiones codificantes del virus, utilizando el programa *Dnasp* v5.10 (Librado & Rozas, 2009).

## RESULTADOS

### Identificación serológica y puesta a punto de la técnica molecular

#### - *Detección serológica del virus*

El SMYEV fue detectado en el 2% de las plantas asintomáticas y en el 36% de las plantas con síntomas (Figura 1.1). Siete muestras resultaron positivas para SLRSV, por serología, y no se detectaron plantas positivas para el resto de los virus transmitidos por nematodos: ArMV, ToRSV, RpRSV, ApMV, TBRV y TNV.



Figura 1.1. Plantas de frutilla cv. Camarosa con síntomas de virus: achaparramiento hojas deformes, bordes cloróticos, necrosis internerval y moteado clorótico.

#### - *Detección molecular de virus en plantas con y sin síntomas*

Mediante la prueba de IC-RT-PCR anidado se logró amplificar un fragmento del tamaño esperado (aproximadamente 406 pb) en las muestras que habían sido positivas al patógeno por serología. En este protocolo se incorporó el uso de PVPP en la maceración de la muestra vegetal, lo que redujo la oxidación de los tejidos.

Por otra parte, se determinó que la dilución óptima de empleo del producto de la RT fue de 1/50 (Figura 1.2) incorporando una alícuota de 1  $\mu$ l a la reacción de PCR anidado.

No se realizó digestión con proteinasa K ni extracción de ácidos nucleicos con fenol/cloroformo y precipitación con etanol, como indicaba el protocolo de Kaden-Kreuziger *et al.* (1995).

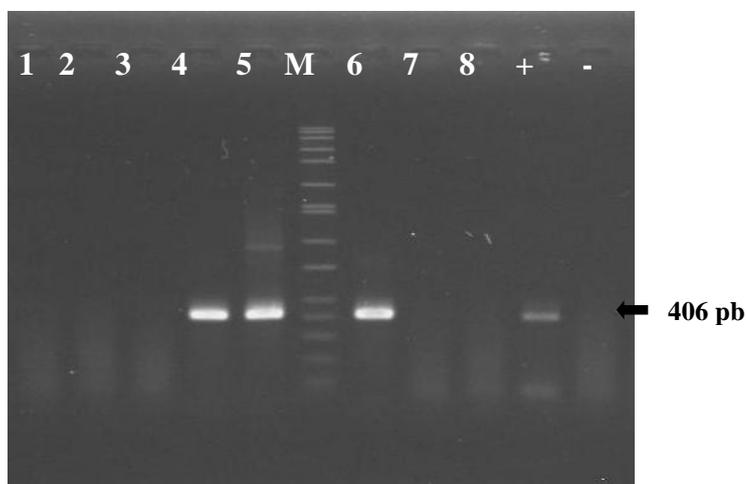


Figura 1.2. Amplificación por IC-RT-PCR Anidado del ARN de SMYEV con iniciadores específicos para el virus. M: marcador peso molecular 50-10000 pb, 1-8 muestras sanas y enfermas; (+): control positivo; (-): control negativo.

Con la extracción realizada por el método comercial *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen Valencia, CA), los resultados fueron negativos.

La extracción de ácidos nucleicos totales por el método CTAB modificado arrojó un buen rendimiento, aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en cada muestra; luego se realizó PCR con los iniciadores de control interno que amplificaron el gen de la NADH2 de planta, corroborando la buena calidad en la extracción (Figura 1.3).

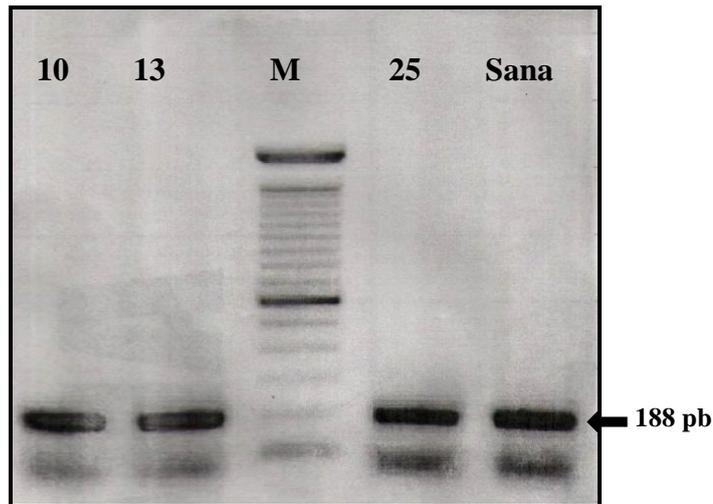


Figura 1.3: Amplificación por PCR con iniciadores de control interno. Muestras de frutilla: 10, 13 y 25. Sana: Planta sana; M: Marcador de peso molecular 50-10.000 pb. La flecha señala el tamaño del fragmento obtenido.

El RT-PCR realizado a las muestras sintomáticas de hojas de frutilla positivas para SMYEV por serología permitió detectar plantas infectadas con el virus y plantas positivas a SMoV y SCV. Se amplificaron fragmentos del tamaño esperados para SMYEV, SMoV, SCV (Figura 1.4).

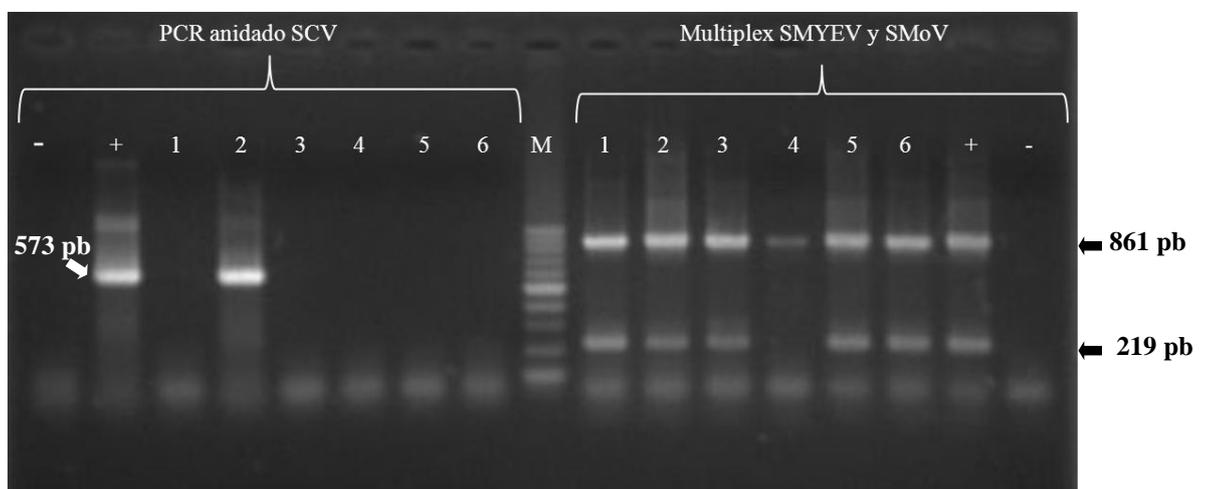


Figura 1.4. Amplificación por PCR anidado y *multiplex* PCR con iniciadores específicos de SMYEV, SCV y SMoV. M: marcador de peso molecular 100 a 1000 pb, muestras con síntomas: 1, 2, 3, 5 y 6; muestra sin síntomas: 4; control positivo (+); control negativo (-).

### Morfología de las partículas virales y alteraciones citológicas producidas

- *Leaf dip*

Partículas con forma de filamento flexuoso fueron observadas en muestras de frutilla en infección simple con SMYEV (Figura 1.5)

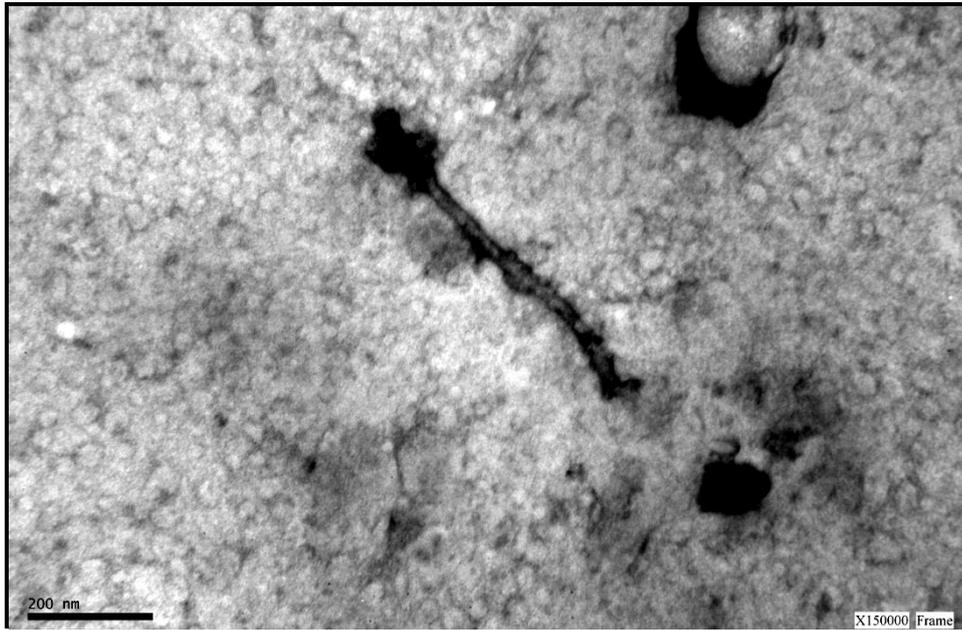


Figura 1.5. Partícula viral filamentosa flexuosa en preparación *leaf dip*.

#### - Alteraciones citopatológicas

En las muestras de hojas de frutilla enferma con infección simple con SMYEV, se pudo observar gran cantidad de vesículas en el citoplasma (Figura 1.6) y en las vacuolas (Figura 1.7). También se detectó la presencia de mitocondrias con espacios vacíos en su interior (Figura 1.6). Se encontraron escasas partículas virales dispersas en el citoplasma de células del mesófilo (Figura 1.8), ausentes en el resto de los tejidos. En núcleo, peroxisomas, retículo endoplasmático rugoso y liso y cloroplastos, no se observaron alteraciones.

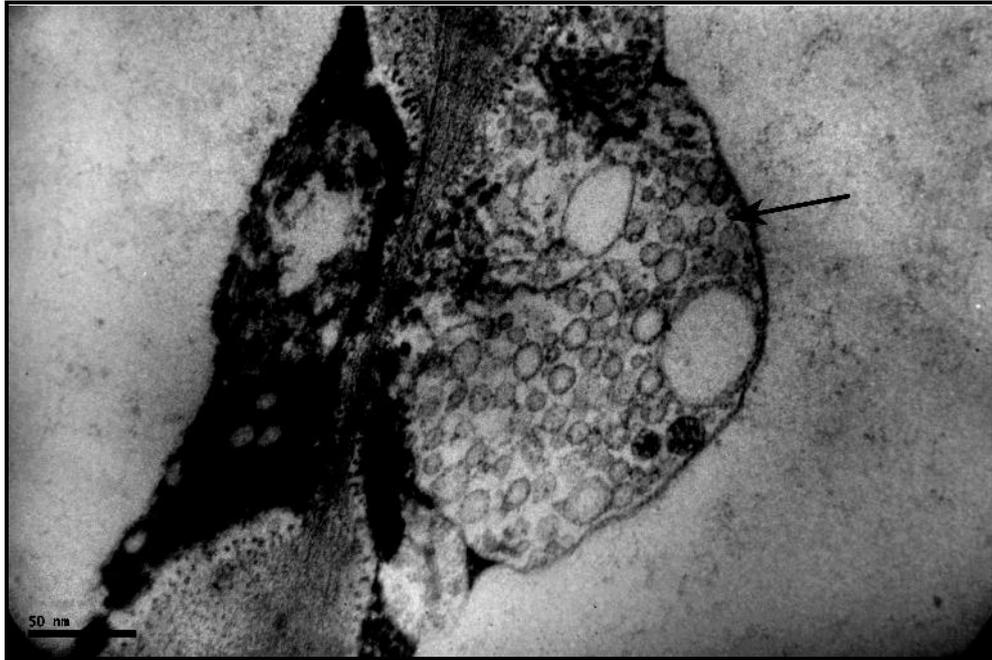


Figura 1.6. Grupo de vesículas formadas en el citoplasma de células infectadas con SMYEV. Las flechas señalan una masa de vesículas en el citoplasma, M: mitocondria con espacios vacíos en su interior.

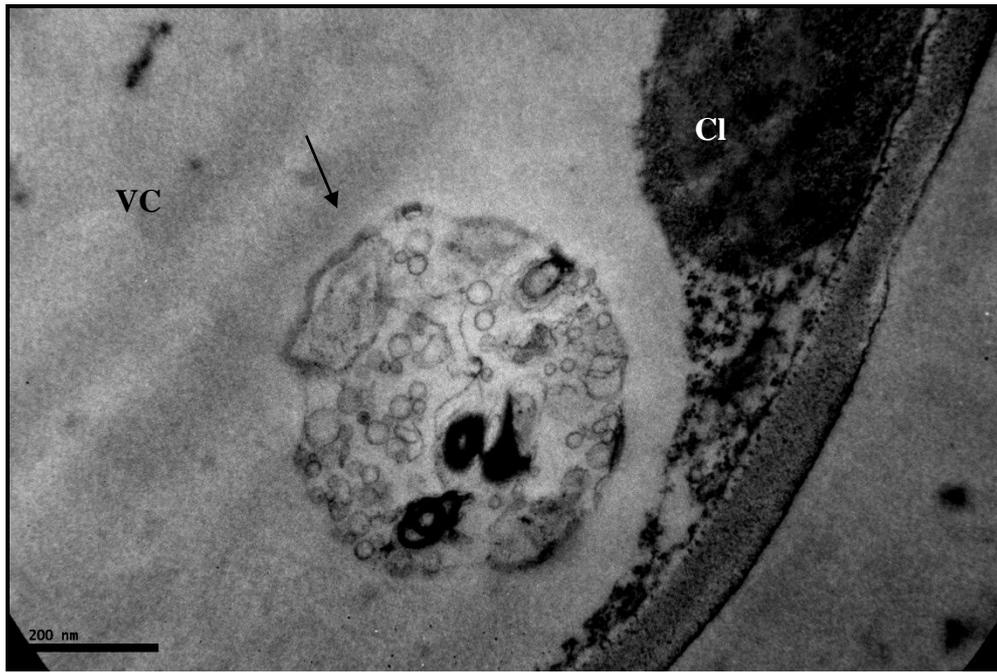


Figura 1.7. Conjunto de vesículas en vacuola de células de mesófilo infectadas con SMYEV. VC: vacuola celular; Cl: cloroplasto

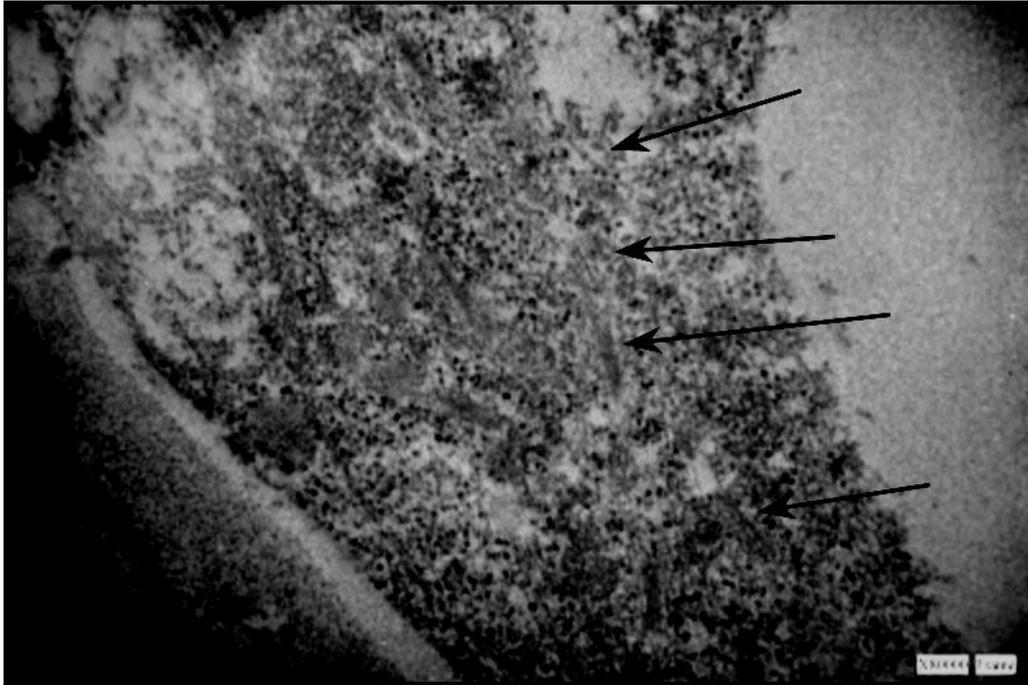


Figura 1.8. Partículas de SMYEV dispersas en el citoplasma de una célula del mesófilo.

En infecciones mixtas (SMYEV y SLRSV), en la que hubo expresión de síntomas, se observaron proliferaciones de membranas en el citoplasma. En los cloroplastos se detectó acumulación de granos de almidón y desorganización de granas y tilacoides. Además se observaron mitocondrias con espacios vacíos en su interior (Figura 1.10).

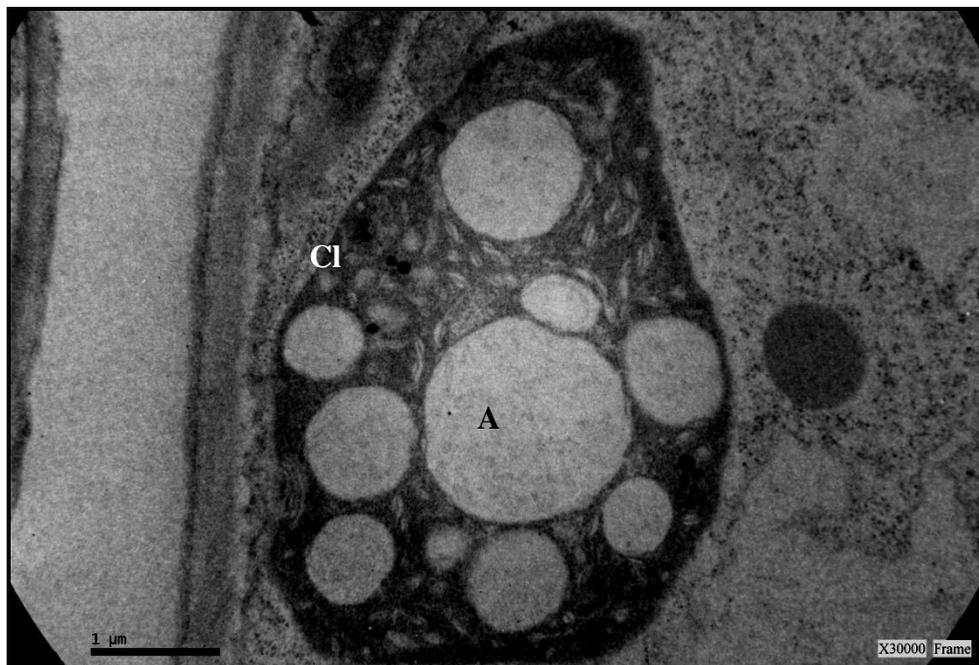


Figura 1.9. Cloroplasto con granas y tilacoides desorganizados, en célula del mesófilo, en planta con infección mixta de SMYEV + SLRSV. A: grano de almidón; Cl: cloroplasto.

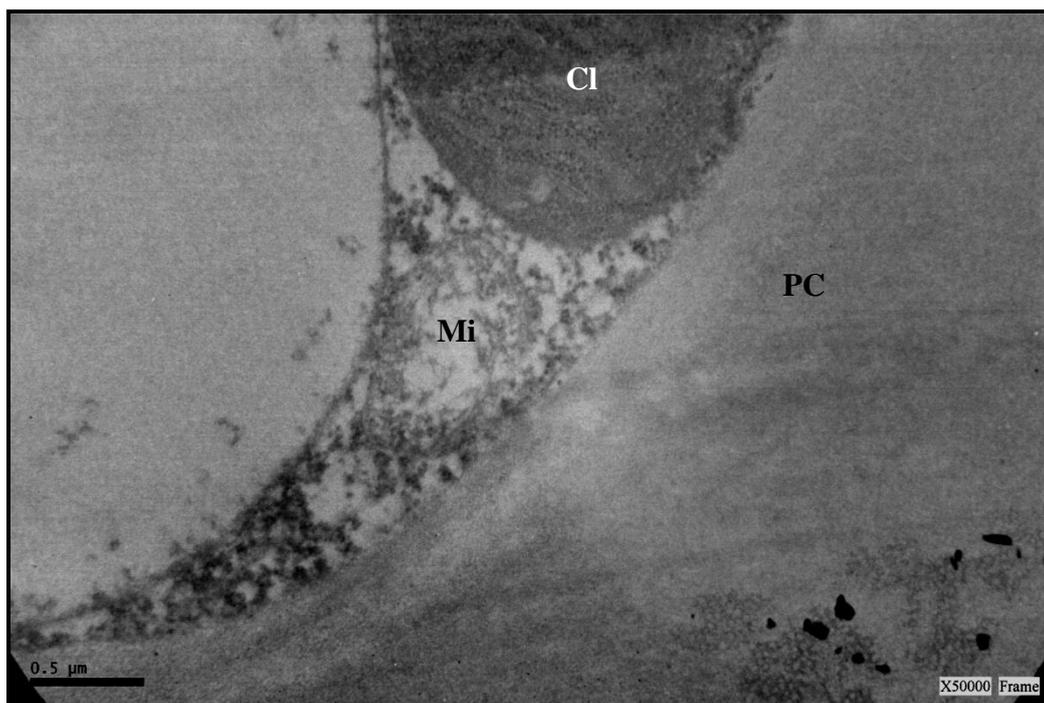


Figura 1.10. Mitocondria con espacios vacíos en su interior en célula del mesófilo con infección mixta (SMYEV y SLRSV). Mi: mitocondria; Cl: cloroplasto; PC: pared celular.

### Secuencia genómica completa de un aislamiento de SMYEV

#### - Purificación del ARN viral

De las dos plantas a las cuales se les realizó la extracción, se obtuvo un mejor rendimiento (concentración de ARN extraído ng/μl) en la denominada “Berra” (Tabla 1.4).

La relación de pureza Abs260 nm/Abs280 nm fue la esperada para el grupo de virus al cual pertenece SMYEV, *Potexvirus* (entre 1,8 y 2). Figura 1.11.

Tabla 1.4. Cuantificación de ARN extraído hoja de frutilla y procesado mediante purificación de partículas virales y columnas de celulosa

Muestra	ng/μl	Abs260	Abs280	260/280
Berra	3361,47	84,037	42,174	1,99
José 5	542,14	13,554	6,457	2,10

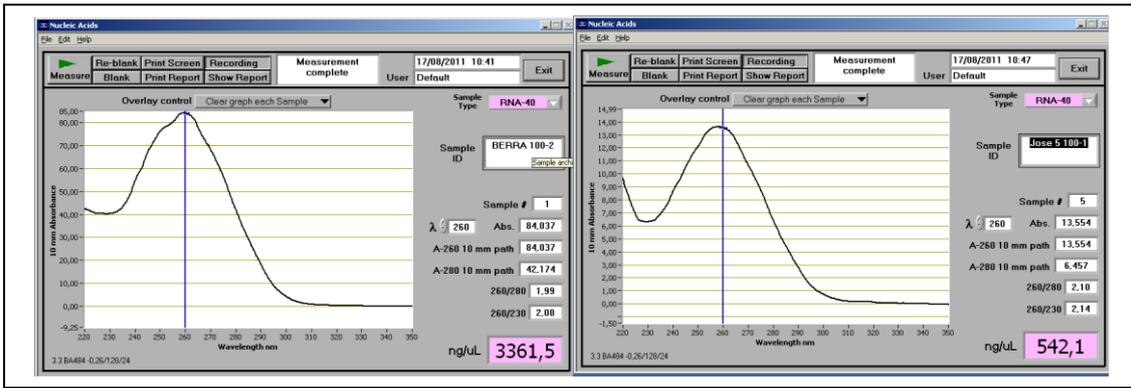


Figura 1.11. Curva de lectura de absorbancia del ARN total. El pico de la curva fue a 260nm que corresponde a la absorción de ácidos nucleicos.

En la figura 1.12 se observa la calidad de la pirosecuenciación. La distribución no fue normal, sino que resultó sesgada hacia la derecha. En el grafico se señala el valor medio de la longitud de las lecturas y de una (1SD) y dos (2SD) desviaciones estándar.

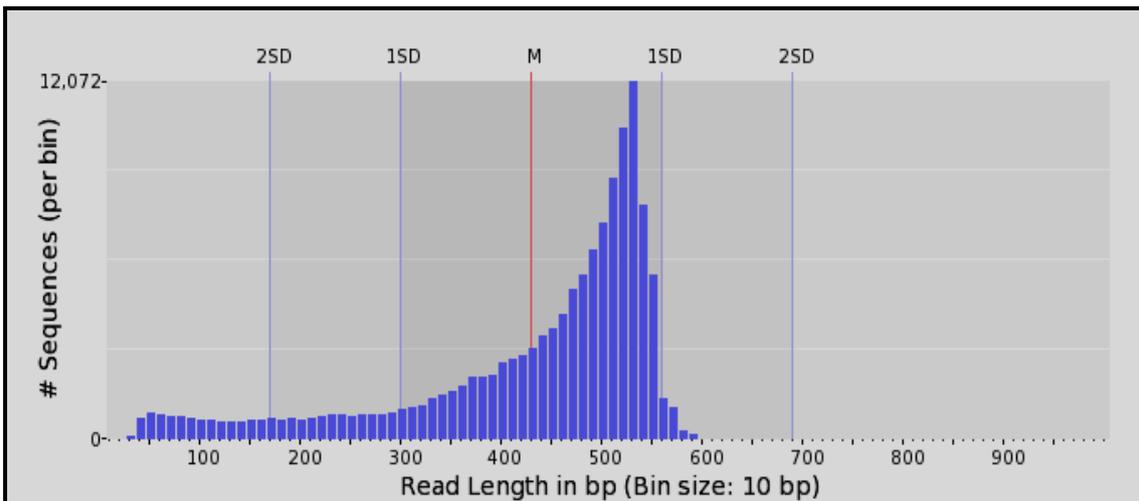


Figura 1.12. Número y distribución de la longitud de lecturas obtenidas en la pirosecuenciación del ARN extraído de plantas de frutilla infectadas con SMYEV. En el eje X se muestra la longitud de las lecturas en pares de base y en el eje Y la frecuencia de secuencias para esa longitud de lecturas. M: valor medio; SD: desviación estándar.

Se obtuvo un total de 130.362 lecturas de la secuencia con una longitud promedio de 424 pb; en el ensamblaje *de novo* se obtuvieron 887 *isotig* donde el total de lecturas ensambladas fue 120.464, que representó el 92,45%. Las secuencias no ensambladas, denominadas *singletons* fueron analizadas con el programa CD-HIT y se redujo a 6.703 el número de secuencias a analizar. Se logró un 89% de la secuencia total del virus.

En la secuencia obtenida se detectaron *gaps* situados, principalmente, en el gen de la replicasa viral. El *gap* 1 estaba ubicado en la región final del dominio metiltransferasa, el *gap* 2 al final de la secuencia del dominio helicasa; *gap* 3 y 4 al principio y final del dominio RdRp y el *gap* 5 abarcó los últimos 64 nt de la CP y la región 3' terminal (Figura 1.13).

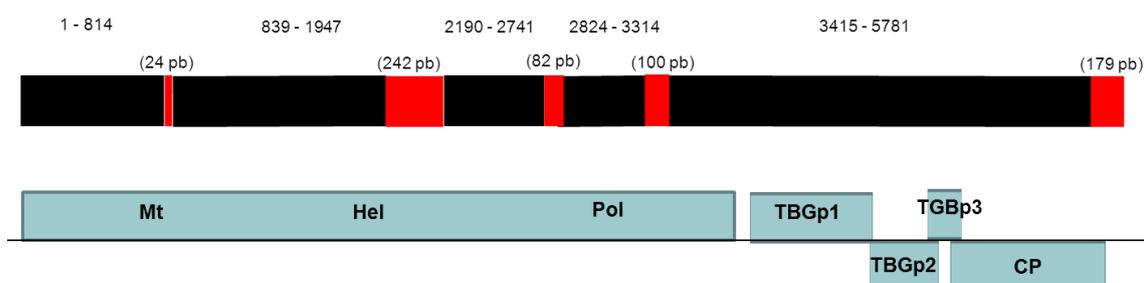


Figura 1.13. Esquema de secuencia del genoma de SMYEV, obtenido por pirosecuenciación y abajo representación esquemática de la organización genómica de SMYEV. Los cubos rojos representan partes no secuenciadas (*gap*) del genoma viral.

Se diseñaron iniciadores específicos para completar los espacios vacíos (5 *gaps*) del genoma viral y se calcularon las condiciones adecuadas para el desarrollo de los respectivos PCR que permitieron obtener los fragmentos del tamaño esperado para cada *gap* (Tabla 1.5; Tabla 1.6, Figura 1.14 A, B y C).

Tabla 1.5. Iniciadores específicos diseñados sobre la secuencia obtenida por pirosecuenciación y utilizados en PCR para completar los *gap* de SMYEV.

Nombre del iniciador	Secuencia del iniciador 5' → 3'	Posición	Tº hibridación (TH)	Fragmento (pb)
SMYEV G1 F SMYEV G1 R	CTCGCGGAAGAATCAAAGAC CAGAAGCTGGCGTAGTTTCC	395-414 1070-1089	58	695
SMYEV G2 F SMYEV G2 R	ATGGTTTCAAGGGCAATCAG AGTGTCGTTGTCCAGCAAA	1586-1605 2493-2511	57	925
SMYEV G3 F SMYEV G3 R	GAGATCCACTTCGTCAACAC TAGGTCTTTTGGACCTCATTC	2563-2582 3063-3083	56	521
SMYEV G4 F SMYEV G4 R	GGCGGAATTCGCTCTCAAG TGTGGTGGTAGGCAATTGAA	2946-2964 3603-3622	58	677
SMYEV G5 F PC-R4 R *	ATTGCCAATGGGCTCTACAC ACCGATTCAACTGGAAGAATT CGCGG	5166-5185 6009-6034	60	869

\* Secuencia obtenida de Tsuneyoshi *et al.*, 1998.

Tabla 1.6. Mezcla de reacción de PCR y condiciones de ciclado utilizadas para la cobertura de los 5 *gaps* de la secuenciación del SMYEV.

Reactivos	Volumen de 1 reacción	Condiciones de ciclado
ADNc	1 $\mu$ l	94° 2 min 94° 30 seg } <b>Th</b> 40 seg } 35 ciclos 72° 2,5 min } 72° 5 min }
Tampón de reacción <i>Go Taq</i> 5X verde (1,5 mM MgCl)	4 $\mu$ l	
dNTPS 10 mM	0,5 $\mu$ l	
Iniciador Fw (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	
Iniciador Rv (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	
<i>Go Taq</i> polimerasa 5 U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	
Agua libre de nucleasas	12,3 $\mu$ l	
Volumen final	20 $\mu$ l	

**Th:** temperatura de hibridación de los iniciadores para cada gap, según tabla 2.

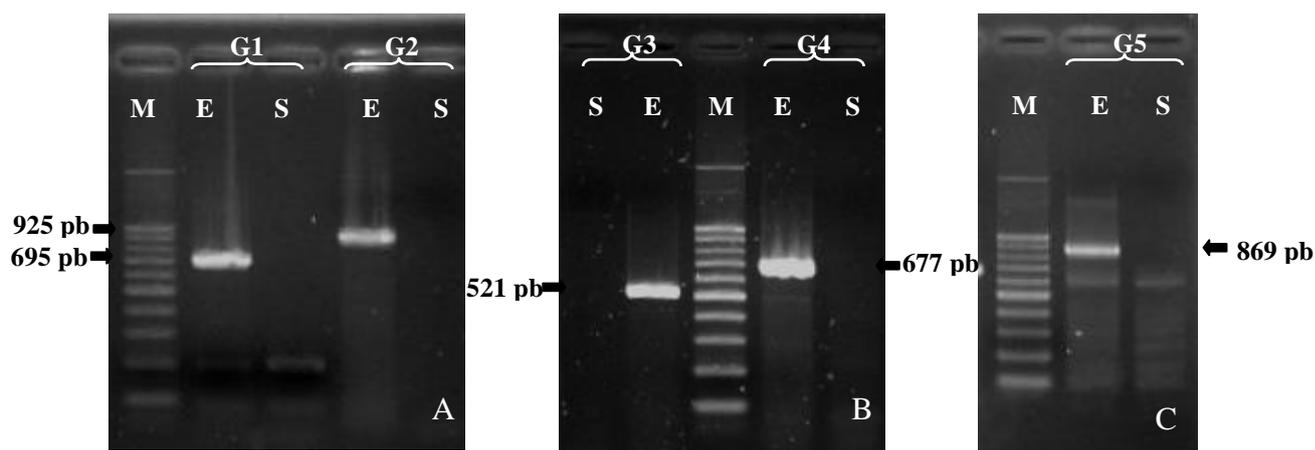


Figura 1.14. Fragmentos amplificados por PCR que cubren los gap (G) de la secuencia de SMYEV. A) G1 y G2. B) G3 y G4. C) G5. M: marcador de peso molecular 100-1.000 pb. E: planta infectada con SMYEV; S planta sana. La flecha señala el tamaño del fragmento obtenido.

Las colonias seleccionadas mediante el medio selectivo fueron evaluadas por PCR con iniciadores específicos (PCR de colonias) y se obtuvieron los productos de tamaño esperado (Figura 1.15).

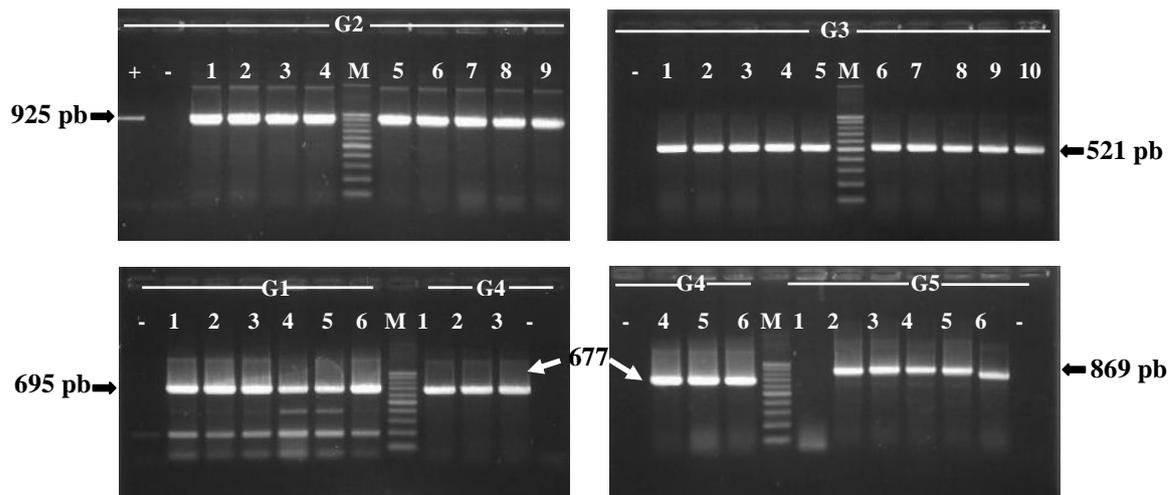


Figura 1.15. Producto de PCR de colonia donde se observan los fragmentos amplificados para cada uno de los *gaps* (G1, G2, G3, G4 y G5) de la secuencia de SMYEV. +: testigo positivo; -: testigo negativo; M: marcador de peso molecular 100 -1.000 pb (Promega). La flecha señala el tamaño del fragmento obtenido

Posteriormente, se ensamblaron los fragmentos secuenciados con la secuencia incompleta de SMYEV. El genoma total del virus de Argentina fue de 5.950 nt, excluyendo la cola poli A. El aislamiento de SMYEV-AR mostró una organización genómica similar a miembros de otras especies del género *Potexvirus*. La región 5' NTR comprendió 78 nt y, al comienzo de la misma, se identificó una secuencia de cinco bases GAAAA que es característica de todos los miembros del género. El ORF 1, correspondiente al gen de la replicasa viral, estuvo constituido por 3.972 nt incluyendo los codones de inicio (ATG) y finalización (1324 aa), con un peso molecular de 149,81 kDa y un contenido de GC de 52,42%. En este gen se detectó tres dominios conservados, un dominio metiltransferasa (1-279 aa), un dominio helicasa con actividad NTPasa (541-774 aa) y finalmente un dominio RdRp 2 (924-1215 aa). No se encontró la presencia del dominio conservado Alk B en la secuencia de aminoácidos de la replicasa viral de la secuencia argentina, como tampoco en la de Alemania y Estados Unidos.

Se halló una secuencia no codificante de 49 nt siguiendo al gen de la replicasa viral y que incluyó al promotor subgenómico GGGTTAAGTTACCATTCTCTCGAAGTTC.

Los siguientes tres ORF (ORF2-4) se encontraron superpuestos, y juntos formaron el triple bloque de genes (TBG). En el ORF2 (TBGp1) hubo 690 nt (230 aa), con un peso molecular calculado de 25,41 kDa y 53,04% de contenido GC. En el análisis *in silico* del ORF2 fue identificado un dominio conservado NTPasa/helicasa (pfam01443). El ORF 3 (TBGp2), integrado por 327 nt (109 aa), con un peso molecular calculado de 11,58 kDa, 51,68 % de contenido GC y contiene dos segmentos hidrófobos, con una región central

conservada entre ellos GDX<sub>2</sub>HX<sub>2</sub>PXGGXYXDGTKX<sub>3</sub>Y común en los *Potexvirus*. El ORF4 (TBGp3) abarcó 228 nt (76 aa), con un peso molecular calculado de 8 kDa y 56,58% de GC. Este ORF incluye un dominio de proteína conservada identificado como Pfam 7kD\_coat (PF02495) que se limita a *Potexvirus* y *Carlavirus*. Finalmente el ORF5, que codifica el gen de la CP del virus, exhibió 729 nt de longitud (243 aa) y un peso molecular calculado de 25,71 kDa y 57,34% de GC. En la región 3' terminal de la CP se detectó el motivo conservado FDFFDGV, que también se ha encontrado en otras especies del género *Potexvirus* como *Clover yellow mosaic*, *Potato virus X*, *Allium virus X* y *Cassava common mosaic virus*, y se observó que comparte tres aa (FAAFDFFDGV) con las secuencias de SMYEV de Estados Unidos y Alemania. La región 3' terminal no codificante estuvo constituida por 105 nt de longitud y tuvo una secuencia conservada de seis nucleótidos ACTTAA (Bancroft *et al.*, 1987).

El porcentaje de identidad de cada uno los ORF del aislamiento de Argentina comparados con los aislamientos de Alemania y Estados Unidos se detallan en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7. Porcentaje de identidad de nucleótidos/aminoácidos de la secuencia completa de SMYEV-AR (Argentina) con dos secuencias completas de SMYEV-AL (Alemania AJ577359) y SMYEV-USA (Estados Unidos NC003794) disponibles en la base de datos del *GenBank*.

Aislamientos	Genoma completo	5'NCR	ORF1	ORF2 (TBGI)	ORF3 (TBGII)	ORF4 (TBGIII)	ORF5	3'NCR
SMYEV-AL	96,7	98,7	97,1/99,2	93,3/97,4	92/100	98,2/98,7	98,9/100	98,4
SMYEV-USA	87	88,5	84,9/96,8	93,2/98,7	96,3/97,2	95,6/96,1	86,8/95,5	94,5

El árbol filogenético construido con las secuencias completas de SMYEV-AR, Estados Unidos SMYEV-USA (N° acceso NC003794) y Alemania SMYEV-AL (N° acceso AJ577359) mostró que la secuencia de Argentina se agrupó con la de Alemania, y en una rama diferente, quedó ubicada la secuencia de Estados Unidos (Figura 1.16)

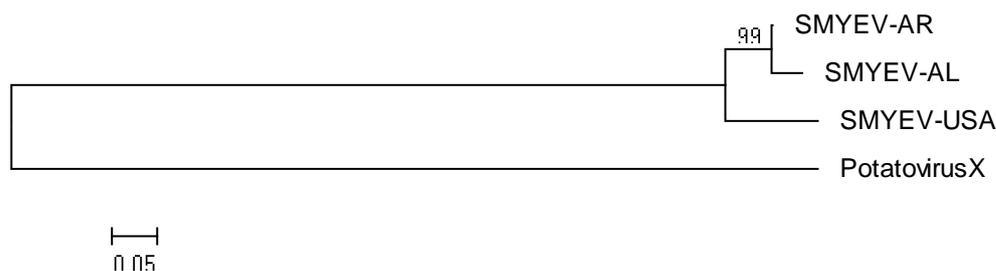


Figura 1.16. Árbol filogenético construido por el método *Neighbour Joining* con la secuencia de nucleótidos del genoma completo de tres aislamientos de SMYEV incluido el de Argentina. En los nodos de las ramas se observan los porcentajes de *bootstrap* (1.000 réplicas). Como extra grupo se incorporó la secuencia de PVX M72416. El análisis filogenético se llevó a cabo con el programa Mega 5.

Se detectaron sitios polimórficos en las cinco regiones codificantes del virus con 16,6, 12, 11,6, 5,2 y 13,7% para genes de la replicasa, TBGp1, 2, 3 y CP, respectivamente, y se determinó la diversidad para cada una de las regiones (Tabla 1.8).

Tabla 1.8. Estadísticos informativos obtenidos para las regiones codificantes del virus

<b>ESTADÍSTICO (N° nucleótidos analizados)</b>	<b>Replicasa (3972)</b>	<b>TBGp1 (690)</b>	<b>TBGp2 (327)</b>	<b>TBGp3 (228)</b>	<b>CP (729)</b>
N° Sitios polimórficos (%)	661 (16,6)	83 (12)	38 (11,6)	12 (5,2)	100 (13,7)
Sitios monomórficos	3311	607	289	216	629
Variantes simples *	637	83	38	12	100
N° haplotipos	3	3	3	3	3
Cambios sinónimos	622	74	35	8	88
Cambios no sinónimos	54	10	3	4	13
Diversidad ( $\pi$ )	0,1	0,08	0,07	0,03	0,09
Desvío estandar	0,04	0,02	0,02	0,01	0,03
Diversidad (Jukes and Cantor)	0,1	0,08	0,08	0,03	0,1

\* Una variante simple contiene al menos dos tipos de nucleótidos (o aminoácidos) con, a lo sumo, uno que ocurre varias veces.

## DISCUSIÓN

SMYEV es un *Potexvirus* emergente en frutilla en Argentina. La identificación y la detección eficiente con un alto grado de sensibilidad es fundamental para un diagnóstico confiable y para realizar estudios epidemiológicos que permitan implementar estrategias de manejo sustentable de la enfermedad.

En esta tesis se ajustaron métodos moleculares de detección del virus, IC-RT-PCR-anidado, RT-PCR y RT-PCR *multiplex* en el que se detectó este virus junto con SMoV. Con respecto a la IC-RT-PCR-anidado se realizaron algunas modificaciones en relación al protocolo original descrito por Kaden-Kreuziger *et al.* (1995). Se incorporó PVPP a la molienda del tejido vegetal, lo cual resultó eficaz para evitar la oxidación de los ácidos nucleicos desde el comienzo del proceso y para atenuar el efecto de los compuestos fenólicos en la PCR. También se determinó que en la reacción de PCR anidado, una dilución 1/50 del producto de RT-PCR, fue más adecuada para obtener buenos resultados. Aunque la IC-RT-PCR-anidado es una técnica mucho más sensible la RT-PCR fue más rápida, práctica y económica.

También se compararon dos tipos de extracción de ácidos nucleicos: uno que emplea columnas comerciales de afinidad (*Qiagen*) para la extracción de ARN total y el segundo denominado CTAB modificado para la extracción de ácidos nucleicos totales. De ellos, el más eficiente fue el segundo (altamente eficaz y mucho más económico que un *kit* comercial). Asimismo, resultó beneficioso porque la técnica de CTAB implica extracción de ácidos nucleicos totales (ADN y ARN) y, por lo tanto, las extracciones son apropiadas para diagnosticar virus presentes en frutilla con cualquiera de los dos tipos de genoma.

La calibración de los sistemas de diagnóstico permitió detectar la presencia de SMYEV en infecciones simples y en infecciones mixtas con otros virus que se transmiten por áfidos (SCV y SMoV), combinando el uso de un método efectivo y económico de extracción de ácidos nucleicos (CTAB modificado) y la técnica de RT y PCR *multiplex*.

Se conoce que, en general, los *Potexvirus* no inducen inclusiones virales en las células de las plantas que infectan. Sin embargo el PVX constituye una excepción y se desconoce si otros virus del mismo género son capaces de inducirlos. En la mayoría de los virus de este género las partículas se acumulan en el citoplasma formando agregados masivos y, en algunos casos, exhiben un bandeo notable (Francki *et al.*, 1985). Cho *et al.* (2011) citaron la presencia de partículas virales de SMYEV compactadas como un cuerpo de inclusión, en células de la epidermis y también partículas virales dispersas en el

citoplasma de células parenquimáticas en hojas de frutilla del cv. Seolhyang en Corea (Cho *et al.*, 2011). Esto se contradice con las observaciones realizadas en esta tesis en la cual se detectaron ocasionalmente agregados de partículas con aspecto flexuoso dispersos en el citoplasma de las células del mesófilo. Martelli *et al.* (2007) citaron la existencia de diferencias entre géneros de la familia *Alphaflexiviridae*, ellos observaron que en la apariencia externa de las acumulaciones de virus, los agregados, tienen un aspecto flexuoso en los géneros *Potexvirus*, *Vitivirus* y *Capillovirus* mientras que en *Carlavirus*, *Trichovirus* y *Foveavirus* son bastante rígidos. Aunque hay citas de masas agregadas que exhiben bandeados de partículas virales, que en algunos casos, son pequeñas (*Allexivirus*, *Capillovirus*, y *Trichovirus*) y en otros grandes (*Potexvirus*, *Vitivirus* y *Carlavirus*) (Martelli *et al.*, 2007), en el presente estudio sólo se hallaron escasos agregados, pequeños y dispersos en el citoplasma de células del mesófilo, en plantas infectadas naturalmente con SMYEV. La presencia de abundantes partículas de SMYEV, detectadas por Cho *et al.*, podría estar relacionada con una mayor replicación del virus en el cultivar coreano de frutilla que la observada en los cultivares analizados en este trabajo.

En esta tesis no se observaron partículas virales dentro de mitocondrias, cloroplastos y núcleo. Se ha comprobado que la aparición de vesículas en el citoplasma de la célula que corresponde a zonas muy ricas en proteínas virales (Francki *et al.*, 1985).

Cabe destacar la existencia de un mecanismo que han desarrollado las plantas, para reciclar constituyentes celulares, que se denomina autofagia. El mismo opera bajo condiciones favorables y también es inducido significativamente después de una condición de estrés. Este sistema involucra a vesículas especializadas que envuelven y entregan el material citoplasmático no deseado a la vacuola para su descomposición (Li & Vierstra, 2012). En los últimos años se ha demostrado que la autofagia opera como un proceso selectivo (autofagia selectiva), que actúa para deshacerse de blancos específicos como las proteínas individuales, agregados de proteínas, orgánulos, e incluso patógenos invasores virus y bacterias, en este caso se denomina xenofagia, (Michaeli & Galili, 2014). Sin embargo se sabe que para coexistir en sus hospedantes los virus han evolucionado diversos mecanismos para aprovechar los procesos celulares y utilizarlos en su beneficio e inducir la autofagia para fomentar su propia replicación, la morfogénesis, la salida celular, o patogenicidad (Deretic & Levine, 2009). Al respecto se pudo detectar proliferación vesicular en el citoplasma de las células infectadas, lo que podría deberse a la activación del mecanismo de autofagia como fue explicado. También podría deberse al hecho de que esta parte de la célula es el lugar donde se replican los *Potexvirus* (Hulo *et al.*, 2011).

También se observó en esta tesis que las mitocondrias contenían espacios vacíos en su interior, modificación que se ha sido citada para otros *Potexvirus* (Francki *et al.*, 1985).

En las infecciones mixtas (SMYEV + SLRSV) se observaron cloroplastos con un sistema de membranas desordenado, un citoplasma más electrodenso que en las plantas sanas, y de aspecto granulado, lo que hace suponer una gran actividad celular. El SMYEV en infecciones simples no evidenció estas alteraciones, lo que podría indicar que la presencia del otro virus fue la causa de las modificaciones detectadas en los cloroplastos, o bien, que los dos virus juntos tienen un efecto sinérgico y alteran la actividad celular. Esto también se observó en plantas de tabaco en coinfecciones de un *Potexvirus* y *Potyvirus* (*Potato virus X* y *Potato virus Y*) (Hull, 2002), o en plantas de poroto y soja en infecciones mixtas de *Potyvirus* y *Comovirus* (*Bean yellow mosaic virus*,+ *Cowpea mosaic virus*, ). Esto también fue observado en caupí, poroto; y tabaco al ocurrir infecciones de un *Tobamovirus* y un *Cucumovirus* (*Sunn hemp mosaic virus* + *Cucumber mosaic virus*) en la que se observaron ultraestructuras paracristalinas compuestas por agregados virales dispuestos sobre las células de la planta hospedante doblemente infectada (Martin *et al.*, 2004).

Esta hipótesis debería ser confirmada con el estudio de las alteraciones citopatológicas producidas por cada uno de los virus en forma aislada.

Se determinó la secuencia completa del genoma de SMYEV y se analizó la similitud de nucleótidos y aminoácidos y las relaciones filogenéticas con otros dos aislamientos existentes. Los resultados mostraron que SMYEV-AR (Argentina) obtuvo una mayor similitud de secuencia de nucleótidos con SMYEV-AL (Alemania). SMYEV-AR y el aislamiento SMYEV-AL están incluidos en el mismo grupo, indicando que ambos pueden ser evolutivamente más cercanos que el aislamiento de SMYEV-USA (Estados Unidos). Los valores de identidad de los distintos ORF que componen el genoma de SMYEV se encontraron dentro del rango de los criterios de demarcación de especies que fueron establecidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ,más del 72% de identidad de nucleótidos o más de 80% de identidad de aminoácidos entre su CP o el gen de la polimerasa (King *et al.*, 2012). La secuencia viral de SMYEV presentó *gap* en cuatro regiones de la replicasa viral, se determinó que en esos lugares la cobertura de las lecturas fue baja. Esto podría estar relacionado con errores en la replicación viral (Duffy *et al.*, 2008), donde la presencia de un salto en la lectura por parte de la polimerasa podría provocar la aparición de un codón de finalización y detener el proceso de replicación liberando una cadena incompleta. En el caso del quinto *gap* se situó en la región 3` terminal

de la CP y la región 3' NTR del virus, en esta última zona del genoma fueron identificadas tres estructuras en forma de horquilla (Thompson & Jelkmann, 2004), las cuales se han relacionado con los puntos de ruptura del ARN genómico viral en los procesos de recombinación del genoma (Carpenter *et al.*, 1995; Nagy & Bujarski, 1997) en varias especies de virus (Nagy *et al.*, 1995; Balasubramanian & Selvarajan, 2014).

También es posible que las estructuras en horquillas en la región 3'NTR sean el motivo por el cual se gatille el mecanismo de defensa de la planta denominado silenciamiento génico (Chaves-Bedoya & Ortiz-Rojas, 2011; Ricaño-rodríguez *et al.*, 2014). El cual por degradación del ARN específico afectaría la expresión de un gen responsable de la sintomatología observada en planta (del Vas *et al.*, 2010).

Es importante destacar que el motivo conservado GAAAA ubicado en la región 5' NTR, se encontró en la secuencia de Argentina y Alemania, pero no en el aislamiento de Estados Unidos. Este motivo es considerado clave para la síntesis de la cadena positiva de ARN (Wong *et al.*, 1997, Verchot-Lubicz *et al.*, 2007, Miglino *et al.*, 2011). En ninguna de las secuencias de aminoácidos del gen de la replicasa viral de los tres aislamientos de SMYEV se detectó la presencia del dominio conservado Alk B, el cual sólo se encontró en 12 de 31 especies virales del género *Potexvirus* que se analizaron. Se conoce que este dominio no es extendido en todos los virus del género *Potexvirus*, pero si es conservado dentro de un subgrupo de la familia *Alphaflexiviridae*, y, posiblemente, se ha integrado recientemente en varios genomas virales en distintas regiones geográficas, por lo que su presencia podría estar implicada en la protección del virus contra el silenciamiento génico postranscripcional o, más probablemente, a una respuesta al aumento de la presión ambiental (Bratlie & Drabløs, 2005).

Los datos mostraron que la variabilidad entre los tres aislamientos de SMYEV en las diferentes regiones codificantes del genoma viral no es uniforme, el valor más alto de diversidad fue de 0,1 para el gen de la replicasa viral y el más bajo de 0,03 para el TBGp3. Los valores de diversidad de nucleótidos para los genes TBGp1, TBGp2 y CP fueron 0,08, 0,07 y 0,09 respectivamente. TBGp2 y TBGp3 contienen secuencias hidrofóbicas que se han señalado como involucradas en la interacción de la proteína viral con la membrana (Schepetilnikov *et al.*, 2005). Además, estas regiones hidrofóbicas, fueron mencionadas como las más conservadas (Morozov & Solovyev, 2003). En esta tesis se detectó al TBGp3 como la el más conservado. Estudios realizados en este gen sugieren que las funciones básicas del TBGp3 están asociadas a su región transmembrana (Schepetilnikov *et al.*, 2005). Es importante destacar que la función de la CP está asociada al movimiento del

virus de célula a célula, pero esta función requiere la presencia de las tres proteínas de movimiento que codifican el TBG (Herzog *et al.*, 1998).

La mayoría de los polimorfismos que se encontraron en los cinco genes no produjeron alteraciones de los aminoácidos, lo cual concuerda con hallazgos previos en otros virus de ARN que infectan plantas (Pagán *et al.*, 2006; Robinson & Murray, 2013). Los resultados indican que la mayoría de las mutaciones de nucleótidos en los genes de SMYEV fueron cambios sinónimos.

El árbol filogenético realizado con las tres secuencias completas que se encuentran depositadas en la base de datos, nos permiten sugerir que el aislamiento SMYEV-AR es muy semejante al obtenido en Alemania por lo que, su origen, podría ser un ancestro proveniente de Europa.

Los trabajos realizados en esta tesis permitieron obtener, por primera vez la secuencia del genoma completo de un aislamiento argentino de SMYEV. Esta constituye la tercera secuencia completa de este virus en el mundo y la primera de Latinoamérica.

Los resultados obtenidos en este capítulo nos permiten concluir:

- ✓ Se logró ajustar un sistema de diagnóstico molecular confiable para la detección de SMYEV mediante RT-PCR, IC-RT-PCR anidado y RT-PCR multiplex.
- ✓ La incorporación de PVPP a la molienda del tejido vegetal, permitió la amplificación del virus por IC-RT-PCR-anidado y se determinó que la dilución 1/50 del producto de PCR es la adecuada para agregar al PCR-anidado.
- ✓ La extracción de ácidos nucleicos en frutilla fue más eficaz y económica con el método CTAB.
- ✓ Se detectaron escasos agregados de partículas con aspecto flexuoso en el citoplasma de las células del mesófilo de plantas infectadas naturalmente con SMYEV en los cv. Camarosa y Albión.
- ✓ Se observó proliferación vesicular en el citoplasma de las células infectas con SMYEV, como así también mitocondrias con espacios vacíos en su interior.

- ✓ En infección mixta SMYEV + SLRSV se observaron cloroplastos con un sistema de membranas desordenado, un citoplasma más electrodensó que en las plantas sanas, y de aspecto granulado.
- ✓ Se determinó por primera vez la secuencia completa (5.950 nt) de un aislamiento Argentino de SMYEV de planta de frutilla cv. Camarosa.
- ✓ La comparación de las secuencias completas de aislamientos de SMYEV mostró porcentajes de identidad de 96,7 y 87% con otras de Alemania y Estados Unidos respectivamente.
- ✓ El aislamiento de Argentina reveló una cercanía filogenética con el aislamiento de Alemania.
- ✓ Para el aislamiento argentino de SMYEV, la proteína RdRp resultó ser la más variable mientras que el TBGp3 resultó ser la proteína que presentó la menor diversidad genética

## CAPÍTULO 2

### **Detección de la variabilidad intraespecífica del gen que codifica la cápside proteica para determinar la presencia de posibles variantes del virus**

#### **INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades virales constituyen una amenaza permanente para la producción de frutilla. Las diferentes especies virales, así como razas o variantes de un virus pueden tener efectos diferentes sobre el desarrollo de las plantas y su producción. Conocer la diversidad tanto específica como intraespecífica presente en las regiones productoras de frutilla constituye una etapa importante para el planteo de medidas estratégicas de manejo del cultivo.

La caracterización molecular es hoy la herramienta más usada para identificar y caracterizar especies virales. Conocer las secuencias genómicas y la comparación con secuencias conocidas permite diferenciar especies, razas o variantes de un virus. El tamaño del fragmento genómico que es necesario comparar para hacer esta clasificación es discutido. En el caso de virus, el ICTV, establece para los distintos géneros de virus cual es el fragmento del genoma viral que es necesario comparar para establecer la identidad. La comparación de las secuencias de la RdRp y la CP son usadas para identificar y diferenciar a los miembros de distintas especies y variantes del género *Potexvirus* (King *et al.*, 2012).

La CP es necesaria para la encapsidación del genoma y forma un complejo de ribonucleoproteínas junto con el TBGp1 y el ARN viral (Verchot-Lubicz, 2005; (Huisman *et al.*, 1988; Santa Cruz *et al.*, 1998). En general, para todos los miembros de virus que infectan plantas, tiene un papel asociado al movimiento (Callaway *et al.*, 2001).

La variación es una propiedad intrínseca de los sistemas con capacidad de reproducirse, esta característica determina la aparición de individuos que difieren genéticamente de sus padres (García Arenal *et al.*, 2008). La variación genética es generada por los cambios que ocurren durante la replicación de los genomas de virus y los

dos principales son la mutación y la recombinación (Hull, 2009). La primera es un cambio heredable en la secuencia de bases de los ácidos nucleicos contenidos en el genoma de un organismo. La recombinación es el proceso por el cual segmentos de información genética son cambiados entre las cadenas de nucleótidos de diferentes variantes genéticas durante el proceso de replicación. En consecuencia, la recombinación es el resultado de un intercambio genético (García Arenal *et al.*, 2001).

Hay poca información acerca de la variabilidad de SMYEV en la naturaleza. En trabajos previos cuando se realizaron análisis filogenéticos de diferentes secuencias del gen de la CP de este virus, se detectaron tres grupos diferentes (Thompson & Jelkmann, 2004).

El análisis filogenético se basa en las relaciones de proximidad evolutiva entre las distintas especies, reconstruyendo la historia de su diversificación (filogénesis), revela la situación global y no necesariamente refleja la frecuencia de recombinación del ARN en sí mismo. El intercambio de material genético se lleva a cabo con mayor frecuencia dentro de una población viral, aunque también se produce entre las diferentes cepas virales, o entre diferentes virus. Además, se ha demostrado que los ARN virales podrían recombinarse con el ARN del hospedante, así como con el ARN viral expresado por hospedantes transgénicos (García Arenal *et al.*, 2001).

En Argentina, se encuentran presentes especies nativas emparentadas con las especies de *Fragaria* (Ontivero *et al.*, 2000) y también plantas originarias de otros países que han sido introducidas, esto podría ser fuente de una abundante diversidad de variantes virales. Debido a que la frutilla es un híbrido comercial entre las especies *F. virginiana* y *F. chiloensis*, esta última originaria de Chile, se planteó la posibilidad de que el virus en estudio estuviera presente en nuestro país en plantas nativas o que hubiera sido introducido por su cercanía geográfica y encontrarse en Argentina.

El objetivo del siguiente capítulo fue detectar la variabilidad intraespecífica del gen que codifica la CP para determinar la presencia de posibles variantes del virus.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Se recolectaron plantas de frutilla con marcados síntomas de virus (deformaciones de hojas, mosaico, plantas enanas y achaparradas) provenientes de diferentes campos de producción. Paralelamente, plantas asintomáticas fueron descalzadas y acondicionadas en

macetas para ser trasladadas y mantenidas en los invernáculos del IPAVE bajo condiciones controladas.

También se tomaron muestras de plantas silvestres del género *Fragaria* y de otras especies relacionadas con el mismo, pertenecientes al Banco de Germoplasma Activo de Frutilla (BGAF) de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán (Tabla 2.1). Este es una de las pocas colecciones de especies del género *Fragaria* que existen en el mundo, las cuales provienen de Argentina y también cuenta con introducciones de diferentes lugares de Latinoamérica.

Tabla 2.1: Plantas silvestres provenientes del Banco de Germoplasma Activo de Frutilla.

Especie	Origen geográfico	año	Nº ingreso del germoplasma	síntomas	observaciones
<i>Duschnea indica</i>	Taficillo (Tucumán)	1995	5	Ampollado y moteado apenas visible	
<i>Duschnea indica</i>	Raco (Tucumán)	2001	59	4 folíolos	Fruto blanco
<i>Duschnea indica</i>	Orco Molle (Tucumán)	2001	56	Sin síntomas	Fruto rojo
<i>Duschnea indica</i>	Bosques Alisos	1995	4	Sin síntomas	
<i>Duschnea indica</i>	Del Pinar	2002	64	Sin síntomas	
<i>Duschnea indica</i>	Potrero de Tranca (Tucumán)	1995	11	Sin síntomas	
<i>Duschnea indica</i>	Taficillo (Tucumán)	-	10		
<i>Duschnea chrysantha</i>	Japón	2004	74	Sin síntomas	
<i>Fragaria vesca</i>	Villa Nougues (Tucumán)	1993	1	Sin síntomas	Fruto blanco
<i>Fragaria vesca</i>	Guasacho (Yerba Buena, Tucumán)	-	S/Nº	Sin síntomas	Fruto blanco, Planta madre 900 metros
<i>Fragaria vesca</i>	Taficillo (Tucumán)	-	S/Nº	Sin síntomas	Encontrada a 1800mts
<i>Fragaria vesca</i>	Villa Nougues (Tucumán)	-	S/Nº	Sin síntomas	Fruto blanco
<i>Potentilla tucumanensis</i>	Potrero de Trancas (Tucumán)	-	15	Sin síntomas	Planta anual por semilla
<i>Fragaria chiloensis</i>	Villa La Angostura (Neuquén)	1998	40	Sin síntomas	
<i>Fragaria virginiana</i>	Estados Unidos	2006	60	Sin síntomas	

### Detección de plantas infectadas con infecciones simples de SMYEV y mixtas

Las plantas recolectadas fueron analizadas mediante DAS-ELISA con antisuero comercial para SMYEV, TNV, TBRV, RpRSV, ArMV, SLRSV, ApMV y ToRSV

(BIOREBA SRL Latín América), conforme a la descripción del fabricante y como se detalló previamente en el capítulo 1 de esta tesis (Anexo 1). También fueron probadas mediante RT-PCR con iniciadores específicos para SCV, SMoV y SMYEV, como se describió en dicho capítulo.

Las plantas infectas con SMYEV fueron empleadas para amplificar el gen completo de la CP del virus. Se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales mediante CTAB modificado, luego la amplificación del fragmento genómico mediante RT, y posterior PCR con los iniciadores específicos (YT1/Y2) descripto en el capítulo anterior.

### **Clonado y secuenciación del gen que codifica para la cápside proteica de SMYEV**

Los fragmentos de SMYEV amplificados fueron clonados en pGEM *Easy Vector Systems* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias de *E. coli* se establecieron en medio de cultivo selectivo LB Broth (Sigma) con agar (Anexo 5) al que se le agrego ampicilina (100 mg/ml), X-Gal y el inductor IPTG para seleccionar los clones recombinantes. Las bacterias transformadas con el plásmido recombinante y que presentaron resistencia a la ampicilina fueron cultivados en medio LB Broth (Sigma) líquido. Se realizó un PCR con los iniciadores YT1/Y2 indicados en el capítulo anterior y se seleccionaron las colonias blancas para confirmar que contenían el inserto. Se sembraron 5 µl de cada producto de PCR y se visualizaron en un gel de agarosa al 2% TAE que se tiño con BrEt (0,5µg/ml). De cada colonia positiva para el virus se realizó la purificación del ADN plasmídico mediante columnas *Plasmid mini Kit (Qiagen)* (Anexo 6). Posteriormente, se cuantificaron en espectrofotómetro *NanoDrop-ND 1000 UVeVis* (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA.), para la estimación de la concentración y calidad de ácidos nucleicos extraídos. A continuación, se realizó la purificación de los plásmidos que manifestaron la presencia del inserto. Finalmente entre tres y cinco clones de cada aislamiento se enviaron a secuenciar a la unidad genómica del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar, con iniciadores específicos (YT1/Y2) e iniciadores universales M13 (-21) forward y M13/pUC reverse (-29).

### **Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidos de la CP del SMYEV**

Las secuencias de la CP de los diferentes clones de SMYEV fueron analizadas con los programas del paquete bioinformático Lasergene 8.0.2 (*DNASTAR Inc., Madison, WI USA*). De las mismas se eliminaron los extremos de baja calidad y los fragmentos

correspondientes a los plásmidos, para comparar sólo la CP. La obtención de secuencias consenso y la posterior traducción a proteína, se realizó con los programas *EditSeq* y *SeqMan* del paquete antes mencionado. Las secuencias de nucleótidos consenso obtenidas y de aminoácidos deducidos de la CP de aislamientos argentinos se compararon con 30 secuencias de SMYEV publicadas en la base de datos del *GenBank*. Se realizó un análisis de alineamiento múltiple por el método *Clustal W*, utilizando el programa *MegAlign* y se calcularon los porcentajes de identidad de nucleótidos y aminoácidos.

Fue efectuado un análisis filogenético con las secuencias de nucleótidos de la CP obtenidas en esta tesis, y con las 30 secuencias para SMYEV extraídas de la base de datos del *GenBank*. En el análisis se incluyó como grupo externo la secuencia del gen de la CP de un aislamiento de PVX (AF485891). Los alineamientos múltiples se realizaron por el método *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994). El árbol filogenético fue construido usando el método de distancia al vecino más cercano (*Neighbour Joining*) (Saitou & Nei, 1987) con el programa Lasergene 8.0.2 (DNASTAR Inc., Madison, WI USA). La significancia estadística del árbol fue estimada aplicando un *bootstrap* de 1000 réplicas.

En base al árbol filogenético obtenido se realizó un análisis de la variabilidad genética de los subgrupos de SMYEV, se obtuvieron datos de diversidad de nucleótidos dentro y entre los subgrupos (número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias), desvío estándar, como así también el número de sitios polimórficos, variantes individuales, sitios de parsimonia informativos, sitios monomórficos, número de haplotipos y diversidad de haplotipos. Estos análisis fueron realizados con el programa *DnaSP v5* (Librado & Rozas, 2009).

### **Análisis de recombinación**

En base al alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos de la CP de los aislamientos argentinos y los depositados en la base de datos del *GenBank* se realizó un análisis para la detección de probables secuencias recombinantes, identificación de posibles secuencias parentales y localización de posibles puntos de recombinación utilizando el programa *RDP3 Alpha RDP* (Martin *et al.*, 2010). El programa posee nueve algoritmos para detección de recombinantes: RDP, GENECONV, MAX CHI, CHIMAERA, BOOT SCAN, 3SEQ, SISCAM, PhylPro y LARD. La probabilidad utilizada en el análisis fue de  $P=0,001$  y el resto de los parámetros del programa fueron usados por defecto seleccionando la opción para trabajar con secuencias lineales.

## RESULTADOS

### Detección de plantas infectadas y extracción de ARN

Se seleccionaron plantas del cv. Camarosa y Albión asintomáticas que mostraron estar naturalmente infectadas con SMYEV. En las mismas sólo se detectó el SMYEV. En las plantas con síntomas se detectó la presencia de SMYEV acompañado de SMOV y/o SCV, confirmando infecciones mixtas (Tabla 2.2). El resto de los virus no fueron encontrados en las muestras analizadas.

Las plantas silvestres pertenecientes al BGAF no revelaron la presencia de ninguno de los virus analizados. Por este motivo, sólo se trabajó con las plantas de frutilla, con y sin síntomas, provenientes de cultivares comerciales.

La extracción de ARN a partir de tejido fresco de las diferentes plantas de frutilla fue eficiente y la RT-PCR permitió la amplificación de un fragmento de 861 pb de cada una de ellas (Figura 2.1).

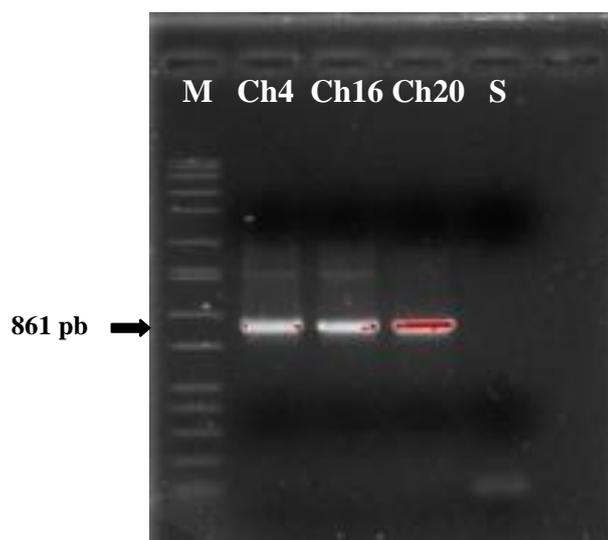


Figura 2.1: Producto de PCR empleando iniciadores específicos para la detección de SMYEV. Ch4, Ch16 y Ch20: plantas de frutilla positivas a SMYEV; S: planta sana; M: marcador de peso molecular 50-10.000 pb. Gel de agarosa 2%.

### Clonado y secuenciación del gen que codifica para la cápside proteica de SMYEV

Se probaron 12 colonias blancas por PCR directo con el juego de iniciadores YT1 e Y2 y fue observada amplificación de fragmentos de 861 pb para cada una de ellas (Figura 2.2). Los ADN plasmídicos, purificados a partir de cada uno de los clones recombinantes, se analizaron en gel de agarosa 2% TAE. Las cuantificaciones en espectrofotómetro

determinaron una pureza de ADN ( $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$ ) entre 1,8-2,08 y una concentración promedio de 408 ng/ $\mu\text{l}$  de los clones.

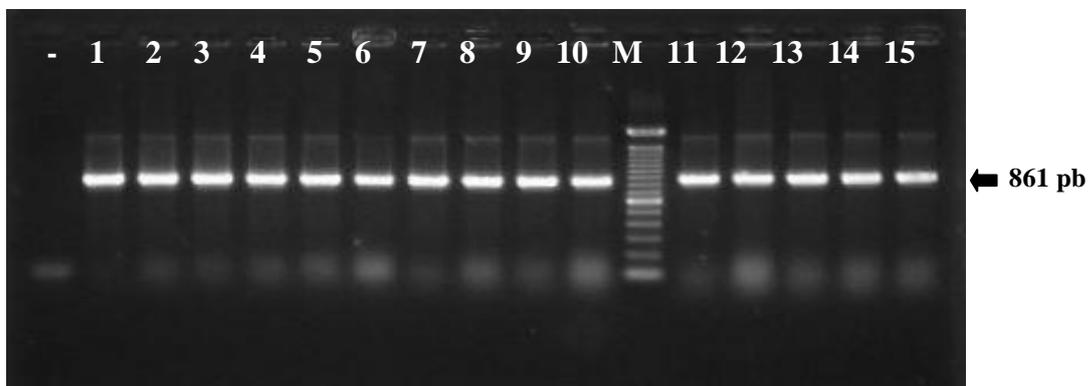


Figura 2.2. Análisis mediante PCR de colonia con iniciadores específicos para SMYEV. 1-15: colonias blancas positivas a SMYEV; (-): control negativo; M: marcador de peso molecular 100-1000 pb.

### **Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidos**

A partir de las secuencias obtenidas se identificaron 12 aislamientos (Tabla 2.2). La CP de todos los aislamientos argentinos reveló una longitud de 729 nt que codifica una proteína de 242 aa, excluyendo el codón de finalización.

Tabla 2.2. Aislamientos de SMYEV obtenidos de plantas de frutilla de Argentina.

<b>Nombre de aislamiento</b>	<b>Nº de acceso</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Infección/presencia de síntoma</b>	<b>Virus detectados</b>
Berra 2		Camarosa	mixta/síntomas	SMYEV, SMoV, SCV
13-2-5		Camarosa	mixta/síntomas	SMYEV, SCV
13-3-4		Camarosa	mixta/síntomas	SMYEV, SCV
15		Camarosa	mixta/síntomas	SMYEV, SMoV
16-1		Camarosa	mixta/síntomas	SMYEV, SMoV, SCV
16-2		Camarosa	mixta/síntomas	SMYEV, SMoV, SCV
16-4-5		Camarosa	mixta/síntomas	SMYEV, SMoV, SCV
20		Camarosa	simple/sin síntoma	SMYEV
53		Camarosa	simple/sin síntoma	SMYEV
36-1-3		Albión	simple/sin síntoma	SMYEV
36-2-4-6		Albión	simple/sin síntoma	SMYEV
264		Albión	simple/sin síntoma	SMYEV

\*Se obtuvieron más de un aislamiento de las plantas 13, 16 y 36.

La comparación del gen que codifica la CP entre los aislamientos de Argentina dio entre 81,5 y 99,6% porcentajes de identidad de nucleótidos y entre 91,4 y 100% de identidad de aminoácidos. Cuando los aislamientos argentinos se compararon con las 30 secuencias de SMYEV citadas en el *GenBank*, se obtuvieron porcentajes de identidad que variaron entre 81,6 y 99 de nucleótidos y entre 86 y 100% de aminoácidos (Tabla 2.3) (Anexo 7 y 8). Las comparaciones de los aislamientos de distintas partes del mundo, sin considerar los de Argentina, mostraron una identidad que varía entre 81 y 100% de nucleótidos y entre 86 y 100% de aminoácidos.

Tabla 2.3 Porcentajes de identidad nucleótidos y aminoácidos entre los aislamientos de SMYEV de Argentina y el resto del mundo, que están depositados en la base de datos del *GenBank*.

Nombre del aislamiento	País	Hospedante	Identidad nucleótidos (%)	Identidad aminoácidos (%)	Referencia
CP-13-2-5	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Camarosa	81,5-97,4	90,5-99,2	Esta tesis
CP-13-3-4	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Camarosa	81,7-98,1	86,4-98,8	Esta tesis
CP-15	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Camarosa	82,1-99,6	87,7-100	Esta tesis
CP-16-1	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Camarosa	81,3-97,4	89,7-98,4	Esta tesis
CP-16-2	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Camarosa	82,8-98,2	86,8-99,2	Esta tesis
CP-16-4-5	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Camarosa	81,3-98,2	86,8-99,2	Esta tesis
CP-36-1-3	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Albión	82,3-97	91,4-99,2	Esta tesis
CP-36-2-4-6	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Albión	81,7-98,9	86,4-99,6	Esta tesis
CP-53	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Camarosa	81,3-99	88,5-99,6	Esta tesis
CP-264	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Albión	82-99,6	87,7-100	Esta tesis
CP-20	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Camarosa	82,1-98,5	87,2-98,8	Esta tesis
CP-Berra2	Argentina	<i>F. x ananassa</i> cv. Camarosa	82,1-99	87,2-100	Esta tesis
CP-AJ577337	Chile	<i>F. chiloensis</i>	82,1-99	86,8-99,6	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577338	Chile	<i>F. chiloensis</i>	84-98,2	88,1-99,6	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577339	Chile	<i>F. chiloensis</i>	83,8-98,2	88,5-99,6	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577340	Chile	<i>F. chiloensis</i>	81,3-98,9	86,4-98,8	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577341	Chile	<i>F. chiloensis</i>	83,4-98,1	86,8-97,9	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577342	Chile	<i>F. chiloensis</i>	82,3-98,1	87,7-98,8	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577343	Chile	<i>F. chiloensis</i>	81,6-98,9	87,7-99,2	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577344	Alemania	<i>F. x ananassa</i> cv. Elsanta	81,7-98,8	86,8-100	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577345	Australia	<i>F. x ananassa</i> cv. Redlands crimson	81,6-97,4	87,7-98,8	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577346	Chile	<i>F. chiloensis</i>	81,6-98,9	86,8-99,2	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577347	Alemania	<i>F. x ananassa</i> cv. Elsanta	82-98,9	87,2-100	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577348	Alemania	<i>F. x ananassa</i> cv. Elsanta	82-100	86,4-100	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577349	Alemania	<i>F. x ananassa</i> cv. Elsanta	81,9-99,2	86,4-99,6	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577350	Bélgica	<i>F. x ananassa</i> cv. desconocido	82-98,9	86,8-98,8	(Thompson & Jelkmann, 2004)

Nombre del aislamiento	País	Hospedante	Identidad nucleótidos (%)	Identidad aminoácidos (%)	Referencia
CP-AJ577351	Italia	<i>F. x ananassa</i> cv. Elsanta	82,1-98,9	86,8-100	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577352	Alemania	<i>F. x ananassa</i> cv. Elsanta	82,1-99,6	86,8-100	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577353	Alemania	<i>F. x ananassa</i> cv. EM834	82,1-99,6	86,8-99,6	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577354	Alemania	<i>F. x ananassa</i> cv. Elsanta	82-100	86,4-100	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577355	Estados Unidos	<i>F. x ananassa</i> selection 1187	81,3-97,1	86-97,5	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577356	Republica Checa	<i>F. vesca</i> clon UC5	81,5-99,2	86-99,2	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577357	Republica Checa	<i>F. vesca</i> clon UC5	81,9-99,2	86,4-99,6	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577358	Estados Unidos	<i>F. x ananassa</i> selection WSU1988	81,9-99,2	86,8-100	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AJ577359	Alemania	<i>F. vesca</i> clon UC5	82,1-99	87,2-100	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-AY955375	China	<i>F. x ananassa</i> cv. Totem	81,6-98,5	86,4-99,6	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-D12515	Estados Unidos	<i>F. x ananassa</i> cv. Totem	83,8-100	88,9-100	(Thompson & Jelkmann, 2004)
CP-EU107084	China	<i>F. x ananassa</i> cv. Seolhyang	81,2-99,3	90,9-96,7	(Cho <i>et al.</i> , 2011)
CP-EU107085	China	No disponible	81-99,3	86,4-93	Yang & Zhang). No publicado
CP-EU107086	China	No disponible	81,3-98,5	91,4-99,2	(Yang & Zhang) No publicado
CP-EU284709	Corea	No disponible	81,7-98,9	87,2-100	Yang & Zhang) No publicado
CP-NC003794	Estados Unidos	No disponible	83,8-100	88,9-100	Yang H. & Zhang Z. No publicado

Posteriormente se realizó un análisis filogenético con las 42 secuencias mencionadas. Fue posible evidenciar la presencia de dos agrupamientos (denominados A y B) con valor de *bootstrap* del 94%, que luego se dividieron y formaron cuatro subgrupos (denominados I, II, III IV); estos fueron separados con valores de *bootstrap* superiores al 56% (Figura 2.3). Los aislamientos argentinos estuvieron incluidos en todos los subgrupos.

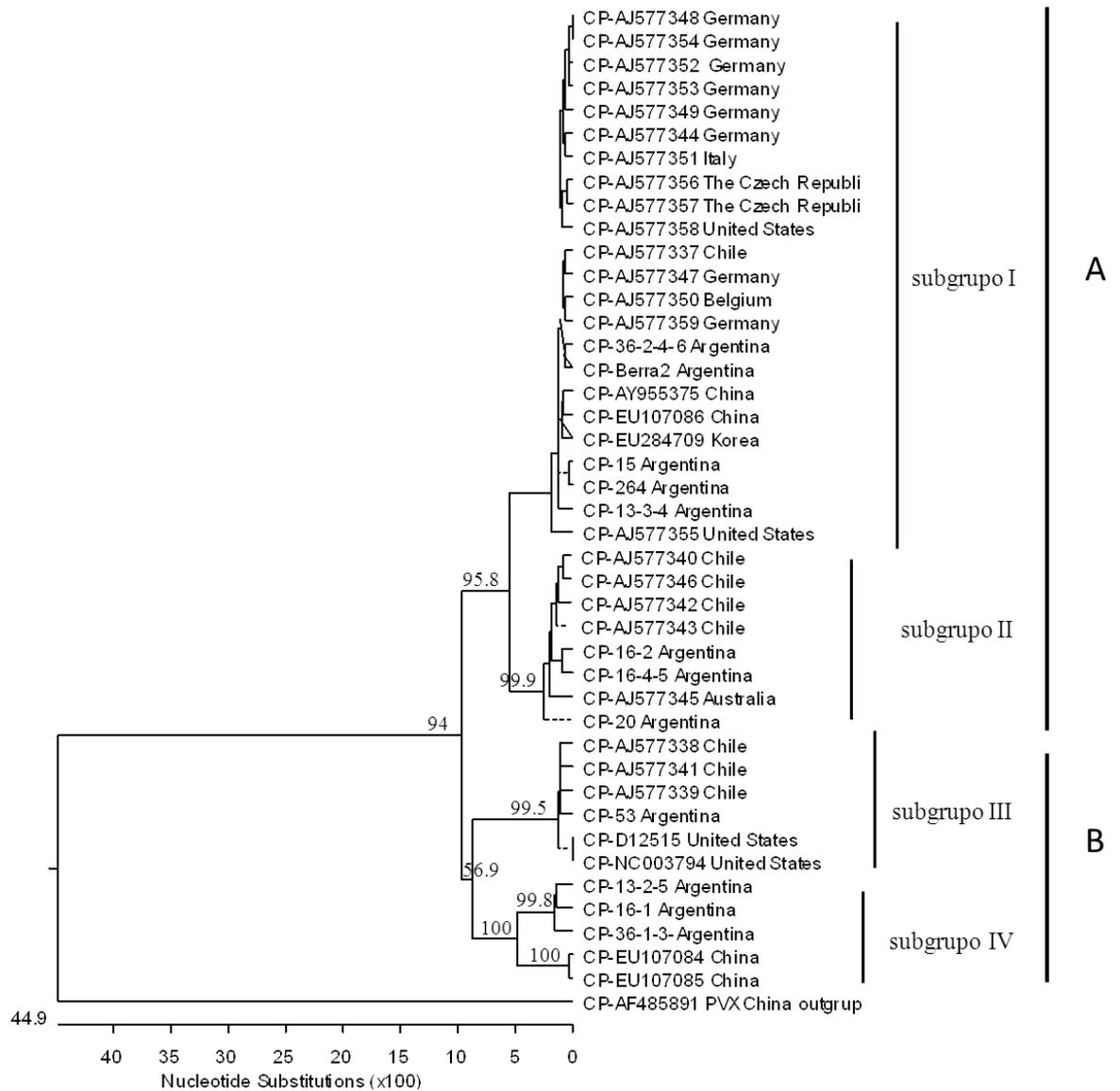


Figura 2.3. Árbol filogenético construido con la secuencia de nucleótidos correspondientes al gen de la CP de aislamientos de SMYEV, por el método *Neighbor-joining*. En los nudos se observan los porcentajes de *bootstraps* correspondientes a 1.000 réplicas, se muestran los valores >50%. Como extra grupo se utilizó la secuencia del gen que codifica la CP de PVX. A y B, identifican la división en grupos; I, II, III y IV, señalan los diferentes subgrupos. La escala bar representa la distancia genética (sustituciones por nucleótido).

El subgrupo I concentró el mayor número de secuencias publicadas, con 23 aislamientos, incluyendo a 12 secuencias de origen Europeo, cinco secuencias de Argentina, tres de Asia, dos de Estados Unidos y una de Chile. Los porcentajes de identidad dentro del subgrupo I fueron desde 95,9 a 100% de nucleótidos y desde 96,3 a 100% de aminoácidos. El subgrupo II estuvo formado por ocho aislamientos, cuatro de Chile, tres de Argentina y uno de Australia con 94,9 a 98,9% de identidad de nucleótidos y 96,7 a 99,2% de identidad de aminoácidos. El subgrupo III constó de seis aislamientos, tres

de Chile, dos de Estados Unidos y un aislamiento de Argentina con 97,9 a 100% de identidad de nucleótidos y 97,5 a 100% de identidad de aminoácidos. El subgrupo IV, a su vez, se conformó de cinco aislamientos: tres aislamientos de Argentina y dos de China con 91,1 a 99,3 % de identidad de nucleótidos y 89,7 a 99,2 % de identidad de aminoácidos.

Las plantas 13, 16 y 36 se hallaban infectadas por más de un aislamiento viral ubicados en distintos subgrupos del árbol filogenético. Los aislamientos 13-2, 16-1 y 36-1-3 integraron el subgrupo IV junto con dos aislamientos de China; 13-3-4 y 36-2-4-6 formaron parte del subgrupo I mientras que 16-2 y 16-4-5 obtenidos de la misma muestra se ubicaron en el subgrupo II.

No hubo inserciones ni deleciones en el gen de la CP de los aislamientos de Argentina pero sí se observaron sustituciones de nucleótidos en todo su largo. De 242 aa, 212 fueron idénticos y 30 variables, y de estos, 11 aa fueron sustituciones conservadas, cuatro aa sustituciones semiconservadas y 15 diferentes. El codón de inicio ATG que codifica el gen de la CP fue conservado en todos los aislamientos de Argentina y en los depositados en la base de datos del *GenBank*, al igual que el codón de finalización TAA, a excepción del aislamiento de Australia (CP-AJ577345) cuyo codón de parada fue TAG. Otra diferencia se observó respecto al aislamiento de China (CP-EU107085), el cual posee una mutación que provoca que la CP no sea funcional. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos del gen de la CP, de todos los aislamientos de Argentina como del resto del mundo, reveló la presencia de una secuencia conservada FAAFDFFDGV, ubicada en la región C-terminal de la CP de SMYEV.

Del alineamiento múltiple de aminoácidos de todas las secuencias (12 de este estudio + 30 de base de datos *GenBank*) se encontraron 61 aa variables de los cuales 16 fueron sustituciones conservadas, 10 tuvieron sustituciones semiconservadas y 35 resultaron diferentes; en este caso las sustituciones se distribuyeron a lo largo de la CP del virus, pero la mayoría se localizó sobre la región N-terminal.

Se calculó la diversidad de nucleótidos dentro de cada uno de los cuatro subgrupos y para todas las secuencias estudiadas.

Dentro de cada subgrupo (I, II, III y IV), la diversidad fluctuó de 0,0185 a 0,0609 con un desvío estándar máximo de 0,01; la diversidad registró un valor alto (0,0609) solo en el grupo IV. Cuando se analizaron todas las secuencias juntas, la diversidad de nucleótidos obtenida fue de 0,0923. La diversidad de las secuencias entre los subgrupos, fue estimada como número promedio de sustituciones de nucleótidos entre pares de

secuencias teniendo en cuenta el efecto del polimorfismo y registró valores entre 0,0896 a 0,1781 (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Diversidad de nucleótidos dentro y entre los subgrupos de secuencias del gen que codifica la CP, de aislamientos de SMYEV de diferentes partes del mundo.

<b>Subgrupo</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>Todos</b>
<b>I</b>	<b>0,0185</b>	0,0896	0,1372	0,1705	-
<b>II</b>	-	<b>0,0266</b>	0,1365	0,1781	-
<b>III</b>	-	-	<b>0,0167</b>	0,1529	-
<b>IV</b>	-	-	-	<b>0,0609</b>	-
<b>Todos</b>	-	-	-	-	<b>0,0923</b>

Valores en negrita corresponden a la diversidad dentro de cada subgrupo

Se encontraron diferencias en los descriptores la variabilidad genética en función de los datos incluidos en el análisis (Tabla 2.5). Cuando fue considerada la totalidad de los mismos, se encontró 32,5% de sitios polimórficos y 27% de parsimonia informativa. Mientras que para cada subgrupo, los sitios polimórficos y de parsimonia informativa fueron I: 12,2% y 4,8%, II: 8,9 y 2,05%, III: 4,2% y 1,1% y para el IV: 11,1% y 7,7%, respectivamente. Cada aislamiento viral se consideró un haplotipo, por lo que, los resultados revelaron alta diversidad de haplotipos dentro del subgrupo II y IV. Los cambios sinónimos en las secuencias fueron mayores que los no sinónimos en todos los casos analizados (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Descriptores estadísticos de la variabilidad genética de los subgrupos de SMYEV.

<b>Estadístico</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>Todos</b>
Nº de secuencias	23	8	6	5	42
Nº de sitios polimórficos	89	65	31	81	237
Nº de mutaciones	89	65	31	83	307
Variantes simples	53	50	23	23	42
Parsimonia informativa*	35	15	8	56	195
Nº Sitios monomórficos	639	664	698	646	488
Nº de haplotipos	22	8	5	5	40
Diversidad de haplotipos (Dh)	0,9960	1	0,9333	1	0,9977
Nº cambios sinónimos	65	43	24	66	178
Nº cambios no sinónimos	21	21	7	16	32

\*Sitios que segregan para sólo dos nucleótidos y que están presentes al menos dos veces.

## Análisis de recombinación

Los resultados del análisis de recombinación en base al alineamiento de las 42 secuencias de la CP: 30 secuencias del gen de la CP de SMYEV de distintas partes del mundo y de 12 secuencias de Argentina, por el programa RDP3, se muestran en la tabla 2.6. Se encontró evidencia de sitios de recombinación significativa con el soporte del valor P, basados en los algoritmos del programa. Se detectaron dos recombinantes, el primero CP-16-2 Argentina formado por la secuencia parental mayor CP-20-1-2-3-4-5 Argentina y la secuencia parental menor CP-16-1 Argentina. El segundo recombinante fue CP-AJ577342 Chile y estuvo formado por la secuencia parental mayor CP-AJ577346 Chile y la secuencia parental menor desconocida, pero, semejante a CP-NC003794 (el parental menor identificado por RDP no es el parental real del recombinante, sino la secuencia en el conjunto de datos analizados que más se parece).

Tabla 2.6. Eventos de recombinación detectados con el programa RDP3 en el gen de la CP de 42 aislamientos de SMYEV.

Recombinante	Parental		Punto de entrecruzamiento		Métodos de detección	Valor P
	Mayor	Menor	Inicial	Final		
CP-16-2 Argentina	CP-20-1-2-3-4-5 Argentina	CP-16-1 Argentina	692	729	RDP	$3,85 \times 10^{-06}$
					GENECONV	$3,60 \times 10^{-06}$
					BOOTSCAM	$3,06 \times 10^{-07}$
					MAX CHI	$1,26 \times 10^{-01}$ <sup>(2)</sup>
CP-AJ577342 Chile	CP-AJ577346 Chile	(NC003794) desconocido <sup>(1)</sup>	16	82	RDP	$2,63 \times 10^{-05}$
					GENECONV	$2,29 \times 10^{-04}$
					BOOTSCAM	$1,028 \times 10^{-03}$
					3Seq	$7,71 \times 10^{-04}$
					MAX CHI	$2,98 \times 10^{-01}$ <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> El programa RDP detecta la secuencia más parecida al parental desconocido.

<sup>(2)</sup> El valor P del algoritmo MAXCHI no fue significativo.

El recombinante CP-16-2 Argentina reveló la presencia de dos puntos potenciales de entrecruzamiento 692 y 729 en la región 3' terminal de la CP (Figura 2.4).

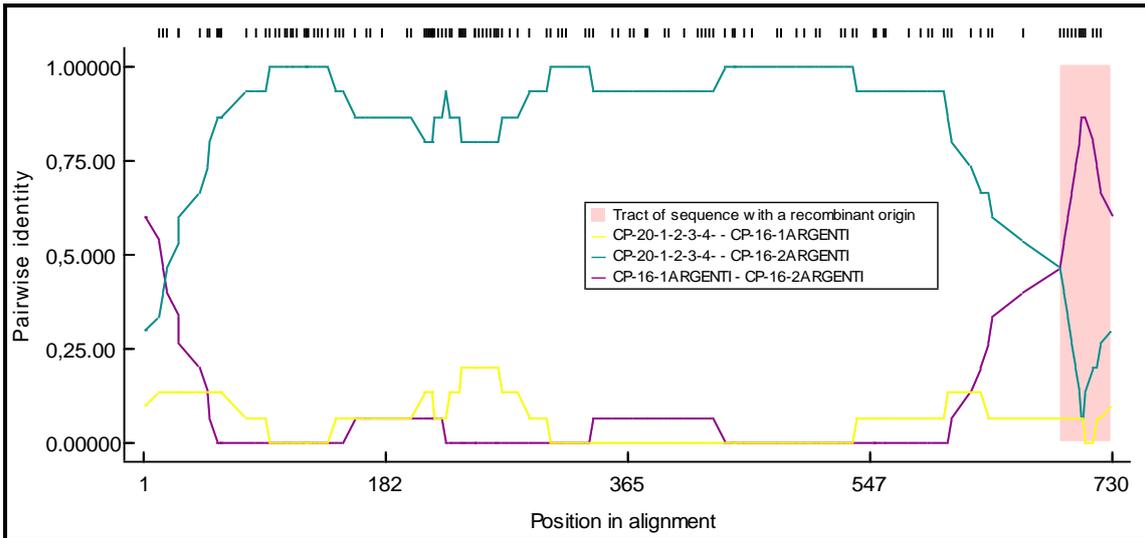


Figura 2.4. Representación gráfica de la zona de recombinación, estimada por los algoritmos RDP, GENECONV, BOOTSCAM y MAX CHI, en la secuencia del gen de la CP de SMYEV de Argentina. Los puntos de entrecruzamiento para los eventos de recombinación son el límite izquierdo y derecho de la zona color rosa.

El recombinante CP-AJ577342 Chile reveló la presencia de dos potenciales puntos de entrecruzamiento en los nucleótidos 16 y 82 (Figura 2.5).

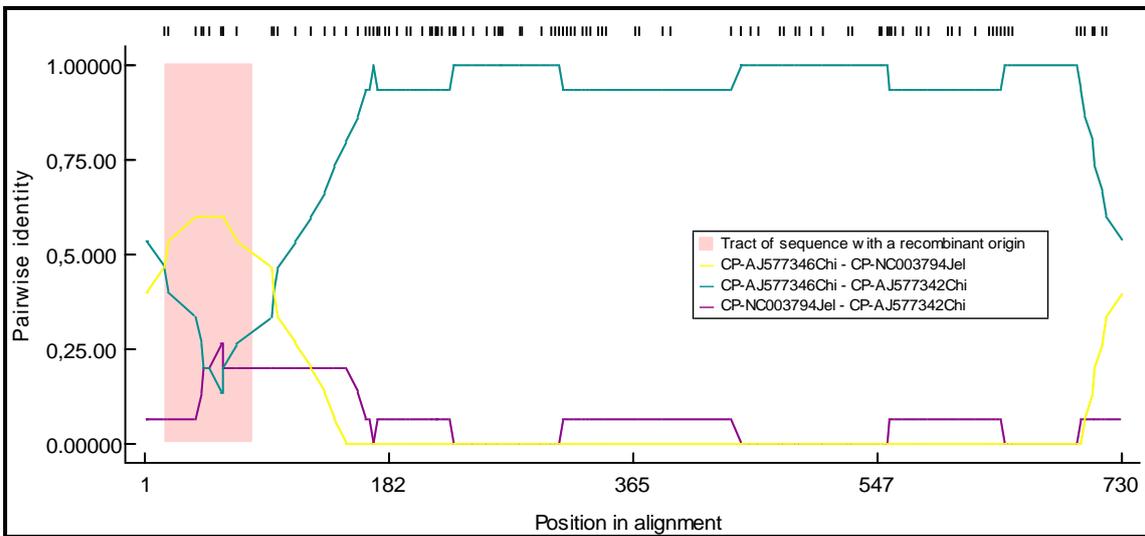


Figura 2.5. Representación gráfica de zonas de recombinación, estimada por los algoritmos RDP, GENECONV, BOOTSCAM y 3Seq, en la secuencia del gen de la CP de SMYEV de Chile. Los puntos de entrecruzamiento para los eventos de recombinación son el límite izquierdo y derecho de la zona color rosa.

## DISCUSIÓN

Las muestras de frutilla provenientes de campos de producción revelaron la presencia del SMYEV en los cv. Camarosa y Albión, tanto en plantas con síntomas como en algunas de las asintomáticas. El SMYEV no fue detectado en las plantas nativas muestreadas en el Banco de Germoplasma Activo de Frutilla de plantas nativas de Argentina. Trabajos de otras partes del mundo han citado el virus en plantas de frutilla nativa, tal es el caso de *F. chiloensis* (Thompson & Jelkmann, 2004; Rojas *et al.*, 2012) en Chile, *F. pentaphylla* (Li & Yang, 2011) en China y *Potentilla reptans*, una especie perteneciente a la familia rosáceas, en Reino Unido (Yohalem *et al.*, 2009).

La búsqueda del virus en plantas nativas de frutilla encontradas en Argentina, o en especies asociadas, podría ser motivo de futuros estudios. Esto permitiría hacer comparaciones genómicas para inferir el origen de este virus en el país, considerando que la frutilla que se usa en forma comercial es un híbrido de dos especies provenientes de Chile y Norteamérica. La presencia del virus en especies silvestres permitiría suponer que las infecciones detectadas en los campos de producción podría iniciarse en plantas que están actuando como reservorio del mismo desde donde es transmitido por el vector *Chaetosiphon fragaefolii* a las especies comerciales.

Además, este dato resultaría interesante para completar la información respecto al origen geográfico de este, o de otros, virus de frutilla.

Con el propósito de detectar las posibles variantes intraespecíficas del SMYEV, se clonaron y secuenciaron el gen de la CP de diferentes aislamientos. Paralelamente, con el mismo fin, se analizaron plantas con síntomas y otras asintomáticas, en las cuales el virus no produce alteraciones visibles.

Se supuso que podrían detectarse variantes genéticas del virus que explicaran las diferencias de respuesta a la infección, como la expresión de síntomas, entre otros. Sin embargo, no se vieron diferencias, en relación a la sintomatología, asociadas con los subgrupos observados en el análisis filogenético, pero si se observó que la CP es una región adecuada para estudiar la variabilidad genética y su comportamiento biológico en el hospedante. En el género *Potexvirus* la CP es necesaria para la encapsidación del genoma y forma un complejo de ribonucleoproteínas junto con el TBGp1 y el ARN viral (Huisman *et al.*, 1988; Santa Cruz *et al.*, 1998; Verchot-Lubicz, 2005).. En tres aislamientos argentinos (**13**, **16**, y **36**) se obtuvieron dos y/o tres virus (secuencias) en la misma muestra vegetal, tanto en infecciones mixtas como simples. Además las secuencias logradas a partir de una

misma planta se ubicaron en distintos subgrupos del árbol filogenético, sugiriendo la presencia de infecciones mixta de variantes del virus. Un resultado similar ocurrió con *Papaya ringspot virus (Potyvirus)* para el que hubo infecciones de hasta tres aislamientos en una misma muestra vegetal (Abdalla & Ali, 2012) .

Thompson y Jelkman, en 2004 (Thompson & Jelkmann, 2004) reportaron sólo tres subgrupos de SMYEV, cuando analizaron filogenéticamente las secuencias del gen de la CP de distintos aislamientos, sin embargo, el análisis filogenético de todas las secuencias del gen de la CP, incluyendo las de Argentina, permitió clasificar las secuencias en cuatro subgrupos (I, II, III y IV). La división en subgrupos parece estar asociada, hasta cierto punto, con una distribución por áreas geográficas, ya que el subgrupo I, contiene aislamientos provenientes de Europa casi en su totalidad y a este grupo pertenecen la mayoría de las secuencias obtenidas. En el subgrupo II, proceden sobre todo de Chile, en el subgrupo III, de Chile y Estados Unidos, y el subgrupo IV está formado por aislamientos de China y Argentina.

El análisis de diversidad dentro de cada subgrupo reveló una alta conservación entre las secuencias en los subgrupos I, II y III con valores de diversidad similares) de 0,0118, 0,026 y 0,016 respectivamente, sugiriendo una estrecha relación entre sus secuencias. El único subgrupo que tuvo un valor más alto de diversidad, fue el IV (0,06), lo que indica la presencia de gran variabilidad entre las secuencias que lo conforman. Esto se evidencia con la separación de los aislamientos argentinos de los chinos con un 100% de significancia y con menores valores de identidad de nucleótidos dentro del subgrupo. Al presente son cinco las secuencias que lo constituyen.

Los subgrupos I y IV tuvieron mayor porcentaje de polimorfismo que los otros subgrupos. En todos los casos la diversidad de haplotipos fue alta, pero los valores más altos fueron en los subgrupos II y IV (Dh: 1,00). En el caso de la diversidad de nucleótidos dentro de cada subgrupo fue baja, a excepción del grupo IV donde se obtuvo el valor más alto de diversidad de nucleótidos y de número de cambios sinónimos. Entre los subgrupos la diversidad de nucleótidos fue similar para todos, a excepción de la diversidad entre los subgrupos I y II que fue la más baja. En todos los casos sustituciones de nucleótidos sinónimos que no dan lugar a alteraciones de aminoácidos fueron las que predominaron.

Una alta diversidad de haplotipos y la falta de diversidad de nucleótidos dentro de los subgrupos son consistentes con un modelo de eventos de expansión de poblaciones recientes. Se conoce que los virus de ARN tienen un alto potencial de variación genética debido a las altas tasas de mutación y recombinación, lo cual incrementa la habilidad para

adaptarse a nuevos entornos. Sin embargo, la alta conservación genética es regla general para la mayoría de las poblaciones de virus de ARN que infectan plantas (García Arenal *et al.*, 2001).

Es importante destacar que los aislamientos argentinos estuvieron presentes en todos los subgrupos, confirmando la presencia de las cuatro variantes que se conocen del virus, en el país. Esto coincide con el hecho de que todo el germoplasma de frutilla que se cultiva en Argentina se importa de viveros del exterior, principalmente de California (Estados Unidos) y/o Europa. Luego es multiplicado agámicamente en viveros ubicados en la Patagonia y posteriormente distribuido entre los productores en las distintas provincias, como Tucumán, Santa Fe, Buenos Aires y Corrientes. También, seguramente, juega un papel importante en esta distribución la presencia de los vectores *Chaetosiphon fragaefolii*, *C. thomasi* y *C. minor* que fueron detectado en nuestro país en las diferentes regiones (Ortego, 1997; Delfino *et al.*, 2007; Cédola & Greco, 2010) los cuales podrían ser responsables de la dispersión de las variantes del virus.

El análisis de recombinación *in silico* de aislamientos de SMYEV en frutilla, reveló que el recombinante 16-2 estaba formado por parentales de dos secuencias argentinas, el parental mayor (16) y el menor (20 infección simple), lo que sugiere, por un lado, la existencia diversidad intraespecífica en los aislamientos argentinos de SMYEV y, además, confirma un intercambio de material genético, entre plantas infectadas, probablemente debido a la actividad de los vectores.

El recombinante encontrado en un aislamiento de Chile, (AJ577342) estuvo formado por un parental de origen chileno (AJ577346) y otro de origen desconocido (NC003794), reconfirmando la presencia de las distintas variantes del virus en las regiones productoras. El análisis de recombinación reveló dos eventos recombinantes los cuales se ubicaron juntos en el subgrupo II del árbol filogenético.

La zona de recombinación con sus secuencias parentales abarca segmentos cortos de 37 y 66 nt para los recombinantes de Argentina y Chile, respectivamente. Al respecto, investigadores informaron datos de recombinación del genoma de otros géneros virales que infectan plantas, implicaron regiones de recombinación de tamaño mayor a 100 pares de bases (Ramírez Rodríguez *et al.*, 2006; Inoue-Nagata *et al.*, 2007; Noa-Carranza *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Pramesh & Baranwal, 2013).

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos del recombinante 16-2 varió en dos aa con las secuencias parentales en la zona donde se entrecruzan. En el caso del recombinante de Chile (AJ577342), el alineamiento de las secuencias parentales en la

región recombinante fue tres aa diferentes. En algunos casos estos eventos podrían afectar la estructura y funcionalidad de la CP de los virus recombinantes. Como en el caso de *Cucumber mosaic virus*, donde la sustitución de un aminoácido en la CP provoca restricción en el movimiento sistémico viral (Takahashi, 2008). Es muy importante destacar que la zona de recombinación en ambas secuencias ocurrió en los extremos 3' y 5' terminal, lo cual constituye una región variable en la CP de los virus, mientras que la región central del genoma, correspondiente a la CP, se encuentra más conservada ya que involucra a residuos funcionalmente importantes (Rogers *et al.*, 2012). La evidencia de recombinación que se produjo en SMYEV implica que este patógeno tiene acceso a este mecanismo evolutivo. La recombinación proporciona un medio adicional para aumentar la variabilidad genética en los virus, pero también es un método por el cual aquellos con altos índices de mutación pueden "reparar" mutaciones deletéreas (García Arenal *et al.*, 2001; Jaag & Nagy, 2010). La recombinación intraespecífica detectó dos recombinantes cuando se analizaron 42 aislamientos de las secuencias de SMYEV. Hay datos sobre recombinación natural en un gran número de virus de ARN cadena simple positiva que infectan plantas entre los que se incluye a *Potyvirus* (Ramírez Rodríguez *et al.*, 2006; Inoue Nagata *et al.*, 2007; Noa Carrazana *et al.*, 2007), *Luteovirus* (Chinnaraja *et al.*, 2013), *Nepovirus* (Vigne *et al.*, 2004), *Closterovirus* (Chare & Holmes, 2006; Biswas *et al.*, 2012), *Cucumovirus* (Bonnet *et al.*, 2005); *Bromovirus* (Sztuba-Solińska *et al.*, 2011) y *Carlavirus* (Singh *et al.*, 2007; Pramesh & Baranwal, 2013). En el género *Potexvirus* se ha citado la presencia de eventos recombinación intraespecíficos en dos especies, *Pepino mosaic virus* en la región correspondiente al gen de la polimerasa y otro al TBGp1 G (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2010) y *Cymbidium mosaic virus* en la región N-terminal del TBGp3, C-terminal del gen de la CP y en el gen de la polimerasa (Sherpa *et al.*, 2007). Aunque el número de recombinantes de SMYEV predicho por el programa RDP3 es muy pequeño, podemos especular que no todas las especies de virus se comportan de igual manera y que algunas regiones genómicas son más propensas a la recombinación que otras. A pesar de la recombinación del ARN tiene una frecuencia alta en algunos virus, la detección de recombinantes virales podría ser difícil ya que la mayoría están, probablemente, mal adaptado a su entorno y, por tanto son eliminados rápidamente de las poblaciones virales (Jaag & Nagy, 2010).

En base a los análisis realizados en el gen de la CP de 42 especies de SMYEV se observa el surgimiento de nuevas variantes del virus que ocurren por recombinación intraespecífica. Este proceso evolutivo es común en virus de ARN de cadena simple y de

sentido positivo, que infectan plantas (Chare & Holmes, 2006). La recombinación ha sido asociada con el aumento en la patogenicidad viral, rango de hospedantes y la capacidad de superar la resistencia en variedades de cultivos (García Arenal & McDonald, 2003). Son necesarios más estudios para evaluar la influencia de la recombinación y proporciona un contexto importante para futuras investigaciones para comprender la evolución de este virus

Los resultados de este capítulo nos permiten concluir:

- ✓ Se obtuvieron 12 secuencias del gen de la CP provenientes de aislamientos argentinos de SMYEV que están en trámite de inscripción en la base de datos del *GenBank*.
- ✓ Las plantas nativas muestreadas del Banco de germoplasma activo de frutilla de Tucumán no fueron infectadas con SMYEV.
- ✓ Las secuencias completas del gen que codifica la CP de 12 aislamientos argentinos de SMYEV mostraron valores de identidad de nucleótidos de 81,3 a 99% y de 86,4 a 100% de aminoácidos.
- ✓ Los valores de identidad de la comparación de 42 secuencias completas provenientes de distintas partes del mundo, para el gen que codifica la CP fueron de 81,2 a 100% de nucleótidos y de 86 a 100% de identidad de aminoácidos.
- ✓ El análisis filogenético del genoma de la CP del virus permitió detectar la existencia de 4 subgrupos.
- ✓ Los subgrupos detectados parecieron mostrar una distribución por origen geográfico. Subgrupo I, es el más abundante y en la mayoría de los casos provenientes de Europa, Subgrupo II proveniente de Chile, subgrupo III provenientes de Chile y Estados Unidos y subgrupo IV provenientes de China y Argentina.
- ✓ Se describió la variabilidad genética del gen de la CP dentro y entre subgrupos. Se ha observado similar diversidad entre subgrupos con excepción entre los subgrupos I y II y dentro de cada uno de ellos a excepción del grupo IV.

- ✓ Se detectaron dos recombinantes del virus, el primero entre dos aislamientos de Argentina, el segundo recombinante formado por la secuencia parental mayor de Chile y una secuencia parental menor desconocida.

# CAPÍTULO 3

## **Determinación de la incidencia y prevalencia del SMYEV en diferentes regiones de Argentina**

### **INTRODUCCIÓN**

De todos los virus que afectan a la frutilla, SMYEV es uno de los patógenos de mayor impacto económico, ampliamente distribuido en el mundo y está entre las 50 enfermedades de plantas más frecuentemente citadas en los reglamentos de cuarentena de 124 países (Lavandero *et al.*, 2012). Fue identificado por primera vez en California en 1922 y luego en Europa, en 1933 (Martin & Tzanetakis, 2006). En Argentina, SMYEV fue citado por primera vez en 2009, en plantas de frutilla provenientes de lotes de la provincia de Tucumán, que pertenecían al cv. Camarosa. El virus se detectó tanto en plantas con síntomas (8/12), como en asintomáticas (12/454) (Conci *et al.*, 2009). En países donde se cultiva frutilla, como Estados Unidos relevamientos realizados en lotes de cultivo mostraron la presencia de SMYEV en 81 de 373 plantas de frutilla analizadas (Martin, 2011).

En Yugoslavia, se detectó un 20% de incidencia en un área de producción (Dulic-Markovic *et al.*, 1998); en China durante los años 2005 a 2009, 53 de 93 muestras recolectadas en diferentes áreas productoras resultaron positivas para SMYEV (Li y Yang, 2011). En Chile, la incidencia de SMYEV en plantas con síntomas fue de 66% (Cabrera *et al.*, 2005). Durante 2011 y 2012 se observaron, en campos comerciales de la región frutillera de Lules (Tucumán), síntomas de amarillamiento en los bordes de la hoja, plantas achaparradas, moteado en hojas jóvenes, deformación de hojas, provocados por infección de un virus, o de mezclas de ellos.

Los productores de frutilla a nivel comercial, en Argentina, compran todos los años los plantines a los viveros especialmente habilitados para la producción de los mismos. Los mismos importan las plantas madres de sanidad controlada desde empresas de Estados Unidos, o Europa, que tienen la patente de los cultivares que se utilizan en el país. Los

viveros están ubicados en áreas aisladas de la producción comercial para evitar la contaminación de los plantines. A partir de las plantas madres se realiza la multiplicación, mediante estolones, por no más de dos ciclos de cultivo y luego los plantines son vendidos a los productores de fruta a nivel comercial.

Debido a la exclusiva propagación agámica de la frutilla, a través de estolones, los patógenos sistémicos como los virus se perpetúan en las plantas y se transmiten a sus plantines hijos. Si bien las plantas madres adquiridas por los viveristas son de sanidad controlada, esto no garantiza la ausencia total de virus. Pequeños porcentajes de plantas infectadas expuestas a la acción de los vectores naturales (áfidos) son suficientes para la diseminación de los virus.

Es relevante determinar la frecuencia y distribución del virus en las áreas de producción.

El objetivo de este capítulo fue determinar la incidencia y prevalencia del SMYEV y su distribución en zonas de producción de frutilla y en viveros de Argentina.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestreo en campos de producción comercial de frutilla**

Se muestrearon lotes de cultivo comercial de frutilla de tres importantes áreas de producción del país: Tucumán (Lules), Santa Fe (Coronda) y Corrientes (Bella Vista). El relevamiento fue llevado a cabo durante dos años consecutivos (2009 y 2010). Las hojas muestreadas en cada año y lugar no fueron necesariamente del mismo vivero.

### **Diseño de muestreo a campo y análisis de SMYEV**

Se registró el tamaño de cada lote muestreado y el cultivar plantado. El diseño de recolección de las muestras en cada lote fue en bloques al azar. Se analizaron entre cinco y nueve bloques por lote de cultivo y se recogieron entre 29 y 72 hojas de plantas por lote dependiendo del tamaño del mismo. Cada bloque fue de 20 m de largo, por dos hileras de plantas de ancho. A lo largo del bloque se realizaron tres paradas: al principio, al medio y al final y en cada una de ellas se extrajeron dos hojas jóvenes de plantas distintas totalizando seis hojas de frutilla por bloque (Figura. 3.1). Las muestras fueron almacenadas en bolsas de polietileno y conservadas en frío (4°C) hasta su traslado al laboratorio. Cada muestra se pesó en balanza de precisión (*Sartorius* L420P+), luego colocada en bolsa de

polietileno de 8 x 16 cm, e identificada con un número para su análisis en el laboratorio. Las muestras fueron analizadas mediante DAS-ELISA con antisuero policlonal específico para SMYEV (BIOREBA SRL, Latin América).

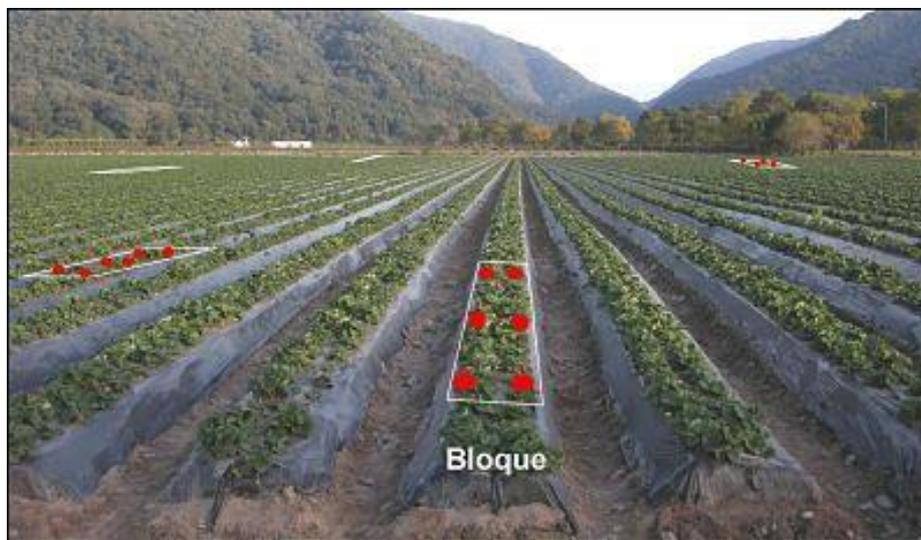


Figura. 3.1. Esquema de muestreo en bloques realizado en lotes de cultivo de frutilla.

### **Muestreo y análisis de SMYEV en plantas provenientes de viveros**

Se muestrearon viveros proveedores de plantines de frutilla para el cultivo comercial en las áreas productoras del país. Los mismos están situados en Plottier (Neuquén), El Maitén (Chubut) y San Carlos (Mendoza). Durante los años 2010 a 2013 se recolectaron al azar muestras de hoja de frutilla de distintos cultivares, de diferentes lotes. Se tomaron entre 20 y 40 muestras por cada lote, que fueron probadas mediante DAS-ELISA con antisuero para SMYEV (BIOREBA SRL, Latin América).

### **Análisis de los datos de incidencia y prevalencia viral en plantas provenientes de vivero**

La incidencia se calculó como porcentaje de plantas infectadas por provincia y en el país, ponderando los resultados de acuerdo a las hectáreas muestreadas. Para ello se multiplicó el porcentaje de incidencia del lote (número de plantas infectadas sobre número de plantas analizadas) por la superficie, en hectáreas, de ese lote, y al producto se lo dividió por las hectáreas totales con frutilla de esa región. La incidencia por región se obtuvo de la suma de las incidencias ponderadas por lote. La incidencia a nivel de país se obtuvo como suma de las incidencias obtenidas por región.

También se calculó la prevalencia por región y en el país como el porcentaje de lotes infectados (al menos con una planta infectada) sobre el total de lotes analizados.

Se realizó un ANOVA para determinar si la incidencia del virus varió entre los cultivares analizados, entre las distintas regiones muestreadas en cada año y para comparar la incidencia del virus entre los diferentes cultivares en la misma región y el mismo año. Cuando fue necesario se efectuó una prueba *a posteriori* de comparaciones múltiples, de los valores medios de incidencia, con DGC. Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico *InfoStat* (DiRienzo *et al.*, 2013).

## **RESULTADOS**

### **Muestreo en lotes de producción comercial de frutilla**

En el primer año se muestrearon 1.303 plantas pertenecientes a 34 lotes de los cv. Camino Real, Earlibrite, Camarosa y Festival y en el segundo año 1.408 plantas provenientes de 42 lotes de los cv. Camino real, Earlibrite, Camarosa, Festival, Albión y Fortuna. Uno de los lotes muestreados tenía una mezcla de dos cultivares (Albión y Camarosa) y por lo tanto no fue incluido en los análisis comparativos entre cultivares.

En los muestreos realizados en las tres regiones de Argentina se extrajeron muestras que fueron representativas de los cultivares locales sembrados en cada provincia.

### **Análisis de los datos de incidencia y prevalencia viral en lotes comerciales**

En todas las regiones analizadas y en los dos años, en los que se detectaron diferencias significativas para incidencia y prevalencia ( $p=0,0001$ ), se manifestó la presencia del virus en porcentajes variables como se detalla a continuación.

#### *- Año 2009*

Se registró entre 3,61 y 4,95% de plantas infectadas con SMYEV, dependiendo de la región muestreada (incidencia ponderada) y entre 57,1 y 60% de lotes con al menos una planta enferma dependiendo de la región (prevalencia) (Tabla 3.1).

En esta campaña no se detectaron diferencias significativas ( $p=0,8618$ ) entre las regiones analizadas resultando en una incidencia total de 3,56% y una prevalencia de 58,8% para el país.

Tabla 3.1. Incidencia y prevalencia año 2009 en tres regiones productoras de frutilla.

Región	Hectáreas Muestreadas	Lotes Muestreados	Lotes Infectados	Incidencia %	Incidencia ponderada (%)	Prevalencia %
Lules	20	17	11	3,7	3,61	64,7
Coronda	2,87	10	6	3,2	3,90	60
Bella Vista	22	7	3	3,5	4,95	57,1
<b>Total país</b>	<b>44,87</b>	<b>34</b>	<b>20</b>	<b>3,5</b>	<b>3,56</b>	<b>58,8</b>

Cuando se analizó la incidencia del virus en función de los cultivares sembrados en el 2009 sin discriminar por región, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p=0,3476$ ), (Figura 3.2).

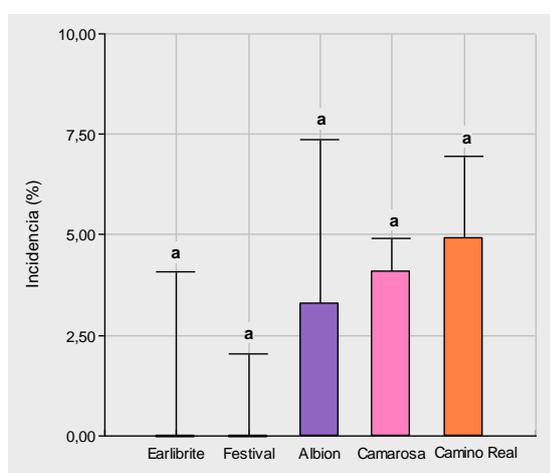


Figura 3.2 Incidencia de SMYEV en los cultivares muestreados en las regiones de Bella Vista, Coronda y Lules, año 2009. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), según prueba DGC.

Sin embargo cuando el análisis se hizo considerando las diferentes regiones se detectó que, en Coronda, la incidencia del virus entre los cv. Camarosa y Festival fue significativamente diferente ( $p=0,0279$ ). El análisis de la incidencia viral de los cultivares de las regiones de Bella Vista y Lules no mostraron diferencias significativas ( $p=0,6066$  y  $p=0,9095$ , respectivamente) (Figura 3.3).

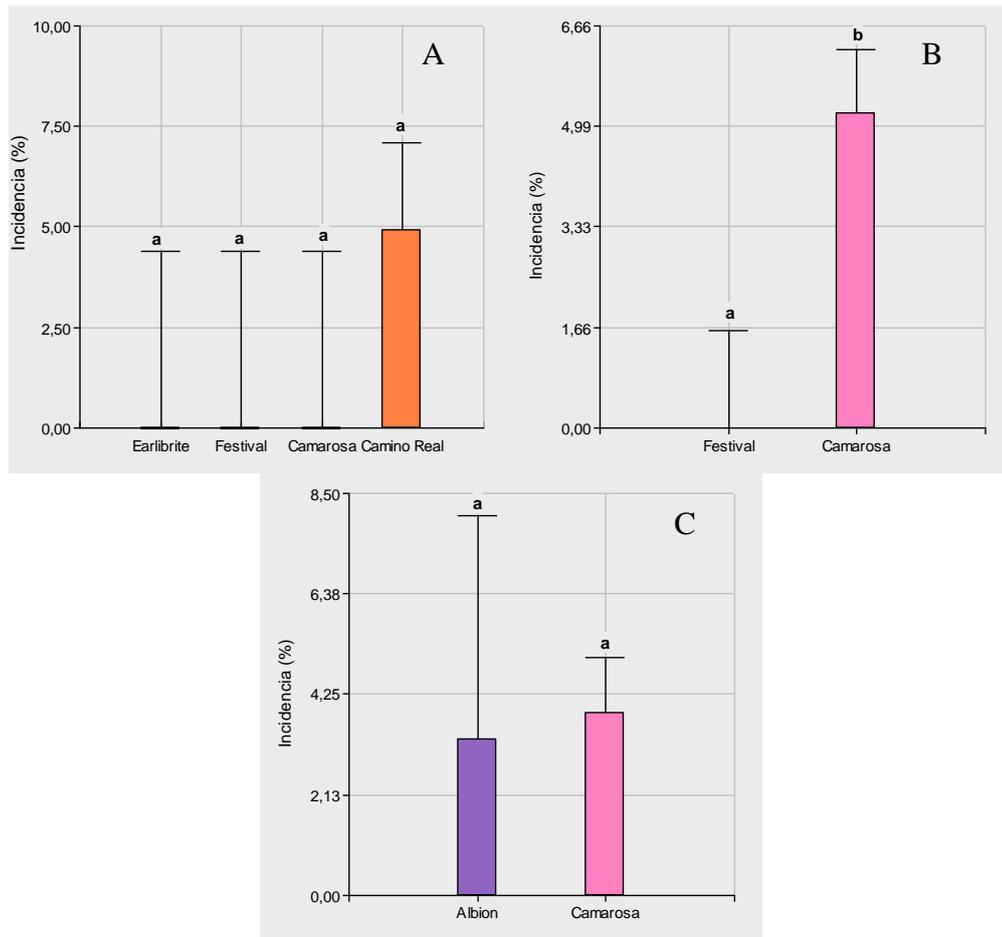


Figura 3.3. Incidencia de SMYEV en distintos cultivares muestreados en A: Bella Vista, B: Coronda y C: Lules, durante el año 2009. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), según prueba DGC.

Tampoco hubo diferencias significativas ( $p=0,5131$ ) para infección del cv. Camarosa entre las tres regiones muestreadas (Figura 3.4).

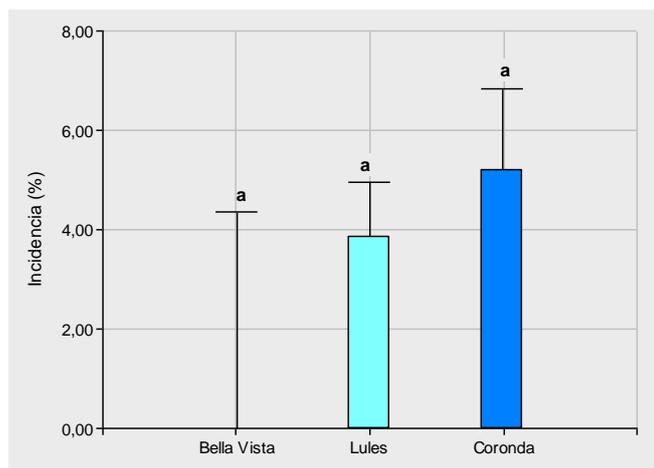


Figura 3.4. Incidencia de SMYEV en el cultivar Camarosa en las tres regiones muestreadas, año 2009. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), según prueba DGC.

- Año 2010

En los análisis realizados en el 2010 se detectó menor incidencia del virus en Coronda (8,74%). Sin embargo la incidencia no fue estadísticamente significativa entre las tres regiones ( $p = 0,1270$ ), (18,48, 8,74 y 20,92%, respectivamente). La prevalencia varió entre 66,6 y 100% dependiendo de las regiones analizadas Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Incidencia y prevalencia año 2010 en las regiones productoras de frutilla.

Región	Hectáreas muestreadas	Lotés muestreados	Lotés infectados	Incidencia (%)	Incidencia ponderada (%)	Prevalencia (%)
Lules	23,5	21	21	21,7	18,48	100
Coronda	4,75	12	11	10,5	8,74	91,6
Bella Vista	3,14	9	6	18,9	20,92	66,6
<b>Total País</b>	<b>31,39</b>	<b>41</b>	<b>37</b>	<b>18,18</b>	<b>19,72</b>	<b>90,5</b>

Cuando se analizó la presencia de la infección viral en los cultivares sembrados entre las tres regiones muestreadas en 2010, se observaron diferencias significativas ( $p = 0,0004$ ) entre los cv. Earlibrite, Fortuna y Camarosa (con baja o 0% de incidencia) y los cv. Camarosa Camino Real y Albión (Figura 3.5).

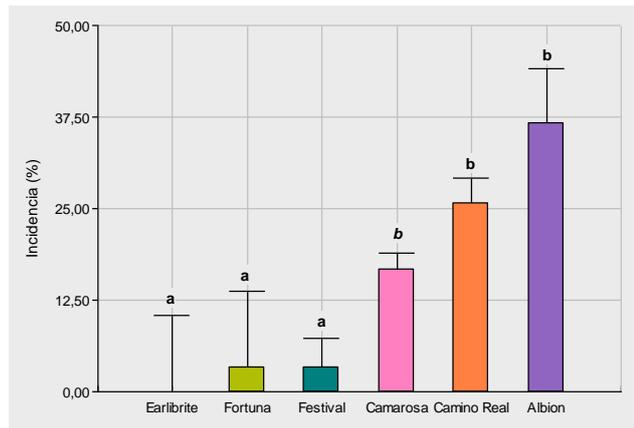


Figura 3.5. Incidencia de SMYEV en los cultivares muestreados en las regiones de Bella Vista, Coronda y Lules, año 2010. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), según prueba DGC.

Cuando el análisis se hizo para cada región por separado se detectó en Bella Vista que los cv. Camarosa y Camino Real fueron significativamente diferentes a Earlibrite y Festival ( $p=0,0028$ ) (Figura 3.6A). En Coronda, la incidencia del virus en Camarosa, Festival y Fortuna no fue estadísticamente significativa ( $p=0,1440$ ) (Figura 3.6B). En Lules, los cv. Camarosa, Camino Real y Albión revelaron una incidencia estadísticamente no significativa ( $p= 0,0815$ ) (Figura 3.6C).

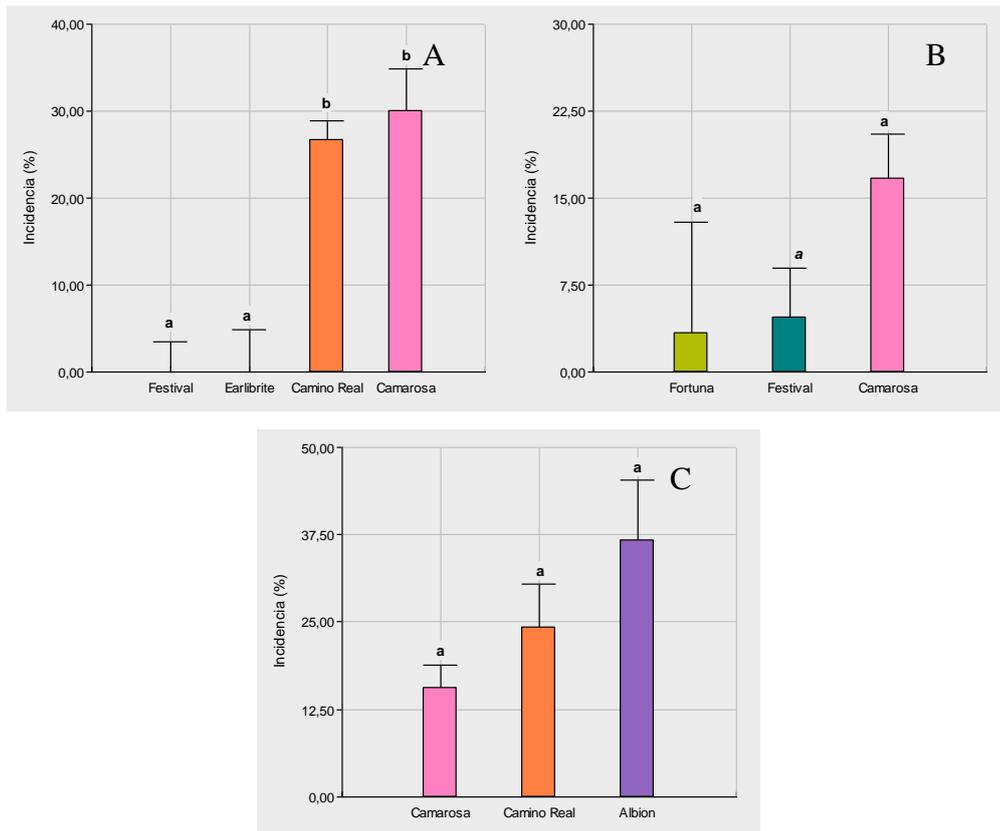


Figura 3.6. Incidencia de SMYEV detectada en los cultivares muestreados en las regiones de A: Bella Vista, B: Coronda y C: Lules, durante el año 2010. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), prueba DGC.

Con respecto al cv. Camarosa durante 2010 no se detectaron diferencias significativas ( $p=0,3537$ ) entre las tres regiones muestreadas (Figura 3.7).

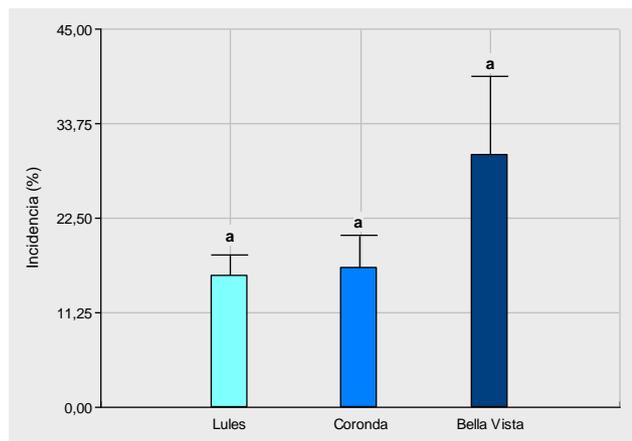


Figura 3.7. Incidencia de SMYEV en el cultivar Camarosa en las tres regiones muestreadas, año 2010. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), según prueba DGC.

### Análisis de los datos de incidencia y prevalencia viral en plantas provenientes de vivero

Durante cuatro años (2010, 2011, 2012 y 2013) se analizaron 3.854 muestras de hoja de frutilla provenientes de viveros comerciales, ubicados en las regiones de Plottier (provincia de Neuquén), El Maitén (Chubut) y San Carlos (Mendoza).

La incidencia del virus varió entre 2,91 y 13,07%. La mayor incidencia de SMYEV fue en el año 2013 con un 13,07% (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Incidencia y prevalencia de SMYEV provenientes de tres regiones y diferentes en viveros comerciales de frutilla de Argentina, años 2010-2013.

Año	Procedencia	n° lotes analizados	n° lotes positivos	n° muestras analizadas	n° muestras positivas	Incidencia (%)	Prevalencia (%)
2010	Plottier-Neuquén	22	18	880	78	8,86	81,81
2010	S.Carlos-Mendoza	17	0	680	0	0	0
<b>Total 2010</b>		<b>39</b>	<b>18</b>	<b>1560</b>	<b>78</b>	<b>5,00</b>	<b>46,15</b>
2011	Plottier-Neuquén	19	10	760	46	6,05	52,63
2011	S.Carlos-Mendoza	14	1	560	5	0,89	7,14
<b>Total 2011</b>		<b>33</b>	<b>11</b>	<b>1320</b>	<b>51</b>	<b>3,86</b>	<b>33,33</b>
2012	Plottier-Neuquén	20	8	515	15	2,91	40
<b>Total 2012</b>		<b>20</b>	<b>8</b>	<b>515</b>	<b>15</b>	<b>2,91</b>	<b>40</b>
2013	El Maitén-Chubut	10	8	159	38	23,9	80
2013	Plottier-Neuquén	1	0	20	0	0	0
2013	S.Carlos-Mendoza	7	1	280	22	7,86	14,28
<b>Total 2013</b>		<b>18</b>	<b>9</b>	<b>459</b>	<b>60</b>	<b>13,07</b>	<b>50</b>
<b>Total país</b>		<b>110</b>	<b>46</b>	<b>3854</b>	<b>204</b>	<b>5,29</b>	<b>41,81</b>

La incidencia de las plantas de frutilla, fue variable entre años, y entre regiones muestreadas. Entre años se encontraron diferencias significativas entre los años 2010, 2011, 2012 con 2013 ( $p=0,0070$ ) (Figura 3.8). Comparando las regiones se detectaron diferencias significativas entre la incidencia de San Carlos y Plottier con El Maitén ( $p=0,0001$ ) (Figura 3.9).

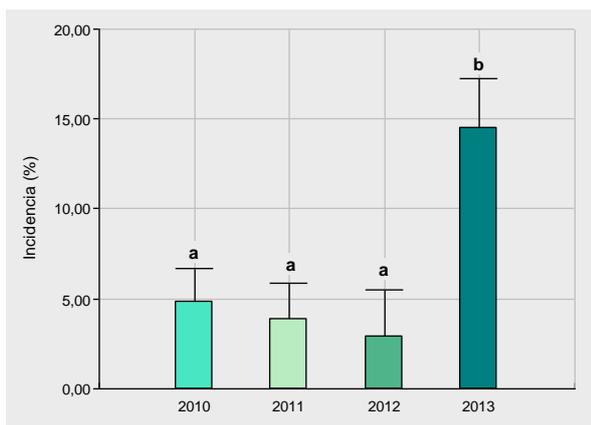


Figura 3.8. Incidencia de SMYEV durante los años 2010 a 2013 en las diferentes regiones y cultivares analizados. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), según prueba DGC.

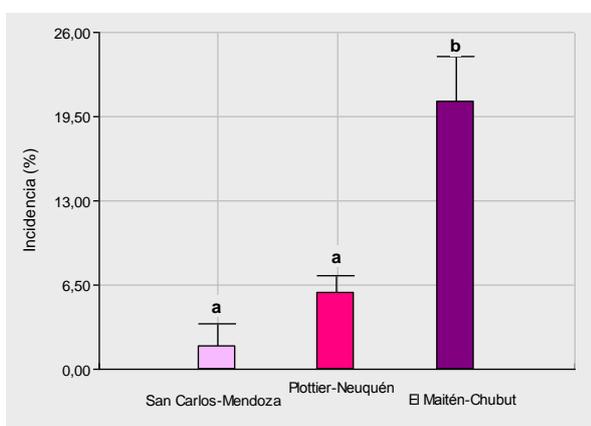


Figura 3.9. Incidencia de SMYEV entre regiones durante 2010 a 2013. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), según prueba DGC.

El análisis de la incidencia del virus, teniendo en cuenta un mismo año de muestreo y comparando las regiones de donde proceden las muestras, fue variable, según la procedencia. En 2010 se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,0001$ ) en la incidencia del virus entre la región de Plottier y San Carlos (Figura 3.10A). Sin embargo en 2011 ambas regiones fueron significativamente iguales ( $p = 0,0683$ ) (Figura 3.10B). En 2012 sólo se muestreó el vivero de Plottier en Neuquén, por lo que no se pudo comparar la incidencia viral entre procedencias. En 2013 no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los viveros de Plottier, San Carlos y El Maitén (Figura 3.10C).

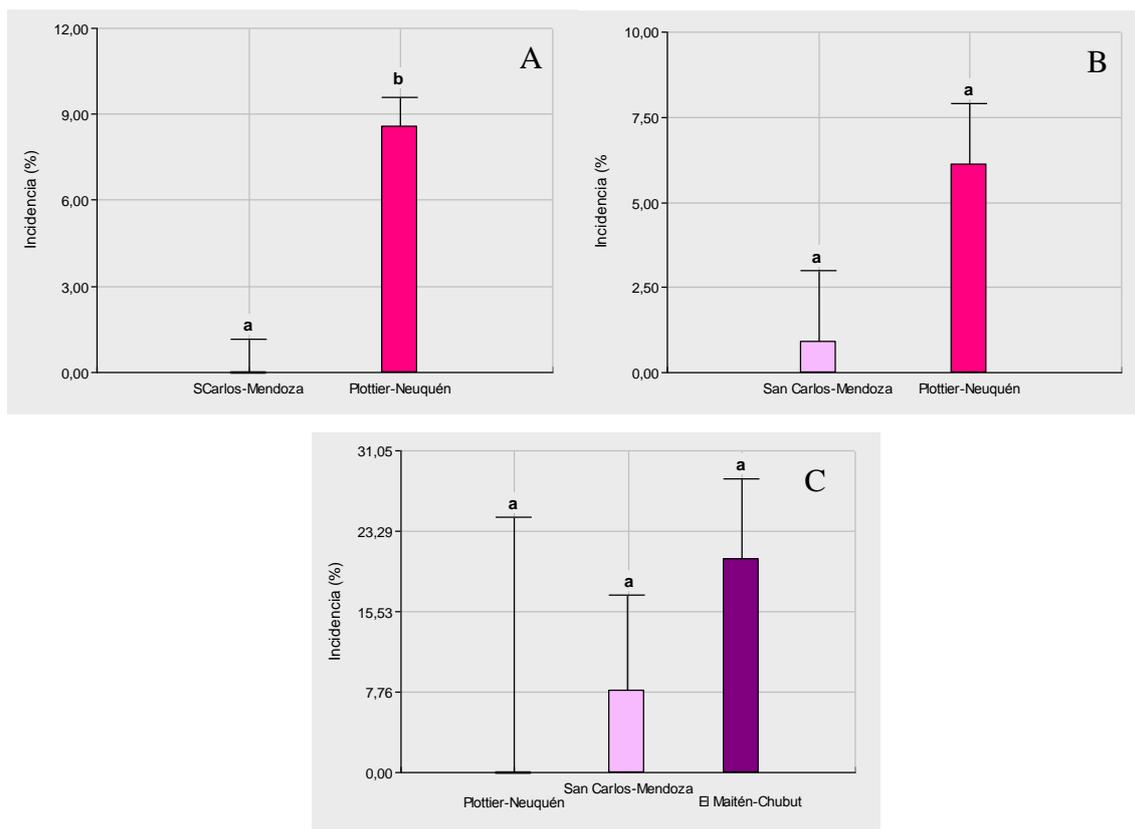


Figura 3.10. Incidencia de SMYEV en las regiones analizadas y en todos los cultivares en A: 2010; B: 2011 y C: 2013. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), según prueba DGC.

Cuando se realizó el análisis para conocer la incidencia del virus a lo largo de los cuatro años en la región de Plottier, no se detectaron diferencias significativas entre los años. En el caso de San Carlos, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tres años analizados (2010, 2011, 2013). La región de El Maitén fue analizada sólo en el 2013, por lo que no se pudo realizar las comparaciones entre años.

En el caso de los viveros de las tres regiones, todos los análisis comparativos que se realizaron, tuvieron en cuenta la suma de todos los cultivares que se analizaron en cada región (Tabla 3.4), esto se debió a que no todos los cultivares estuvieron representados en cada uno de las regiones y años que se muestrearon y compararon.

Tabla 3.4. Cultivares analizados en tres regiones, durante 2010 a 2013.

<b>Año</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Cultivares analizados (lotes infectados/ lotes analizados)</b>
2010	Plottier, Neuquén	Albión (7/7); Palomar (1/1); San Andreas (1/1); Aromas (4/6); Camarosa (1/1); Camino Real (1/2); Monterrey (1/1); Portolas (1/1); Ventana (1/1); Diamante (0/1).
	San Carlos, Mendoza	Gariguette (0/2); Darselect (0/2); Sabrosa (0/1); Carmela (0/2); Winterdawn (0/1); Cristal (0/1); Macarena (0/1); Oso Grande (0/1); Earlibrite (0/1); Fortuna (0/1); Festival (0/2); S. Charlie (0/1); Elyana (0/1).
2011	Plottier, Neuquén	Albión (5/6); San Andreas (1/2); Aromas (1/6); Camino Real (1/1); Camarosa (1/1); Portolas (0/1); Monterrey (1/1); Palomar (0/1) 40 muestras de cada cv.
	San Carlos, Mendoza	Gariguette (0/2); Darselect (0/2) Festival (1/2); S. Charlie (0/1); S. Anne (0/1); Sabrosa (0/1); Winterdawn (0/1); Earlibrite (0/1); Oso Grande (0/1); Cristal (0/1); Fortuna (0/1).
2012	Plottier, Neuquén	Albión (2/6); San Andreas (1/2); Aromas (2/6); Camino Real (0/1); Camarosa (1/1); Benicia (1/1); Mojave (1/1); Portolas (0/1); Monterrey (0/1).
2013	Plottier, Neuquén	Aromas (0/1).
	El Maitén, Chubut	San Andrea (1/1); Benicia (1/2) Benicia (1/1); S. Charlie (1/1).
		San Andrea (1/1) 20 muestras; Benicia (1/2); San Andrea (1/1); Camarosa (1/1) 5 a 21 muestras por cv.
San Carlos Mendoza	Festival 0/1; Fortuna 0/1; S Anne 0/1 Elyana 0/1; Festival 0/1; Sabrina 1/1 S. Charlie 0/1.	

Durante los cuatro años de análisis se muestrearon 27 cultivares de frutilla de los cuales 13 no resultaron infectados con SMYEV y un lote del cv. Sabrina fue el que exhibió con el mayor porcentaje de incidencia viral (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Porcentaje de infección de SMYEV en los cultivares provenientes de viveros de San Carlos, Plottier y El Maitén durante 2010 a 2013.

<b>Cultivar</b>	<b>N° de lotes analizados</b>	<b>Incidencia (%)</b>
Diamante	1	0
Macarena	1	0
Fortuna	3	0
Winterdawn	2	0
Sweet Anne	3	0
Oso Grande	2	0
Gariguette	4	0
Sabrosa	2	0
Darselec	4	0
Elyana	2	0
Earlibrite	2	0
Cristal	2	0
Carmela	2	0
Camino Real	4	1,25
Sweet Charlie	4	1,56
Festival	6	2,08
Portolas	3	2,5
Aromas	19	3,25
Mojave	1	4
Palomar	2	6,25
Monterrey	3	7,5
Camarosa	4	8,03
Albión	19	8,16
Benicia	5	9,74
Ventana	1	17,5
San Andrea	8	24,5
Sabrina	1	55

## DISCUSIÓN

La frutilla es una hortaliza importante a nivel mundial. Su valor económico se reduce cuando está infectada con virus especialmente en infección mixta, dando lugar a pérdidas incalculables en los rendimientos (Martin & Tzanetakis, 2006). Es por esta razón que para la producción comercial de frutilla es imperioso el uso de plantas de sanidad controlada. Plantas libres de virus son obtenidas por cultivo de meristemas que, en una primera etapa, son multiplicadas bajo jaulas antiáfidos y posteriormente a campo en áreas alejadas de la producción comercial. El total de los cultivares que se usan en el país son comprados en viveros de Estados Unidos o de Europa que tienen las patentes de los cultivares agrónomicamente mejores y venden las plantas madres certificadas. Cuando estas plantas son adquiridas por los viveristas de Argentina las multiplican durante dos ciclos de cultivos antes de entregarlas a los productores comerciales. Los vectores de virus están presentes en todas las regiones del país por lo cual, si esta multiplicación no es bien controlada, las plantas llegan a los productores infectadas con virus.

La prospección realizada en esta tesis en lotes de producción comercial durante dos años reveló la amplia distribución del SMYEV en las regiones productoras del país. Este virus se detectó en el 2009 con una incidencia promedio del 4% y una prevalencia de 59%, mientras que en 2010 el porcentaje fue mayor: 20% de incidencia y 90% de prevalencia. Las diferencias en incidencia del virus entre los dos años fueron estadísticamente significativas.

Las tres regiones productoras no mostraron diferencias estadísticamente significativas durante 2009 y 2010 para incidencia del patógeno. Sin embargo la tendencia en ambos años, mostró a la región de Lules como la de mayor prevalencia viral. La investigaciones realizadas demuestran que el SMYEV está ampliamente distribuido en todas las zonas productoras de frutilla del mundo (EPPO/CABI, 1996) y su presencia debería ser motivo de preocupación, ya que se transmite por el mismo vector que otros virus de frutilla produciendo infecciones mixtas. El efecto sinérgico de los virus en las infecciones múltiples causa la pérdida total de la producción en la mayoría de las combinaciones, lo que es precedido por una grave deformación de plantas. Los daños ocasionados por las infecciones mixtas de este virus combinado con otros han sido bien reportados por numerosos autores (Converse *et al.*, 1988; Martin & Tzanetakis, 2006). Datos publicados en 2004 en Chile informaron una alta incidencia de SMYEV (66%) en un muestreo realizado en lotes de producción de frutilla comercial *Fragaria x ananassa* y

*Fragaria chiloensis*, incluyendo evidencia de infección múltiple de hasta cinco virus por planta (Cabrera *et al.*, 2005). En Yugoslavia, de 33 campos muestreados en cinco regiones productoras, se obtuvo un 20% de incidencia del virus en una sola región (Dulic-Markovic *et al.*, 1998).

En esta tesis se reporta por primera vez para Argentina los porcentajes de incidencia encontrados. Estos fueron más bajos que los detectados en otros países en el primer año de estudio, pero en el segundo año los porcentajes fueron similares a los reportados en Yugoslavia.

En el año 2009, cuando se analizaron los cinco cultivares de frutilla muestreados en las tres regiones no se detectaron diferencias significativas entre ellos. La incidencia varió ampliamente entre lotes, aunque no fue significativamente distinta. De igual manera, cuando se analizaron los cultivares por región no se encontraron diferencias entre ellos en las regiones de Lules y Bella Vista, a excepción de Coronda, donde los cv. Festival y Camarosa se comportaron de modo estadísticamente diferente, revelando mayor infección en el cv Camarosa. Sin embargo, cuando se analizó la incidencia del virus de este cultivar en las tres regiones estudiadas no se detectaron diferencias significativas entre ellas. Esto estaría indicando una incidencia similar del virus entre los cultivares analizados en el 2009, como así también en distintas regiones.

En 2010, tampoco hubo diferencia en la incidencia viral entre las tres regiones, pero sí entre cultivares. Cuando se analizó cada región se observaron entre genotipos sólo en Bella Vista, donde los cv. Camino Real y Camarosa fueron superiores a Festival y Earlibrite. Sin embargo, al estudiar el cv. Camarosa, al igual que en el año 2009, no se detectaron diferencias entre distintas regiones para incidencia.

Tanto en 2009 como 2010, todos los cultivares exhibieron igual incidencia de SMYEV en las diferentes regiones. No obstante, hubo excepciones, en relación a la incidencia viral en cultivares de dos regiones distintas: Coronda (entre Festival y Camarosa) y en Bella Vista (entre Festival, Earlibrite y Camarosa Camino Real) en 2009 y 2010 respectivamente. Estas diferencias responderían a la baja o ausente presencia de SMYEV en los cv. Festival y Earlibrite. Muchos cultivares de frutilla muestran una respuesta diferencial a la infección por virus (Martin & Tzanetakis, 2006). Si bien no se conoce resistencia a SMYEV en el género *Fragaria*, la mayoría de los cultivares son tolerantes a la infección simple con SMYEV. Los genotipos sensibles desarrollan enanismo, clorosis marginal, distorsión de las hojas y disminución del tamaño de los frutos, mientras que los tolerantes no muestran síntomas a menos que sean razas severas, o

mezclas de más de dos virus (Martin & Tzanetakis, 2006). Plantas de frutilla transformadas con el gen de la CP de SMYEV, luego propagadas a través de cultivo de tejidos y transferidas a suelo fueron tolerantes al virus (Finstad & Martin, 1995). La disponibilidad de resistencia transgénica sería una importante opción para minimizar las pérdidas en el rendimiento de los frutos. La utilización de esta herramienta puede conducir al desarrollo de la resistencia efectiva y duradera contra SMYEV.

Es importante destacar que, en Argentina, los cv Camarosa y Albión obtuvieron, en algunas regiones, los más altos valores de incidencia. Este dato resulta importante porque Camarosa ha sido mencionado como el cultivar mejor adaptado a los suelos de la principal provincia productora: Tucumán (Pedraza *et al.*, 2007), el más sembrado y distribuido en Argentina y el que posee ciertas características agronómicas y de calidad de frutos que son elegidas por los consumidores del mundo y requeridas para su exportación (Miserendino, 2010; Agüero *et al.*, 2012). Sin embargo, la alta infección de Camarosa con SMYEV hace que se deba tener en cuenta la posibilidad de evaluar otros cultivares que lo replacen. Un dato importante fue que el cv. Earlibrite no se infectó con SMYEV en ninguno de los dos años. Resultados preliminares realizados en Lules, Tucumán demostraron que Earlibrite es muy promisorio como cultivar precoz, funciona mejor en microtúneles y es apto para cultivo de hasta dos años (Kirschbaum *et al.*, 2001). En Mar del Plata la evaluación de varios cultivares ubicó a Monterrey como el de mejores propiedades organolépticas, logrando los mayores valores en sabor, dulzura y textura. El cv. Albión obtuvo el segundo mejor valor general (Adlercreutz, 2013), sin embargo estos dos cultivares se infectaron con SMYEV.

Otro factor ecológico importante en la enfermedad es la presencia de áfidos en el cultivo de frutilla. Se destacan las especies del género *Chaetosiphon*, en especial *C. fragaefolii*, que es el principal vector natural del virus. Es transmisor de SMYEV, SMOV, SCV y de otros cuatro virus, y su presencia ha sido previamente reportada en nuestro país (Nome & Yossen, 1980; Cédola & Greco, 2010; Delfino *et al.*, 2007). Un dato importante en cuanto a la biología del insecto es que fue encontrado en mayor abundancia en algunos cultivares de frutilla, siendo los más afectados Carmine Diamante y Festival (Rondon & Cantliffe, 2004). Esta información sugiere que los cultivares podrían ser seleccionados, no sólo por sus características productivas, sino también por su capacidad de desarrollar colonias de pulgones (Cédola & Greco, 2010).

En el estudio de incidencia del virus realizado en esta tesis se detectó diferencia de infección entre los dos años evaluados. Trabajos realizados con *C. fragaefolii* determinaron

la ocurrencia de diferencias estadísticamente significativas en la relación de abundancia poblacional de estos áfidos y las prácticas de manejo agrícola del cultivo de frutilla. Otra característica que observaron fue su aparición esporádica, ya que el áfido no fue encontrado todos los años en el cultivo, y esto puede ser la causa por la cual el porcentaje de plantas infectadas con virus también varía. Estos cambios en la población de pulgones son particularmente peligrosos, ya que no se lo puede detectar hasta que es demasiado tarde para realizar un control efectivo. El método usado frecuentemente a tal fin involucra el uso regular de insecticidas en base a un calendario anual. Sin embargo, muchos productores de frutilla están empezando a reducir el uso de pesticidas y algunos no utilizan productos químicos, debido a su costo, o porque pretenden obtener un precio superior para las frutillas libres de pesticidas (Cédola & Greco, 2010).

Todos estos factores, posiblemente, favorezcan la presencia del vector y aumenten la dispersión de los virus que transmiten.

Con respecto a la incidencia del virus detectada en los viveros, los valores variaron entre 0,89 y 13%. El menor porcentaje fue en 2011 y el mayor, en 2013. En el caso de la prevalencia del virus, 2010 y 2013 fueron los años en los cuales se registraron los más altos valores (46 y 50% respectivamente), mientras que 2011 resultó el de menores registros (33%) (Tabla 3.4). Este dato es revelador porque las plantas analizadas en 2010 fueron las cultivadas en 2011 y año de gran preocupación por parte de los productores de frutilla a nivel comercial de la Provincia de Tucumán, por la altísima gran incidencia de virosis en los cultivos (D. Kirschbaum y V. Conci, comunicación personal).

La producción de plantines en el país está en manos de unos pocos viveristas (5) y el área de muestreo contemplada en esta tesis corresponde al total de la región productora de Argentina. Algunos de estos viveristas multiplican, en años, parte de estas plantas en Tafí del Valle (provincia de Tucumán) pero el origen de las plantas madres es el mismo. Cuando se analizaron diferentes regiones, donde estaban ubicados los viveros, se detectaron diferencias significativas en la incidencia del virus. Durante 2010 y 2013 en San Carlos (Mendoza) y Plottier (Neuquén) respectivamente no se observaron infecciones virales en las muestras analizadas. En el caso de Plottier ese año se probaron sólo 20 plantas de un lote, número insuficiente para concluir que no hubo infección. La presencia de plantas infectadas en los viveros es, sin duda, debido al ingreso de material de propagación infectado, de lo contrario los virus estarían ausentes. Esto, acompañado de un mal manejo sanitario de la planta en el vivero donde las mismas se propagaron, y la falta de control de los vectores, llevan a aumentar los porcentajes de plantines con virus.

La diferencia significativa observada entre los años analizados, posiblemente podría relacionarse con una proporción de plantas infectadas con el virus y con la ocurrencia de factores ambientales, que difieren en cada región, y que favorecen a las poblaciones de vectores del virus. Sin embargo, la razón más importante, quizás, sean diferencias en la sanidad de las plantas madres provenientes del exterior. Como se explicó en la introducción de esta tesis, todos los plantines provienen de la multiplicación de plantas madres que se compran en USA o Europa. Los países proveedores de material de plantación certifican el proceso de producción que no involucra ausencia total de virus (FPS, 2008; FERA, 2013). Por tal motivo el material, si bien es controlado, no es completamente libre de virus y este porcentaje de infección puede variar. Cuando las plantas son introducidas en los viveros son multiplicadas en áreas alejadas de la producción comercial, para evitar ser infectadas por virus por los vectores naturales como los pulgones, pero si un pequeño número de esas plantas madres está infectado los pulgones diseminan los virus. Si el porcentaje de infección viral es muy bajo, y los pulgones son bien controlados esta diseminación será mínima. Estos resultados permiten inferir que los porcentajes de infección en los cultivos comerciales dependen, en gran medida, de los porcentajes de plantas madres infectadas que fueron introducidas al país y de los cuidados que luego tuvieron los viveristas para evitar que se propaguen en las etapas de multiplicación. Con el fin de minimizar la dispersión de la infección, sería importante que el material de partida para la producción de plantines sea estrictamente controlado al momento de su ingreso al país y, posteriormente, el empleo de un programa de control de áfidos para evitar que se propague alguna infección preexistente.

Es importante resaltar que DAS ELISA resultó una técnica confiable, ya que los anticuerpos empleados para la detección del virus eran policlonales, es decir, anticuerpos que se caracterizan por detectar las diferentes variantes que posee el virus. Como se vio en otra sección de esta tesis, en el país existen diferentes variantes del virus, por lo cual el uso de un antisuero policlonal y obtenido a partir de la purificación de un virión completo ofrece mayores seguridades de detectar todas las posibles razas del patógeno.

Este es el primer informe de la incidencia de SMYEV en diferentes regiones productora de frutilla de Argentina y en los viveros de multiplicación de las plantas que luego van a ser usadas en la producción comercial.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir:

- ✓ El SMYEV fue detectado en todas las regiones productoras del país con valores de incidencia que variaron entre 4 y 20% y de prevalencia entre 59 y 90%, dependiendo del año de infección.
- ✓ No se observaron diferencias significativas entre las diferentes regiones productoras de frutilla a nivel comercial en cada uno de los años analizados.
- ✓ Se detectaron algunas diferencias significativas entre los cultivares analizados, que si bien fueron pocas, podrían estar indicando la presencia de un comportamiento diferencial frente a la infección viral.
- ✓ Earlibrite fue el único cultivar, muestreado en vivero y a campo, que no se infectó con SMYEV. Otros cultivares provenientes de vivero que no presentaron infección con SMYEV fueron: Diamante, Gariguette, Darselect, Sabrosa, Carmela, Winterdawn, Cristal, Macarena, Oso Grande, Sweet Charlie, Elyana, Portolas, Monterrey, Sweet Anne, aunque en estos últimos, el número de lotes y plantas analizadas fue muy bajo como para inferir algún comportamiento diferencial.
- ✓ La presencia de virus, tanto en viveros como en los campos de producción comercial, probablemente se debe a la combinación de varios factores entre los cuales quedó en evidencia la presencia de plantas madres infectadas en vivero lo que posiblemente se agravó por la falta de control de los vectores durante el proceso de multiplicación.

# CAPÍTULO 4

## **Efectos del SMYEV en el rendimiento de frutos de plantas asintomáticas de frutilla**

### **INTRODUCCIÓN**

Se ha demostrado que las enfermedades virales son limitantes para el rendimiento de la frutilla, pero aún falta establecer el efecto de muchas de ellas (Martin & Tzanetakis, 2006; Tzanetakis & Martin, 2013). En algunos casos, existen virus que infectan cultivares comerciales de frutilla y no provocan síntomas; en otros, la infección de la frutilla por dos o más virus diferentes provoca un daño mayor que el de infección de cada virus por separado. Este tipo de sinergia ha sido documentado en Canadá para SMoV, SCV y SMYEV en infección mixta y simple, en cv. Hood y Northwest, (Barritt & Loo, 1973), para SMoV, SVBV y *Strawberry latent C virus* (SLVC) en infección mixta y en distintas combinaciones en los cv. Redcoat, Catskill y Sparkle (Bolton, 1974). También se llevaron a cabo estudios para determinar diferencias en infecciones naturales mixtas recientes y mixtas crónicas de SMoV, SCV y SMYEV (Martin & Converse, 1977). Un estudio del efecto de SCV en infección simple, repetido durante 3 años, determinó una disminución en el rendimiento de frutos de entre 36 y 39% en plantas de frutilla infectadas con el virus, en dos cultivares característicos de la región, en comparación con los testigos sanos y durante el tercer año del ensayo (Babovic, 1976). SMoV también disminuyó el rendimiento de los frutos en casi un 30% en cultivares susceptibles a la infección (Freedman & Mellor, 1962). En el caso de *Strawberry necrotic shock virus* (SNSV), se produjo una reducción de hasta un 15% en los rendimientos del fruto y de hasta un 75% en la producción de estolones (Johnson *et al.*, 1984).

La importancia económica de SMYEV como patógeno se estudió como acción combinada con otras infecciones virales y los síntomas encontrados fueron: enanismo, plantas achaparradas, mosaico, moteado, y distorsión de la hoja (Martin & Tzanetakis,

2006). Sin embargo, poco se sabe de los efectos de SMYEV sobre el rendimiento de la frutilla cuando está en infecciones simples ya que las plantas infectadas son asintomáticas.

La falta de información relativa a infección simple de los virus sobre el rendimiento de frutilla se debe a la dificultad de aislar cada especie desde la planta debido a su propagación agámica.

Además, es importante destacar que en nuestro país el cultivar dominante en las áreas de producción de frutilla es el cv. Camarosa (Molina *et al.*, 2007; Agüero *et al.*, 2012) y, por ello, se eligió al mismo para realizar los ensayos comparativos de rendimiento mostrados en esta sección de la tesis.

En este capítulo el objetivo fue evaluar el efecto de SMYEV en la producción de frutos en plantas con infecciones simples (asintomáticas) de frutilla cv. Camarosa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

El estudio se llevó a cabo con plantas frutilla cv. Camarosa (*Fragaria x ananassa* Duch.), con origen comercial en la Universidad de California. Este cultivar se caracteriza por ser de día corto con una increíble adaptación climatológica. Se trabajó con plantas de frutilla de raíz desnuda provenientes de viveros comerciales ubicados en Trevelin, Argentina. Las plantas fueron desenterradas mecánicamente entre el 18 y 25 de marzo y mantenidas en cámara de frío (1°C) hasta la siembra en el mes de mayo.

### **Análisis serológicos**

Al comienzo y al final de cada ensayo las plantas fueron probadas por DAS-ELISA con antisuero comercial (BIOREBA SRL Latin America) para *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Tobacco necrosis virus* (TNV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Raspberry ringspot virus* (RPRSV) y *Apple mosaic virus* (ApMV).

El SMYEV fue evaluado en diferentes momentos del ciclo de cultivo en los tres ensayos realizados en este trabajo: floración, después de la primera cosecha y al final de la cosecha de los frutos. Las lecturas de absorbancia se realizaron en espectrofotómetro Dinex MRX II, a una longitud de onda de 405 nm. Se consideraron positivas las muestras que dieron valores de absorbancia superiores a dos veces el valor de la media de los cinco

testigos sanos, evaluados en la misma placa de ELISA. Los testigos positivos que se usaron fueron provistos por el *kit*, a excepción del testigo enfermo de SMYEV para el cual se utilizaron plantas de frutilla previamente identificadas como infectadas con este virus (Conci *et al* 2009). En cada placa de ELISA se usaron cinco testigos sanos que fueron plantas de *F. vesca variedad semperflorens* Alpina, *F. virginiana* UC-12 y *F. vesca* UC-5 provenientes del *stock* de plantas indicadoras del Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) del INTA.

### **Ensayos a campo**

Se llevaron a cabo dos ensayos a campo: en otoño de 2009 y 2010 en un suelo franco arcilloso (pH 6,5) en la Estación Experimental INTA Famaillá, Tucumán (27° S), región que posee un clima subtropical. Las camas de plantación de 0,30 m de alto, 0,50 m de ancho y 1,20 m entre centros se construyeron mecánicamente.

Sobre esas camas se colocaron tubos de riego por goteo y, finalmente se las cubrió con polietileno negro (Figura 4.1). La distancia entre hileras fue de 0,23 m y la distancia entre plantas en la hilera, de 0,35 m. La fertilización antes de la siembra consistió en 48 kg/ha de N y 123 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Además N (144 kg/ha) y K (303 kg/ha K<sub>2</sub>O), como también P (57 kg/ha P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), Ca (125 kg/ha CaO) y Mg (25,5 kg/ha MgO) se aplicó dos veces por semana durante la temporada de cultivo a través del sistema de riego por goteo. El riego se realizó tres o cuatro veces por semana. Se aplicó aficída según protocolo establecido para su control.



Figura 4.1: Plantas de frutilla infectadas con SMYEV y sanas, pertenecientes al ensayo I, realizados en la estación experimental de INTA Famaillá, provincia de Tucumán, año 2009.

### Ensayo I (ciclo de cultivo 2009)

Al final de la temporada de producción de frutilla en diciembre de 2008, se recogieron muestras de hojas de un grupo de 51 plantas asintomáticas del cv. Camarosa. La detección de virus se efectuó mediante varios métodos:

- 1) Al comienzo y final de cada ensayo, las plantas fueron probadas para ArMV, ToRSV, TBRV, TNV, SLRSV, RPRSV y ApMV, mediante DAS- ELISA con antisueros comercial específicos (BIOREBA SRL Latin América).
- 2) SCV por RT-PCR anidada.
- 3) SMoV y *Strawberry vein banding virus* (SVBV) por RT-PCR, con iniciadores específicos (Posthuma *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2007).

De 51 plantas, 36 estaban infectadas con SMYEV y 15 libres de virus. Éstas fueron etiquetadas y mantenidas en el campo durante todo el verano para la producción de estolones (plantines hijos), con el objeto de aumentar el número de plantas sanas e infectadas para el desarrollo del ensayo. Los plantines hijos fueron enraizados individualmente en macetas de plástico, manteniendo la identidad clonal.

Cuando se implantó el ensayo se usaron un total de 215 plantas, 167 enfermas y 48 sanas en un diseño experimental completamente aleatorizado. El ensayo fue implantado el 4 de mayo de 2009 y SMYEV fue evaluado mediante DAS-ELISA en tres momentos durante el desarrollo del cultivo: el 8 de junio, (floración); el 24 de agosto, (después de la primera cosecha) y el 13 de noviembre, (después del final de la cosecha). Los frutos se cosecharon semanalmente desde el 1 de julio, y se finalizando el 13 de noviembre, en los meses de mayor producción se realizaron dos cosechas por semana.

### **Ensayo II (ciclo de cultivo 2010)**

Plantas de vivero libres de virus fueron plantadas el 11 de mayo en el campo experimental de la EEA Famaillá, Tucumán. Cuando estuvieron crecidas se identificaron las infectadas con SMYEV (27) y las sanas (44) usando DAS ELISA con antisuero comercial para SMYEV (BIOREBA SRL, Latin América) (Figura 4.2). Las plantas seleccionadas fueron probadas serológicamente y molecularmente para otros virus citados en frutilla, como se describió anteriormente en el ensayo I. El diseño fue completamente aleatorizado. SMYEV fue evaluado el 15 de junio (floración), el 10 de agosto (después de la primera cosecha), y el 25 de noviembre, (al final de la cosecha de frutos). La cosecha de frutos comenzó el 5 de septiembre y finalizó el 25 de noviembre.



Figura 4.2. Plantas de frutilla infectadas con SMYEV y sanas correspondientes al ensayo II, 2010.

## **Componentes de rendimiento**

En los ensayos I y II se evaluaron por separado los componentes de rendimiento de cada planta. Se cosecharon los frutos una o dos veces por semana y se registraron los datos de: peso total de frutos, número total de frutos, peso de frutos comerciales (fruto  $\geq 10$  g), número frutos comerciales, número de frutos deformes y número de frutos podridos.

## **Análisis estadístico**

Cada uno de los valores obtenidos de los componentes de rendimiento se calculó como suma del número y peso de frutos medidos cada semana, durante todos los meses que duró la cosecha de frutilla. Estos valores se relacionaron con los de absorbancia obtenidos de cada planta infectada con el virus en distintos momentos del ciclo del cultivo. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA para comparar los tratamientos de la planta (enferma o sana). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico *InfoStat* (DiRienzo *et al.*, 2013).

Con los valores de absorbancia del virus, obtenidos de cada planta, se calculó la mediana para hacer los análisis de correlación y por categoría de la siguiente manera:

- Se evaluó el nivel de correlación de *Pearson* entre la concentración de virus de cada planta y las componentes del rendimiento. Se correlacionaron con la absorbancia máxima, mediana, y acumulada de cada planta.
- Se hizo además una categorización de la concentración de SMYEV en la cual se dividieron las plantas en función de los valores de absorbancia A: alto, M: medio B: bajo. Se realizó un ANOVA con cada uno de los componentes del rendimiento evaluados y una prueba *a posteriori* de comparaciones múltiples LSD *Fisher's*.

## **RESULTADOS**

### **Ensayo I (ciclo de cultivo 2009)**

El número total de frutos y el peso de los mismos fue 28% y 36% inferior, respectivamente, en plantas enfermas respecto a plantas sanas. Las plantas enfermas, además, dieron un 38% menos de frutos comerciales que pesaron 40% menos que los producidos por las plantas sanas.

El número y peso de frutos deformes y podridos no fue estadísticamente diferente entre los tratamientos (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Ensayo I (2009). Efecto de SMYEV en el número de frutos comerciales, peso de frutos comercial, número total de frutos, peso total de frutos y número de frutos deformes y podridos en plantas de frutilla.

Componentes del rendimiento	Número de fruto comercial por planta	Peso de fruto comercial (g/planta)	Número de fruto total por planta	Peso de fruto total (g/planta)	Número de fruto deforme por planta	Número de fruto podrido por planta
Tratamiento						
Plantas enfermas (n=167)	5,15	70,28	18,31	133,11	2,80	1,24
Plantas sanas (n=48)	8,38	117,77	25,44	207,35	2,67	1,33
	*	*	*	*	ns	ns

Diferencias significativas (\*) y no significativas (ns) dentro de cada columna y en cada ensayo.

El coeficiente de *Pearson* fue significativo para todos los componentes de rendimiento evaluados, a excepción de número de frutos podridos. Esta correlación fue negativa, lo cual indica que a medida que la concentración de virus aumenta el rendimiento de la planta disminuye (Tabla 4.2). Por otra parte, cuando se correlacionaron los componentes de rendimiento con el valor acumulado y máximo de absorbancia no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 4.2. Análisis de correlación (coeficiente de *Pearson*) entre las componentes del rendimiento obtenidas de plantas enfermas al final del ciclo de cultivo y los valores de la mediana de absorbancia viral, ensayo I (2009).

Componentes del rendimiento	Número de frutos es por planta	Peso de frutos comerciales (g/planta)	Número total de frutos por planta	Peso de total frutos (g/planta)	Número de frutos deformes por planta	Número de frutos podridos por planta
Estadístico						
Coefficiente <i>Pearson</i>	-0,27	-0,27	-0,29	-0,31	-0,19	-0,14
Significancia	0,0005	0,0005	0,0001	0,0001	0,014	0,073

Cuando las plantas enfermas del ensayo fueron separadas en categorías (alta, media y baja) según la concentración de virus (valores de absorbancia), se detectó que todos los componentes de rendimiento fueron significativamente mayores en las plantas con bajos valores de absorbancia, a excepción de número de frutos podridos (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Efecto de la concentración del virus en componentes del rendimiento de plantas infectadas según categorías de medianas de concentración de virus (absorbancia), ensayo I (2009).

Componentes del rendimiento	Número de frutos comerciales por planta	Peso de frutos comerciales (g/planta)	Número de total frutos por planta	Peso total de frutos (g/planta)	Número de frutos deformes por planta	Número de frutos podridos por planta
<b>Categorías</b>						
Alto (2.22 – 4.00)	3,59a	47,77a	14,23a	95,71 <sup>a</sup>	2,14a	1,07a
Medio (1.72 - 2.21)	4,56a	61,33a	16,35a	118,16 <sup>a</sup>	2,49a	0,98a
Bajo (0.29 - 1.71)	7,33b	102,15b	24,42b	186,13b	3,78b	1,67b
Probabilidad	0,0014	0,0012	0,0003	0,0002	0,0030	0,0463

Letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas entre categorías según prueba de LSD Fisher ( $p \leq 0.005$ ).

### Ensayo II (ciclo de cultivo 2010)

De las 44 plantas sanas plantadas 17 se infectaron con SMYEV durante el ensayo, por lo cual éstas fueron incluidas en el tratamiento “plantas enfermas”. Las plantas que se contaminaron con otros virus fueron eliminadas.

En este estudio no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de los componentes de rendimiento evaluados (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Valores promedio obtenidos de las componentes del rendimiento ensayo II (2010).

Componentes de rendimiento	Número de frutos comerciales por planta	Peso de frutos comerciales (g/planta)	Número total de frutos por planta	Peso total de frutos (g/planta)	Número de frutos deformes por planta	Número de frutos podridos por planta
<b>Tratamiento</b>						
Plantas enfermas (n=40)	15,63	241,50	39,03	329,93	4,25	2,90
Plantas sanas (n=27)	13,93	229,96	45,44	326,78	3,48	2,44

En este ensayo no se detectaron valores significativos de correlación entre las componentes del rendimiento y los valores acumulados, máximo y mediana de absorbancia (Tabla 4.5), ni tampoco por categorías de plantas según los valores de concentración viral (absorbancia) (Tabla 4.6).

Tabla 4.5. Análisis de correlación (coeficiente de *Pearson*) entre las componentes del rendimiento obtenidas de plantas enfermas al final del ciclo de cultivo y los valores de la mediana de absorbancia viral, ensayo II (2010).

Componentes del rendimiento	Número de frutos comerciales por planta	Peso de frutos comerciales (g/planta)	Número total de frutos por planta	Peso total de frutos por planta(g/planta)	Número de frutos deformes por planta	Número de frutos podridos por planta
Estadístico						
Coefficiente <i>Pearson</i>	-0,11	-0,24	-0,18	-0,29	0,18	-0,10
Significancia	0,50	0,13	0,26	0,06	0,27	0,54

Tabla 4.6. Efecto de la concentración del virus en componentes del rendimiento de plantas infectadas según categorías de las medianas de concentración de virus (absorbancia), ensayo II (2010).

Componentes del rendimiento	Número de frutos comerciales por planta	Peso de frutos comerciales (g/planta)	Número total de frutos por planta	Peso total de frutos (g/planta)	Número de frutos deformes por planta	Número de frutos podridos por planta
Categorías						
Alto (2.08 - 3.10)	2,22a	228,77a	37,31a	311,77 <sup>a</sup>	5,38a	3,08a
Medio (0.64 - 2.07)	2,22a	210,46a	34,15a	282 <sup>a</sup>	3,92a	2,15a
Bajo (0.03 - 0.63)	2,14a	282,14a	45,14a	391,29 <sup>a</sup>	3,50a	3,43a
Probabilidad	0,5	0,3	0,3	0,18	0,7	0,3

Letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas entre categorías según prueba de LSD Fisher ( $p \leq 0.005$ ).

## DISCUSIÓN

Los ensayos realizados en este trabajo dieron resultados diferentes. En un caso (ensayo I) se determinó una importante disminución de los rendimientos relacionada a la presencia de SMYEV, en cambio, no ocurrió lo mismo en el ensayo II. Es importante destacar que, en el primer ensayo, las plantas enfermas se habían detectado durante el año 2008, y luego fueron multiplicadas vegetativamente por estolones y usadas en el ensayo del año siguiente (2009). En cambio en el ensayo II las plantas provenientes de plantines de viveros fueron plantadas y directamente sobre ellas se hizo la evaluación. Muchas de ellas se habían infectado recientemente, ya que se enfermaron y evaluaron ese mismo año. Un alto porcentaje de las plantas sanas se infectaron con SMYEV después de comenzado el ensayo II (17 plantas). En otros trabajos también ha sido reportado que la infección reciente no afecta los rendimientos en los primeros ciclos de cultivo, sino que los efectos de la presencia del virus se hacen notables en los ciclos sucesivos. Conci *et al.* (2003)

reportaron que cuando las plantas de ajo son infectadas con virus hay una progresiva pérdida del peso de los bulbos de plantas de ajo a través de los sucesivos ciclos de cultivo (Conci *et al.*, 2003). Lot *et al.* (1998), también observaron pérdidas mayores en la producción de ajo cuando las plantas habían pasado por más de un ciclo de cultivo de infección, con respecto a las plantas recientemente infectadas (Lot *et al.*, 1998).

En el ensayo I nuestros resultados indicaron que las plantas de frutilla infectadas con SMYEV durante el ciclo de cultivo anterior (2008) mostraron una importante disminución en los rendimientos con respecto a las plantas sanas, a pesar de ser asintomáticas, llegando en algunos casos a más de 40% de reducción en el peso de frutos comerciales. Esto no coincide con lo reportado por Barritt y Loo, (1973) quienes informaron que plantas de frutilla con infección simple de SMYEV, o SMoV, no manifiestan efectos significativos sobre el rendimiento. Cabe aclarar que en los ensayos llevados a cabo por estos autores se utilizaron plantas libres de virus que fueron injertadas con plantas infectadas con SMYEV y luego multiplicadas para obtener estolones que se plantaron en el ensayo a campo, mientras que, las del ensayo I de nuestro trabajo provenían de plantas infectadas naturalmente y probablemente desde mucho más tiempo. El momento de la infección podría jugar un rol importante ya que no es lo mismo el uso de plantines de frutilla que provienen de madres infectadas (nuestro ensayo), que el de plantines que han sido infectados artificialmente con el virus durante su periodo de crecimiento. Los resultados de Barritt y Loo (1973) son coincidentes con los del ensayo II, en el cual las plantas se infectaron en alto porcentaje durante el mismo ciclo de cultivo. Un estudio llevado a cabo con otro virus que afecta la frutilla (SCV) permitió establecer que no hubo diferencias significativas en el primer año pero sí en el segundo y tercer año de ensayo a campo con respecto al control sano (Babovic, 1976), coincidiendo con los resultados observados en este trabajo para SMYEV.

Los resultados del ensayo I demostraron que la ausencia de síntomas en una planta infectada no significa falta de efecto en el rendimiento del cultivo. Esto coincide con lo dicho por otros autores en batata (Gibson *et al.*, 1997), papa (Hane and Hamm, 1999), y en flores como la petunia (Liu *et al.*, 2003) y lirios (Chinestra *et al.*, 2010).

En el ensayo I, se observó que la infección por SMYEV en el cv. Camarosa, a pesar de ser asintomática, afectó significativamente los rendimientos produciendo un 28% menos de frutos totales y 36% menos pesadas, el efecto que fue más notable cuando se evaluaron número y peso de frutos comerciales (38 y 40% respectivamente).

Además, se detectó una correlación entre concentración viral y producción. El rendimiento fue mayor en plantas con bajos valores de absorbancia de virus (Tabla 3), lo que sugiere una relación entre la cantidad de inóculo viral y este atributo como ha sido mencionado en cultivos infectados por otros virus en frutilla (Barritt & Loo, 1973), frambuesa (Martin *et al.*, 2013), arveja (Coutts *et al.*, 2009) y tomate (Ramkat *et al.*, 2008).

A pesar de que en el Ensayo II las diferencias no fueron estadísticamente significativas, cuando los efectos del virus se analizaron por intervalos de concentración, se observó que el número de frutos totales y comerciales, y la producción total de fruta fueron los más bajos cuando la concentración viral fue la alta y media (Tabla 4.6)

La infección secundaria del virus fue diferente entre los ensayos realizados en los años 2009 y 2010. En el primer año no hubo infección de plantas sanas, en cambio, en el segundo año, el rango de infección con SMYEV llegó al 43% mientras que el porcentaje de las plantas enfermas que se infectaron con otro virus fue del 17%. Como SMYEV es transmitido por áfidos al igual que SCV y SMoV (Krczal, 1982) es probable que la aparición de los áfidos haya ocurrido durante el ensayo, ya que antes de la siembra las plantas fueron analizadas y eran negativas para el virus. Este elevado nivel de infección podría estar relacionado con una alta población de áfidos durante el año 2010. Se conoce que el vector de SMYEV, *C. fragaefolii*, reportado en Argentina (Nome & Yossen, 1980; Delfino *et al.*, 2007; Cédola & Greco, 2010), tiene una aparición esporádica (Cédola & Greco, 2010). Hay trabajos que indican que la fluctuación de áfidos puede variar tanto estacional como localmente (Carrera & Cermeli, 2001), por lo que la dispersión del virus está determinada por la dinámica poblacional del vector. También deben considerarse otros factores como la presencia de fuentes de infección, las razas de los patógenos y el comportamiento de los cultivares con los que se trabaja (Niño *et al.*, 2001).

En este trabajo se demostró por primera vez el efecto de la infección de SMYEV en la producción de los frutos de plantas con infección simple (plantas asintomáticas) en frutilla cv. Camarosa. Esto fue evaluado en la principal región productora de Argentina, demostrando la necesidad de analizar las plantas para detectar si realmente están libres de virus, ya que en el caso de frutilla los virus usualmente no dan síntomas en infecciones simples. También se determinaron las pérdidas de rendimiento en plantas infectadas y asintomáticas. Esta situación sería más riesgosa para los cultivos de frutillas en las regiones donde está presente el pulgón fresa (*C. fragaefolii*), ya que podría producirse una propagación silenciosa de la enfermedad, con impactos negativos para la industria de la

frutilla. Camarosa, junto con el cv. Candonga (también llamado Sabrosa), es considerado el más favorable para el desarrollo de *C. fragaefolii*, como lo demuestra un estudio llevado a cabo en Brasil con varios cultivares de frutilla (Bernardi *et al.*, 2012). En consecuencia, estos dos cultivares no deben sembrarse en regiones donde la presencia del vector podría implicar un riesgo, y otros cultivares deben ser evaluados cuidadosamente en términos de susceptibilidad del virus antes de ser introducidos.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir:

- ✓ Se detectó una importante disminución en los rendimientos de plantas de frutillas asintomáticas infectadas con SMYEV.
- ✓ En el ensayo I, el SMYEV produjo reducciones significativas en el número y peso de frutos totales (hasta 28% menos en el número de frutos y 36% en peso de frutos) y de frutos comerciales (hasta 38% menos en el número de frutos y 40% en peso de frutos) en las plantas infectadas.
- ✓ En el ensayo I existió correlación directa entre concentración del SMYEV en la planta y el rendimiento, en casi todas las componentes de rendimiento evaluadas. Las correlaciones efectuadas entre la concentración viral y el peso y número de fruto comercial y total y el número de fruto deforme por planta fueron negativas y significativas.
- ✓ En el ensayo I, se determinó que la categoría alta y media concentración del virus en la planta disminuye significativamente el valor de cada una de las componentes del rendimiento.
- ✓ Se detectó que plantas recientemente infectadas no manifiestan significativas reducciones en el rendimiento (ensayo II, 2010). Por otra parte, cuando las infecciones ocurrieron varios ciclos de cultivo previos los efectos en el rendimiento fueron considerables (ensayo I, 2009).
- ✓ En el ensayo II, se determinó que la categoría alta y media concentración del virus en la planta disminuye, aunque no significativamente, el valor de cada una de las componentes del rendimiento.

## CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Las diferentes variedades comerciales de frutilla son propagadas vegetativamente lo que asegura la perpetuación de patógenos sistémicos como los virus. Además, están expuestas a nuevas infecciones debido a la presencia de los vectores naturales de virus (áfidos, moscas blancas, nematodos, etc.) durante las diferentes etapas de crecimiento y hasta la producción de frutos. Las plantas pueden estar afectadas por una o varias especies de virus, en infecciones simples, que en general no producen síntomas, o en infecciones mixtas en cuyo caso los síntomas son muy notables. Antes de comenzar este trabajo había sido citado en nuestro país un solo virus de frutilla (SMoV) en el año 1980.

En los últimos años, Argentina, aumentó la superficie de cultivo de frutilla y con ello la importación de plantines para multiplicar y distribuir a las distintas regiones productoras, incrementando así los riesgos de entrada de nuevos patógenos al país. Como consecuencia de ello, en 2009, se reportó por primera vez en Argentina el virus *Strawberry mild yellow edge* (SMYEV) dando lugar al desarrollo de este trabajo de tesis.

Ampliar los conocimientos respecto a las virosis que afectan al cultivo, permitirá un mejor manejo de la enfermedad (complejo viral).

Se calibró la detección molecular del SMYEV desde su hospedante natural mediante RT-PCR, RT-PCR multiplex e IC-RT-PCR. El bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) con modificaciones, resultó el método de rutina más adecuado para la extracción de ácido nucleico viral directamente desde frutilla.

En este trabajo se detectaron alteraciones citopatológicas en la planta en presencia de SMYEV en infecciones simples y mixtas. En la primera, se observó presencia de partículas virales formando agregados y proliferación de vesículas en el citoplasma de la célula. En el caso de infecciones mixtas de SMYEV con SLRSV, se determinó proliferación de membranas en el citoplasma de las células y, en el cloroplasto, acumulación de granos de almidón y desorden en granas y tilacoides. En ambos tipos de infección las mitocondrias fueron afectadas con espacios vacíos en su interior. Así los resultados obtenidos muestran un fenotipo de vesiculización que podría estar asociado a un mecanismo de inmunidad de la planta contra la invasión del patógeno viral, pero también a la adaptación del virus para evadir el mecanismo o explotarlo en su beneficio y sobrevivir en su hospedante. En esta línea de trabajo, se podrían profundizar los estudios respecto a la

vesiculización observada y la forma en que los virus sobreviven a los mecanismos de defensa de la planta.

Se determinó por primera vez para Argentina la secuencia completa de un aislamiento de SMYEV, constituyendo esta la tercera cita completa del virus a nivel mundial (las anteriores son de Alemania y USA) y la primera para Argentina y Latinoamérica. Al comparar la secuencia de nucleótidos de los genes que componen el virus con los genes de las dos secuencias completas publicadas en el *GenBank*, se obtuvieron valores de identidad dentro del rango establecido para la especie (87 a 96,7%) y, filogenéticamente, el aislamiento de Argentina fue más cercano al aislamiento de Alemania, considerando que sólo existen 2 secuencias completas del virus en el *GenBank*, una de Estados Unidos y otra de Alemania. Esto es llamativo ya que el mayor ingreso de material de propagación proviene de Estados Unidos.

Con el propósito de conocer la variabilidad existente en el país, se compararon la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la cápside proteica (CP) del virus de 12 aislamientos argentinos con todos los publicados en el *GenBank*. Los estudios mostraron un porcentaje de identidad que varió entre 81,3 a 99% de nucleótidos y de 86,4 a 100% de aminoácidos deducidos. En base al análisis y la topología del árbol filogenético, se detectaron cuatro grupos bien definidos que tendieron a mostrar una distribución por origen geográfico. Los aislamientos argentinos revelaron ser diversos, ya que se distribuyeron en todos los subgrupos. Entre subgrupos los valores de diversidad fueron altos. Dentro de cada subgrupo, el IV obtuvo el valor más alto de diversidad mientras que I, II, III acusaron los valores más bajos. Sin embargo, se pudo determinar que los cambios sinónimos, los cuales no producen alteraciones de los aminoácidos, fueron siempre mayores a los no sinónimos. El análisis de recombinación que se realizó con todos los aislamientos permitió detectar dos recombinantes del virus, el primero entre dos aislamientos de Argentina, y el segundo recombinante formado por la secuencia parental mayor de Chile y una secuencia parental menor desconocida. Esta información confirma la variabilidad intraespecífica en las secuencias de SMYEV y la aparición de aislamientos recombinantes generadores de variantes del virus.

La aplicación eficiente de cualquier programa de manejo de enfermedades requiere información puntual y precisa sobre el impacto de la enfermedad en el cultivo. Esto incluye relevar la importancia del patógeno en las zonas de producción: incidencia y

prevalencia del patógeno y evaluación del efecto del virus en el rendimiento de frutos de plantas asintomáticas.

Se determinó la incidencia y prevalencia del virus en las regiones productoras de frutilla, durante dos años de cultivo. Se detectó SMYEV en las tres regiones productoras estudiadas (Lules, Bella Vista y Coronda) con porcentajes de prevalencia entre 59% y 90% y de incidencia entre 4% y 20%. Se determinó la presencia del patógeno en porcentajes que variaron entre 33% y 50% de prevalencia y 3% y 13% de incidencia en los viveros donde se multiplican los plantines.

Por primera vez se realizó un estudio para evaluar el daño del virus en la producción de frutos en plantas con infecciones simples (plantas asintomáticas). Las plantas infectadas con SMYEV produjeron estadísticamente menos frutos que las plantas sanas. En el primer año de ensayo se estableció que las plantas infectadas produjeron 28% menos de frutos totales que las plantas sanas y pesaron 36% menos. Las plantas enfermas, además, dieron un 38% menos de frutos comerciales que pesaron 40% menos que los producidos por las plantas sanas. Sin embargo, En el segundo año de ensayo en las nuevas plantas evaluadas, no se observaron diferencias significativas en el rendimiento de plantas infectadas con el virus respecto a las sanas. Sin embargo, cuando los efectos del virus se analizaron por intervalos de concentraciones, se observó que el número de frutos totales y comerciales, y la producción total de fruta fueron más bajos cuando la concentración viral fue más alta. Este es un dato muy importante, ya que un método muy utilizado para el manejo de virosis en cultivos de propagación agámica, es el uso de plantas libres de virus. Las plantas libres de virus una vez que se sacan a campo, generalmente se recontaminan de forma inmediata con virus, debido a la presencia de vectores y la cercanía de cultivos comerciales infectados. Conocer que las plantas recientemente infectadas no disminuyen su rendimiento tan marcadamente como las crónicamente enfermas, es un dato epidemiológico importante a considerar para el manejo de la enfermedad. Esto abre la puerta a nuevos estudios para evaluar la caída en los rendimientos de plantas libres de virus sacadas a campo.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten ampliar el rango de conocimiento sobre este virus y sobre la problemática de virus de frutilla en Argentina. Los resultados de la variabilidad genética brindan información valiosa para futuros estudios de diversidad del SMYEV afectando los cultivos de frutilla, y se desprende la necesidad de realizar evaluaciones biológicas del virus que incluyan su rango de hospedantes, eficiencia de

transmisión por áfidos, evaluación de posibles variantes virales y probables sinergismos con otros virus. Los resultados mencionados en relación a la distribución y propagación del virus son un desafío importante en cuanto a las medidas cuarentenarias que deberían ser adoptadas por los organismos fiscalizadores para evitar la introducción de virus al país. La evaluación de la presencia del SMYEV en los diferentes cultivares puede ser un importante aporte a los planes de mejoramiento para tratar de detectar cultivares con respuesta diferencial a SMYEV.

Es de fundamental importancia considerar que este trabajo está enmarcado en el desarrollo de los temas de investigación llevados adelante por el grupo de trabajo del cual formo parte y donde se contempla una gran diversidad temática respecto a la problemática del complejo viral que afecta al cultivo de frutilla en Argentina. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta Tesis, son un aporte más a los resultados logrados hasta el presente en el grupo de trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, O. & Ali, A. (2012).** Genetic diversity in the 3'-terminal region of papaya ringspot virus (PRSV-W) isolates from watermelon in Oklahoma. *Arch Virol* **157**, 405–412.
- Adlercreutz, E. (2013).** *Evaluación de variedades de frutilla de día neutro en el cinturón hortícola de Mar del Plata (2011/2012)*. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Agüero, J. J., Salazar, S. M., Kirschbaum, D. S. & Contini, A. (2012).** Cultivares de frutilla adecuadas al uso de residuos de cosecha de caña de azúcar como acolchado alternativo al plástico. *Hortic Argentina* **31**, 5–10.
- Allison, A. V. & Shalla, T. A. (1974).** The ultrastructure of local lesions induced by Potato virus X: a sequence of cytological events in the course of infection. *Phytopathology* **64**, 784–793.
- Asinari, F., Cafrune, E. E., Torrico, A. K. & Conci, V. C. (2013).** Avances en la caracterización molecular de un aislamiento argentino de Strawberry mottle virus en frutilla. In *XXXVI Congr Argentino Hortic y II Congr Int Plásticos Agrícolas*. Tucumán, Argentina.
- Babovic, M. V. (1976).** Changes in the yield and quality of strawberry fruits infected by Strawberry crinkle virus. *Acta Hortic* **66**, 25–28. Heidelberg, Germany.
- Balasubramanian, V. & Selvarajan, R. (2014).** Genetic diversity and recombination analysis in the coat protein gene of Banana bract mosaic virus. *Virus Genes* **48**, 509–517.
- Bancroft, J. B., Rouleau, M., Johnston, R., Prins, L. & Mackie, G. A. (1987).** The entire nucleotide sequence of foxtail mosaic virus RNA. *J Gen Virol* **72**, 2173–2181.
- Barritt, B. H. & Loo, H. Y. S. (1973).** Effects of mottle, crinkle, and mild yellow-edge viruses on growth and yield of Hood and Northwest strawberries. *Can J Plant Sci* **53**, 605–607.
- Bernardi, D., Garcia-Silveira, M., Botton, M. & Nava, D. (2012).** Biology and fertility life table of the green aphid *Chaetosiphon fragaefolli* on strawberry cultivars. *J Insect Sci* **12**, 1–8.
- Biswas, K., Tarafdar, A., Diwedi, S. & Lee, R. (2012).** Distribution, genetic diversity and recombination analysis of Citrus tristeza virus of India. *Virus Genes* **45**, 139–148.
- Biswas, M. K., Hossain, M., Ahmed, M. B., Roy, U. K., Karim, R., Razvy, M. A., Salahin, M. & Islam, R. (2007).** Multiple Shoots Regeneration of Strawberry under Various Colour Illuminations. *Am J Sci Res* **2**, 133–135.
- Bolton, A. T. (1974).** Effects of three virus diseases and their combinations on fruit yield of strawberries. *Can J Plant Sci* **54**, 271–275.

- Bonnet, J., Fraile, A., Sacristán, S., Malpica, J. M. & García-Arenal, F. (2005).** Role of recombination in the evolution of natural populations of Cucumber mosaic virus, a tripartite RNA plant virus. *Virology* **332**, 359–368.
- Bratlie, M. S. & Drabløs, F. (2005).** Bioinformatic mapping of AlkB homology domains in viruses. *BMC Genomics* **6**, 1–15.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. & Zurcher, E. J. (1996).** Plant Viruses Online Descriptions and Lists from the VIDE Database Strawberry mild yellow edge-associated potexvirus. *Plant Viruses Online* (A. A. Brunt, K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson & E. J. Zurcher, Eds.).
- Cabrera, M., Toro, M., Munoz, M., Flores, R., Baldera, M., Bustos, A., Lopez, L. & Martin, R. R. (2005).** Survey of strawberry viruses in *Fragaria x ananassa* and *Fragaria chiloensis* in the VIII region. *Fitopatologia* **40**, 148.
- Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E. T., Sit, T. L. & Lommel, S. A. (2001).** The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 419–460.
- Carpenter, C. D., Oh, J. W., Zhang, C. & Simon, A. E. (1995).** Involvement of a stem-loop structure in the location of junction sites in viral RNA recombination. *J Mol Biol* **245**, 608–622.
- Carrera, A. & Cermeli, M. (2001).** Fluctuación e identificación de áfidos en tres localidades productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el estado Monagas , durante los años 1987 - 1990. *Entomotrópica* **16**, 67–72.
- Cédola, C. & Greco, N. (2010).** Presence of the aphid, *Chaetosiphon fragaefolii*, on strawberry in Argentina. *J Insect Sci* **10**, 1–9.
- Chang, L., Zhang, Z., Yang, H., Li, H. & Dai, H. (2007).** Detection of strawberry RNA and DNA viruses by RT-PCR using total nucleic acid as a template. *J Phytopathol* **155**, 431–436.
- Chare, E. R. & Holmes, E. C. (2006).** A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Arch Virol* **151**, 933–946.
- Chaves-Bedoya, G. & Ortiz-Rojas, L. (2011).** Ingeniería genética vegetal para resistencia viral y vectores virales en genética reversa Plant genetic engineering for viral resistance and viral vectors in reverse genetics. *Orinoquia* **15**, 148–159.
- Chinestra, S. C., Facchinetti, C., Curvetto, N. R. & Marinangeli, P. A. (2010).** Detection and Frequency of Lily Viruses in Argentina. *Plant Dis* **94**, 1188–1194.
- Chinnaraja, C., Viswanathan, R., Karuppaiah, R., Bagyalakshmi, K., Malathi, P. & Parameswari, B. (2013).** Complete genome characterization of Sugarcane yellow leaf virus from India: Evidence for RNA recombination. *Eur J Plant Pathol* **135**, 335–349.

- Cho, J. D., Kim, J. S., Lee, S. H., Chung, B. N. & Choi, G. S. (2011).** Strawberry mild yellow edge potexvirus from Strawberry in Korea. *Plant Pathol J* **27**, 187–190.
- Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977).** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* **34**, 475–483.
- Conci, V. C., Canavelli, A., Lunello, P., Di Rienzo, J. A., Nome, S. F., Zumelzu, G. & Italia, R. (2003).** Yield Losses Associated with Virus-Infected Garlic Plants During Five Successive Years. *Plant Dis* **87**, 1411–1415.
- Conci, V. C., Torrico, A. K., Cafrune, E. E., Quevedo, V., Bains, O., Ramallo, J. C., Borquez, A. M., Mollinedo, V. A., Agüero, J. J. & Kirschbaum, D. S. (2009).** First report of Strawberry mild yellow edge virus in Argentina. *Acta Horti* **842**, 303–306.
- Converse, R. H. (1987).** Virus diseases of small fruits. In *Agric Handb No 631*, p. 277. Edited by R. H. Converse. Washington, USA: United States Department of Agriculture.
- Converse, R. H., Adams, A. N., Barbara, D. J., Clark, M. F., Casper, R., Hepp, R. F., Martin, R. R., Morris, T. J., Spiegel, S. & Yoshikawa, N. (1988).** Laboratory detection of viruses and mycoplasma-like organisms in strawberry. *Plant Dis* **72**, 744–749.
- Coutts, B. A., Prince, R. T. & Jones, R. A. C. (2009).** Quantifying effects of seedborne inoculum on virus spread, yield losses, and seed infection in the pea seed-borne mosaic virus-field pea pathosystem. *Phytopathology* **99**, 1156–67.
- Delfino, M., Conci, V. C. & Dughetti, A. C. (2007).** Áfidos transmisores de virus de frutilla en la Argentina. In *XXX Congr Argentino Horti*, p. 106. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Deretic, V. & Levine, B. (2009).** Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. *Cell Host Microbe* **5**, 527–549. Elsevier Ltd.
- DiRienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. (2013).** InfoStat versión 2013. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Duffy, S., Shackelton, L. & Holmes, E. C. (2008).** Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* **9**, 267–76.
- Dulic-Markovic, I., Rankovic, M. & Converse, R. H. (1998).** Occurrence of strawberry viruses in Yugoslavia. *Acta Horti* **471**, 35–38.
- El-gaied, L. F., Salama, M. I., Salem, A. M., El-deen, A. F. & Abdallah, A. N. (2008).** Molecular and serological studies on a plant virus affecting strawberry. *Biochemistry* **11**, 303–314.

- EPPO/CABI. (1996).** Strawberry mild yellow edge disease. In *Quar Pests Eur*, 2da edn., p. 1440. Edited by I. M. Smith, D. G. McNamara, P. R. Scott & M. Holderness. Wallingford, UK.
- FAO. (2012).** Base de datos estadística. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>.
- FERA. (2008).** *STRAWBERRIES PHPS 5 Special requeriments for strawberry plants to qualify as nuclear stock STRAWBERRIES*. The Food And Environment research Agency. UK.
- FERA. (2013).** *PHPS Explanatory Leaflet for Strawberry*. The Food And Environment research Agency. UK.
- Finstad, K. & Martin, R. R. (1995).** Transformation of strawberry for virus resistance. *Acta Hortic VII*, 86–90.
- FPS. (2008).** *Guide to the Strawberry Clean Plant Program*. Foundation Plant Services, University of California. USA.
- Francki, R. I., Milne, R. G. & Hatta, T. (1985).** *Atlas of Plant Viruses, Volumen I*, CRC Press. Boca Ratón, Florida.
- Freedman, J. A. & Mellor, F. C. (1962).** Influences of latent viruses on vigor, yield and quality of british sovereign strawberry. *Can J Plant Sci* **68**, 390–392.
- García Arenal, F. & McDonald, B. A. (2003).** An Analysis of the Durability of Resistance to Plant Viruses. *Phytopathology* **93**, 941–952.
- García Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2001).** Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 157–186.
- García Arenal, F., Malpica, J. M. & Fraile, A. (2008).** Análisis de la variabilidad de los virus de plantas. In *Herramientas Biotecnológicas en Fitopatol*, pp. 135–146. Edited by V. Pallas, C. Escobar, P. Rodriguez Palenzuela & J. F. Marcos. Madrid, España.
- Gibson, R. W., Mwangi, R. O. M., Kasule, S., Mpenbe, I. & Carey, E. E. (1997).** Apparent absence of viruses in most symptomless field-grown sweet potato in Uganda. *Ann Appl Biol* **130**, 481–490.
- Hane, D. C. & Hamm, P. B. (1999).** Effects of Seedborne Potato Virus Y Infection in Two Potato Cultivars Expressing Mild Disease Symptoms. *Plant Dis* 105–107.
- Hanzliková-Vašková, D., Špak, J. & Petrzik, K. (2006).** Variability in sequence of Strawberry vein banding virus. *Biol Plant* **50**, 660–666.
- Hasiów-Jaroszewska, B., Kuzniar, A., Peters, S., Leunissen, J. & Pospieszny, H. (2010).** Evidence for RNA recombination between distinct isolates of Pepino mosaic virus. *Acta Biochim Pol* **57**, 385–8.

- Herzog, E., Hemmer, O., Hauser, S., Meyer, G., Bouzoubaa, S. & Fritsch, C. (1998).** Identification of Genes Involved in Replication and Movement of Peanut Clump Virus. *Virology* **248**, 312–322.
- Horne, W. T. (1922).** Strawberry troubles. *Calif Agric Exp Stn Rep* **1921-22**, 122–123.
- Huang, Y., Han, Y. & Chang, Y. (2004).** Critical Residues for GTP Methylation and Formation of the Covalent m<sup>7</sup> GMP-Enzyme Intermediate in the Capping Enzyme Domain of Bamboo Mosaic Virus Critical Residues for GTP Methylation and Formation of the Covalent m<sup>7</sup> GMP-Enzyme Intermediate in the Capp. *J Virol* **78**, 1271–1280.
- Huisman, M. J., Linthorst, J. M., Bol, J. F. & Cornelissen, B. J. C. (1988).** The Complete Nucleotide Sequence of Potato Virus X and Its Homologies at the Amino Acid Level with Various Plus-stranded RNA Viruses. *J Gen Virol* **69**, 1789–1798.
- Hull, R. (2002).** *Matthews' Plant Virology*, 4<sup>a</sup> edn. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Hull, R. (2009).** *Comparative Plant Virology*, 2da edn. Norwich, UK: Academic Press.
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I. & Le Mercier, P. (2011).** ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res* **39**, 576–582.
- Hummer, K. E., Bassil, N. & Njuguna, W. (2011).** Fragaria. In *Wild Crop Relat Genomic Breed Resour Temp Fruits*, Kole, C., p. 247. Edited by Springer-Verlag. Heidelberg, Berlin.
- Inoue Nagata, A. K., De Mello Franco, C., Martin, D. P., Marques Rezende, J. A., Barros Ferreira, G., Silva Dutra, L. & Nagata, T. (2007).** Genome analysis of a severe and a mild isolate of Papaya ringspot virus-type W found in Brazil. *Virus Genes* **35**, 119–27.
- Jaag, H. M. & Nagy, P. D. (2010).** The combined effect of environmental and host factors on the emergence of viral RNA recombinants. *PLoS Pathog* **6**, e1001156.
- Jelkmann, W., Martin, R. R., Lesemann, D. E., Vetten, H. J. & Skelton, F. (1990).** A new potexvirus associated with strawberry mild yellow edge disease. *J Gen Virol* **71**, 1251–1258.
- Jelkmann, W., Maiss, E. & Martin, R. R. (1992).** The nucleotide sequence and genome organization of strawberry mild yellow edge-associated potexvirus. *J Gen Virol* **73**, 475–479.
- Johnson, H. A., Converse, R. H., Amorao, A., Espejo, J. I. & Frazier, N. W. (1984).** Seed transmission of Tobacco streak virus in strawberry. *Plant Dis* **68**, 390–392.
- Kaden-Kreuziger, D., Lamprecht, S., Martin, R. R. & Jelkmann, W. (1995).** Immunocapture polymerase chain reaction assay and elisa for the detection of Strawberry mild yellow edge associated potexvirus. *Acta Horti* **33**–38.

- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B. & Lefkowitz, E. J. (2012).** *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 1ra ed. (A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz, Eds.). San Diego: Elsevier Academic Press.
- Kirschbaum, D. S. (2014, May).** Frutilla: Condiciones del cultivo en el inicio de la cosecha en Tucumán. *INTA*. Tucumán, Argentina.
- Kirschbaum, D. S., Quipildor, L., Borquez, A. M., Yommi, A. & Gonzales, D. (2001).** Earlibrite: Nueva Variedad de Frutilla para Lules. *Horiz Agroaliment* 1–24. Tucumán, Argentina.
- Kitajima, E. W. & Nome, C. F. (1999).** Microscopia electrónica en virología vegetal. In *Métodos para Detect patógenos sistémicos*, pp. 59–87. Edited by D. M. Docampo & S. L. Lenardón.
- Kitajima, E. W., Lin, M. T., Cupertino, F. P. & Costa, C. L. (1977).** Electron Microscopy of Bamboo Mosaic Virus-infected Leaf Tissues. *Phytopath Z* **90**, 180–183.
- Krczal, H. (1982).** Investigations on the biology of the strawberry aphid (*Chaetosiphon fragaefolii*), the most important vector of strawberry viruses in west Germany. *Acta Horti* 63–68.
- Lavandero, B., Rojas, P., Ramirez, C., Salazar, M. & Caligari, P. (2012).** Genetic structure of the aphid, *Chaetosiphon fragaefolii*, and its role as a vector of the Strawberry Yellow Edge Virus to a native strawberry, *Fragaria chiloensis* in Chile. *J Insect Sci* **12**, Disponible en: <http://www.insectscience.org/12>.
- Li, F. & Vierstra, R. D. (2012).** Autophagy: A multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci* **17**, 526–537. Elsevier Ltd.
- Li, H., Dai, H., Zhang, Z., Gao, X., Du, G. & Zhang, X. (2007).** Isolation and Identification of Virus dsRNA from Strawberry Plants. *Agric Sci China* **6** (1), 86–93.
- Li, L. & Yang, H. (2011).** A new chinese isolate of Strawberry mild yellow edge virus from *Fragaria Pentaphylla*. *J Gen Virol* **93**.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009).** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451–1452.
- Liu, H., Sears, J. L. & Morrison, R. H. (2003).** Isolation and Characterization of a Carmo-like Virus from Calibrachoa Plants. *Plant Dis* **87**, 167–171.
- Lot, H., Chovelon, V., Souche, S. & Delecalle, B. (1998).** Effects of Onion Yellow Dwarf and Leek Yellow Stripe Viruses on Symptomatology and Yield Loss of Three French Garlic Cultivars. *Plant Dis* **82**, 1381–1385.
- Maas, J. L. (1998).** *Compendium of Strawberry Diseases*, 2da ed. (J. L. Maas, Ed.). USA: APS Press.

- Martelli, G. P., Adams, M. J., Kreuze, J. F. & Dolja, V. V. (2007).** Family Flexiviridae: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annu Rev Phytopathol* **45**, 73–100.
- Martin, D., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D. & Lefevre, P. (2010).** RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* **26**, 2462–2463.
- Martin, E. M., Cho, J. D., Kim, J. S., Goeke, S. C., Kim, K. S. & Gergerich, R. C. (2004).** Novel cytopathological structures induced by mixed infection of unrelated plant viruses. *Phytopathology* **94**, 111–9.
- Martin, L. W. & Converse, R. H. (1977).** Influence of Recent and Chronic Virus Infections on Strawberry Growth and Yield. *Phytopathology* **67**, 573–575.
- Martin, R. R. (2011).** Viruses and similar disorders on strawberry and raspberry Strawberry Virus Diseases. *Les Journées Hortic.* Saint-Rémi, Québec.
- Martin, R. R. & Tzanetakis, I. E. (2006).** Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Dis* **90**, 384–396.
- Martin, R. R., MacFarlane, S., Sabanadzovic, S., Quito, D., Poudel, B. & Tzanetakis, I. E. (2013).** Viruses and Virus Diseases of Rubus. *Plant Dis* **97**, 168–182.
- Mellow, F. C. & Frazier, N. W. (1970).** Strawberry mottle. In *Viruses Dis Small Fruits Grapevines*, pp. 4–8. Edited by N. W. Frazier. Berkeley, University of California.
- Michaeli, S. & Galili, G. (2014).** Degradation of organelles or specific organelle components via selective autophagy in plant cells. *Int J Mol Sci* **15**, 7624–7638.
- Miglino, R., Druffel, K. L., van Schadewijk, a R. & Pappu, H. R. (2011).** Molecular characterization of allium virus X, a new potexvirus in the family Alphaflexiviridae, infecting ornamental allium. *Arch Virol* **156**, 2113–5.
- MINAGRI. (2011).** El jardín de las frutas finas. *Minist Agric Ganad y Pesca* 81.
- Miserendino, E. (2010).** Posibilidades de producción de frutilla en Bariloche. *Rev Presencia* 16–20. Bariloche; Rio Negro.
- Moisander, J. (2006).** Effect of Micro-propagation on the Health Status of Strawberry Planting Material for Commercial Production of Strawberry Runners for Queensland. *Acta Hortic* **708**, 271–274.
- Molina, N., Giménez, L. & Richieri, C. (2007).** Economía del Sector Hortícola de Corrientes Producción frutillera regional y su relación con la oferta nacional y del MERCOSUR. *EEA Bella Vista - INTA* 57 pp. Bella Vista, Corrientes.
- Morozov, S. Y. & Solovyev, A. G. (2003).** Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J Gen Virol* **84**, 1351–1366.

- Nagy, P. D. & Bujarski, J. J. (1997).** Engineering of homologous recombination hotspots with AU-rich sequences in brome mosaic virus. *J Virol* **71**, 3799–3810.
- Nagy, P. D., Dziañott, A., Ahlquist, P. & Bujarski, J. J. (1995).** Mutations in the helicase-like domain of protein 1a alter the sites of RNA-RNA recombination in brome mosaic virus. *J Virol* **69**, 2547–2556.
- Niño, L., Cermeli, M., Becerra, F. & Flores, M. (2001).** Fluctuación Poblacional de Áfidos Alados en Dos Localidades Productoras de Papa en el Estado Mérida, Venezuela. *Rev Latinoam la Papa* **12**, 57–71.
- Noa Carrazana, J. C., González de León, D. & Silva Rosales, L. (2007).** Molecular characterization of a severe isolate of papaya ringspot virus in Mexico and its relationship with other isolates. *Virus Genes* **35**, 109–117.
- Nome, S. F. & Yossen, V. (1980).** Identificación de virus de frutilla en Argentina. Virus del moteado de la frutilla (Strawberry mottle virus). *Rev Investig Agropecu INTA XV*, 245–258.
- Nunes, C. F., Ferreira, J. L., Nunes Fernandes, M. C., de Souza Breves, S., Leal Generoso, A., Fontes Soares, B. D., Carvalho Dias, M. S., Pasqual, M., Borem, A. & de Almeida Cancado, G. (2011).** An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciência Rural* **41**, 1383–1389.
- Ontivero, M., Arias, M., Diaz Ricci, J., Babot, J., Albornoz, P. & Castagnaro, A. P. (2000).** Analysis of genetic similarities among species of *Fragaria*, *Potentilla*, and *Duchesnea* found in northwest Argentina by using morphological, anatomical, and molecular characters. *Can J Bot* **78**, 547–556.
- Ortego, J. (1997).** Pulgones de la Patagonia Argentina con la descripción de *Aphis intrusa* sp. n. (Homoptera: Aphididae). *Rev la Fac Agron* **102**, 59–80.
- Pagán, I., Córdoba-Sellés, M., Martínez-Priego, L., Fraile, A., Malpica, J. M., Jordá, C. & García-Arenal, F. (2006).** Genetic Structure of the Population of Pepino mosaic virus Infecting Tomato Crops in Spain. *Phytopathology* **96**, 274–279.
- Pedraza, R. O., Motok, J., Tortora, M. L., Salazar, S. M. & Díaz-Ricci, J. C. (2007).** Natural occurrence of *Azospirillum brasiliense* in strawberry plants. *Plant Soil* **295**, 169–178.
- Perotto, M. C., Cafrune, E. E., Torrico, A. K., Nome, C. F., Kirschbaum, D. S. & Conci, V. C. (2010).** Detección de un rhabdovirus en frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.). In *XXXIII Congr Argentino Hortic*, p. 421. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Posthuma, K. I., Adams, A. N., Hong, Y. & Kirby, M. J. (2002).** Detection of Strawberry crinkle virus in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. *Plant Pathol* **51**, 266–274.

- Pramesh, D. & Baranwal, V. K. (2013).** Molecular characterization of coat protein gene of Garlic common latent virus isolates from India: an evidence for distinct phylogeny and recombination. *Virus Genes* **47**, 189–193.
- Ramírez Rodríguez, V. R., Frías, G. & Soriano, M. (2006).** Caracterización de variantes necróticas del virus PVY detectadas en plantas de papa ( *Solanum tuberosum* L. ). *Biológicas* 150–162.
- Ramkat, R. C., Wangai, A. W., Ouma, J. P., Rapando, P. N. & Lelgut, D. K. (2008).** Cropping system influences Tomato spotted wilt virus disease development, thrips population and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Ann Appl Biol* **153**, 373–380.
- Ricaño-rodríguez, J., Zavala-gonzález, M. & Ramírez-lepe, E. (2014).** Silenciamiento génico en plantas: mecanismos moleculares del ARN de interferencia y aplicaciones biotecnológicas. *Rev Fitotec Mex* **37**, 339–350.
- Rivas, E. B., Galleti, S. R., Duarte, L. M. L., Alexandre, M. A. V. & Estelita, M. E. M. (2004).** Cytopathic features induced by Caladium virus X (Potexvirus) in *Caladium bicolor* and *Gomphrena globosa*. *Arq Inst Biol* **71**, 457–464.
- Robinson, M. D. & Murray, T. D. (2013).** Genetic variation of wheat streak mosaic virus in the United States Pacific Northwest. *Phytopathology* **103**, 98–104.
- Rodriguez, G. & Pérez, D. (2013, April).** Cultivo de frutilla: actividad comercial en la Argentina y Tucumán . Gastos de producción estimados en Tucumán , campaña y perspectivas para 2013. *Rep AGROINDUSTRIAL/Estadísticas y márgenes Cultiv Tucuman* 7 pp. Tucumán Argentina.
- Rogers, S. M., Payton, M., Allen, R. W., Melcher, U., Carver, J. & Fletcher, J. (2012).** Method: a single nucleotide polymorphism genotyping method for Wheat streak mosaic virus. *Investig Genet* **3**, 1–11.
- Rojas, P., Almada, R. D., Sandoval, C., Keller, K. E., Martín, R. R. & Caligari, P. D. S. (2012).** Occurrence of aphidborne viruses in southernmost South American populations of *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*. *Plant Pathol* **62**, 428–435.
- Rondon, S. I. & Cantliffe, D. J. (2004).** Chaetosiphon *Fragaefolii* ( Homoptera: Aphididae): A Potential New pest in Florida? *Florida Entomol* **87**, 612–615.
- Rymelska, N., Borodynko, N., Pospieszny, H. & Hasiów-Jaroszewska, B. (2013).** Analysis of the biological and molecular variability of the Polish isolates of Tomato black ring virus (TBRV). *Virus Genes* **47**, 338–46.
- Saccone, K. (2004).** *Caracterización de la zona de Coronda como productora de frutillas*. Subsecretaria de Producción y Medio Ambiente Municipalidad de Coronda. Coronda, Santa Fe.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.

- Santa Cruz, S., Roberts, A. G., Prior, D. A. M., Chapman, S. & Oparka, K. J. (1998).** Cell-to-Cell and Phloem-Mediated Transport of Potato Virus X: The Role of Virions. *Plant Cell* **10**, 495–510.
- Schepetilnikov, M. V., Manske, U., Solovyev, A. G., Zamyatnin, A. A., Schiemann, J. & Morozov, S. Y. (2005).** The hydrophobic segment of Potato virus X TGBp3 is a major determinant of the protein intracellular trafficking. *J Gen Virol* **86**, 2379–2391.
- Sherpa, A. R., Hallan, V., Pathak, P. & Zaidi, A. A. (2007).** Complete nucleotide sequence analysis of Cymbidium mosaic virus Indian isolate: further evidence for natural recombination among potexviruses. *J Biosci* **32**, 663–669.
- Shukla, D. D., Ward, C. W. & Brunt, A. A. (1994).** *The Potyviridae*, CAB Intern. Wallingford, UK.
- Singh, L., Hallan, V., Jabeen, N., Singh, A. K., Ram, R., Martin, D. P. & Zaidi, A. A. (2007).** Coat protein gene diversity among Chrysanthemum virus B isolates from India. *Arch Virol* **152**, 405–413.
- Staudt, G. (1989).** The species of fragaria, their taxonomy and geographical distribution. *Acta Horti* **23–34**.
- Sztuba-Solińska, J., Działtowski, A. & Bujarski, J. J. (2011).** Recombination of 5' subgenomic RNA3a with genomic RNA3 of Brome mosaic bromovirus in vitro and in vivo. *Virology* **410**, 129–141.
- Takahashi, H. (2008).** Study on interaction between Cucumber mosaic virus and host plants at a molecular level. *J Gen Plant Pathol* **74**, 454–456.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Thompson, J. R. & Jelkmann, W. (2004).** Strain diversity and conserved genome elements in Strawberry mild yellow edge virus. *Arch Virol* **149**, 1897–1909.
- Thompson, J. R., Wetzel, S., Klerks, M. M., Vašková, D., Schoen, C. D., Špak, J. & Jelkmann, W. (2003).** Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *J Virol Methods* **111**, 85–93.
- Torricco, A. K., Cafrune, E. E., Perotto, M. C., Celli, M. G., Quevedo, V. & Conci, V. C. (2011).** Evaluación de la variabilidad intraespecífica de la cápside proteica del

Strawberry mild yellow edge virus. In *XXX Congr Colomb y XVI Latinoam Fitopatol*, p. 118. Bogotá, Colombia.

**Truol, G. (2007).** *Microscopía Electrónica de Transmisión aplicado a diagnóstico de enfermedades de plantas* (IFFIVE-INTA y Fac. de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Ed.). Córdoba, Argentina.

**Tsuneyoshi, T., Matsumi, T., Deng, T. C., Sako, I. & Sumi, S. (1998).** Differentiation of *Allium carlaviruses* isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. *Arch Virol* **143**, 1093–1107.

**Tzanetakis, I. E. & Martin, R. R. (2013).** Expanding Field of Strawberry Viruses Which Are Important in North America. *Int J Fruit Sci* **13**, 184–195.

**Tzanetakis, I. E., Halgren, A. B., Wintermantel, W. M., Keller, K. E. & Martin, R. R. (2004).** Two criniviruses are associated with the strawberry pallidosis disease. *Acta Hort* **21–26**.

**Tzanetakis, I. E., Wintermantel, W. M., Cortez, A. A., Barnes, J. E., Barrett, S. M., Bolda, M. P. & Martin, R. R. (2006).** Epidemiology of Strawberry pallidosis-associated virus and Occurrence of Pallidosis Disease in North America. *Plant Dis* **90**, 1343–1346.

**Tzanetakis, I. E., Martin, R. R. & Wintermantel, W. M. (2013).** Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. *Front Microbiol* **4**, 119.

**Del Vas, M., Distéfano, A. J., Rovere-Vázquez, C. & Hopp, H. E. (2010).** Técnicas de Ingeniería Genética para conferir resistencia a virus en plantas. In *Biotecnol y Mejor Veg II*, INTA., pp. 447–456. Edited by G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginski. Buenos Aires, Argentina.

**Verchot-Lubicz, J. (2005).** A new cell-to-cell transport model for Potexviruses. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 283–90.

**Verchot-Lubicz, J., Chang-Ming, Y. & Bamunusinghe, D. (2007).** Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J Gen Virol* **88**, 1643–55.

**Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S. & Fuchs, M. (2004).** Population structure and genetic variability within isolates of Grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *J Gen Virol* **85**, 2435–2445.

**Wei, T. & Clover, G. (2008).** Use of primers with 5' non-complementary sequences in RT-PCR for the detection of nepovirus subgroups A and B. *J Virol Methods* **153**, 16–21.

**Wong, S. M., Mahtani, P. H., Lee, K. C., Yu, H. H., Tan, Y. & Neo, K. K. (1997).** Cymbidium mosaic potexvirus RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *Arch Virol* **142**, 383–391.

**Yohalem, D., Lower, K., Harvey, N. & Passey, T. (2009).** *Potentilla reptans* is an Alternative Host for Two Strawberry Viruses. *J Phytopathol* **157**, 646–648.

## ANEXOS

### Anexo 1: Protocolo DAS-ELISA (modificado de Clark & Adams 1977)

#### 1- Cobertura de la placa con anticuerpos (sensibilización de la placa):

- Diluir la Ig en la dilución óptima con el tampón de sensibilización
- Adicionar 100 µl de la dilución a cada celda de la placa.
- Cubrir la placa con polietileno logrando un buen sellado y colocarla en caja húmeda para evitar deshidrataciones.
- Incubar 37°C durante 4 horas.

#### 2- Lavado de la placa

- Vaciar la placa luego llenar con tampón lavado, dejar reposar 3 minutos a temperatura ambiente (T.a.) y vaciar la placa. Este procedimiento se repite tres veces.

#### 3- Preparación y agregado del antígeno.

- Identificar las muestras y macerarlas con tampón de extracción en una relación 1/5 peso/volumen, mantenerlas a 4°C hasta su utilización.
- Adicionar 90 µl de la dilución a cada celda.
- Llenar una celdilla con tampón extracción como blanco.
- Cubrir la placa logrando un buen sellado y colocarla en caja húmeda.
- Incubar la placa a 4°C toda la noche.

#### 4- Lavado de la placa

- Vaciar la placa luego llenar con tampón lavado, dejar reposar 3 minutos a T.a. y vaciar la placa. Este procedimiento se repite tres veces.

#### 5- Agregado del conjugado enzimático.

- Diluir la Ig conjugada con la enzima en tampón de conjugado.
- Adicionar 90 µl de la dilución por celda.
- Cubrir la placa logrando un buen sellado y colocarla en caja húmeda.
- Incubar 37°C durante 4 horas.

#### 6- Lavado de la placa

- Vaciar la placa luego llenar con tampón lavado, dejar reposar 3 minutos a T.a. y vaciar la placa. Este procedimiento se repite tres veces.

#### 7- Adición del sustrato

- Disolver en el tampón sustrato entre 0,6 a 1mg/ml de *p-nitrophenyl phosphate*

y adicionar 100 µl de la dilución por celda

- Incubar a temperatura ambiente (18-25 ° C) en oscuridad.
- Luego de 15–30 minutos observar la placa, las muestras infectadas son aquellas que presentan coloración amarilla, cuya intensidad varía de acuerdo a la concentración del virus en la muestra.
- Los datos se registran mediante la medición de la Absorbancia a 405 nm en espectrofotómetro vertical para placas de ELISA DYNEX MRX II (DYNEX, Chantilly, VA, EUA).

### **Tampones para DAS-ELISA**

#### PBS (tampón fosfato salino)

CLNa	8 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g/l
KCl	0,2 g/l
NaN <sub>3</sub>	0,2 g/l

Llevar a pH 7,4.

#### Tampón de lavado (PBS + Tween)

PBS	1 l
Tween-20	0,5 ml/l

#### Tampón de sensibilización

NaCO <sub>3</sub>	1,59 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g/l
NaN <sub>3</sub>	0,2 g/l

Llevar a pH 9,6.

#### Tampón de extracción

PBS	1 l
Tween-20	0,5 g/l
PVP-40	20 g/l

Agregar en el momento de usar 2% de leche peso /volumen (p/v) de leche en polvo.

Tampón de conjugado (tampón enzima)

PBS	1 l
Tween-20	0,5 g/l
PVP-40	20 g/l
Ovoalbúmina	2 g/l

Agregar en el momento de usar 2% p/v de leche en polvo.

Tampón de sustrato

Dietanolamina	97 ml/l
H <sub>2</sub> O	800 ml/l
NaN <sub>3</sub>	0,2 g/l

Llevar a pH 9,8

**Anexo 2: Protocolo extracción de ARN viral *kit de extracción Qiagen***

- 1- Moler 100 mg de tejido vegetal con nitrógeno líquido en morteros estériles, pasar la muestra a un ependorff de 2 ml.
- 2- Agregar 1 ml de tampón RLT agitar vigorosamente con vortex e incubar 90 seg en baño térmico a 56°C luego trasladar la muestra a un tubo de 1,5 ml.
- 3- Centrifugar 2 minutos a 12.000 rpm, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo ependorff.
- 4- Adicionar 225 ml de alcohol etílico, mezclar pipeteando y transferir la mezcla a un nuevo tubo ependorff.
- 5- Centrifugar 15 minutos a 10.000 rpm y recuperar el pellet.
- 6- Pipetear 700 ml de tampón RW1 en una columna del *Kit* de extracción de ARN.
- 7- Centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm, descartar el sobrenadante y pasar la columna a un tubo nuevo de 2 ml.
- 8- Agregar 500 µl de buffer RPE, centrifugar 15 seg a 10.000 rpm y descartar el sobrenadante.
- 9- Agregar tampón RPE 500 µl y centrifugar 2 min a 12.000 rpm.
- 10- Transferir la columna a un nuevo tubo y agregar 30 µl de agua estéril, centrifugar 1 min a 10.000 rpm.
- 11- Conservar el ARN eluido en freezer a -20°C.

### **Anexo 3: *Leaf dip* (Kitajima & Nome, 1999)**

- 1- Flotar una rejilla en una gota de As específico en dilución adecuada (generalmente entre 1/500 y 1/1000) 5-30 min a T.a.
- 2- Lavar con 30 gotas de tampón borato y secar con papel de filtro.
- 3- Flotar una rejilla en una gota de tejido vegetal macerado en tampón borato (1/20 p/v) durante 15 min a T.a. y en cámara húmeda.
- 4- Lavar con agua destilada y secar con papel de filtro.
- 5- Apoyar la rejilla en Acetato de uranilo 2% p/v.
- 6- Secar con papel de filtro.

Las rejillas que se utilizaron se cubrieron con una membrana de Collodion (Sigma).

El tampón borato en esta técnica es 0,05 Molar pH 8,1.

#### Acetato de uranilo

Pesar 2 g de acetato de uranilo y disolver en 2 ml de agua estéril, filtrar y guardar a 4°C.

### **Anexo 4: Fijación e inclusión del material vegetal (Kitajima 1997)**

- 1- Cortar fragmentos de aproximadamente 3x2 mm de la lámina foliar de hojas con síntomas y sin síntomas.
- 2- Fijar en solución de Karnovsky (2% paraformaldehído / 2,5% glutaraldehído).
- 3- Posfijar en tetróxido de osmio (en 1% en tampón fosfato) durante 2 horas a T.a.
- 4- Incubar toda la noche en solución de acetato de uranilo 0,5% a T.a.
- 5- Realizar tres lavados de 5 min cada uno con agua destilada.
- 6- Deshidratar las secciones de tejido en una serie creciente de acetona (50%, 70%, 90%, 100%) a T.a. durante 10 min en cada una de ellas.

7- Infiltrar, mediante incubación, en solución de resina Epoxi Spurr Low Viscosity (en acetona en una proporción 1:1) a T.a. toda la noche (en este paso los solventes orgánicos se remplazan gradualmente por la resina).

8- Colocar las muestras en moldes de silicona donde se incluirán con resina pura toda la noche a T.a.

9- Colocar las muestras en estufa 70°C para la polimerización

### **Anexo 5: Medio de cultivo para bacterias**

#### Medio de cultivo liquido:

LB Broth (Sigma) 20 g

Agua destilada 1 l

Autoclavar 20 minutos

#### Medio de cultivo agarizado:

LB Broth (Sigma) 20 g

Bacto-agar (Gibco) 15 g

Agua destilada 1 l

Autoclavar 20 minutos

### **Anexo 6: Protocolo purificación del ADN plasmídico kit Qiagen**

1-Centrifugar 3 ml de medio de cultivo con el crecimiento bacteriano en un tubo de 2 ml.

2-Agregar 300 µl de tampón 1 del kit y 3 µl de RNasa, mezclar por golpeteo.

3-Agregar 300 µl de tampón 2 del kit, mezclar por inversión 6 veces e incubo a T.a. 5 min.

4-Agregar 300 µl de tampón 3, mezclar por inversión vigorosamente e incubar en hielo 5 min.

5-Centrifugar 12.000 rpm 10 min. El sobrenadante debe quedar bien claro, si no es así, centrifugar nuevamente.

- 6-Equilibrar la columna colocando 1 ml de tampón QBT dejar que la columna se vacíe por gravedad (tirar el chorro contra la pared).
- 7-Colocar el sobrenadante del paso 5 dejando que entre por la columna por gravedad.
- 8-Lavar 4 veces con 1 ml de tampón QC, el tampón debe eluir por gravedad.
- 9-Eluir el ADN con 0,8 ml de buffer QF. Para recolectar el eluido colocar un tubo Eppendorf de 2 ml nuevo. Dejar que eluya por gravedad.
- 10-Precipitar el eluido con 0,7 volúmenes de isopropanol por cada 0,8 ml de tampón elusión.
- 11-Centrifugar inmediatamente 12.000 rpm 4°C por 30 min.
- 12-Eliminar el sobrenadante lentamente.
- 13-Lavar el pellet con 1 ml de etanol 70%. Centrifugar 10.000 rpm 10 min.
- 14-Eliminar el sobrenadante y secar bien el pellet o llevar a estufa 37°C por unos min.
- 15-Resuspender en 20 µl de H<sub>2</sub>O estéril.



