

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización biológica y molecular de un
rhabdovirus causal de mosaico estriado amarillo en
maíz (*Zea mays L.*) en Argentina**

Bióloga María Fernanda Maurino

Directora: Biol. (Dra.) Irma Graciela Laguna

**Desarrollada en el Instituto de Patología Vegetal, Centro de Investigaciones
Agropecuarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IPAVE-CIAP-INTA)**



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2016

COMISIÓN ASESORA DE TESIS

Dra. Irma Graciela Laguna, Instituto de Patología Vegetal (IPAVE, CIAP, INTA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Dra. María Jimena Nores, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, CONICET, UNC)

Dr. Guillermo Eyherávide, Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino (EEA INTA Pergamino)

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:.....

Firma:

Aclaración:.....

Firma:

Aclaración:.....

DEDICATORIA

A mis padres, que siempre apoyaron todas mis decisiones y confiaron en mí incondicionalmente, no sólo en cuanto a lo profesional sino en todos los aspectos de la vida, guiando pero siempre con la libertad necesaria para hacerme sentir que podía lograr cualquier cosa que me propusiese.

A la hermosa familia que formamos junto a la persona que elijo todos los días, son el motor y motivo de todas mis acciones. No me alcanzan las palabras para agradecerles por apoyarme y comprenderme en esta etapa, pero sobre todas las cosas por hacerme feliz a cada instante de mi vida. Este logro es para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Dra. Irma Graciela Laguna y la Dra. María de la Paz Giménez Pecci por su apoyo, guía y aliento constantes, y por confiar en mí en todo este proceso.

Muchas gracias a la Dra. Claudia Nome por su asistencia en la sección de microscopía y al Dr. Fabián Giolitti por su apoyo intelectual en gran parte del proceso y técnico en el desarrollo del reactivo de diagnóstico serológico.

A la Dra. Ana María Marino de Remes Lenicov por su asistencia en la identificación de los insectos estudiados y al Dr. Eduardo Virla por proveer de ejemplares de los mismos, para su utilización en esta tesis.

Por último, aunque no menor, quisiera también agradecer a todos aquellos que desde uno u otro lugar me brindaron siempre su ayuda desinteresada y sin los cuales me hubiese resultado mucho más difícil esta tarea, compañeros de logros y alegrías pero también de frustraciones y desaciertos.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

2012. Maurino F., Nome C., Laguna I.G. y Giménez Pecci, M.P. Cap. VIII Virosis emergentes en maíz. En: Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina. Editores: Giménez Pecci M.P., Laguna I.G., Lenardon S.L. Ediciones INTA. Buenos Aires, 2012. Pág. 99-107.

2012. Maurino M.F., Laguna I.G., Giolitti F., Nome C. y Giménez Pecci M.P. First Occurrence of a Rhabdovirus Infecting Maize in Argentina. Plant Disease, Vol. 96 Issue 9, pág. 1383.

Índice de contenidos

Índice de contenidos	v
Índice de tablas y figuras	1
Abreviaturas.....	4
Resumen	7
Summary.....	9
Introducción.....	11
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos.....	21
Capítulo I: Localización y morfología de las partículas del virus en estudio.....	22
Introducción.....	23
Materiales y Métodos	25
1-Colección de muestras.....	25
2-Microscopía electrónica	25
3-Characterización de partículas virales.....	26
Resultados	26
1-Colección de muestras.....	26
3-Characterización de las partículas virales.	26
Conclusiones	30
Capítulo II: Reconstrucción de las relaciones filogenéticas del rhabdovirus causal de estriado amarillo en maíz.....	31
Introducción.....	32
Materiales y Métodos	35
1-Colección de muestras.....	35

2-Extracción de ARN y RT-PCR.	35
3-Clonado y secuenciación.	36
4-Análisis de identidades nucleotídicas.	36
5-Análisis filogenético.	39
Resultados	39
1-Colección de muestras.	39
2-Extracción de ARN y RT-PCR.	40
4-Análisis de identidades nucleotídicas.	41
5-Análisis filogenético del gen de la polimerasa L.	43
Conclusiones	45
Capítulo III: Evaluación, en condiciones experimentales, de insectos vectores del patógeno y de otros medios de transmisión	46
Introducción.	47
Materiales y Métodos	49
1-Recolección de insectos delfácidos para cría.	49
2-Transmisión mediante insectos vectores.	49
3-Transmisión mediante incisiones vasculares (VPI).	51
Resultados	52
1-Recolección de insectos delfácidos para cría.	52
2-Transmisión mediante insectos vectores.	52
3-Transmisión mediante incisiones vasculares (VPI).	55
Conclusiones	55
Capítulo IV: Desarrollo de métodos de diagnóstico eficientes	56
Introducción.	57
Materiales y métodos.	59
1-Producción de un reactivo de diagnóstico molecular específico para MYSV	59

2-Antisuero de virus parcialmente purificado.	59
Resultados	63
1-Producción de un reactivo de diagnóstico molecular específico para MYSV	63
2-Antisuero de virus parcialmente purificado.	64
Conclusiones	70
Capítulo V: Reconstrucción de la historia demográfica de aislamientos espacio temporales del virus en estudio	71
Introducción.....	72
Materiales y Métodos	76
1-Recolección de muestras enfermas con MYSV de diferentes localidades y campañas agrícolas.	76
2-Obtención de la secuencia genómica completa del MYSV.	76
3-Organización genómica del MYSV.	77
4-Amplificación y secuenciación del gen N de los distintos aislamientos del MYSV.....	77
5-Análisis de estructura demográfica de los diferentes aislamientos espacio temporales del MYSV.	79
Resultados	80
2-Obtención de la secuencia genómica completa del MYSV.	80
3-Organización genómica del MYSV.	80
4-Amplificación y secuenciación del gen N de los distintos aislamientos del MYSV.....	83
5-Análisis de estructura demográfica de los diferentes aislamientos espacio temporales del MYSV.	84
Conclusiones	87
Capítulo VI: Discusión y conclusión general.....	88
Referencias	98

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Secuencias de rhabdovirus seleccionadas para el análisis filogenético.....	37
Tabla 2. Similitud relativa de secuencia con maize yellow striate virus.....	42
Tabla 3. Ubicación geográfica y campaña agrícola en las cuales fueron recolectados cada uno de los aislamientos espacio temporales del maize yellow striate virus.	76
Tabla 4. Cebadores específicos para el gen N del MYSV diseñados en esta tesis.....	79
Tabla 5. Características de las proteínas deducidas del genoma del maize yellow striate virus.	81
Tabla 6. Regiones intergénicas repetitivas del ARN genómico del maize yellow striate virus en comparación con barley yellow striate mosaic virus.....	82
Tabla 7. Porcentaje de similitud relativa de la secuencia nucleotídica del gen N entre los diferentes aislamientos del maize yellow striate virus	85
Fig. 1. Diagrama ilustrativo de un virión de rhabdovirus y la estructura de su nucleocápside	14
Fig. 2. Insectos vectores de rhabdovirus en plantas.	16
Fig. 3. Síntomas de enanismo, enrojecimiento, necrosis y distorsión de hojas en cebada colectada a campo, causados por una infección mixta de rhabdovirus y mal de Río Cuarto virus.	19
Fig. 4. Síntomas de estriado de color amarillo intenso, fino y grueso en hojas de plantas de maíz, observados a campo.	20
Fig. 5. Diagrama ilustrativo de la estructura de una partícula de rhabdovirus	24
Fig. 6. Síntomas de infección por rhabdovirus en plantas de maíz colectadas a campo durante 2011/12.....	27
Fig. 7. Partículas virales del rhabdovirus en estudio observadas por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de hojas de plantas infectadas	29
Fig. 8. Representación esquemática del genoma lineal de ARN (-) de <i>Rhabdoviridae</i>	33

Fig. 9. Partículas virales de maize yellow striate virus observadas por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de tejido vegetal de plantas sintomáticas colectadas a campo	40
Fig. 10. Amplicones obtenidos por RT-PCR con cebadores degenerados (Lamprecht <i>et al.</i> 2009) a partir de ARN total extraído de muestras de plantas con síntomas de infección por rhabdovirus colectadas a campo	41
Fig. 11. Amplicones obtenidos por RT-PCR con cebadores degenerados (Bourhy <i>et al.</i> 2005) a partir de ARN total extraído de muestras de plantas con síntomas de infección por rhabdovirus colectadas a campo	41
Fig. 12. Árbol filogenético de secuencias parciales del gen de la polimerasa L de maize yellow striate virus y otras secuencias de rhabdovirus de plantas construido utilizando metodología de máxima verosimilitud	44
Fig. 13. Árbol filogenético de secuencias parciales del gen de la polimerasa L de maize yellow striate virus y otras secuencias de rhabdovirus de plantas construido utilizando metodología bayesiana	45
Fig. 14. Metodología para la transmisión de maize yellow striate virus mediante insectos vectores.....	50
Fig. 15. Instrumento utilizado para realizar la inoculación de maize yellow striate virus mediante la técnica de incisiones vasculares de semillas de maíz.	51
Fig. 16. Partículas virales de maize yellow striate virus observadas por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de hojas de plantas transmitidas con <i>Peregrinus maidis</i> ...	53
Fig. 17. Síntomas de estriado amarillo asociado a infección por maize yellow striate virus, observados en plantas transmitidas experimentalmente con insectos hemípteros de la familia <i>Delphacidae</i>	54
Fig. 18. Amplicones obtenidos por RT-PCR con cebadores específicos para maize yellow striate virus	54
Fig. 19. Ejemplares de conejo blanco neozelandés utilizados para la obtención de los anticuerpos anti maize yellow striate virus.....	61
Fig. 20. Representación esquemática del procedimiento utilizado para la producción del antisuero específico para maize yellow striate virus.	62

Fig. 21. Amplicones obtenidos por RT-PCR con cebadores específicos para maize yellow striate virus	63
Fig. 22. Partículas de rhabdovirus observadas por microscopía electrónica de transmisión de preparados de purificaciones parciales de tejido vegetal enfermo	66
Fig. 23. SDS-PAGE de purificaciones parciales del maize yellow striate virus	67
Fig. 24. NC-ELISA de muestras sanas y enfermas con suero preinmune.....	67
Fig. 25. NC-ELISA de muestras sana y enfermas con suero anti maize yellow striate virus crudo en dilución de 1:1600	68
Fig. 26. NC-ELISA de muestras sanas y enfermas con maize yellow striate virus en diluciones seriadas de suero adsorbido en extracto de planta sana	68
Fig. 27. NC-ELISA de plantas sanas y enfermas con rhabdovirus utilizando suero para maize yellow striate virus.....	69
Fig. 28. Presencia de maize yellow striate virus en Argentina.....	75
Fig. 29. Diagrama esquemático de la organización genómica del maize yellow striate virus.	81
Fig. 30. Complementariedad de secuencias entre los extremos terminales 3' y 5' del genoma del maize yellow striate virus	83
Fig. 31. Amplicones obtenidos por RT-PCR con los cebadores específicos externos (Ef y Er) para el gen N del maize yellow striate virus.....	83
Fig. 32. Diagrama esquemático de las regiones amplificadas por los cebadores diseñados para el gen N del maize yellow striate virus.....	84
Fig. 33. Dinámica poblacional del maize yellow striate virus utilizando secuencias nucleotídicas del gen N viral	85
Fig. 34. Árbol datado de máxima credibilidad de clado del gen N viral del maize yellow striate virus en Argentina.....	86

Abreviaturas

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNdc: ácido desoxirribonucleico de doble cadena
- ADNsc: ácido desoxirribonucleico de simple cadena
- ADV: alfalfa dwarf virus
- AMV: transcriptasa reversa del virus aviar de la mieloblastosis
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNdc: ácido ribonucleico de doble cadena
- ARNsc: ácido ribonucleico de simple cadena
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- AWSMV: american wheat striate mosaic virus
- BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
- BYSMV: barley yellow striate mosaic virus
- BYDV: barley yellow dwarf virus
- CCMV: cereal chlorotic mottle virus
- CoRSV: coffee ringspot virus
- CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
- CSS: corn stunt spiroplasma
- CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio
- dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato
- DSV: digitaria striate virus
- DYVV: datura yellow vein virus
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- Ef: iniciador específico para el gen N del maize yellow striate virus externo, forward
- ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
- EMDV: eggplant mottled dwarf virus
- Er: iniciador específico para el gen N del maize yellow striate virus externo, reverse
- GTR: generalized time reversible
- HIV: virus de inmunodeficiencia humana
- HPV: High Plains virus

Abreviaturas

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

If: iniciador específico para el gen N del maize yellow striate virus interno, forward

IFFIVE: Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal

INDEAR: Instituto de Agrobiotecnología Rosario

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Ir: iniciador específico para el gen N del maize yellow striate virus interno, reverse

IPAVE: Instituto de Patología Vegetal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

LBVaV: lettuce big-vein associated virus

LNyV: lettuce necrotic yellows virus

LYMoV: lettuce yellow mottle virus

MBSP: maize bushy stunt phytoplasma

MCCT: árbol datado de máxima credibilidad de clado (most credibility clade tree)

MCMV: maize chlorotic mottle virus

MDMV: maize dwarf mosaic virus

MET: microscopía electrónica de transmisión

MFSV: maize fine streak virus

MIMV: maize Iranian mosaic virus

M-MLV: transcriptasa reversa del virus de la leucemia Moloney murine

MMV: maize mosaic virus

MRCV: mal de Río Cuarto virus

MRFV: maize rayado fino virus

MRSV: maize red stripe virus

MSSV: maize sterile stunt virus

MStpV: maize stripe virus

MSV: maize streak virus

MYSV: maize yellow striate virus

NC-ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas en membrana de nitrocelulosa

NCMV: northern cereal mosaic virus

OFV: orchid fleck virus

ORF: marcos abiertos de lectura

PCR: reacción de la polimerasa en cadena

PROIMI: Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos

PYDV: potato yellow dwarf virus

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

Abreviaturas

RYSV: rice yellow stunt virus

SCMV: sugarcane mosaic virus

SCV: strawberry crinkle virus

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en sulfato dodecil de sodio

SYNV: sonchus yellow net virus

TAE: tampón Tris-acetato-EDTA

TaVCCV: taro vein chlorosis virus

Tfl: polimerasa *Thermus flavus*

t_{MRCA} : edad del ancestro común más reciente (time of the most recent common ancestor)

UV: ultravioleta

VPI: incisiones vasculares

WSMV: wheat streak mosaic virus

Resumen

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus define a una especie viral como “una clase politética de virus que constituye un linaje replicativo y ocupa un nicho ecológico particular”. Una clase politética es un grupo cuyos miembros comparten varias propiedades, aunque no necesariamente todos poseen una única característica definitoria en común. En todas las campañas agrícolas desde 2000/01 hasta 2015/16, se han observado plantas de maíz con síntomas característicos de infección viral: enanismo, esterilidad de panoja y mosaico de estrías gruesas y finas, de color amarillo intenso en hojas, vainas y chalas, en diversas localidades de las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Estudios previos a éste sugirieron que podría tratarse de una infección causada por un miembro de la familia *Rhabdoviridae*.

El objetivo general de este trabajo fue obtener información morfológica, biológica, serológica y molecular del rhabdovirus que afecta a cultivos de maíz en Argentina, para determinar su identidad específica.

En primer lugar se realizaron observaciones al microscopio electrónico de transmisión de muestras de plantas infectadas y se determinó de esta manera la morfología, tamaño y localización de las partículas virales encontradas. Se observaron así partículas virales baciliformes, principalmente en células de parénquima de haces vasculares, restringidas al citoplasma celular o asociadas al retículo endoplásmico.

Se amplificó, clonó y secuenció una región conservada del gen de la polimerasa L del rhabdovirus en estudio. La secuencia nucleotídica del virus en estudio obtenida fue depositada en GenBank bajo el nombre de maize yellow striate virus (MYSV, JQ715419). Se obtuvieron similitudes de secuencia nucleotídica con otras secuencias disponibles de rhabdovirus, siendo las mayores con tres aislamientos de MYSV en trigo y con el virus barley yellow striate mosaic virus (BYSMV) aislamiento Zanzan-1. Con la secuencia parcial del gen de la polimerasa del MYSV se diseñaron cebadores específicos.

Se realizaron transmisiones experimentales del patógeno mediante insectos de la familia *Delphacidae* correspondientes a las especies *Peregrinus maidis*, *Metadelphax propinqua* y *Delphacodes kuscheli*. Se comprobó la transmisión experimental por parte de estas tres especies con porcentajes de transmisión de 6,6%, 12,5% y 10,7%, respectivamente.

Purificaciones parciales de MYSV a partir de plantas de maíz enfermas fueron inoculadas a un conejo para la producción de anticuerpos específicos contra el virus. El suero, producto de sangrados del animal, fue probado y calibrado con muestras de plantas de maíz, alfalfa, frutilla, *Physalis sp.*, trigo y cebada enfermas con diferentes rhabdovirus y sus respectivos controles sanos, determinándose así una buena sensibilidad y especificidad del mismo para el MYSV. Se disponen de 33 ml de suero específico para MYSV.

A partir del análisis de datos generados mediante pirosecuenciación genómica WGS Illumina Hiseq 1500 se lograron reconstruir 12.640 nt del genoma del MYSV. Se determinó que este presenta 71% de identidad nucleotídica con el genoma completo de BYSMV, aislamiento Hebei (KM213865), con un porcentaje de cobertura del 87%. Se encontraron 10 marcos abiertos de lectura, organizados de la siguiente manera: 3'-N-P-3-4-5-6-M-G-9-L-t 5'. La mayor de las identidades aminoacídicas observada entre MYSV y BYSMV fue de 80%, entre las proteínas L de dichos virus.

Se obtuvieron 7 aislamientos espacio temporales del MYSV de distintas localidades de las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires, desde la campaña agrícola 2010/11 hasta 2014/15. Se determinó que la curva demográfica que mejor representaría a la estructura poblacional, dada por la variabilidad genómica del gen N de los aislamientos recolectados, es la exponencial. El ancestro común más reciente dataría de alrededor de 31,5 años. El árbol datado de máxima credibilidad de clado obtenido en base a los datos recolectados mostró que no existiría relación entre la variabilidad genómica del MYSV y la distribución geográfica del mismo.

En el presente trabajo de tesis se logró determinar microscópica y molecularmente que el virus que afecta cultivos de maíz en Argentina es nuevo miembro del género *Cytorhabdovirus*, familia *Rhabdoviridae*, y se lo denominó MYSV. Se detectaron vectores experimentales del patógeno (*P. maidis*, *M. propinqua* y *D. kuscheli*) y se desarrollaron dos reactivos de diagnóstico para este virus, uno molecular y el otro serológico. La información generada es de gran importancia para la caracterización e identificación de este nuevo patógeno que afecta al cultivo de maíz en el área central de producción del país.

Summary

The International Committee on Taxonomy of Viruses defines a virus species as a ‘polythetic class of viruses that constitutes a replicating lineage and occupy a particular ecological niche’. A polythetic class is a group whose members have several common properties, although they do not necessarily all share a single common defining characteristic.

Maize plants presenting characteristic symptoms of virus infection: shortened internodes, panicle sterility and coarse and fine yellow stripes on leaf blades and sheaths, have been observed in every period from 2000/01 to 2015/16 in several localities of the provinces of Córdoba, Santa Fe and Buenos Aires. Previous studies suggested that this infection could be caused by a member of the *Rhabdoviridae* family.

The main objective of this work was to obtain morphological, biological serological and molecular information of the rhabdovirus affecting maize crops in Argentina, in order to determine its specific identity.

First, samples of infected plants were observed under the transmission electron microscope and thus determined the morphology, size and localization of the viral particles. Bacilliform viral particles were observed mainly in cells from vascular bundle parenchyma, restricted to the cell cytoplasm or associated to the endoplasmic reticulum.

A conserved region of the L polymerase gene of the rhabdovirus under study was amplified, cloned and sequenced. The nucleotide sequence obtained was deposited in GenBank under the denomination of maize yellow striate virus (MYSV, JQ715419). Nucleotide sequence similarities to other available rhabdoviruses were obtained, being the highest to three MYSV isolates from wheat and to the virus barley yellow striate mosaic virus (BYSMV) isolate Zanzan-1. Specific primers were designed from the partial sequence of the polymerase gene of MYSV.

Experimental transmissions of this pathogen were performed using insects of the family *Delphacidae* corresponding to the species *Peregrinus maidis*, *Metadelphax propinqua* and *Delphacodes kuscheli*. Experimental transmission by these three species was registered in percentages of 6.6%, 12.5% and 10.7%, respectively.

Partial purifications of MYSV from infected maize plants were inoculated to a rabbit for the production of specific virus antibodies. The serum, product of bleedings

Summary

of the animal, was tested and calibrated with samples of maize, alfalfa, strawberry, *Physalis sp.*, wheat and barley plants infected with different rhabdoviruses and their respective healthy controls, thus determining a good sensitivity and specificity of this serum to MYSV. We dispose of 33 ml of this specific MYSV serum.

From the analysis of the data generated by pyrosequencing WGS Illumina Hiseq 1500 we were able to reconstruct 12640 nt of the MYSV genome. It was determined that this genome presents 71% nucleotide identity to BYSMV isolate Hebei (KM213865) complete genome, with an 87% coverage. Ten open reading frames were found, organized in the following order: 3'-N-P-3-4-5-6-M-G-9.L-t 5'. The highest aminoacidic identity presented by MYSV and BYSMV was 80% between the L proteins of these viruses.

Seven space-time MYSV isolates were obtained from different localities of Córdoba, Santa Fe and Buenos Aires provinces, from 2010/11 to 2014/15. It was determined that the demographic trend that would represented the best the population structure given by the genetic variability of the N gene of the collected isolates, was the exponential. The most recent common ancestor would be around 31.5 years old. The most credibility clade tree obtained in base of the collected data, indicated that there would be no relation between the genetic variability and the geographic distribution of MYSV.

In the present thesis work it was microscopically and molecularly determined that the virus affecting maize crops in Argentina is a new member of genus *Cytorhabdovirus*, family *Rhabdoviridae*, and it was named MYSV. Experimental vectors of this pathogen were detected (*P. maidis*, *M. propinqua* and *D. kuscheli*) and two diagnostic tools for this virus were developed, one molecular and the other serological. The information here generated is of great importance for the characterization and identification of this new pathogen that affects maize crops in the central productive area of the country.

Introducción

Generalidades de virus. Los virus son parásitos obligados, esto implica que no son activos fuera de sus hospedantes ya que dependen de la maquinaria celular de los mismos para reproducirse. Todos los tipos de organismos vivos incluyendo animales, plantas, hongos y bacterias son hospedantes de virus, pero la mayoría de los virus infecta solo un tipo de hospedante (Gergerich & Dolja 2006). Estos patógenos causan numerosas enfermedades en plantas y son responsables de grandes perjuicios en los cultivos (Pennazio *et al.* 1996; Laguna & Giménez Pecci 2012). En vegetales, constituyen el segundo grupo de patógenos después de los hongos, en cuanto al número e importancia de las enfermedades que causan (Fraile Pérez & García Arenal Rodríguez 2005). Aunque en teoría los virus pueden infectar todas las especies de plantas cultivadas y silvestres, los rangos de hospedantes de cada virus son variables, pudiendo ser muy reducidos o muy amplios: algunos virus, como el citrus tristeza virus, infecta solamente a pocas especies de un determinado género, mientras que existen otros, como el cucumber mosaic virus, que afectan a muchas especies de plantas diversas familias. De esta manera, dependiendo de la combinación especial de virus y hospedante, y de las condiciones ambientales, la respuesta vegetal a una infección puede ser muy variada: las plantas infectadas pueden mostrar un espectro de síntomas, siendo los más frecuentes el amarillamiento de hojas, patrones de bandas o mosaicos, distorsión de hojas (enrollamiento, acartuchamiento, cortes), achaparramiento de planta completa, anormalidades en formación o nula producción de flores o frutos, manchado y deformación de semillas, declinamiento y muerte prematura de las plantas. En ocasiones los virus se restringen a ciertas regiones de la planta (manchas discretas en las hojas, áreas necróticas en pecíolos, frutos y tallos) aunque en la mayoría de los casos, causan infecciones sistémicas. La infección no siempre resulta en síntomas visibles, como en el caso de los virus latentes, y ocasionalmente puede resultar en síntomas de valor ornamental (Gergerich & Dolja 2006).

Los virus en plantas causan enfermedades en cultivos e importantes pérdidas económicas en todo el mundo, a causa de la reducción en la cantidad y calidad de la producción. A pesar de ello estas pérdidas resultan difíciles de cuantificar, a diferencia de las ocasionadas por bacterias u hongos, debido a una falta de reconocimiento de las

mismas. Factores tales como variaciones en las pérdidas de región a región, de campaña a campaña, así como infecciones crípticas o efectos sutiles en las plantas, son algunos de los problemas al momento de intentar cuantificar los detrimentos causados por virus en la producción (Hull 2009).

El conocimiento de la forma de replicación de los virus y la manera en la que ocasionan enfermedades, permite la implementación de medios efectivos de detección mediante la producción de reactivos y desarrollo de técnicas de diagnóstico, de prevención y de manejo. Entre estas últimas dos, pueden mencionarse una serie de estrategias como lo son la exclusión (aislamiento de plantas para evitar su contacto con el patógeno), erradicación (eliminación o disminución de inóculo inicial del agroecosistema), evasión (manejo del cultivo de manera de evitar la coincidencia espacio-temporal con el patógeno), protección (control químico de vectores), resistencia (desarrollo y utilización de cultivares resistentes al virus) y terapia (drogas antivirales) (Hogenhout *et al.* 2003; March *et al.* 2010; March & Lenardon 2012).

Taxonomía viral. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ha clasificado siete órdenes virales: *Caudovirales*, *Herpesvirales*, *Ligamenvirales*, *Nidovirales*, *Picornavirales*, *Tymovirales* y *Mononegavirales*. De todos ellos, los últimos tres contienen a especies de virus que infectan a plantas. A su vez, existe una gran cantidad de familias virales que todavía no han sido asignadas a ningún orden (King *et al.* 2011). Es necesario hacer una distinción entre los términos “especie viral” y “virus”. Una especie viral es una construcción taxonómica, por lo cual no puede ser transmitida, aislada, manipulada y no posee una secuencia genómica; un virus es una entidad física que sí puede transmitirse, manipularse, posee variantes y cepas con diferentes secuencias genómicas. Los nombres de las especies virales aprobados por el ICTV se indican en itálica y con mayúsculas, mientras que los nombres de los virus no están italizados y se indican con minúsculas, a excepción de aquellos que involucren nombres propios (Kuhn & Jahrling 2010). Sin embargo, los nombres de especies virales muchas veces se tratan del mismo nombre común que para el virus que causa una enfermedad y pertenece a dicha especie. Esto lleva a ambigüedades al tratar de indicar a una especie viral o un virus, por lo cual el ICTV ha propuesto para algunas familias virales el agregado del nombre genérico al nombre de la especie viral (van Regenmortel *et al.* 2010). De esta manera, por ejemplo la especie que hasta muy recientemente se denominaba *Lettuce necrotic yellows virus*, actualmente se denomina *Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus* para diferenciarlo de la entidad viral lettuce necrotic yellows virus (LNYV) (Afonso *et al.* 2016).

Generalidades de rhabdovirus. La familia *Rhabdoviridae*, perteneciente al orden *Mononegavirales* incluye alrededor de 160 especies (Mann & Dietzgen 2014), dentro de las cuales se encuentran varios patógenos económicamente importantes de humanos, ganado y cultivos, y contiene tentativamente más de 90 virus que afectan plantas (Mann & Dietzgen 2014). Los integrantes del orden presentan membrana y poseen genomas de ARN de simple cadena, lineales, no segmentados, con orientación en sentido negativo. La característica distintiva de la familia *Rhabdoviridae* consiste en poseer viriones recubiertos por membrana cuyas partículas tienen morfología baciliforme (Fig. 1) (Dietzgen *et al.* 2011).

Hasta principios del año 2016, los rhabdovirus que infectan plantas se clasificaban en aquellos que producen inclusiones en el núcleo que luego se acumulan en el espacio perinuclear, y en los que desarrollan viriones en el citoplasma, en donde luego se acumulan. Así, se diferencian los géneros *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus* (Ammar *et al.* 2009; Dietzgen *et al.* 2011; Afonso *et al.* 2016). *Cytorhabdovirus* incluye a las especies *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus*, *Barley yellow striate mosaic cytorhabdovirus*, *Broccoli necrotic yellows cytorhabdovirus*, *Festuca leaf streak cytorhabdovirus*, *Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus*, *Lettuce yellow mottle cytorhabdovirus*, *Northern cereal mosaic cytorhabdovirus*, *Sonchus cytorhabdovirus*, *Strawberry crinkle cytorhabdovirus* y *Wheat American striate mosaic cytorhabdovirus*; *Nucleorhabdovirus* incluye a las especies *Datura yellow vein nucleorhabdovirus*, *Eggplant mottled dwarf nucleorhabdovirus*, *Maize fine streak nucleorhabdovirus*, *Maize Iranian mosaic nucleorhabdovirus*, *Maize mosaic nucleorhabdovirus*, *Potato yellow dwarf nucleorhabdovirus*, *Rice yellow stunt nucleorhabdovirus*, *Sonchus yellow net nucleorhabdovirus*, *Sowthistle yellow vein nucleorhabdovirus* y *Taro vein chlorosis nucleorhabdovirus* («ICTV Online» 2016). Recientemente ha sido propuesta una nueva modificación en la taxonomía de la familia *Rhabdoviridae*, que incluye a dos géneros de virus que infectan plantas y se distinguen de los anteriormente mencionados *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus* por poseer su genoma segmentado y carecer de envoltura lipídica. Estos géneros son *Dichorhavirus*, integrado por las especies *Coffee ringspot dichorhavirus* y *Orchid fleck dichorhavirus* y *Varicosavirus* con su único representante *Lettuce big-vein associated varicosavirus* (Dietzgen *et al.* 2014; Afonso *et al.* 2016). Cerca de 100 miembros putativos de la familia *Rhabdoviridae* que infectan plantas han sido descritos basándose sólo en la forma distintiva de sus inclusiones observadas por microscopía electrónica, aunque la mayoría aún no han sido purificados, ni analizados en detalle para verificar su pertenencia a esta

familia (Jackson *et al.* 2005; Hogenhout *et al.* 2008). Se han realizado reconstrucciones filogenéticas de los géneros de rhabdovirus que infectan plantas *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus*, utilizando secuencias del gen que codifica para la nucleoproteína (N) y del gen de la polimerasa (L). Estos análisis sugieren un origen monofilético de este grupo de rhabdovirus, y una posterior división en dos clados, correspondientes a los géneros antes mencionados, dividiéndose cada uno de ellos luego en dos grandes clados (Jackson *et al.* 2005; Almasi *et al.* 2010; Bejerman *et al.* 2015; Babaie *et al.* 2015). A su vez, análisis filogenéticos utilizando regiones conservadas del gen L han ubicado a los miembros del género *Dichorhavirus*, *Orchid fleck dichorhavirus* y *Coffee ringspot dichorhavirus* más cercanamente emparentados con los miembros de *Nucleorhabdovirus*, con el cual compartirían un ancestro más reciente que con *Cytorhabdovirus* (Kondo *et al.* 2006; Ramalho *et al.* 2014). Por otra parte, Sasaya y colaboradores (2002) ubicaron mediante análisis filogenéticos de este mismo gen, al único representante del miembro *Varicosavirus* con un ancestro más lejano común a todo el grupo de rhabdovirus que infectan plantas.

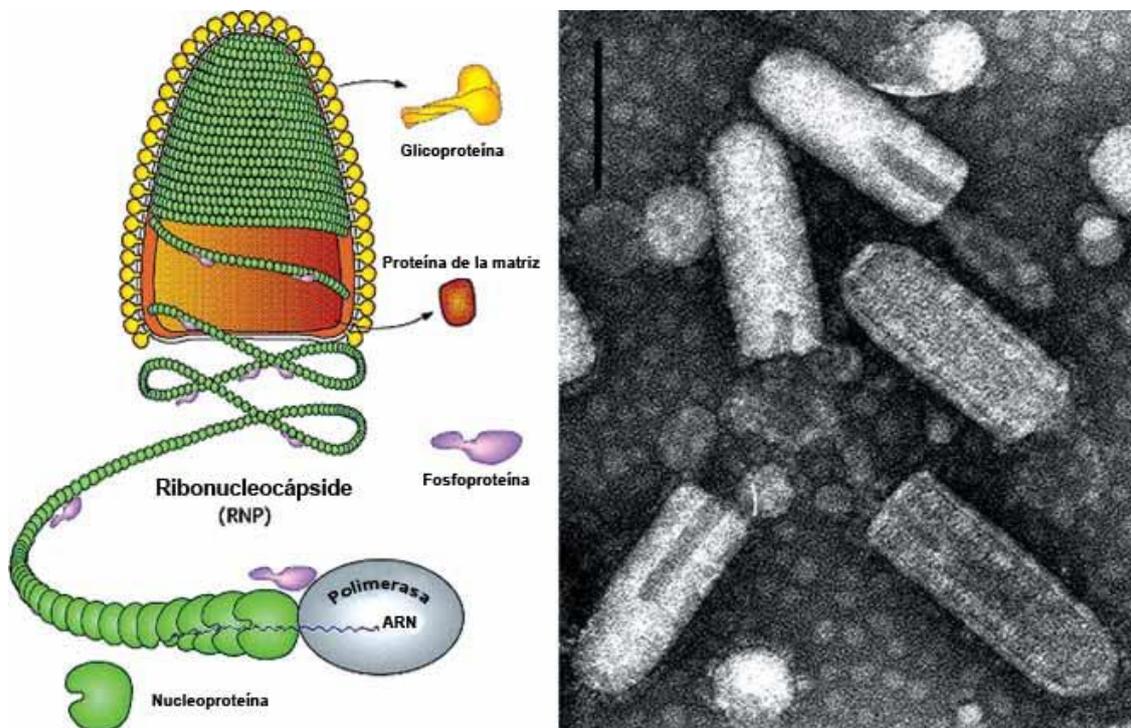


Fig. 1. (Izquierda) Diagrama ilustrativo de un virión de rhabdovirus y la estructura de su nucleocápside; (Derecha) Micrografía electrónica negativa de partículas de un aislamiento de vesicular stomatitis Indiana virus. La barra representa 100 nm. Figura tomada de Dietzgen *et al.* 2011.

Los integrantes de esta familia de virus infectan una gran cantidad de especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Todos los rhabdovirus conocidos que causan enfermedades en *Gramineae* son transmitidos por insectos, de modo que su prevalencia y distribución están en gran parte influenciadas por la ecología y preferencias de sus vectores (Jackson *et al.* 2005). Las interacciones virus-vector son altamente específicas, y en todos los casos en los que se han analizado cuidadosamente los vectores conocidos, se ha registrado la replicación en ellos del rhabdovirus que transmiten (Redinbaugh *et al.* 2002; Ammar *et al.* 2004, 2009; Tordo *et al.* 2005), indicando así una transmisión del tipo persistente propagativa. Aunque algunos rhabdovirus pueden ser transmitidos mecánicamente por abrasión foliar, este modo de transmisión no contribuye significativamente a su dispersión en la naturaleza. Asimismo no se ha reportado transmisión de rhabdovirus de plantas mediante polen o semilla (Jackson *et al.* 2005; Mann & Dietzgen 2014). Los rhabdovirus infectan numerosas malezas y varias familias importantes de cultivos en todo tipo de climas. Cada especie induce un amplio espectro de síntomas en sus respectivas plantas huéspedes, y éstos varían desde la ausencia de efectos discernibles hasta la muerte total de la planta; los síntomas de infección incluyen achaparramiento, decoloración y amarillamiento de nervaduras, moteado o mosaico de plantas sistémicamente infectadas y necrosis de tejidos (Jackson *et al.* 2005). La mayoría de los rhabdovirus que infectan cereales son resistentes a transmisiones experimentales por raspado de las hojas (Mann & Dietzgen 2014), pero la inoculación por incisiones vasculares ha sido exitosa para algunos de ellos (Louie 1995; Madriz Ordenana *et al.* 2000; Redinbaugh *et al.* 2002; Jackson *et al.* 2005).

Vectores de rhabdovirus. Los insectos juegan un rol esencial en la transmisión horizontal de la mayoría de los rhabdovirus. Miembros de las familias *Cicadellidae*, *Delphacidae* y *Aphididae* transmiten naturalmente rhabdovirus en plantas (Fig. 2) (Greber 1982a; Tsai 1996; Hogenhout *et al.* 2008; Todd *et al.* 2010; Lamprecht *et al.* 2010; Redinbaugh *et al.* 2012). Los recientemente caracterizados géneros de rhabdovirus *Dichorhavirus* y *Varicosavirus* contienen virus transmitidos por ácaros (*Brevipalpus* sp.) el primero (Childers & Derrick 2003; Jackson *et al.* 2008), y por hongos el segundo (Dietzgen *et al.* 2014; Afonso *et al.* 2016). Debido a que los rhabdovirus se replican en sus insectos vectores, la mayoría de las especies conocidas tienen dos hospedadores naturales: insectos y plantas o bien insectos y vertebrados (Redinbaugh *et al.* 2002; Chi-Wei Tsai 2006). Algunos rhabdovirus son transmitidos a la progenie de insectos hospedadores, lo que no ha sido observado en hospedadores vegetales o vertebrados.

Debido a ello, es probable que el hospedador primario del rhabdovirus ancestral fuera un insecto (Hogenhout *et al.* 2003).



Fig. 2. Insectos vectores de rhabdovirus en plantas. A) Pulgón negro de las leguminosas, *Aphis craccivora* (*Aphididae*) (cortesía de Verónica Trucco, IPAVE-INTA); B) Chicharrita del maíz, *Dalbulus maidis* (*Cicadellidae*); C) Delfácido del maíz, *Peregrinus maidis* (*Delphacidae*).

Clasificación de especies virales. La falta de conocimiento alrededor del origen de los virus, y las complejidades de su evolución, genera problemas únicos para su taxonomía. El ICTV define a una especie viral como “una clase politética de virus que constituye un linaje replicativo y ocupa un nicho ecológico particular”. Una clase politética es un grupo cuyos miembros comparten varias propiedades, aunque no necesariamente todos poseen una única característica definitoria en común (Ball 2005). Debido a ello, los métodos de identificación viral más específicos y confiables se basan en la caracterización de diversas propiedades de los virus. Entre ellas se encuentran la transmisibilidad, la arquitectura de las partículas virales, la presencia de estructuras virales características en células infectadas, las propiedades inmunológicas de la cubierta proteica y las propiedades de sus ácidos nucleicos (Gergerich & Dolja 2006). De esta manera la clasificación de una especie de virus implica el análisis de características morfológicas, biológicas, moleculares, serológicas, para determinar la similitud entre dos patógenos virales que indique la pertenencia de ambos a la misma especie. La hibridación de ácidos nucleicos y criterios serológicos han permitido la verificación de especies comunes que infectan distintos hospedantes. Sin embargo no se han definido cepas virales por serología (Dietzgen *et al.* 2011). Actualmente se encuentran disponibles una mayor cantidad de secuencias genómicas completas de 6 *Cytorhabdovirus*: barley yellow striate mosaic virus (BYSMV), lettuce necrotic yellows virus (LNYV), lettuce yellow mottle virus (LYMoV),

strawberry crinkle virus (SCV), alfalfa dwarf virus (ADV) y northern cereal mosaic virus (NCMV); 9 *Nucleorhabdovirus*: datura yellow vein virus (DYVV), eggplant mottled dwarf virus (EMDV), sonchus yellow net virus (SYNV), maize fine streak virus (MFSV), maize mosaic virus (MMV), potato yellow dwarf virus (PYDV), taro vein chlorosis virus (TaVVCV), rice yellow stunt virus (RYSV) y maize Iranian mosaic virus (MIMV); 2 *Dichorhavirus*: orchid fleck virus (OFV) y coffee ringspot virus (CoRSV); y 1 *Varicosavirus*: lettuce big vein-associated virus (LBVaV). Por lo tanto, la secuencia genómica viral es actualmente utilizada como criterio de demarcación de especie (Dietzgen & Kuzmin 2012).

Generalidades de maíz. El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales cereales, ubicándose tercero en el ranking de producción en el mundo, con un promedio de casi 1000 millones de toneladas producidas durante 2015/16, en 177 millones de hectáreas, de 53 países («United States Department of Agriculture» 2016). Es el cultivo más ampliamente distribuido a nivel mundial: en casi todas las áreas tropicales del mundo, incluyendo regiones de más de 3.000 m de altitud, hasta regiones templadas llegando hasta 65° de latitud sur. Debido a las diferencias en las condiciones ecológicas que existen entre las regiones templadas y tropicales, los insectos vectores y los agentes patógenos también son diferentes bajo estas diversas condiciones. A partir de mediados del siglo pasado se produjeron mejoras sustanciales en las vías de transporte, comunicaciones y conexiones con distintos países, lo que acarrió una gran expansión del área agrícola. Sin embargo con estos avances también se facilitó el transporte de patógenos a través de semillas y vectores, lo cual junto a la uniformización de los materiales genéticos utilizados para la siembra contribuyen a la expansión de los problemas fitosanitarios (Gerónimo Gómez 2012). La importancia del cultivo de maíz en Argentina queda reflejada en los niveles de producción de este grano: Argentina es el 6° productor y 2° exportador mundial de maíz («United States Department of Agriculture» 2016). La producción de este grano es eminentemente pampeana, siendo las provincias de Córdoba, Buenos Aires y Santa Fe las principales productoras de maíz del país (Eyhérbide 2012).

Virosis de maíz. Las enfermedades causadas por virus en el cultivo de maíz constituyen factores importantes de pérdidas en la producción de esta especie en el mundo. Algunas de ellas están ampliamente distribuidas a nivel mundial, como por ejemplo el maize dwarf mosaic virus (MDMV), sugarcane mosaic virus (SCMV) maize chlorotic mottle virus (MCMV), wheat streak mosaic virus (WSMV), maize red stripe virus (MRSV, sin High Plains virus, HPV) y MMV y otras más restringidas como el maize streak virus

(MSV) el cual causa efecto devastadores en el continente africano (Laguna & Giménez Pecci 2012). En zonas tropicales prevalecen al menos cinco patógenos virales y dos mollicutes que afectan al maíz y que son transmitidos por hemípteros (áfidos, delfácidos y cicadélidos). Entre ellos se incluyen el MDMV, el maize stripe virus (MStpV), el maize rayado fino virus (MRFV), el MMV, y el spiroplasma y el phytoplasma del achaparramiento del maíz (Corn stunt spiroplasma, CSS y Maize bushy stunt phytoplasma, MBSP) (Oliveira *et al.* 2002; Laguna & Giménez Pecci 2004, 2012; Giménez Pecci 2010). En Argentina las enfermedades causadas por virus ocasionan, de manera periódica, graves problemas al cultivo del maíz. Al menos siete virus se encuentran presentes en el cultivo de maíz en Argentina, entre los cuales se mencionan el MDMV, MCMV, MRFV, WSMV, barley yellow dwarf virus (BYDV), MRSV y mal de Río Cuarto virus (MRCV) (Laguna & Giménez Pecci 2012). Las pérdidas en la producción del cultivo de maíz a causa de enfermedades virales en nuestro país, pueden ser elevadas resultando a veces hasta en pérdidas totales de la cosecha, como ocurre de manera periódica con el MRCV (Giménez Pecci *et al.* 2012).

Rhabdovirus en maíz. En maíz se había citado la presencia de varios rhabdovirus, entre estos AWSMV, transmitido por insectos de la familia *Cicadellidae*: *Elymana virescens* y *Endria inimica* (Sinha & Behki 1972); cereal chlorotic mottle virus (CCMV), transmitido por los cicadélidos *Nesoclutha pallida*, *Cicadula bimaculata*, *Cicadulina bipunctata* y *Bipunctella ssp.* (Greber 1982b); MMV, transmitido por el delfácido *Peregrinus maidis* (Falk & Tsai 1983); BYSMV, transmitido por delfácidos: *Laodelphax striatellus*, *Javesella pellucida* (Milne & Conti 1986), *Delphacodes kuscheli*, *Pyrophagus tigrinus*, *Chionomus haywardi* y *Metadelphax propinqua* (Dumón, Argüello Caro, *et al.* 2011); maize sterile stunt virus (MSSV, cepa de BYSMV), transmitido por el delfácido *Laodelphax striatellus* (Greber 1982a); y MFSV, transmitido por el cicadélido *Graminella nigrifrons* (Shurtleff *et al.* 1993; Todd *et al.* 2010). Ninguno de ellos ha sido reportado en maíz en territorio argentino. De ellos, MMV es el más importante debido a las pérdidas económicas que genera a nivel mundial.

Antecedentes sobre el rhabdovirus en estudio. En 1997 el grupo de enfermedades de maíz del entonces Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE-INTA) detectó en la localidad de Jesús María, Córdoba, plantas de cebada con síntomas de enanismo, enaciones, enrojecimiento y necrosis y distorsión de hojas (Fig. 3). Pruebas serológicas indicaron la presencia de mal de Río Cuarto virus (*Fijivirus*), y “leaf dips” y cortes ultrafinos permitieron observar al microscopio electrónico la presencia de

partículas icosaédricas y otras baciliformes. Las primeras, características de *Fijivirus*, y las segundas, de 245 nm de largo y 40 nm de diámetro, ubicadas dentro del retículo endoplásmico de células parenquimáticas, semejantes a rhabdovirus. Los estudios serológicos realizados por western blot y ELISA resultaron negativos con antisueros de MMV, NCMV y BYSMV, todos ellos rhabdovirus que afectan gramíneas. Las transmisiones mecánicas a plantas de maíz sano resultaron negativas (Nome *et al.* 1999).



Fig. 3. Síntomas de enanismo, enrojecimiento, necrosis y distorsión de hojas en cebada colectada a campo, causados por una infección mixta de rhabdovirus y mal de Río Cuarto virus (Nome *et al.* 1999).

En todos los períodos desde 2000/01 hasta la actualidad (2015/16), se han observado plantas de maíz con síntomas de enanismo, esterilidad de panoja y mosaico de estrías gruesas y finas, de color amarillo intenso en hojas, vainas y chalas (Fig. 4), en las localidades de Santa Isabel y Venado Tuerto (provincia de Santa Fe); Sinsacate, Río Cuarto, Jesús María, Río Segundo, Sampacho y Cañada de Luque (provincia de Córdoba) y Pedro Luro y Los Toldos (provincia de Buenos Aires). En “leaf dips” y cortes ultrafinos de estos materiales, pudieron observarse al microscopio electrónico partículas características de rhabdovirus en citoplasma de células de mesófilo y parénquima de haces vasculares. Ensayos preliminares de transmisiones experimentales a plantas sanas de maíz utilizando insectos delfácidos de la especie *P. maidis* arrojaron resultados positivos (Maurino *et al.* 2011).

Considerando que, a nuestro conocimiento, no existen otros antecedentes de infecciones causadas por rhabdovirus en cultivos de maíz en Argentina, resulta de gran

importancia la identificación específica de este rhabdovirus con el fin de aportar conocimiento para el desarrollo de medidas efectivas de detección, control y manejo de esta virosis. Aunque hasta el momento no se han cuantificado las pérdidas en la producción del cultivo de maíz en Argentina ocasionadas por este rhabdovirus, es de gran importancia disponer de dichas medidas de manejo debido a la potencialidad de su dispersión y las pérdidas que produciría, mayormente en casos de infecciones tempranas.



Fig. 4. Síntomas de estriado de color amarillo intenso, fino y grueso en hojas de plantas de maíz, observados a campo.

Hipótesis

El agente causal de la sintomatología de estriado amarillo en maíz en Argentina es un virus nuevo, perteneciente a la familia *Rhabdoviridae* que es transmitido por delfácidos (*Hemiptera – Delphacidae*).

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue obtener información morfológica, biológica, serológica y molecular acerca del rhabdovirus que afecta a cultivos de maíz en Argentina, de manera de determinar su identidad específica.

Objetivos específicos

- 1- Caracterizar posicional y morfológicamente a las partículas del virus en estudio.
- 2- Reconstruir las relaciones filogenéticas del rhabdovirus causal de estriado amarillo en maíz.
- 3- Evaluar, en condiciones experimentales, insectos vectores del patógeno y ensayar otros medios de transmisión eficientes.
- 4- Desarrollar métodos de diagnóstico eficientes.
- 5- Reconstruir la historia demográfica de aislamientos espacio temporales del virus en estudio

Capítulo I: Localización y morfología de las partículas del virus en estudio

Introducción

Las partículas virales (viriones) están conformadas por dos partes principales: el genoma, compuesto de ácido nucleico, y una cubierta proteica o cápside. Además, algunos grupos virales poseen partículas recubiertas por una membrana externa constituida por lípidos y proteínas. Las cápsides de los virus vegetales se ensamblan siguiendo uno de dos tipos fundamentales de simetría. El primer tipo de virión es helicoidal, y posee dos variantes: los “bastones” o “varas” y los filamentos flexuosos. En ambas variantes, el ácido nucleico está altamente organizado adquiriendo la misma conformación helicoidal que la cápside proteica. El segundo tipo de partícula viral es icosaédrica, y las variantes incluyen a los viriones baciliformes y los viriones gemelos compuestos por la unión de dos icosaedros incompletos. En los viriones icosaédricos, el ácido nucleico genómico forma una esfera parcialmente organizada dentro de la cápside proteica (Gergerich & Dolja 2006).

El orden *Mononegavirales* se caracteriza por poseer viriones grandes, cuya superficie externa está cubierta por proyecciones (peplómeros) de 5-10 nm de largo, 3 nm de diámetro y espaciados por 7-10 nm. Hasta principios de 2016 este orden agrupaba a cinco familias de virus recubiertos por una membrana lipídica y cuyo genoma está constituido por ARN de cadena simple, lineal y no segmentado. Estas familias son: *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Nyamiviridae*, *Paramyxoviridae* y *Rhabdoviridae* (Easton & Pringle 2011). Muy recientemente el ICTV ha incluido en el orden *Mononegavirales* en su último reporte, a dos familias de virus filogenéticamente emparentadas a las ya pertenecientes a dicho orden. Se trata de las familias *Sunviridae* y *Mymonaviridae* (Afonso *et al.* 2016)

La familia *Rhabdoviridae* se caracteriza por presentar viriones de 100-430 nm de largo y 45-100 nm de diámetro. El nombre rhabdovirus deriva del griego “rhabdos” que significa vara, haciendo alusión a la morfología de sus partículas: los rhabdovirus que infectan vertebrados tienen forma de bala o cono, mientras que los que infectan plantas son mayormente baciliformes, aunque en preparaciones fijadas pueden mostrar forma de bala o ser pleomórficos. Externamente están recubiertos por los peplómeros, los cuales consisten en trímeros de la glicoproteína viral (G), e internamente poseen una nucleocápside de simetría helicoidal que puede observarse como estriaciones transversales en cortes delgados de partículas virales teñidas negativamente. Esta nucleocápside consiste en un complejo ARN-proteína N, además de las proteínas L y P virales. Una envoltura lipídica

que contiene a la glicoproteína G interactúa con la nucleocápside a través de la proteína M (Fig. 5). La nucleocápside posee actividad transcriptasa y constituye la unidad infecciosa mínima viral (Dietzgen *et al.* 2011; Mann & Dietzgen 2014).

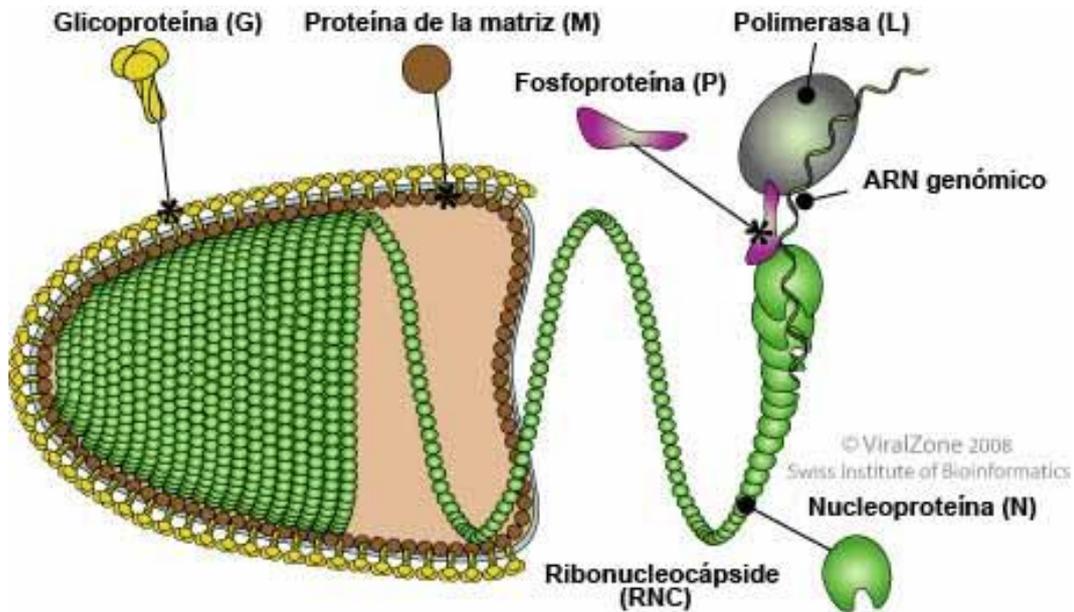


Fig. 5. Diagrama ilustrativo de la estructura de una partícula de rhabdovirus. La nucleocápside está compuesta por el ARN genómico, la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P) y la proteína de la polimerasa (L). La proteína de la matriz (M) está involucrada en el enrollamiento de la nucleocápside, su adhesión a la envoltura y asociación con la glicoproteína (G). Intercalados entre los lípidos de la membrana se encuentran protrusiones de la proteína G (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/77.html).

Los rhabdovirus que infectan plantas se clasificaban hasta 2016 en los géneros *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus*, dependiendo de su ubicación y sitio de maduración: el género *Nucleorhabdovirus* se multiplica en el núcleo formando inclusiones granulares de gran tamaño. La morfogénesis viral ocurre en la membrana nuclear interna, y las partículas virales recubiertas se acumulan en el espacio perinuclear. Los *Cytorhabdovirus* desarrollan viriones en el citoplasma de las células infectadas, en asociación con estructuras en forma de hebra denominadas viroplasma. La morfogénesis viral ocurre en asociación con vesículas del retículo endoplásmico y los virus luego se

acumulan en el citoplasma (Ammar *et al.* 2009; Dietzgen *et al.* 2011). El ICTV en su último reporte ha incluido en la familia *Rhabdoviridae* dos nuevos géneros de virus que infectan plantas, y se diferencian de los anteriores por poseer un genoma bipartito y carecer de envoltura lipídica. Estos son los géneros *Dichorhavirus* y *Varicosavirus* (Dietzgen *et al.* 2014; Afonso *et al.* 2016). Las partículas de los *Dichorhavirus* poseen morfología baciliforme y pueden encontrarse tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células infectadas, indicándose de esta manera con la sigla “N” los primeros y “C” los segundos (Kitajima *et al.* 2010; Dietzgen *et al.* 2014). Los *Varicosavirus* poseen partículas baciliformes que se localizan en el citoplasma de las células infectadas, de manera similar al género *Cytorhabdovirus* (Kuwata *et al.* 1983; Walsh & Verbeek 2011).

Con el objetivo de caracterizar posicional y morfológicamente a las partículas del virus que infecta cultivos de maíz en Argentina, se analizaron microscópicamente muestras de plantas con síntomas característicos de infección por este virus.

Materiales y Métodos

1-Colección de muestras. Se colectaron muestras con síntomas de enanismo, esterilidad de panoja y mosaico de estrías gruesas y finas, de color amarillo intenso en hojas, vainas y chalas, de plantaciones de maíz entre diciembre y marzo de la campaña 2011/12, de la localidad de Sinsacate, provincia de Córdoba y de plantas de maíz transmitidas experimentalmente con insectos (capítulo III). Las muestras de tejido foliar se conservaron embebidas en solución Karnovsky hasta su procesamiento.

2-Microscopía electrónica. Se realizaron cortes ultrafinos de tejido foliar de plantas infectadas con el virus en estudio y se realizaron observaciones de los mismos al microscopio electrónico. Las muestras se fijaron en solución Karnovsky, por al menos 1 h. Luego de ser enjuagadas con una solución de cacodilato de sodio 0,05 M pH 7, se las postfijó por 1-2 h en solución de osmio 1%. Posteriormente se contrastaron en solución de acetato de uranilo 0,5%, para luego ser deshidratadas usando concentraciones graduales de acetona e incluidas en resina Spurr (Spurr low viscosity embedding media kit

®. Data Sheet # 217 Polysciences, INC.) durante 48 h a 60 -80°C. Cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y se observaron con microscopio electrónico de transmisión Jeol 1220 (Kitajima & Nome 1999).

3-Characterización de partículas virales. Para determinar el tamaño y la forma de las partículas del virus en estudio, se tomaron fotografías a partir de cortes ultrafinos de hojas de maíz infectadas y se los observó al microscopio electrónico con un aumento de X60000 o X80000. Un mínimo de 100 partículas virales fueron medidas con el software Image-Pro Plus 4.5, y se calcularon valores promedio y desvío estándar del diámetro y longitud de las partículas.

Resultados

1-Colección de muestras. Las plantas observadas y colectadas mostraban síntomas severos de infección por rhabdovirus (Fig. 6 A-C), aunque la cantidad de plantas enfermas en los lotes muestreados fue baja.

3-Characterización de las partículas virales. Se observaron partículas virales baciliformes cubiertas de membrana, en células de mesófilo y de parénquima de haces vasculares. Las partículas se encontraron agrupadas dentro de vesículas del retículo endoplásmico de las células infectadas, o aisladas, pero siempre recubiertas por la membrana del mismo (Fig. 7 A-C). No se observaron partículas virales en ninguna otra organela celular, incluyendo el núcleo celular. En algunas células infectadas se observaron vesículas marcadamente expandidas debido a la gran cantidad de partículas en su interior (Fig.7 D-F). Las partículas virales observadas en cortes ultrafinos, presentaron un tamaño de 401 ± 35 nm de largo ($n=100$) y 65 ± 7 nm de diámetro ($n=336$).

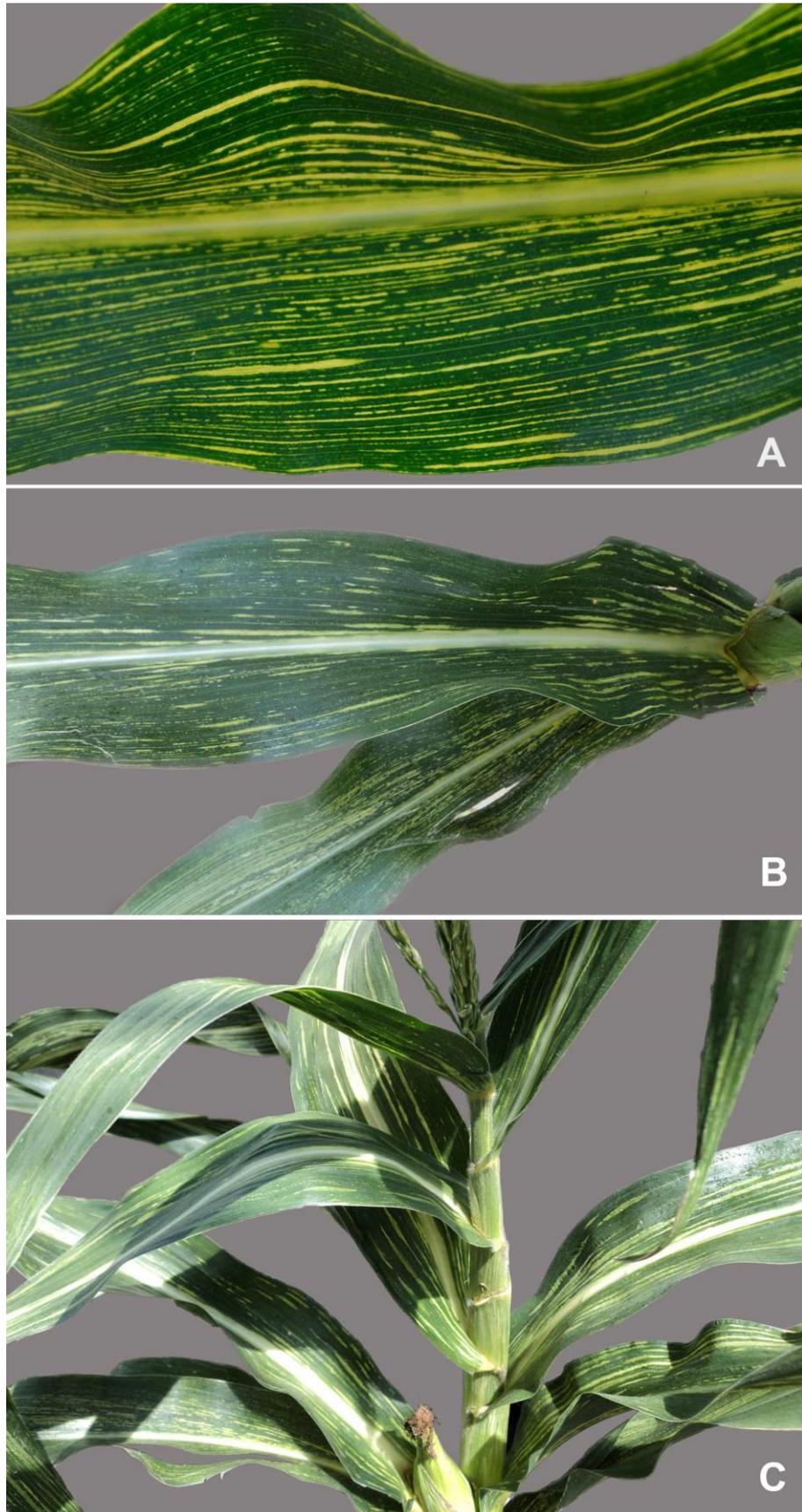
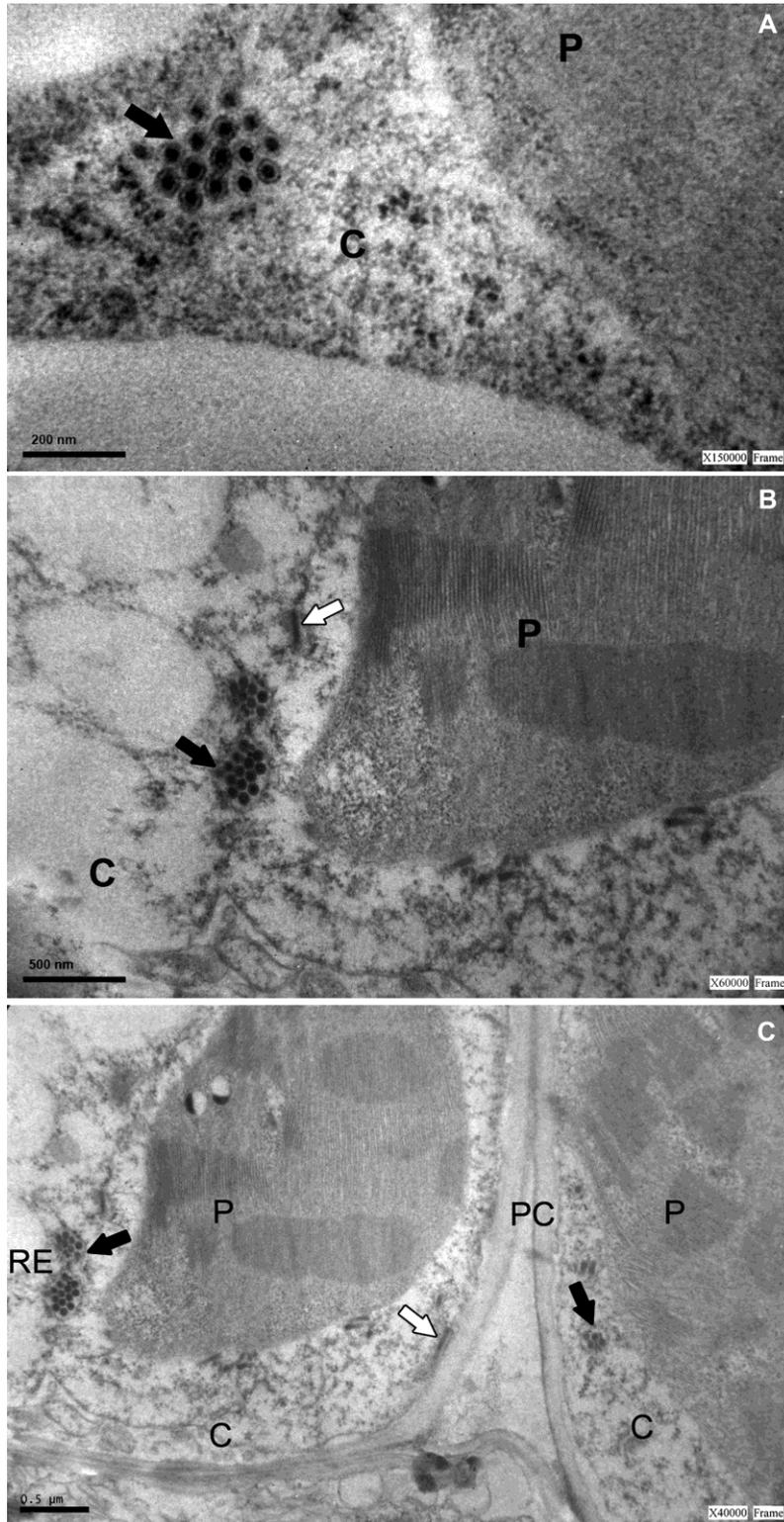


Fig. 6. Síntomas de infección por rhabdovirus en plantas de maíz colectadas a campo durante 2011/12. A) Estriado fino en el ápice de la hoja. B) Estrías cloróticas gruesas hacia la base foliar. C) Achaparramiento general de la planta.

Localización y morfología de las partículas del virus en estudio



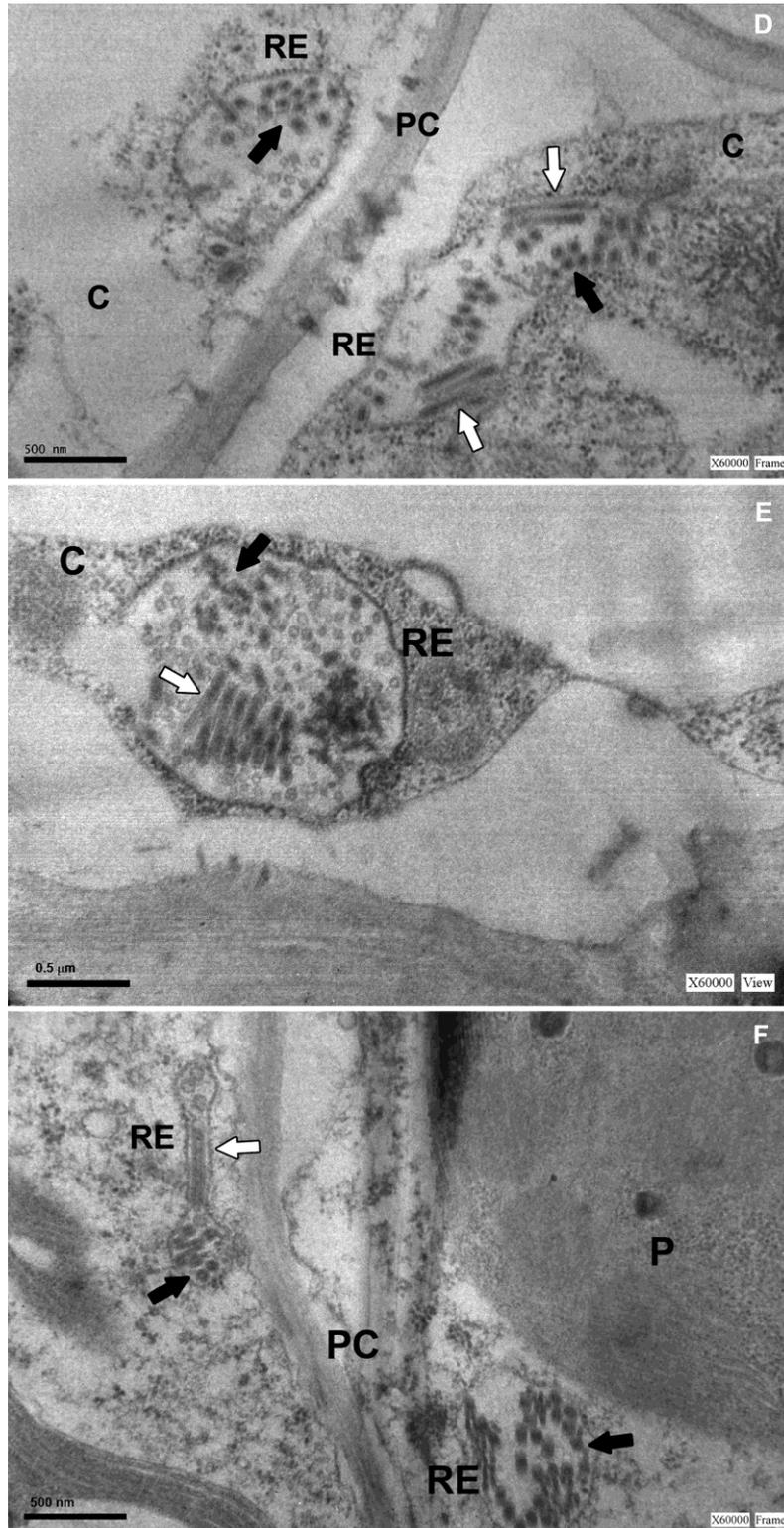


Fig. 7. (Páginas 28 y 29) Partículas virales del rhabdovirus en estudio observadas por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de hojas de plantas infectadas. Flecha negra: partículas en corte transversal; flecha blanca: partículas en corte longitudinal; RE: retículo endoplásmico; C: citoplasma; PC: pared celular; P: plastidio; V: vacuola. A-C) Partículas agrupadas o aisladas en el citoplasma celular. D-E) Vesículas del retículo endoplásmico expandidas con partículas en su interior.

Conclusiones

Los cortes ultrafinos realizados a partir de porciones fijadas de tejido vegetal con síntomas característicos de infección por rhabdovirus, evidenciaron partículas virales baciliformes de 401 ± 35 nm de largo y 65 ± 7 nm de diámetro. Éstas se encontraron principalmente en células de parénquima de haces vasculares, lo que indica que se trata de una infección causada por un virus sistémico. Se observaron también partículas virales en células de mesófilo, y siempre restringidas al citoplasma celular o asociadas a vesículas del retículo endoplásmico, no así en el núcleo celular. La morfología observada es característica de rhabdovirus que afectan plantas, indicando que se trataría de una infección ocasionada por un integrante de esta familia.

Capítulo II: Reconstrucción de las relaciones filogenéticas del rhabdovirus causal de estriado amarillo en maíz

Introducción

Aunque el material genético de la mayoría de los organismos está constituido por ADN de doble cadena (ADNdc) sólo una pequeña fracción de los virus de plantas posee genomas de este tipo. Algunos virus poseen genomas formados por ADN de simple cadena (ADNsc), aunque casi todos los virus vegetales poseen ARN como material genético. La mayoría de estos contienen ARN de simple cadena (ARNsc) en el mismo sentido que el ARNm de la célula (sentido positivo, retrovirus), aunque también existen aquellos cuyo material genético está formado por ARNsc en sentido negativo o ARN de doble cadena (ARNdc). En general, la mayor parte de los virus vegetales poseen genomas de ARNsc de sentido positivo, y estos reciben entonces el nombre de virus de ARN de cadena positiva. Dentro de esta categoría, existen numerosos ejemplos de familias de virus de importancia económica, tales como *Bromoviridae*, *Closteroviridae*, *Luteoviridae*, y *Potyviridae*. Relativamente pocos virus vegetales, tales como las familias *Bunyaviridae* y *Rhabdoviridae* poseen genomas de ARNsc de sentido negativo. *Reoviridae* es la familia más grande de virus de ARNdc. Solamente los virus de la familia *Caulimoviridae* (también conocidos como para-retrovirus), poseen genomas de ADNdc y para su replicación es necesaria la presencia de un ARN intermediario. La familia *Geminiviridae*, la cual es muy amplia y tiene gran importancia económica, está integrada por virus de ADNsc, y tienen un ADNdc intermediario en sus ciclos de vida (Gergerich & Dolja 2006).

El genoma de la mayoría de los miembros de la familia *Rhabdoviridae* está compuesto por una única molécula lineal de ARNsc sentido negativo, con un grupo OH 3'-terminal libre y un 5'-terminal trifosfato (Dietzgen *et al.* 2011). Los géneros recientemente clasificados de rhabdovirus *Dichorhavirus* y *Varicosavirus* poseen un genoma de ARNsc en sentido negativo, segmentado en dos elementos (Walsh & Verbeek 2011; Dietzgen *et al.* 2014; Afonso *et al.* 2016). El genoma en sentido negativo está organizado en 5 marcos de lectura abiertos (ORFs) en el orden 3'-N-P-M-G-L-5' que codifican para cinco polipéptidos estructurales y lindan con regiones conservadas regulatorias no codificantes llamadas "leader" (3') y "tráiler" (5') (Fig. 8) (Walker *et al.* 2011; Yan *et al.* 2015). La proteína L es un componente de la nucleocápside viral y responsable de la mayoría de las funciones de transcripción y replicación; la proteína G, forma las protuberancias en la superficie de la partícula viral, se une a los receptores celulares del hospedante induciendo la endocitosis viral y la fusión de las membranas endosomales y viral; la proteína N, es el

mayor componente de la nucleocápside viral, está asociada al ARN viral y es la responsable del desencadenamiento de respuestas inmunológicas por parte del hospedante; la proteína P, es un cofactor de la polimerasa viral requerido para la transcripción y replicación; y la proteína M, es un componente básico interno del virión, regulador de la transcripción del ARN genómico (Dietzgen *et al.* 2011). Los genomas de algunos rhabdovirus de plantas codifican además una o más proteínas adicionales entre los genes N-P, P-M o G-L

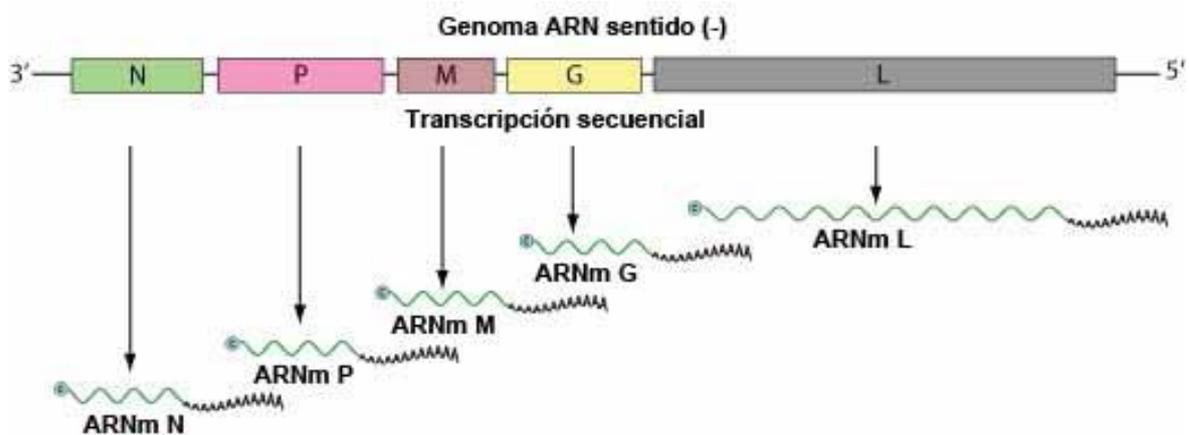


Fig. 8. Representación esquemática del genoma lineal de ARN (-) de *Rhabdoviridae*. N, P, M, G y L, proteínas estructurales del genoma (http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/2.html).

Los virus con genomas de ARN debieron desarrollar mecanismos de polimerización muy específicos para la multiplicación de su propio genoma en las células hospedantes, ya que estas últimas poseen polimerasas de ARN dependientes de ADN. Existen, de esta manera, dos tipos de polimerasas virales que son capaces de replicar el ARN viral en las células hospedantes: las ADN polimerasas dependientes de ARN (transcriptasas reversas) y las ARN polimerasas dependientes de ARN. Las transcriptasas reversas están involucradas en la replicación de retrovirus, mientras que las ARN polimerasas dependientes de ARN participan en la replicación de virus con ARNsc sentido negativo o ARNdc (Poch *et al.* 1989; Choi 2012).

La polimerasa L de los rhabdovirus es un tipo de ARN polimerasa dependiente de ARN, y su función general, depende de la actividad de varios dominios

cercanamente relacionados pero distintos de esta proteína, cada uno de los cuales contribuye con una actividad particular. Estos dominios no se encuentran distribuidos de manera aleatoria en la polimerasa sino agrupados en 6 blocks altamente conservados, denominados blocks I-VI, unidos por regiones variables de baja conservación evolutiva. Los block de mayor conservación aminoacídica se ubican en la región central de la proteína, y de ellos el block III es el que presenta una mayor conservación evolutiva entre las diferentes ARN polimerasas dependientes de ARN, virales (Poch *et al.* 1990). El block III de las ARN polimerasas dependientes de ARN parece ser esencial para la actividad de dichas proteínas (Delarue *et al.* 1990; Poch *et al.* 1990), por lo cual mutaciones en esta zona eliminan su actividad (Sleat & Banerjee 1993; Schnell & Conzelmann 1995). Es por ello que existen en este block dentro de estas proteínas, regiones muy conservadas entre los grupos taxonómicos virales, de manera tal que reconstrucciones filogenéticas de todo el orden *Mononegavirales* han sido realizadas utilizando secuencias de aminoácidos de estas regiones (Poch *et al.* 1989, 1990; Easton & Pringle 2011). De la misma manera, la proteína L de los rhabdovirus posee regiones de secuencias aminoacídicas de homología conservada, mayormente en el dominio catalítico. Un buen acercamiento a la determinación de relaciones filogenéticas entre rhabdovirus como a la identificación de nuevas especies virales, consiste en la utilización de estas regiones conservadas de la polimerasa (Delarue *et al.* 1990; Elliott *et al.* 1992; Dhillon *et al.* 2000; Bock *et al.* 2004; Bourhy *et al.* 2005; Lamprecht *et al.* 2009, 2010). Reconstrucciones filogenéticas realizadas a partir de las proteínas L y N virales de la familia *Rhabdoviridae* han demostrado que todas las especies de rhabdovirus de plantas evolucionaron de un ancestro común, y a su vez cada uno de los géneros *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus* posee un origen monofilético (Kuzmin *et al.* 2009; Mann & Dietzgen 2014; Bejerman *et al.* 2015).

Con el fin de reconstruir las relaciones filogenéticas del rhabdovirus causal de estriado amarillo en maíz y bajo la hipótesis de que se trata de un miembro del género *Cytorhabdovirus*, se construyeron árboles filogenéticos utilizando regiones conservadas de la polimerasa L del virus en estudio y de especies de rhabdovirus de plantas de los géneros *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus*.

Materiales y Métodos

1-Colección de muestras. Ocho (8) plantas con síntomas característicos de infección por rhabdovirus fueron colectadas de plantaciones de maíz entre diciembre y marzo de la campaña 2011/12, de la localidad de Sinsacate, provincia de Córdoba. Estas fueron colocadas en bolsas plásticas a 4°C hasta su posterior procesamiento. Para análisis moleculares las muestras fueron conservadas a -80°C hasta el momento de realizar la extracción de ARN. Para la observación de partículas virales al microscopio electrónico se fijaron muestras de tejido foliar en solución Karnovsky, por al menos 1 h y posteriormente se realizaron cortes ultrafinos como fue descrito en el capítulo I.

2-Extracción de ARN y RT-PCR. El ARN viral fue extraído del tejido vegetal infectado usando SV Total RNA Isolation System (Promega Corp., Madison, WI) empleando el protocolo provisto por el fabricante. Para los ensayos de RT-PCR se utilizaron cebadores degenerados para secuencias conservadas del gen de la polimerasa L de rhabdovirus, Rhab (Lamprecht *et al.* 2009) con un amplicon esperado de aproximadamente 900 pb y PVO (Bourhy *et al.* 2005) con un amplicon esperado de aproximadamente 450 pb. Este último juego de cebadores fue utilizado de manera diagnóstica para la amplificación de solo dos de las muestras recolectadas. El total de las muestras fue amplificado con los cebadores Rhab, por generar un segmento de mayor tamaño sobre el genoma que los PVO, y de esta manera otorgar mayor información. Con el ARN total extraído se realizó RT-PCR en un paso empleando Access RT-PCR Kit (Promega, Madison, WI). En la reacción se utilizaron alrededor de 300 ng (3 µl) de ARN molde, 0,2 mM de mezcla de dNTPs, 5 µl de tampón 5x, 1,3 µl de MgSO₂, 1 u de Tfl, 1 u de AMV, 0,25 µM de cada uno de los cebadores Rh (forward y reverse), en un volumen final de 25 µl. El ciclado fue realizado en un T3000 Thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany) y las condiciones fueron las siguientes: un ciclo de 55 min a 48°C, un ciclo de 4 min a 94°C, nueve ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 41 °C, 1 min 30 seg a 68°C, 29 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C, 1 min 30 seg a 68°C, y un ciclo final de 11 min a 68°C. Los amplicones fueron visualizados en gel de agarosa al 1,4% en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE), teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz UV en un analizador de imágenes Universal Hood II (BioRad, Hercules, US).

3-Clonado y secuenciación. Para el clonado, productos de RT-PCR con los cebadores Rhab (Lamprecht *et al.* 2009) de ARN extraído de una planta sintomática, fueron purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI) y ligados en un vector pGEM-T Easy Vector System (Promega Corp., Madison, WI). Con los plásmidos recombinantes se transformaron células competentes de alta eficiencia JM109 (Promega Corp.), de las cuales luego se seleccionaron y multiplicaron aquellas que poseían el inserto. El ADN plasmídico fue purificado de los clones de interés con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corp.) y secuenciado en ambas direcciones con los cebadores universales M13F/R mediante la metodología Sanger (Ruralex S.R.L).

4-Análisis de identidades nucleotídicas. Las secuencias parciales del gen de la polimerasa L de cinco clones independientes fueron alineadas para obtener una secuencia consenso con el programa EditSeq (Lasergene, DNASTAR, Madison, WI). Esta secuencia consenso fue analizada usando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para compararla con todas las secuencias disponibles en GenBank. Para determinar la similitud relativa entre la secuencia del rhabdovirus que afecta al maíz y otras secuencias de rhabdovirus disponibles, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con la secuencia consenso del rhabdovirus en estudio y las secuencias más similares de rhabdovirus (Clustal X2, Larkin *et al.*, 2007). Estas secuencias fueron seleccionadas en base a las que se encontraban disponibles para esta región del gen L y correspondían a especies de los géneros de rhabdovirus que infectan plantas *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus*. Se incluyeron a su vez en el análisis secuencias parciales del gen L de tres aislamientos de MYSV de trigo (Dumón *et al.* 2015). No fueron incluidas en el análisis secuencias nucleotídicas de especies de rhabdovirus de plantas de los géneros *Dichorhavirus* y *Varicosavirus* por haberse determinado la pertenencia de estos a la familia *Rhabdoviridae* posteriormente al análisis realizado en esta tesis. Se analizaron las identidades nucleotídicas entre dichas secuencias parciales del gen de la polimerasa L (BioEdit Sequence Alignment Editor, Hall, 1999). Las secuencias utilizadas en el análisis fueron las de los virus: TaVVCV, MIMV, MFSV, MMV, RYSV, SYNIV, PYDV, EMDV, BYSMV, LNYV, LYMoV, NCMV, SCV, ADV, cytorhabdovirus Rio Cuarto/2008, MYSV 1 y MYSV 2 aislamiento Marcos Juárez (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de rhabdovirus seleccionadas para el análisis filogenético.

Género y especie	Virus	Abreviatura	Hospedante natural	Vector	N° acceso GenBank
<i>Cytorhabdovirus</i>					
<i>Barley yellow striate mosaic cytorhabdovirus</i>	barley yellow striate mosaic virus	BYSMV	monocotiledóneas	<i>Laodelphax striatellus-Delphacidae</i>	FJ665628
<i>Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus</i>	lettuce necrotic yellows virus	LNYV	dicotiledóneas	<i>Hyperomyzus lactucae-Aphididae</i>	NC007642
<i>Lettuce yellow mottle cytorhabdovirus</i>	lettuce yellow mottle virus	LYMoV	dicotiledóneas	Desconocido	EF687738
<i>Northern cereal mosaic cytorhabdovirus</i>	northern cereal mosaic virus	NCMV	monocotiledóneas	<i>Laodelphax, Muellrianella, Ribautodelphax, Unkanodes-Delphacidae</i>	NC002251
<i>Strawberry crinkle cytorhabdovirus</i>	strawberry crinkle virus	SCV	dicotiledóneas	<i>Chaetosiphon spp.-Aphididae</i>	AY250986
<i>Alfalfa dwarf cytorhabdovirus</i>	alfalfa dwarf virus	ADV	dicotiledóneas	<i>Aphis craccivora-Aphididae</i>	HQ380230
-	cytorhabdovirus Rio Cuarto/2008	Cyto RC/2008	monocotiledóneas	<i>Delphacodes kuscheli-Delphacidae</i>	KF430632
-	maize yellow striate virus	MYSV (1)	monocotiledóneas	<i>Delphacodes kuscheli-Delphacidae</i>	KM009143
-	maize yellow striate virus aislamiento Marcos Juarez	MYSV (2)	monocotiledóneas	<i>Delphacodes kuscheli-Delphacidae</i>	KM097989
<i>Nucleorhabdovirus</i>					
<i>Taro vein chlorosis nucleorhabdovirus</i>	taro vein chlorosis virus	TaVCV	monocotiledóneas	Desconocido	AY674964

Tabla 1. Continuación

Género y especie	Virus	Abreviatura	Hospedante natural	Vector	N° acceso GenBank
<i>Maize Iranian mosaic nucleorhabdovirus</i>	maize Iranian mosaic virus	MIMV	monocotiledóneas	<i>Ribautodelphax Notabilis-Delphacidae</i>	DQ186554
<i>Maize fine streak nucleorhabdovirus</i>	maize fine streak virus	MFSV	monocotiledóneas	<i>Graminella nigrifrons-Cicadellidae</i>	AY618417
<i>Rice yellow stunt nucleorhabdovirus</i>	rice yellow stunt virus	RYSV	monocotiledóneas	<i>Nephotettix spp.-Cicadellidae</i>	AB516283
<i>Maize mosaic nucleorhabdovirus</i>	maize mosaic virus	MMV	monocotiledóneas	<i>Peregrinus maidis-Delphacidae</i>	AY618418
<i>Potato yellow dwarf nucleorhabdovirus</i>	potato yellow dwarf virus	PYDV	dicotiledóneas	<i>Agallia constricta, A. quadripunctata, Aceratagallia sanguinolenta-Cicadellidae</i>	NC016136
<i>Sonchus yellow net nucleorhabdovirus</i>	sonchus yellow net virus	SYNV	dicotiledóneas	<i>Aphis coreopsis-Aphididae</i>	L32603
<i>Eggplant mottled dwarf nucleorhabdovirus</i>	eggplant mottled dwarf virus	EMDV	dicotiledónea	<i>Agallia vorobjevi-Cicadellidae</i>	NC025389

5-Análisis filogenético. Para reconstruir las relaciones filogenéticas del rhabdovirus causal de estriado amarillo en maíz y sus ancestros, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas con la secuencia consenso del rhabdovirus en estudio y las secuencias de rhabdovirus seleccionadas indicadas en el punto anterior (Clustal X2, Larkin *et al.*, 2007), obteniéndose una matriz de secuencias nucleotídicas. Aquellas secuencias de la matriz de mayor tamaño que la secuencia consenso del rhabdovirus en estudio (989 pb) fueron cortadas con referencia a esta y la matriz fue nuevamente alineada. Mediante el software jModel Test 0.1.1 se evaluó el modelo de sustitución nucleotídica que mejor representaba a los datos (Posada 2008) y se estimaron las tasas de transiciones y transversiones, bajo las siguientes condiciones: se pusieron a prueba 11 esquemas de sustitución, se consideraron distintas frecuencias de bases (F), se contempló la posibilidad de que existan sitios invariantes en el genoma (I) y que la tasa de sustitución entre sitios sea heterogénea (G). La selección del modelo se realizó mediante el criterio de información de Akaike, determinándose así que el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica que mejor representaba a la matriz era el “Generalized time reversible” (GTR) considerando la heterogeneidad entre sitios de la tasa de sustitución (Gamma) (Waddell & Steel 1997). Se construyeron árboles filogenéticos por los métodos de máxima verosimilitud (PhyML v 3.0, Guindon & Gascuel, 2003), con un bootstrap considerando 1.000 réplicas, y bayesiano (MrBayes v 3.1.2, Ronquist & Huelsenbeck, 2003), con muestreo de 1.000.000 y frecuencia de 100.

Resultados

1-Colección de muestras. La presencia del virus en las 8 plantas colectadas fue confirmada mediante la observación de partículas virales en cortes ultrafinos al microscopio electrónico (Fig. 9) y por la amplificación de segmentos de la polimerasa L conservados entre los rhabdovirus, mediante RT-PCR con cebadores degenerados (Fig. 10 y Fig. 11) (Bourhy *et al.* 2005; Lamprecht *et al.* 2009).

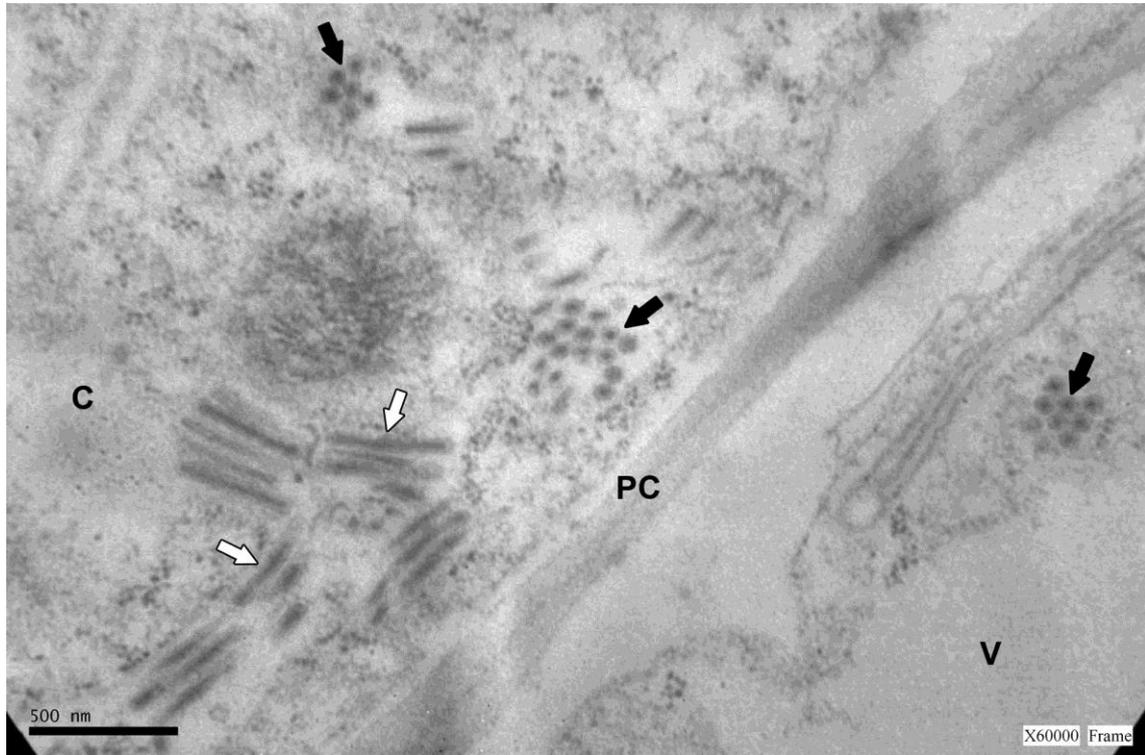


Fig. 9. Partículas virales del rhabdovirus en estudio observadas por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de tejido vegetal de plantas sintomáticas colectadas a campo. Flecha blanca: partículas en corte longitudinal; flecha negra: partículas en corte transversal; C: citoplasma; PC: pared celular; V: vacuola.

2-Extracción de ARN y RT-PCR. Mediante RT-PCR con cebadores degenerados para regiones conservadas de la polimerasa L de rhabdovirus se obtuvieron las bandas esperadas de 900 pb (Fig. 10) y 450 pb (Fig. 11), correspondientes a regiones conservadas del gen de la polimerasa L de *Rhabdoviridae*.



Fig. 10. Amplicones obtenidos por RT-PCR con cebadores degenerados (Lamprecht *et al.* 2009) a partir de ARN total extraído de muestras de plantas con síntomas de infección por rhabdovirus colectadas a campo. Calles: 1: 100bp DNA Ladder; 2: testigo sano; 3-9: plantas con síntomas de infección por MYSV.

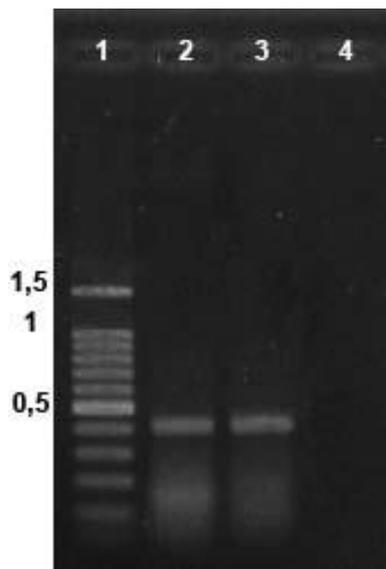


Fig. 11. Amplicones obtenidos por RT-PCR con cebadores degenerados (Bourhy *et al.* 2005) a partir de ARN total extraído de muestras de plantas con síntomas de infección por rhabdovirus colectadas a campo. Calles: 1: 100bp DNA Ladder; 2-3: plantas con síntomas; 4: testigo sano.

4-Análisis de identidades nucleotídicas. Los cinco clones independientes seleccionados, presentaron los mayores valores de identidad nucleotídica con miembros de la familia *Rhabdoviridae*, más aún con el género *Cytorhabdovirus* (Tabla 2). La secuencia consenso obtenida mediante el alineamiento de las secuencias individuales de los distintos clones del rhabdovirus del maíz, fue depositada en GenBank con el nombre de maize yellow striate virus (MYSV, GenBank JQ715419).

Tabla 2. Similitud relativa de secuencia con maize yellow striate virus (JQ715419). La matriz fue construida utilizando BioEdit.

MYSV JQ715419		Cytorhabdovirus	
MYSV JQ715419	ID		
MYSV2 KM097989	0,962	Cytorhabdovirus	
Cyto RC/2008 KF430632	0,926		
MYSV1 KM009143	0,907		
BYSMV FJ665628	0,724		
NCMV NC002251	0,683		
LYMoV EF687738	0,509		
LNYV NC007642	0,496		
SCV AY250986	0,487		
ADV HQ380230	0,473		
MIMV DQ186554	0,485		Nucleorhabdovirus
TaVCV AY674964	0,481		
RYSV AB516283	0,465		
MMV AY618418	0,447		
PYDV NC016136	0,447		
MFSV AY618417	0,444		
EMDV NC025389	0,429		
SYNV L32603	0,393		

Entre las secuencias genómicas virales analizadas, las identidades variaron entre 39,3% y 96,2%, siendo mayor con el género *Cytorhabdovirus*: 47,3% a 96,2% (Tabla 2). El análisis de identidad de la secuencia parcial del gen de la polimerasa L reveló que el mayor nivel de identidad de MYSV se registró con MYSV 2 aislamiento Marcos Juárez (KM097989) seguido por cytorhabdovirus Rio Cuarto/2008 (KF430632), siendo de 96.2% y 92.6%, respectivamente (Tabla 2). Los virus pertenecientes a una especie reconocida por el ICTV que presentaron mayores valores de identidad nucleotídica con MYSV fueron BYSMV (FJ665628) y NCMV (NC002251), siendo los porcentajes 72,4% y 68,3%, respectivamente.

5-Análisis filogenético del gen de la polimerasa L. Los análisis filogenéticos por los métodos de máxima verosimilitud y bayesiano (Fig. 12 y Fig. 13) registraron la misma topología de árbol. Los árboles muestran un grupo monofilético constituido por MYSV, Cyto RC/2008, BYSMV y NCMV (clado A). Por otra parte LNYV, LYMoV, ADV y SCV también se agruparían monofiléticamente con un alto soporte formando un clado hermano al clado A. Todos los virus pertenecientes al género *Cytorhabdovirus* analizados, conformarían un grupo monofilético diferenciado de los virus del género *Nucleorhabdovirus*, también monofiléticamente agrupado. Todos estos clados están altamente soportados (1) (Fig. 12).

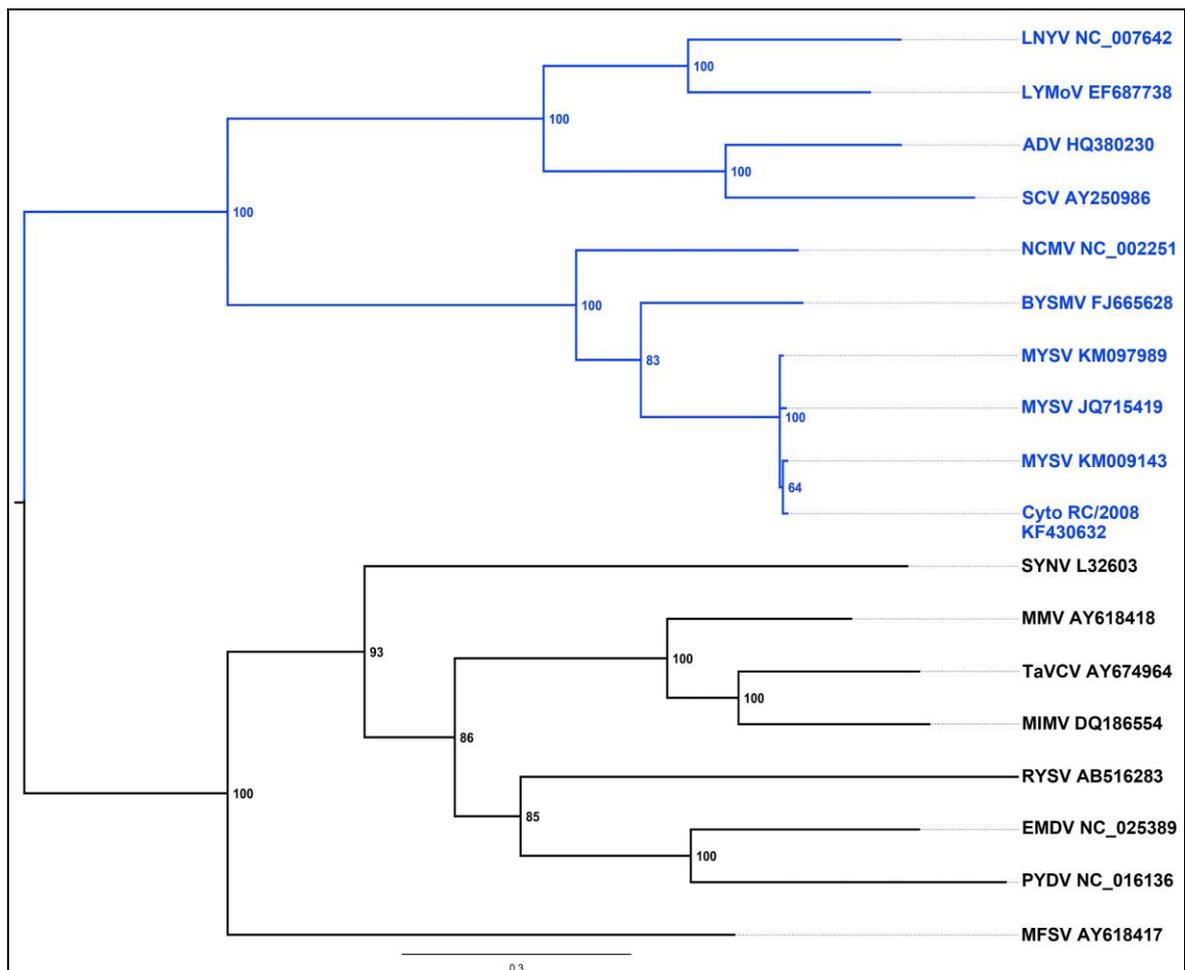


Fig. 12. Árbol filogenético de secuencias parciales del gen de la polimerasa L de maize yellow striate virus-MYSV (JQ715419) y otras secuencias de rhabdovirus de plantas. El árbol fue construido utilizando metodología de máxima verosimilitud. Sólo se indican los bootstrap mayores al 50%. Lettuce necrotic yellows virus-LNYV, lettuce yellow mottle virus- LYMoV, alfalfa dwarf virus-ADV, strawberry crinkle virus-SCV, northern cereal mosaic virus-NCMV, barley yellow striate mosaic virus-BYSMV, maize yellow striate virus isolate Marcos Juárez, maize yellow striate virus, cytorhabdovirus Rio Cuarto/2008-Cyto RC/2008, maize fine streak virus-MFSV, sonchus yellow net virus-SYNV, maize mosaic virus-MMV, taro vein chlorosis virus-TaVCV, maize Iranian mosaic virus-MIMV, rice yellow stunt virus-RYSV, eggplant mottled dwarf virus-EMDV y potato yellow dwarf virus-PYDV. En color azul se indica el clado que agrupa al género *Cytorhabdovirus*. En color negro se indica al clado que agrupa al género

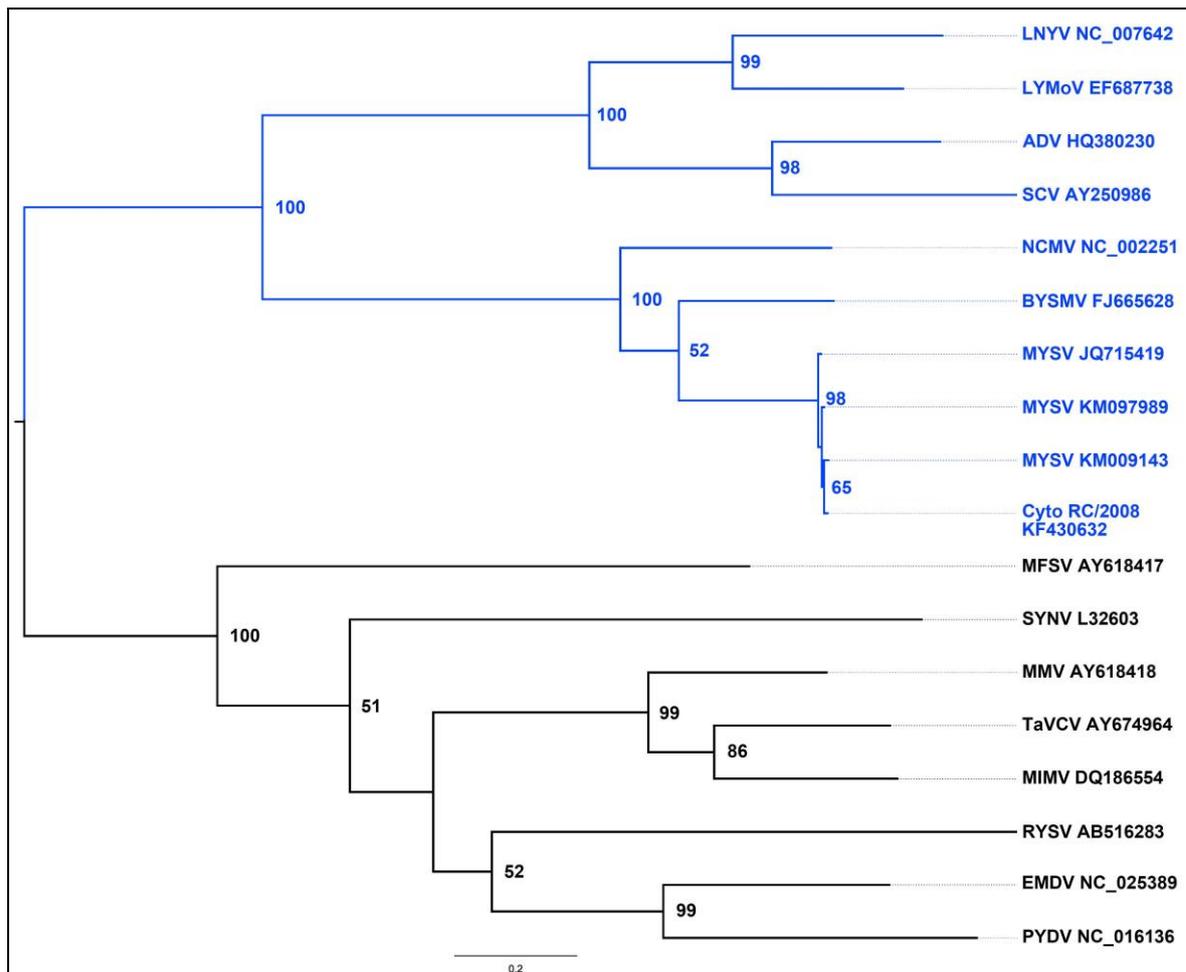


Fig. 13. Árbol filogenético de secuencias parciales del gen de la polimerasa L de maize yellow striate virus-MYSV (JQ715419) y otras secuencias de rhabdovirus de plantas. El árbol fue construido utilizando metodología bayesiana. Lettuce necrotic yellows virus-LNYV, lettuce yellow mottle virus- LYMoV, alfalfa dwarf virus-ADV, strawberry crinkle virus-SCV, northern cereal mosaic virus-NCMV, barley yellow striate mosaic virus-BYSMV, maize yellow striate virus isolate Marcos Juárez, maize yellow striate virus, cytorhabdovirus Rio Cuarto/2008-Cyto RC/2008, sonchus yellow net virus-SYNV, maize mosaic virus-MMV, taro vein chlorosis virus-TaVCV, maize Iranian mosaic virus-MIMV, rice yellow stunt virus-RYSV, eggplant mottled dwarf virus-EMDV, potato yellow dwarf virus-PYDV y maize fine streak virus-MFSV. En color azul se indica el clado que agrupa al género *Cytorhabdovirus*. En color negro se indica al clado que agrupa al género *Nucleorhabdovirus*.

Conclusiones

Todas las muestras de plantas de maíz con síntomas de infección por rhabdovirus colectadas a campo mostraron un fragmento del tamaño esperado al ser analizadas por RT-PCR, y al microscopio electrónico de transmisión se observaron partículas características de rhabdovirus. La secuencia parcial de la polimerasa L del rhabdovirus que infecta al maíz en Argentina fue depositada en GenBank bajo el nombre de maize yellow striate virus (MYSV, GenBank JQ715419), denominación con la cual será identificado de ahora en adelante en este trabajo de tesis. Esta secuencia mostró mayor similitud con el género *Cytorhabdovirus*, y específicamente con tres aislamientos de MYSV de trigo y con el virus BYSMV, en trigo. Árboles filogenéticos reconstruidos a partir de esta secuencia parcial de la polimerasa L viral agruparon al MYSV con miembros del género *Cytorhabdovirus*, conformando un grupo monofilético. Se determinó de esta manera que el MYSV sería un rhabdovirus del género *Cytorhabdovirus*.

Capítulo III: Evaluación, en condiciones experimentales, de insectos vectores del patógeno y de otros medios de transmisión

Introducción

Los rhabdovirus infectan numerosas especies de mono y dicotiledóneas, desde malezas hasta varias familias importantes de cultivos tales como lechuga, trigo, cebada, arroz, papa, tomate y maíz en todo tipo de clima (Jackson *et al.* 2005; Walsh & Verbeek 2011; Dietzgen *et al.* 2014; Mann & Dietzgen 2014). Cada especie induce un amplio espectro de síntomas en sus respectivas plantas huéspedes, y éstos van desde la falta de efectos discernibles hasta la muerte total de la planta. Los síntomas de infección incluyen achaparramiento, decoloración y amarillamiento de nervaduras, moteado o mosaico de plantas sistémicamente infectadas y necrosis de tejidos (Jackson *et al.* 2005). La mayoría de los rhabdovirus que infectan cereales son resistentes a transmisiones experimentales por raspado de las hojas (Redinbaugh *et al.* 2012), pero la inoculación por incisiones vasculares ha sido exitosa para algunos de ellos (Louie 1995; Madriz Ordenana *et al.* 2000; Redinbaugh *et al.* 2002; Jackson *et al.* 2005).

Los rhabdovirus de plantas son en su mayoría dependientes de transmisión por insectos, de modo que su prevalencia y distribución están en gran parte influenciadas por la ecología y preferencias de sus vectores. Las interacciones virus-vector son altamente específicas, y en todos los casos en los que se han analizado cuidadosamente los vectores conocidos, se ha registrado la replicación en ellos del rhabdovirus que transmiten (Redinbaugh *et al.* 2002; Ammar *et al.* 2004, 2009; Tordo *et al.* 2005). Este tipo de transmisión se conoce como persistente propagativa: luego de que el insecto ha adquirido el virus desde una planta enferma, ocurre un periodo de latencia que va desde algunos días a pocas semanas, durante el cual el virus se replica dentro del vector convirtiéndolo en inoculativo, condición que mantendrá durante toda su vida (Ammar & Nault 2002a; Hogenhout *et al.* 2003). Debido a que los rhabdovirus se replican en sus insectos vectores, la mayoría de las especies conocidas tienen dos hospedadores naturales: insectos y plantas o bien insectos y vertebrados (Redinbaugh *et al.* 2002; Chi-Wei Tsai 2006). Algunos rhabdovirus son transmitidos a la progenie de insectos hospedadores (Sylvester & Richardson 1992), lo que no ha sido observado en hospedadores plantas o vertebrados. Por esta razón, es probable que el hospedador primario del rhabdovirus ancestral fuera un insecto (Hogenhout *et al.* 2003). Aunque algunos rhabdovirus pueden ser transmitidos mecánicamente por abrasión foliar, este modo de transmisión no contribuye significativamente a su dispersión en la naturaleza y sólo ha sido demostrado para rhabdovirus transmitidos por áfidos (Sylvester & Richardson 1992; Hogenhout *et al.*

Evaluación, en condiciones experimentales, de insectos vectores del patógeno y de otros medios de transmisión eficientes

2008). Asimismo, no se ha reportado transmisión de rhabdovirus de plantas mediante polen o semilla (Jackson *et al.* 2005; Mann & Dietzgen 2014).

Considerando lo mencionado anteriormente, es notable el rol que cumplen los insectos en la transmisión horizontal de la mayoría de los rhabdovirus. Insectos del orden Hemiptera: *Cicadellidae*, *Delphacidae* y *Aphididae*, transmiten rhabdovirus a plantas (Greber 1982a; Tsai 1996; Hogenhout *et al.* 2008). Áfidos transmiten rhabdovirus a dicotiledóneas, mientras que cicadélidos y delfácidos lo hacen en su mayoría a monocotiledóneas (Jackson *et al.* 2005; Ammar *et al.* 2009; Mann & Dietzgen 2014). Los recientemente clasificados géneros *Dichorhavirus* y *Varicosavirus* poseen otros vectores, como otros artrópodos u hongos (Childers & Derrick 2003; Jackson *et al.* 2008; Walsh & Verbeek 2011; Dietzgen *et al.* 2014).

En estudios preliminares con MYSV, la transmisión experimental utilizando insectos de la familia *Delphacidae* resultó exitosa (Maurino *et al.* 2011). Puesto que los virus transmitidos por delfácidos raramente son a su vez transmitidos por cicadélidos (Nault & Ammar 1989; Ammar & Nault 2002b; Redinbaugh *et al.* 2002), en esta tesis se ensayaron tres especies de insectos delfácidos. Las especies de hemípteros delfácidos *Peregrinus maidis* (Ashmead), *Metadelphax propinqua* (Fieber) y *Delphacodes kuscheli* (Fennah) se encuentran ampliamente distribuidas en el área productora de maíz argentina (Marino de Remes Lenicov & Virla 1999; Marino de Remes Lenicov *et al.* 2014) y son vectores de rhabdovirus en gramíneas (Kitajima & Costa 1982; Lockhart *et al.* 1985; Remes Lenicov *et al.* 1985; Ammar & Hogenhout 2005; Dumón, Argüello-Caro, *et al.* 2011). A su vez, Dumón y colaboradores (2015) han reportado la capacidad de *D. kuscheli* de transmitir MYSV a plantas de trigo. Aunque el maíz no es un hospedante natural de *D. kuscheli* y *M. propinqua*, se conoce que estas especies son capaces de transmitir virus que ocasionan graves problemas al maíz, como es el caso del MRCV (Presello *et al.* 1997; Truol *et al.* 2001; Velázquez *et al.* 2001).

Para evaluar la capacidad de insectos vectores de transmitir en condiciones experimentales el MYSV a plantas sanas de maíz, se ensayaron tres especies de insectos, bajo la hipótesis de que integrantes de la familia *Delphacidae* (*Hemiptera*) serían capaces de actuar como vectores de este virus.

Evaluación, en condiciones experimentales, de insectos vectores del patógeno y de otros medios de transmisión eficientes

Materiales y Métodos

1-Recolección de insectos delfácidos para cría. Se realizaron dos viajes de campo a la zona sur de la provincia de Córdoba para la recolección de insectos de las especies a ensayar como vectores del virus, *D. kuscheli* y *M. propinqua*. Los muestreos se llevaron a cabo sobre de plantas de trigo candeal (*Triticum aestivum* L.), avena (*Avena sativa* L.) y gramón (*Cynodon dactylon* L.). A su vez, se realizó un viaje a la ciudad de San Miguel de Tucumán, región subtropical del país, para la recolección de insectos de la especie *P. maidis* sobre plantas de maíz criadas en la Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI-CONICET-Tucumán). Para la recolección de los ejemplares se utilizó una red entomológica de arrastre, y los individuos colectados fueron colocados en una jaula antiáfido y llevados al Instituto de Patología Vegetal (IPAVE-INTA) para su identificación. Bajo lupa estereoscópica se seleccionaron los individuos adultos de las especies de interés y se los colocó en jaulas de cría de 40 cm x 40 cm x 30 cm, sobre plantas sanas de avena, gramón (Marino de Remes Lenicov *et al.* 1997; Truol *et al.* 2001) o maíz (Tsai 1996) dependiendo de si se trataba de *D. kuscheli*, *M. propinqua* o *P. maidis*, respectivamente. Las colonias obtenidas se mantuvieron en un fitotrón bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

2-Transmisión por vectores. Se realizaron transmisiones del virus usando las especies criadas como se mencionó en el punto anterior. Los ensayos de transmisión del virus con *P. maidis* se llevaron a cabo colocando ninfas sanas de 1° a 3° estadio sobre plantas de maíz infectadas con rhabdovirus, durante 7 días para la adquisición. Posteriormente los insectos fueron transferidos a plantas sanas de maíz por 21 días para completar el período de latencia.

Desde que *M. propinqua* y *D. kuscheli* no tienen preferencia por el maíz (A. M. Remes Lenicov *et al.* 1991; Virla & Remes Lenicov 1991), las condiciones de los ensayos de transmisión debieron ser levemente distintas. Ninfas de 1° a 3° estadio fueron colocadas sobre plantas enfermas por 16 a 18 h, para la adquisición viral (Fig. 14 A). Posteriormente se transfirieron las ninfas a plantas sanas de *Cynodon sp.* para *M. propinqua* y avena para *D. kuscheli*, por un periodo de latencia de 21 días.

En todos los casos los ensayos de transmisión se realizaron utilizando 5 adultos virulíferos por planta, sobre plántulas de 15 días de edad, durante 7 días (Fig. 14

Evaluación, en condiciones experimentales, de insectos vectores del patógeno y de otros medios de transmisión eficientes

B). Se transmitieron 76 plantas utilizando *P. maidis*, 28 con *D. kuscheli* y 8 utilizando *M. propinqua* (Fig. 14 C).

Luego del periodo de acceso a la inoculación se aplicó insecticida sobre las plantas y se las colocó a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en invernadero, para el desarrollo de síntomas. El resultado fue evaluado mediante observación periódica de síntomas de las plantas inoculadas. Luego de un periodo de 30 días después de la inoculación, se tomaron muestras de hoja de las plantas y se las conservó a -80°C para análisis de RT-PCR con cebadores específicos para una región del gen de la polimerasa L diseñados en esta tesis (ver capítulo IV). Para la observación de partículas virales al microscopio electrónico se fijaron muestras de tejido foliar en solución Karnovsky, por al menos 1 h y posteriormente se realizaron cortes ultrafinos como fue descrito en el capítulo I.



Fig. 14. Metodología para la transmisión de maize yellow stripe virus mediante insectos vectores. A) Adquisición del virus: ninfas alimentándose de una planta de maíz enferma con MYSV. B) Latencia: individuos criados en jaulas sobre plantas sanas de maíz. C) Transmisión viral: insectos adultos alimentándose de una planta de maíz sana.

Evaluación, en condiciones experimentales, de insectos vectores del patógeno y de otros medios de transmisión eficientes

3-Transmisión mediante incisiones vasculares (VPI). Se realizaron dos ensayos de transmisión por incisiones vasculares según Louie (1995). Las semillas se colocaron a remojar en agua durante 24 h a 4°C. Posteriormente se las inoculó en la zona del tejido vascular del embrión, inyectándolo a 45° utilizando un instrumento con un peine fino con agujas de acupuntura de acero inoxidable de 0,25 mm de diámetro y de puntas pulidas (Fig. 15 A y B). La solución inoculada estaba compuesta por un macerado de hojas de plantas infectadas con MYSV en tampón Na_2HPO_4 0,01 M pH 7, en proporción 1/5 p/v. Luego de la inoculación las semillas se dejaron a 27°C durante 24h, y posteriormente fueron colocadas en macetas con tierra estéril de a 5 por maceta y llevadas a invernadero para evaluar su evolución. Se inyectaron 50 semillas con el macerado, 50 sólo con tampón y se dejaron como control sin inocular 50 semillas. El resultado fue evaluado mediante observación periódica de síntomas de las plantas inoculadas.



Fig. 15. Instrumento utilizado para realizar la inoculación de maize yellow striate virus mediante la técnica de incisiones vasculares de semillas de maíz. A) Vista general de la herramienta. B) Detalle de la punta con peine de dientes finos.

Evaluación, en condiciones experimentales, de insectos vectores del patógeno y de otros medios de transmisión eficientes

Resultados

1-Recolección de insectos delfácidos para cría. Se logró mantener colonias estables de las especies de hemípteros delfácidos *D. kuscheli*, *M. propinqua* y *P. maidis*. Las mismas se mantuvieron en un fitotrón bajo condiciones controladas de luz, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad; y temperatura, de 24 ± 2 °C para *D. kuscheli* y *M. propinqua* y 27 ± 2 °C para *P. maidis*. Las colonias de *D. kuscheli* fueron mantenidas alimentándose sobre plantas de avena, las de *M. propinqua* sobre plantas de gramón y las de *P. maidis* sobre plantas de maíz.

2-Transmisión mediante insectos vectores. Se logró transmitir el virus a plántulas de maíz de 15 días desde siembra utilizando insectos de la especie *P. maidis*, con un porcentaje de transmisión, determinado por la presencia en los materiales analizados de la banda esperada mediante RT-PCR con cebadores específicos para MYSV, de 6,58% (5/76 plantas), 10,71% (3/28 plantas) con *D. kuscheli* y 12,5% (1/8 plantas) con *M. propinqua*. La transmisión del virus se logró colocando 5 individuos por planta, con tiempos de adquisición del patógeno, latencia e inoculación de 7, 21 y 7 días, respectivamente, para *P. maidis* y 16 a 18 h, 21 y 7 días para *M. propinqua* y *D. kuscheli* constituyendo una transmisión de tipo persistente. Sólo se recuperó la sintomatología característica en algunas de las plantas que fueron transmitidas con *P. maidis* (2/76) (Fig. 17 A y B), las cuales a su vez registraron resultado positivo al ser analizadas por RT-PCR (Lamprecht *et al.* 2009) y microscopía electrónica (Fig. 16). Sin embargo, plantas que no mostraron ninguna alteración visible con respecto a los controles sanos amplificaron por RT-PCR las bandas correspondientes al gen de la polimerasa L de rhabdovirus con cebadores degenerados (Lamprecht *et al.* 2009) y específicos para una región conservada del gen de la polimerasa del MYSV, desarrollados en este trabajo de tesis (Fig. 18).

Evaluación, en condiciones experimentales, de insectos vectores del patógeno y de otros medios de transmisión eficientes

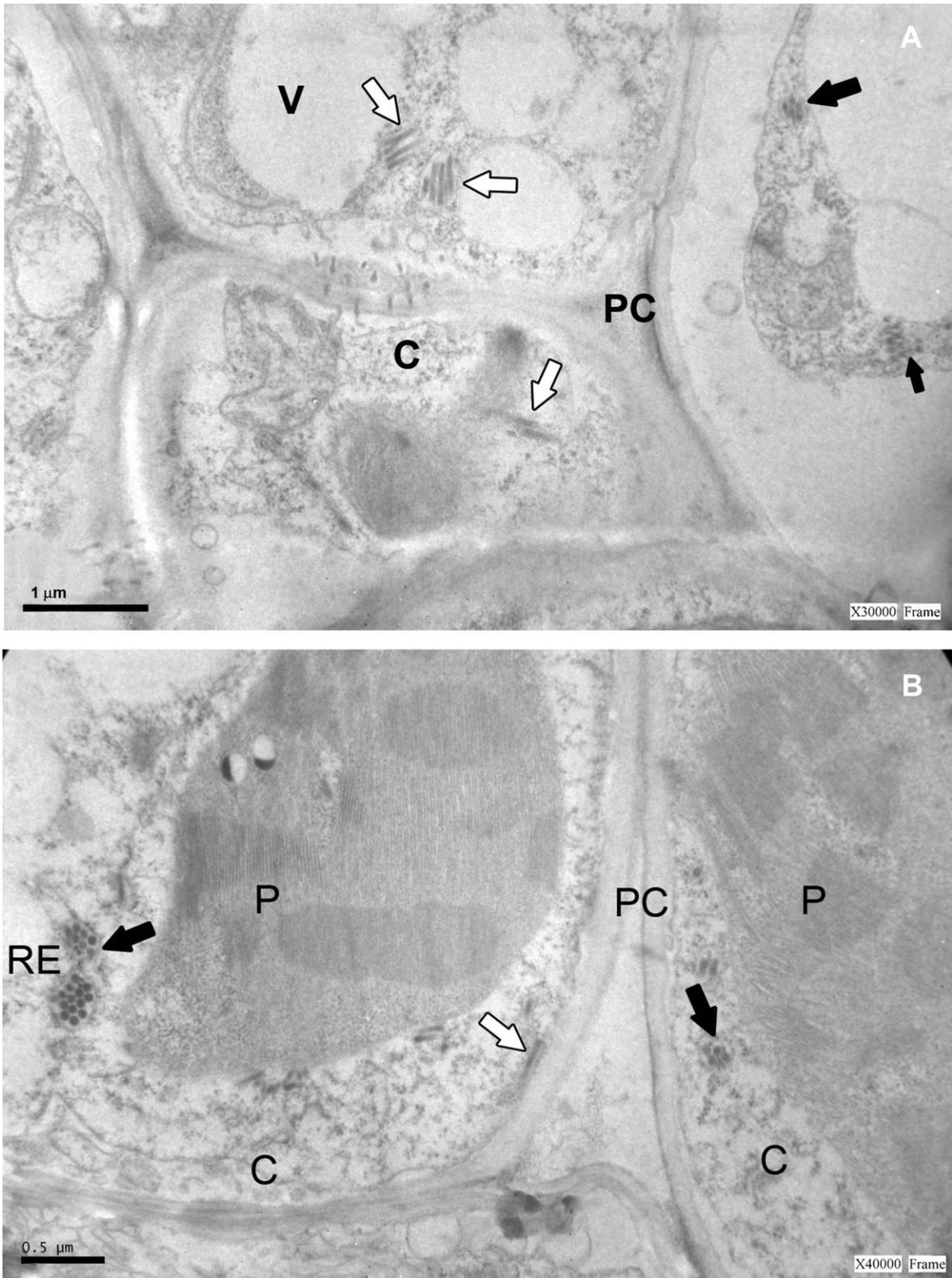


Fig. 16. Partículas virales de maize yellow striate virus observadas por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de hojas de plantas transmitidas con *Peregrinus maidis*. Flecha negra: partículas en corte transversal; flecha blanca: partículas en corte longitudinal. A) Vista en aumento de X30000. B) Vista en aumento de X40000. P: cloroplasto; C: citoplasma; PC: pared celular; RE: retículo endoplásmico.

Evaluación, en condiciones experimentales, de insectos vectores del patógeno y de otros medios de transmisión eficientes



Fig. 17. Síntomas de estriado amarillo asociado a infección por maize yellow striate virus, observados en plantas transmitidas experimentalmente con insectos hemípteros de la familia *Delphacidae*. A) Estrías finas hacia el ápice de la hoja. B) Estrías gruesas en la base foliar. C) Síntomas en toda la planta: estrías y acortamiento de entrenudos.

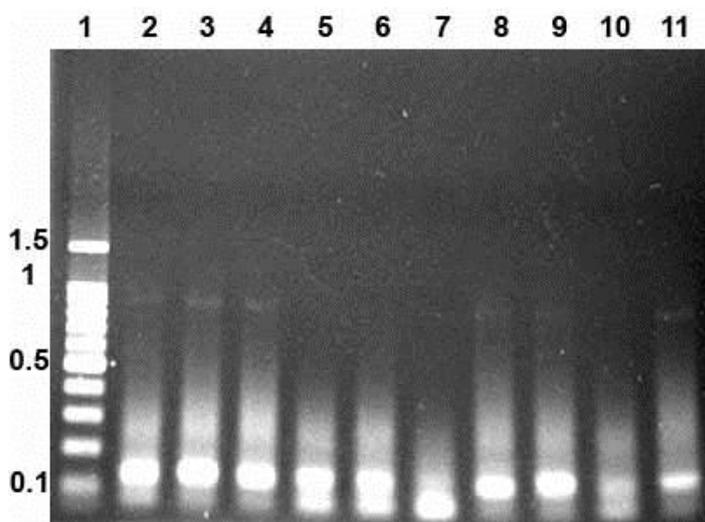


Fig. 18. Amplicones obtenidos por RT-PCR con cebadores específicos para maize yellow striate virus. Calles: 1: 100bp DNA ladder; 2: testigo enfermo; 3, 4 y 9 plantas transmitidas con *Delphacodes kuscheli*; 5, 6, 7, 8 y 10 plantas transmitidas con *Peregrinus maidis*; 11. planta transmitida con *Metadelphax propinqua*.

Evaluación, en condiciones experimentales, de insectos vectores del patógeno y de otros medios de transmisión eficientes

3-Transmisión mediante incisiones vasculares (VPI). No se logró transmitir la virosis mediante VPI. Las semillas inoculadas correspondientes a la 1° repetición no lograron germinar, probablemente por haber sufrido heridas en su embrión (datos no mostrados). Las semillas de la 2° repetición germinaron pero no mostraron ningún síntoma de infección viral.

Conclusiones

Se logró mantener colonias estables de las especies de delfácidos *P. maidis*, *M. propinqua* y *D. kuscheli* a partir de individuos colectados a campo. Se comprobó la transmisión experimental del MYSV a plantas sanas de maíz con estas tres especies de insectos, con tiempos de adquisición de 7 días para *P. maidis* y 16 a 18 h para *D. kuscheli* y *M. propinqua* y 21 y 7 días de latencia e inoculación, respectivamente, para las tres especies. Se recuperaron los síntomas característicos de infección por este virus, se obtuvieron las bandas esperadas al ser amplificadas con cebadores específicos para MYSV y se observaron partículas características en cortes ultrafinos de hojas de plantas transmitidas. Los porcentajes de transmisión determinados mediante RT-PCR con cebadores degenerados fueron de 6,58% con *P. maidis*, 10,71% con *D. kuscheli* y 12,5% con *M. propinqua*.

Capítulo IV: Desarrollo de métodos de diagnóstico eficiente

Introducción

Los rhabdovirus poseen generalmente 5 polipéptidos estructurales que representan entre 65 - 75% del peso seco del virus y se denominan G, P, M y L. La proteína G forma las proyecciones de la superficie viral y se une a los receptores de las células hospedadoras. Posee actividad hemaglutinina, además de estar involucrada en procesos de tropismo y patogenicidad. P es un polipéptido de 20-30 kDa y es cofactor de la polimerasa viral L, por lo que es requerido para la transcripción y replicación. M es una proteína componente interna del virión. Se cree que regula la transcripción genómica del ARN uniéndose a la nucleocápside y al dominio citoplásmico de G; inhibe la transcripción de las células hospedantes y es mediadora de otros procesos patológicos. La proteína L posee una masa de alrededor 220-240 kDa y es uno de los componentes de la nucleocápside viral. Es una enzima multifuncional responsable de la mayoría de las funciones necesarias para la transcripción y replicación como las de polimerasa dependiente de ARN, “capping” del 5' del ARNm, metilación, poliadenilación de los ARNm virales o actividad de “protein kinasas” (Dietzgen *et al.* 2011).

Los métodos tradicionales de diagnóstico de virus en plantas incluyen bioensayos que requieren mucho tiempo y esfuerzo e involucran la utilización de un hospedante indicador, evaluación y seguimiento de síntomas, observación de partículas virales, evaluación del rango de hospedantes vegetales e insectos vectores. La disponibilidad de un único método de diagnóstico confiable es de gran importancia para el estudio de la patología vegetal, mayormente en estudios que involucran el análisis rutinario de una gran cantidad de muestras. El progreso en las técnicas de biología molecular e inmunología han posibilitado el desarrollo de nuevas técnicas de detección rápidas y masivas, principalmente aquellas basadas en anticuerpos (serológicas) y las basadas en ácidos nucleicos (moleculares) (Sharma & Misra 2011). De esta manera, se han desarrollado una gran cantidad de reactivos para la detección de ácidos nucleicos virales, mediante por ejemplo la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (Heim *et al.* 2008) o para la detección de proteínas virales utilizando ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Giménez Pecci *et al.* 1986; Anklam *et al.* 2002; Shi *et al.* 2003). Las técnicas serológicas se basan en la utilización de anticuerpos que reconocen de manera específica a proteínas (antígenos) virales. Para la producción de dichos anticuerpos, partículas virales pueden ser purificadas de tejido vegetal enfermo y luego inoculadas a conejos, cabras o gallinas para la obtención de anticuerpos policlonales, o bien a ratones

para generar anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y no presentan reacciones cruzadas, pudiendo diferenciar incluso cepas diferentes de un mismo virus (Permar *et al.* 1990; Nemchinov *et al.* 1996). Por otra parte, los anticuerpos policlonales son mucho más estables a cambios de pH y salinidad, el enlace que presentan es de mayor avidez, y su producción es menos costosa y requiere de menor tiempo que la de anticuerpos monoclonales (Lipman *et al.* 2005).

Como fue mencionado en el capítulo II de esta tesis, debido a la función esencial que cumplen las proteínas L de los virus de ARNsc en los procesos de replicación del ARN viral en las células hospedantes, los genes que codifican para estas proteínas contienen regiones en su secuencia nucleotídica muy conservadas entre todos los virus de ARNsc de cadena negativa (Poch *et al.* 1989). De esta manera, se han diseñado cebadores específicos para el gen que codifica para la proteína L de varios rhabdovirus, los cuales han resultado exitosos en la identificación de dichas especies virales (Posthuma *et al.* 2002; McGavin *et al.* 2011).

La proteína N, con una masa de alrededor de 47-62 kDa, es el principal componente de la nucleocápside, asociado a los ARN (-) o ARN (+). Es un elemento activo en la transcripción, exponiendo las bases nucleotídicas a la polimerasa. Tanto la proteína G, como la P y la N inducen respuestas inmunes mediadas por células en sus hospedantes. Esta última, a su vez, desencadena la producción de anticuerpos humorales en los mismos (Dietzgen *et al.* 2011). La función de otras proteínas virales como glicoproteínas adicionales o proteínas C, presentes en algunos rhabdovirus, podrían estar involucradas en procesos de infección y patogénesis, o replicativos, aunque muchas de sus funciones son todavía desconocidas (Walker *et al.* 2011). Antisueros desarrollados a partir de purificaciones de la nucleocápside de los rhabdovirus digitaria striate virus (DSV) y MSSV han demostrado una alta especificidad en su capacidad de detección mediante serología por difusión en gel (Greber 1990).

Con la finalidad de obtener un diagnóstico eficiente y rápido del MYSV, se desarrollaron dos reactivos de diagnóstico, uno de ellos basado en técnicas serológicas y el otro en la detección de los ácidos nucleicos virales.

Materiales y métodos

1-Producción de un reactivo de diagnóstico molecular específico para MYSV. A partir de la secuencia nucleotídica parcial del gen de la polimerasa L obtenida (capítulo II), se diseñaron cebadores específicos para MYSV, a los cuales se denominó MYSV L. Mediante la herramienta informática AmplifX (Nicolas Julien 2004-2008, versión 1.5.0) se probaron los cebadores en reacciones virtuales de amplificación determinándose la calidad, especificidad y temperaturas de óptimas de alineamiento de los mismos. A su vez, los cebadores fueron probados en reacciones reales de RT-PCR, utilizando como controles ARN extraído de dos plantas de maíz sin sintomatología alguna de MYSV (testigos sanos), dos plantas con síntomas de infección por MYSV colectadas a campo y que reaccionaron positivamente con cebadores degenerados para rhabdovirus (Lamprecht *et al.* 2009), una de ellas colectada durante la campaña 2011/12 (capítulo II) y la otra durante 2012/13 (testigos enfermos), una planta de alfalfa infectada con ADV y ADN purificado de uno de los clones que se utilizaron para obtener la secuencia parcial de la polimerasa L del rhabdovirus en estudio (clon 4). De todas las muestras vegetales se extrajo ARN total con CTAB y LiCl (Doyle & Doyle 1994). Las reacciones de RT-PCR fueron realizadas utilizando el kit Access RT-PCR (Promega), siguiendo el protocolo provisto por la empresa: 300 ng de ARN total, y 0,25 μ M de cada uno de los cebadores MYSV (forward y reverse), en un volumen total de 25 μ l. El ciclado fue realizado en un termociclador T3000 Thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany) y las condiciones fueron las siguientes: un paso de retrotranscripción de 55 min a 48°C, un paso de 4-min a 94°C, 40 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 53°C, 1:30 min a 68°C, y un paso final de 11 min a 68°C. Los resultados fueron visualizados mediante protocolos estándar.

2-Antisuero de virus parcialmente purificado. Se realizaron 3 purificaciones del virus según Creamer (1992), modificado, empleando la siguiente metodología: se molieron 100 g de hojas de plantas de maíz infectadas con MYSV en 4 volúmenes de tampón Tris- HCl 0,1 M pH 8,4 (tampón extracción) y se filtró el homogenato en frío con voile. Luego de centrifugar a 8.000 rpm por 15 minutos a 4 °C el sobrenadante fue nuevamente filtrado con voile y colocado sobre un gradiente de sacarosa al 30/60%, en tampón Tris - HCl 0,1 M pH 7,5 (tampón mantenimiento). Este fue

centrifugado a 25.000 rpm por 1 h. La banda verde de la interfase fue concentrada a 25.000 rpm por 1 h. El precipitado se resuspendió en tampón mantenimiento, se sembró en un gradiente de sacarosa 5, 10, 20 y 30% y se lo centrifugó por 15 minutos a 26.000 rpm. El gradiente fue separado manualmente en 8 fracciones que se concentraron a 30.000 rpm por 30 minutos, resuspendieron en tampón de mantenimiento y almacenaron a -80 °C. De cada fracción se realizó un “leaf dip” para MET. Para ello se colocó una gota de la suspensión obtenida de cada una de las fracciones del gradiente de sacarosa en una gradilla para microscopía electrónica, la cual luego fue contrastada con acetato de uranilo al 2%. Las gradillas obtenidas fueron observadas con microscopio electrónico de transmisión Jeol 1220 (Kitajima & Nome 1999).

Con una alícuota de cada una de las purificaciones y una alícuota de un paso intermedio de una de ellas, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE) teñido con coomasie blue, para observar la/s proteína/s virales purificadas (Laemmli 1970).

Se dispuso de un ejemplar de sexo femenino de conejo adulto blanco neozelandés, para realizar la producción de anticuerpos específicos contra MYSV (Fig. 19). De manera de descartar la reacción antigénica previa del animal hacia el material vegetal a analizar se extrajeron 5 ml de sangre realizando un pequeño corte con un bisturí en la vena marginal de la oreja del animal. La sangre se recolectó en un tubo limpio recubierto con vaselina sólida y se la dejó coagular toda la noche a 4 °C. Posteriormente se separó manualmente el suero del coagulo formado y se lo centrifugó 5 minutos a 5.000 rpm a 4 °C, para la obtención de un suero preinmune. Mediante la técnica de NC-ELISA en membrana de nitrocelulosa se determinó la reacción del suero hacia plantas de maíz. Se molieron dos plantas sanas de maíz y una planta enferma con MYSV, en tampón extracción en proporción 1/5. A su vez se ensayaron tres concentraciones del suero preinmune: 1:300, 1:1.000 y 1:2.000.



Fig. 19. Ejemplares de conejo blanco neozelandés utilizados para la obtención de los anticuerpos anti maize yellow striate virus.

Se inoculó al animal en tres oportunidades, y a modo de clarificar la escala temporal se considerará como día 1 al día en el cual fue realizada la primera inoculación (Fig. 20). En esta primera inoculación se utilizó extracto parcialmente purificado de MYSV en tampón HEPES salino 0,02 M y adyuvante completo de Freund 1/1 (v/v), y se realizaron 4 inyecciones subdérmicas en el dorso del animal, a cada lado de la columna vertebral y una inyección intramuscular en el muslo (Rodríguez Pardina *et al.* 1998). Para esta inoculación se eligió la primera purificación realizada, por tratarse de una de las más limpias (Fig. 23 A), a modo de iniciar una reacción inmunológica lo más específica posible en el animal. La segunda inoculación fue realizada el día 14 inyectando a la coneja de manera intramuscular en ambos muslos con la purificación 2, diluida en tampón HEPES salino 0,02 M y adyuvante incompleto de Freund 1/1 (v/v). La última inoculación se realizó el día 102, reservándose para este caso la tercera purificación, ya que al tratarse de otra de las más limpias, se buscó elevar de manera más específica la reacción inmune (Fig. 23 A.). Se efectuaron dos sangrados, el primero el día 28 (suero N1), y el segundo el día 112 (suero N2). El sangrado se realizó como fue descrito anteriormente para el suero preinmune dejando coagular la sangre recolectada toda la noche a 4 °C o 2 h a 37 °C y luego 2 h a 4 °C. Una parte de este suero se fraccionó y conservó a – 80°C y la otra fue liofilizada.

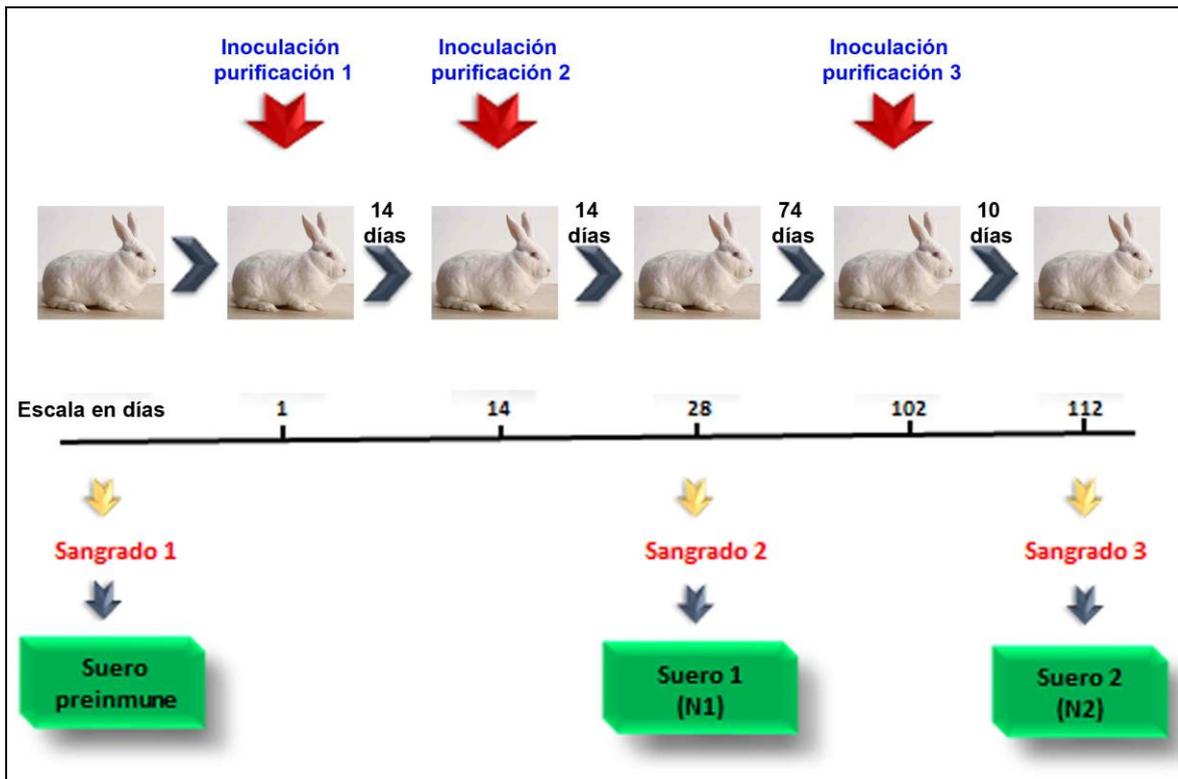


Fig. 20. Representación esquemática del procedimiento utilizado para la producción del antisuero específico para maize yellow striate virus.

Para determinar la reacción inespecífica contra proteínas de planta sana de los sueros obtenidos, se realizó la técnica de NC-ELISA en membrana de nitrocelulosa, ensayándose dos muestras de plantas enfermas con MYSV, una muestra de planta sana y tampón, con una dilución 1:1.600 de los sueros N1 y N2, crudos.

Para evaluar la eficiencia de los sueros obtenidos en la detección de MYSV, se realizó NC-ELISA en nitrocelulosa, ensayando diluciones seriadas de los sueros N1 y N2 adsorbidos previamente toda la noche a 4 °C en extracto de planta sana de maíz 1/30, desde 1:100 a 1:51.200. Se evaluaron dos muestras de plantas de maíz enfermas con MYSV y una planta sana.

Para determinar la especificidad de los sueros N1 y N2 de MYSV se realizó la técnica de NC-ELISA en nitrocelulosa en una concentración de 1:1.600 de ambos sueros, adsorbidos toda la noche a 4 °C en extracto de maíz sano 1:30, evaluándose una planta de maíz enferma con síntomas de MYSV, una planta de maíz enferma (positiva mediante RT-PCR con los cebadores MYSV L) sin síntomas de MYSV, un control enfermo de maíz con MMV (Agdia Inc.), una planta de alfalfa enferma con ADV

(Bejerman *et al.* 2011), una planta de frutilla enferma con SCV, una planta de *Physalis sp.* enferma con SCV (Perotto *et al.* 2014), una planta de cebada y una planta de trigo con síntomas de MYSV (Dumón *et al.* 2015), además de sus respectivos controles sanos.

Resultados

1-Producción de un reactivo de diagnóstico molecular específico para MYSV. El fragmento amplificado por estos cebadores diseñados es de 896 pb y las secuencias son MYSM L-f: 5'-GAGGTTGATAGGGACCAAAAGG-3' para el forward y MYSV L-r: 5'-CTAGGTCTTTCTCCAAACTCT-3' para el reverse.

Los cebadores fueron específicos en la amplificación de una región del gen de la polimerasa L de MYSV cuando fueron utilizados en reacciones de PCR. Los controles positivos (plantas infectadas y el clon de ADN) presentaron el fragmento esperado de 896 pb, mientras que los controles negativos (planta sana de maíz y planta enferma con ADV) no mostraron ninguna banda del tamaño esperado (Fig. 21).

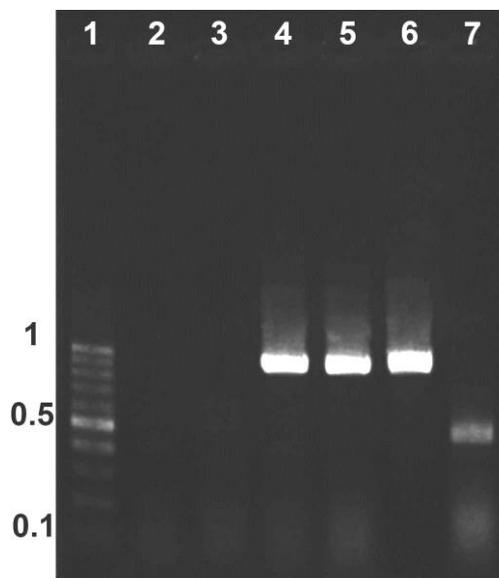


Fig. 21. Amplicones obtenidos por RT-PCR con cebadores específicos para maize yellow striate virus. Calles: 1: CienMarker; 2-3: testigos sanos; 4 -5: plantas con síntomas de infección por MYSV; 6: clon 4; 7: planta infectada con alfalfa dwarf virus.

Con estos cebadores se logró detectar 41 muestras enfermas de campo de las localidades de Cañada de Luque y Sinsacate, provincia de Córdoba, Los Toldos provincia de Buenos Aires y Santa Isabel, Santa Fe, provincia de Santa Fe.

2-Antisuero de virus parcialmente purificado. En las fracciones 2 y 3 del gradiente de sacarosa pudieron observarse, al microscopio electrónico de transmisión, algunas partículas virales completas en las cuales pudo confirmarse el tamaño de alrededor de 400 nm de largo y 30 nm de diámetro, anteriormente determinado de cortes ultrafinos. A su vez, se observó en las mismas el estriado característico de la familia *Rhabdoviridae* formado por protrusiones de la glicoproteína viral (Fig. 22 A). La mayor parte de las partículas virales se encontraban fragmentadas y formando agregados (Fig. 22 B).

En gel de acrilamida al 15 % se evidenció una banda de alrededor de 50 kDa tanto en las diluciones, como en el paso previo de los productos de las purificaciones virales realizadas (Fig. 23). En los productos de una de las purificaciones y en el paso previo de una de ellas se observaron bandas extra, además de aquella de 50 kDa, indicando que esa purificación o paso de la misma se encontraba contaminado con otro tipo de proteínas.

En la membrana de nitrocelulosa pudo observarse que la reacción preinmune del suero proveniente del conejo contra las plantas de maíz fue moderada. Incluso en una concentración elevada de 1:300, la reacción evidenciada no fue demasiado alta (Fig. 24).

Mediante NC-ELISA se registró una muy buena eficiencia de ambos sueros, observándose una reacción colorimétrica positiva en las muestras enfermas con MYSV luego de sólo 7 minutos de acción del sustrato en una concentración 1:1.600, con suero crudo (Fig. 25). El 1° suero (N1) resultó ser más específico aunque levemente menos sensible que el 2° (N2), ya que presentó menor reacción contra la muestra sana, pero a su vez la reacción de las enfermas, comparadas con las muestras enfermas del 2° suero también es levemente menor. El 2° suero es evidentemente más sensible, aunque la reacción inespecífica contra proteínas de planta sana también es mayor (Fig. 25).

Luego de la adsorción de los dos sueros en extracto de planta sana para eliminar la reacción inespecífica de ellos contra proteínas propias de la planta, la reacción de NC-ELISA registró que este bloqueo efectivamente eliminó casi por completo esta

reacción de tipo inespecífica. Sólo en las concentraciones más altas del suero, 1:100 y 1:200 para el 1° suero y 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800 para el 2°, se observa una leve tonalidad en la celda correspondiente a la planta sana (Fig. 26 A y B).

En la membrana de nitrocelulosa pudo observarse que los sueros N1 y N2 producidos durante este trabajo de tesis, presentan una muy buena especificidad para MYSV. La concentración de 1:1.600 del suero N1 detectó claramente la muestra de maíz con síntomas de MYSV y las muestras de cebada y trigo con síntomas de MYSV, y presentó una muy leve reacción hacia el ADV (Fig. 27 A). El suero N2, como ya se había observado anteriormente, resultó ser más sensible, ya que la reacción contra MYSV fue más evidente, pero un poco menos específico ya que la reacción presentada hacia ADV fue levemente mayor que con el suero N1 (Fig. 27 B). Ninguno de los dos sueros reaccionó hacia el maíz asintomático enfermo con MYSV, ni contra los otros rhabdovirus ensayados aparte del ADV (Fig. 27 A y B).

Se obtuvieron 15 ml del antisuero N1 y 18 ml de antisuero N2, los cuales se conservan en parte liofilizados y en parte a -80 °C.

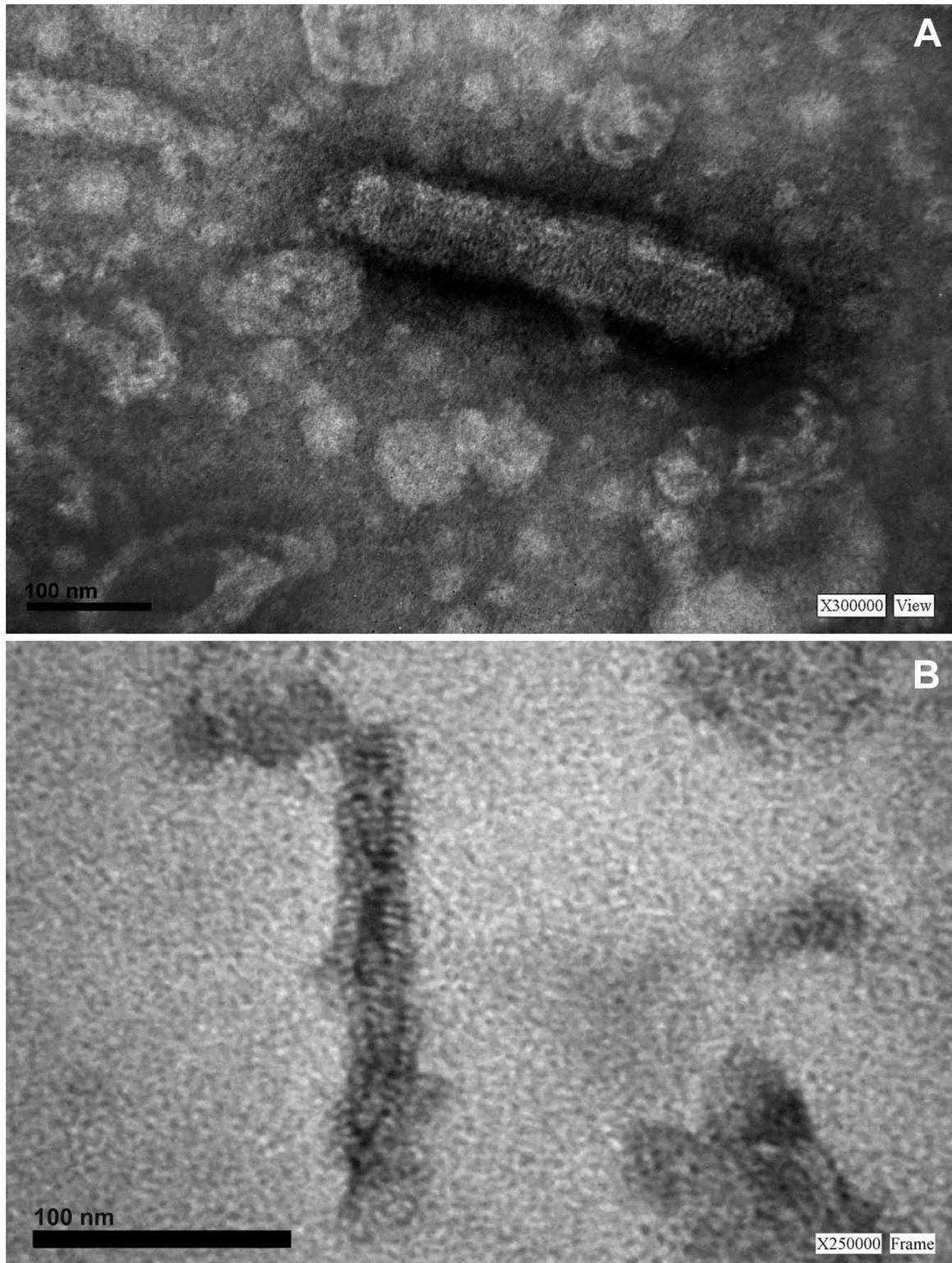


Fig. 22. Partículas de rhabdovirus observadas por microscopía electrónica de transmisión de preparados de purificaciones parciales de tejido vegetal enfermo. A) Partícula viral completa de maize yellow striate virus (MYSV). B) Fragmentos de partículas virales de MYSV

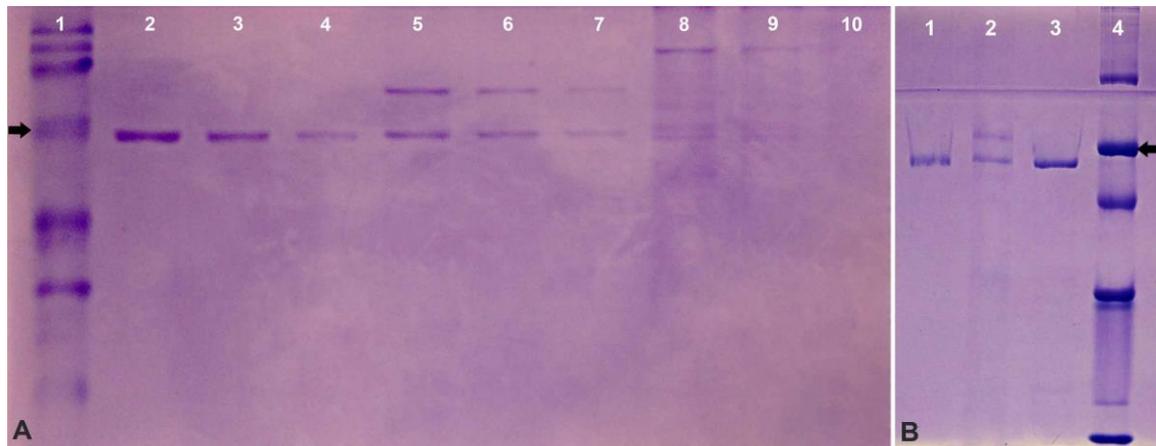


Fig. 23. SDS-PAGE de purificaciones parciales del maize yellow striate virus. A) Purificaciones 1 y 2; Calles: 1, SDS-PAGE Standards Low Range, Prestained (BioRad); 2-4 purificación 1 (10, 5 y 2 μ l, respectivamente); 5-7 purificación 2 (10, 5 y 2 μ l, respectivamente); 8-10 paso intermedio de purificación 1 (10, 5 y 2 μ l, respectivamente). Flecha negra: ovoalbúmina, 50,9 kDa. B) Purificación 3; Calles: 1 purificación 1 (10 μ l); 2 purificación 2 (10 μ l); 3 purificación 3 (10 μ l); 4 SDS-PAGE Standards Low Range (BioRad) (7,5 μ l). Flecha negra: ovoalbúmina, 45 kDa.

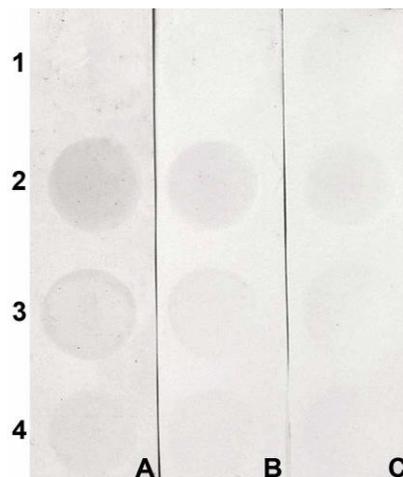


Fig. 24. NC-ELISA de muestras sanas y enfermas con suero preinmune. A) Dilución 1:300. B) Dilución 1:1000. C) Dilución 1:2000. 1: tampón extracción; 2: planta sana; 3: planta enferma con MYSV; 4: planta sana.

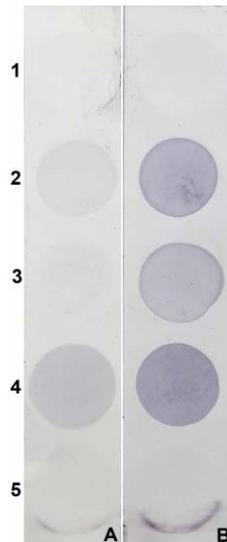


Fig. 25. NC-ELISA de muestras sana y enfermas con suero anti maize yellow striate virus (MYSV) crudo en dilución de 1:1600. A) Suero N1. B) Suero N2. 1: tampón extracción; 2: planta enferma con MYSV; 3: planta sana; 4: planta enferma con MYSV; 5: tampón extracción.

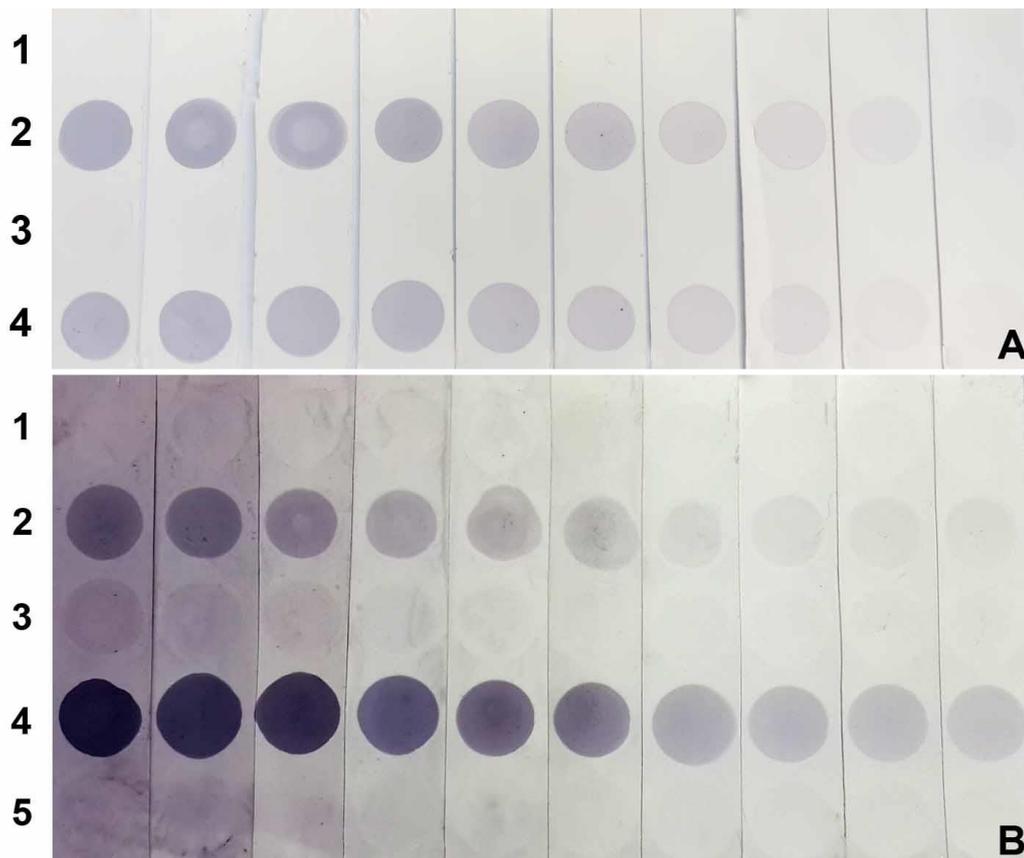


Fig. 26. NC-ELISA de muestras sanas y enfermas con maize yellow striate virus (MYSV) en diluciones seriadas de suero adsorbido en extracto de planta sana. De izquierda a derecha, diluciones 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800; 1:25600; 1:51200. 1: tampón extracción; 2: planta enferma con MYSV; 3: planta sana; 4: planta enferma con MYSV; 5: tampón extracción. A) Suero N1. B) Suero N2.

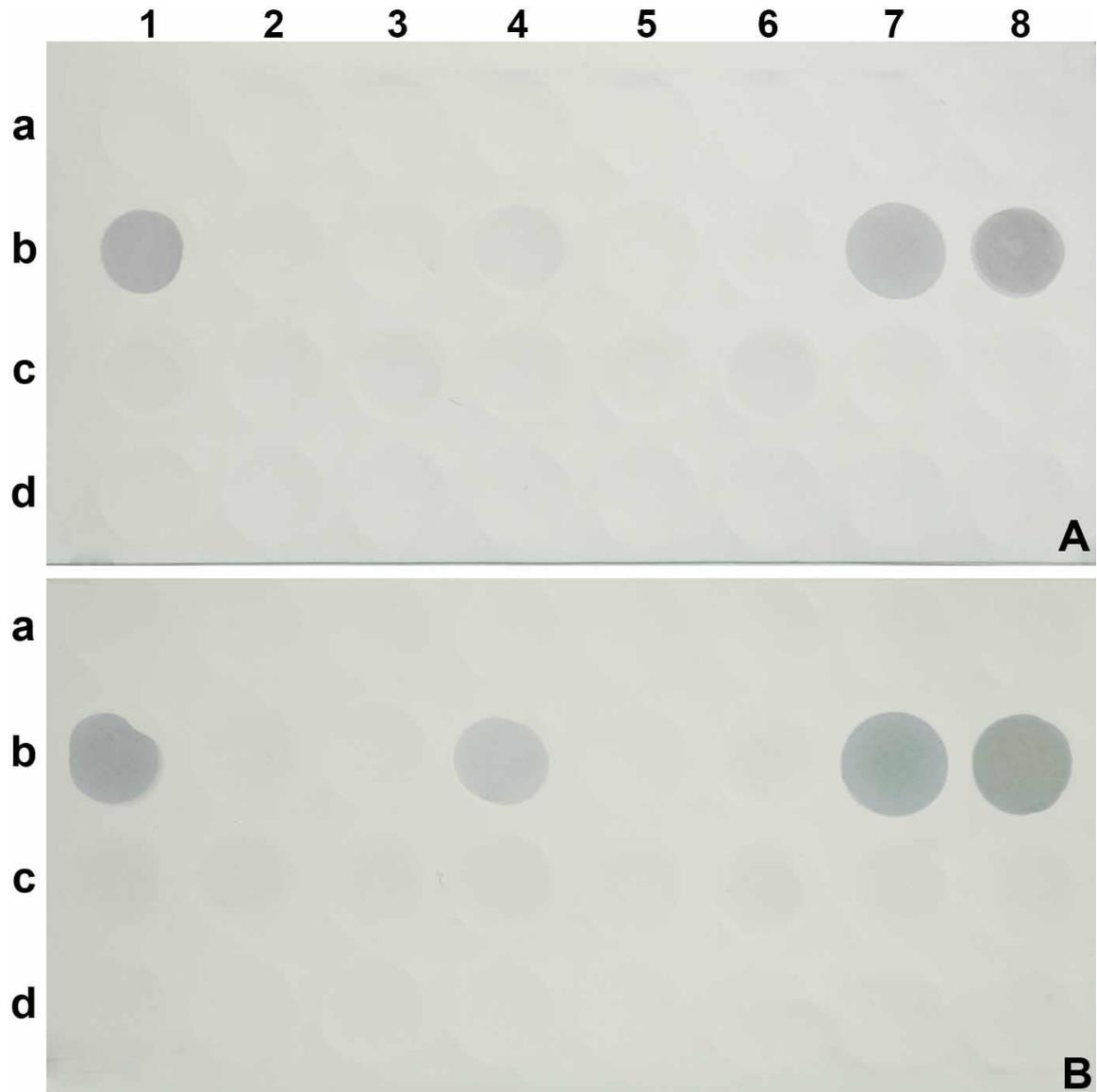


Fig. 27. NC-ELISA de plantas sanas y enfermas con rhabdovirus utilizando suero para maize yellow striate virus (MYSV). A) Suero N1. B) Suero N2. a: tampón extracción; b: planta enferma; c: planta sana; d: tampón extracción. 1: maíz enfermo con MYSV sintomático; 2: maíz enfermo con MYSV sin síntomas; 3: maíz con maize mosaic virus; 4: alfalfa con alfalfa dwarf virus; 5: frutilla con strawberry crinkle virus (SCV); 6: *Physalis sp.* con SCV; 7: cebada con síntomas de MYSV; 8: trigo con síntomas de MYSV.

Conclusiones

Se obtuvieron dos reactivos de diagnóstico para MYSV, uno molecular y el otro serológico. Considerando que la nucleoproteína de los rhabdovirus posee un peso molecular de alrededor de 50 kDa (Ammar *et al.* 2005; Dietzgen *et al.* 2011; Bejerman *et al.* 2015), podemos afirmar que se logró purificar, al menos parcialmente, la proteína N del rhabdovirus causal de estriado amarillo, a partir de material vegetal enfermo. Se comprobó la especificidad de los cebadores diseñados para la detección de MYSV de plantas enfermas de maíz. Se obtuvieron dos sueros anti MYSV para análisis serológicos, ambos con una muy buena sensibilidad en la detección de este virus: 15 ml de antisuero N1 y 18 ml de antisuero N2. Con los sueros desarrollados se logró un medio de diagnóstico masivo, sensible y económico del patógeno, que puede complementarse, en caso de ser necesario, mediante técnicas moleculares con los cebadores específicos diseñados.

Capítulo V: Reconstrucción de la historia demográfica de aislamientos espacio temporales del virus en estudio

Introducción

El conocimiento de la estructura y secuencia genómica de los miembros de un grupo viral es de gran importancia para el estudio de las relaciones tanto inter como intraespecíficas. Se han obtenido las secuencias genómicas completas de seis miembros aceptados del género *Cytorhabdovirus*: BYSMV (GenBank KM213865), LNYV (GenBank NC007642), LYMoV, (GenBank EF687738 y NC011532), SCV (Schoen *et al.*, 2004), NCMV (GenBank NC002251, AB030277 y GU985153) y ADV (GenBank KP205452); nueve *Nucleorhabdovirus*: DYVV (GenBank KM823531), EMDV (GenBank NC025389), SYNV (GenBank L32603 y M13950), MFSV (GenBank NC005974, y AY618417), MMV (GenBank NC005975 y AY618418), PYDV (GenBank NC016136, y GU734660), TaVCV (GenBank NC006942 y AY674964), RYSV (GenBank NC003746, AB516283 y AB011257) y MIMV (GenBank NC011542); 2 *Dichorhavirus*: OFV (GenBank NC009608, NC009609, AB244418 y AB244417) y CoRSV (GenBank KF812526 y KF812525); y 1 *Varicosavirus*: LBVaV (GenBank NC011558 y NC011568)

El genoma de todos los miembros de la familia *Rhabdoviridae* codifica al menos para cinco proteínas estructurales: la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína de la matriz (M), la glicoproteína (G) y la polimerasa (L). Los genes que las codifican se presentan en el orden 3'-N-P-M-G-L-5' y están flanqueados por las regiones conservadas regulatorias no codificantes "leader" (3') y "trailer" (5') (Mann & Dietzgen 2014). La característica distintiva del genoma de los rhabdovirus de plantas es la de poseer además genes accesorios que codifican para una o más proteínas adicionales entre N y P, P y M o G y L (Jackson *et al.* 2005). Estas proteínas parecen estar involucradas en el movimiento célula-célula y el silenciamiento del RNA (Benitez-Alfonso *et al.* 2010). El número y ubicación de estos genes accesorios varía ampliamente tanto dentro como entre taxa, algunos miembros de rhabdovirus que infectan plantas pueden codificar hasta cuatro proteínas accesorias adicionales entre los genes N-P, P-M y G-L (Walker *et al.* 2011), mientras que otros, como NCMV, SCV, RYSV y BYSMV, contienen también un ORF corto entre los genes G y L, cuya función es todavía desconocida (Walker *et al.* 2011; Yan *et al.* 2015). Por otro lado, los genes se encuentran separados por regiones intergénicas de secuencias repetitivas compuestas por tres elementos: un elemento rico en uracilo (U) en el extremo 3' del ARNm de esta región intergénica; una secuencia corta variable no transcripta; y una región conservada al extremo 5' de ARNm de esta región intergénica (Jackson *et al.* 2005). En su conjunto, estas regiones intergénicas son altamente

conservadas tanto entre los genes de cada virus, como entre los genomas de los diferentes rhabdovirus de plantas (Tsai *et al.* 2005; Heim *et al.* 2008; Massah *et al.* 2008; Bejerman *et al.* 2015; Yan *et al.* 2015; Babaie *et al.* 2015). Estas regiones intergénicas parecen jugar un rol importante en los procesos regulatorios de la transcripción y replicación del ARNm, y por tanto se han conservado evolutivamente (Jackson *et al.* 2005). Las regiones “leader” y “tráiler” del genoma de los rhabdovirus de plantas poseen secuencias nucleotídicas, de entre 84-206 nt la primera y 145-389 nt la segunda, de homología conservada entre las especies del mismo género (Walker *et al.* 2011; Yan *et al.* 2015). La mayoría de los integrantes de la familia *Rhabdoviridae* (BYSMV, NCMV, LNYV, MFSV, TaVVCV, SYNIV, EMDV, ADV) poseen cierto grado de complementariedad invertida en los extremos 3' y 5' del ARN genómico, lo cual probablemente derive en una estructura de “Panhandle” (Choi *et al.* 1994; Tanno *et al.* 2000; Tsai *et al.* 2005; Revill *et al.* 2005; Dietzgen *et al.* 2006, 2011; Heim *et al.* 2008; Bejerman *et al.* 2015; Yan *et al.* 2015; Babaie *et al.* 2015).

Los virus cuyo genoma está compuesto por ARN, como los rhabdovirus, poseen un gran potencial para una alta variabilidad genética debido a la rápida replicación, a la generación de grandes poblaciones y a las altas tasas mutacionales que presentan, debido a la falta de mecanismos de corrección de errores de las ARN polimerasas (García-Arenal *et al.* 2001; García-Arenal & Fraile 2011). A su vez, muchos de estos virus pueden sufrir procesos de recombinación genómica entre cepas o especies virales diferentes que se encuentren infectando al mismo hospedante, e incrementar de esta manera variabilidad genética (Nagy 2008). La distribución de la variabilidad genética generada de esta manera por los procesos de mutación y recombinación en una población viral, dependerá de tres fuerzas evolutivas: la deriva génica, la selección natural y el flujo génico (Roossinck 2003; Moya *et al.* 2004). La deriva génica es el proceso azaroso por el cual algunos caracteres de la población se mantendrán en las generaciones futuras, producto de un tamaño poblacional finito (Moya *et al.* 2004). En el caso de infecciones virales en plantas, si bien dentro de una planta los tamaños poblacionales son grandes, y más aún en virus que causan infecciones sistémicas, el número de individuos que efectivamente se reproducirá y transmitirá su material genético a la descendencia es mucho menor. Este proceso puede ocurrir en los eventos de movimiento del virus a otras células del hospedante, de transmisión del virus a otra planta mediante vectores o en la interacción con otros virus en infecciones mixtas (Fraile *et al.* 1997; Sacristán *et al.* 2003; Betancourt *et al.* 2008). La selección natural es un proceso direccional por el cual los caracteres que le otorguen

ventajas a sus portadores aumentarán su frecuencia en la población. Este evento que puede tener lugar en la interacción de los virus con sus hospedantes, con sus vectores o incluso con otros virus coinfectantes (García-Arenal *et al.* 2001). El flujo génico puede ocurrir a diferentes escalas durante el movimiento de los virus a otras regiones de la planta, otras plantas u otras regiones geográficas (Moya *et al.* 2004). El estudio de la variabilidad genética de una población viral y de los mecanismos evolutivos relacionados a los distintos aspectos de su biología es una herramienta crucial para entender la epidemiología y emergencia viral (Grenfell *et al.* 2004).

Los estudios filodinámicos o evolutivos se basan en la relación existente entre la evolución de la secuencia nucleotídica y el tiempo, y son capaces de proveer estimaciones de la estructura de una población en el pasado (Drummond *et al.* 2005). Es posible incorporar además información espacial logrando reconstruir la dispersión geográfica de un virus. Los estudios coalescentes se encuentran dentro de los denominados filodinámicos. Estos están basados en la teoría de la coalescencia: un proceso estocástico que describe la manera en la cual los procesos genéticos poblacionales determinan la forma de la genealogía, reconstruida a partir de secuencias génicas (Drummond *et al.* 2005). La inferencia de la historia demográfica de una población a partir de datos de secuencias génicas ha sido utilizada con éxito en distintas disciplinas biológicas como la antropología (Reich & Goldstein 1998), biología de la conservación (Roman & Palumbi 2003) y ecología (Flanagan *et al.* 2004) y epidemiología (Joy *et al.* 2003). En el área de la virología, se han inferido con cierto éxito aspectos epidemiológicos de virus como dengue (Carrington *et al.* 2005), HIV (Gilbert *et al.* 2007; Worobey *et al.* 2008; Faria *et al.* 2014), influenza (Rambaut *et al.* 2008), hepatitis C (Ré *et al.* 2011; Culasso *et al.* 2014), rhabdovirus de aves transmitidos por mosquitos (Allison *et al.* 2014), virus de la rabia (Seetahal *et al.* 2013), entre otros.

Dentro de la familia *Rhabdoviridae* la máxima diversidad se presenta en los géneros que afectan plantas: *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus*. Los análisis comparativos de secuencias de los genes N y L indicaron variabilidad genética considerable en distintos aislamientos de LNYV, SCV y TaVVCV (Klerks *et al.* 2004; Callaghan & Dietzgen 2005; Revill *et al.* 2005). En el caso de LNYV, el análisis filogenético del gen N de 12 aislamientos colectados entre 1985 y 2003 en Australia, reveló la existencia de dos subgrupos cuyas secuencias nucleotídicas diferían en aproximadamente 20% (Callaghan & Dietzgen 2005). De la misma manera se obtuvo evidencia de la existencia de dos subgrupos entre 8 aislamientos europeos de SCV

mediante el análisis de secuencias parciales del gen L (Klerks *et al.* 2004). Asimismo, altos niveles de variabilidad nucleotídica de los genes L y N, fueron encontrados entre 6 aislamientos de TaVCV de Islas del Pacífico (Revill *et al.* 2005).

Desde la campaña 2000/01 hasta 2015/16 se han observado plantas de maíz con síntomas de enanismo, esterilidad de panoja y mosaico de estrías gruesas y finas, de color amarillo intenso en hojas, vainas y chalas en las localidades de Sinsacate, Jesús María, Sampacho, Río Cuarto, Cañada de Luque y Río Segundo, provincia de Córdoba; Santa Isabel y Venado Tuerto, provincia de Santa Fe; y Pedro Luro y Los Toldos, provincia de Buenos Aires (Fig. 28). En el presente trabajo de tesis se logró determinar, mediante técnicas de microscopía electrónica, moleculares y biológicas, que se trataba de un virus perteneciente a la familia *Rhabdoviridae*, género *Cytorhabdovirus*, al cual se denominó MYSV. La historia evolutiva y demográfica de este patógeno es un aspecto de interés para el estudio epidemiológico del mismo. Los análisis de coalescencia a partir de secuencias nucleotídicas genómicas constituyen una adecuada herramienta para inferir y tratar de dilucidar la historia demográfica del virus en estudio.

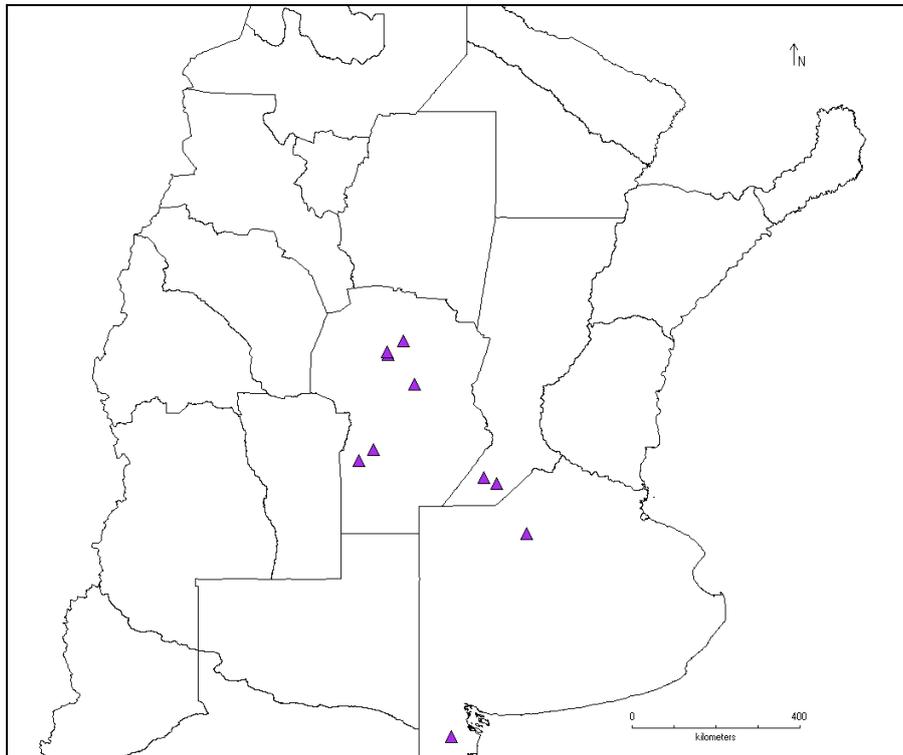


Fig. 28. Presencia de maize yellow striate virus (MYSV) en Argentina. Los triángulos indican localidades en donde se observó la presencia de MYSV: Sinsacate, Jesús María, Sampacho, Río Cuarto, Cañada de Luque y Río Segundo (provincia de Córdoba); Santa Isabel y Venado Tuerto, provincia de Santa Fe y Pedro Luro y Los Toldos (provincia de Buenos Aires).

Materiales y Métodos

1-Recolección de muestras enfermas con MYSV de diferentes localidades y campañas agrícolas. Se recolectaron muestras a campo con síntomas característicos de infección por MYSV en diferentes campañas agrícolas y localidades. Se buscó abarcar la mayor variabilidad espacial y temporal a la que se pudo acceder, dada la distribución del patógeno, obteniéndose así un total de 7 muestras independientes de MYSV (Tabla 3). Para simplificar los datos denominaremos en adelante aislamientos a cada una de estas muestras tomadas en distintos lugares y campañas. Estos fueron conservados a -80°C.

Tabla 3. Ubicación geográfica y campaña agrícola en las cuales fueron recolectados cada uno de los aislamientos espacio temporales del maize yellow striate virus.

Aislamiento	Localidad	Campaña
1	Santa Isabel, Santa Fe	2010/11
2	Sinsacate, Córdoba	2011/12
3	Sinsacate, Córdoba	2012/13
4	Cañada de Luque, Córdoba	2012/13
5	Los Toldos, Buenos Aires	2012/13
6	Los Toldos, Buenos Aires	2013/14
7	Sinsacate, Córdoba	2014/15

2-Obtención de la secuencia genómica completa del MYSV.

Se realizó un enriquecimiento viral a partir de muestras enfermas con MYSV colectadas durante la campaña 2014/15 de la localidad de Sinsacate, Córdoba (aislamiento 7). Para ello, se molieron 100 g de hojas de plantas de maíz infectadas con MYSV en 4 volúmenes de tampón Tris - HCl 0,1 M pH 8,4 (tampón extracción) y se filtró el homogenato en frío con voile. Luego de centrifugar a 8.000 rpm por 15 minutos a 4 °C el sobrenadante fue nuevamente filtrado con voile y centrifugado a 25.000 rpm por 1 h. El pellet obtenido fue resuspendido en 300 µl de agua libre de ARNasas. Posteriormente, a partir de este extracto viral enriquecido se realizó una extracción de ARN usando SV Total RNA Isolation System (Promega Corp., Madison, WI) y siguiendo el protocolo provisto por el fabricante.

El ARN total extraído se envió para el servicio de pirosecuenciación genómica WGS Illumina Hiseq 1500 (INDEAR, Rosario, Argentina).

Los datos obtenidos del servicio de pirosecuenciación genómica se analizaron con el software BLAST para determinar aquellos ensamblados que contuviesen información genómica similar a rhabdovirus, probables segmentos del genoma del MYSV. Una vez identificados estos datos, fueron analizados con el software Tablet (Milne *et al.* 2013), junto con la secuencia publicada más similar de rhabdovirus (Yan *et al.* 2015), para determinar la profundidad de la secuencia y bases en conflicto de estos ensamblados. La identidad de las bases “indefinidas” se determinó en función a la cantidad de lecturas existente para cada una de las opciones, y en el caso de que no pudiese ser definido se tomaron las dos opciones como posibles, quedando registradas esas posiciones en el genoma.

3-Organización genómica del MYSV. Utilizando la herramienta informática Open Reading Frame Finder (ORF Finder, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) se identificaron los posibles marcos abiertos de lectura (ORF) de la secuencia del MYSV, los cuales luego fueron comparados con la base de datos de secuencias de nucleótidos y proteínas disponibles (BLASTN y BLASTP). Una vez identificados los ORFs del MYSV se determinó el peso molecular de las proteínas que cada ORF codifica con la herramienta ExPASy Bioinformatics Resource Portal (http://web.expasy.org/compute_pi/) y se analizaron los dominios transmembrana (TMHMM Server v. 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Una vez identificados los ORF del genoma del MYSV, se analizaron visualmente las regiones intergénicas y mediante comparación con el genoma del cytorhabdovirus más similar (BYSMV), se determinaron los tres elementos de las secuencias repetitivas conservadas entre rhabdovirus: el elemento rico en uracilo (U) en el extremo 3´del ARNm; la secuencia corta variable no transcripta; y la región conservada del extremo 5´de ARNm. Una vez identificadas, estas secuencias repetitivas intergénicas conservadas fueron alineadas con el software Bioedit y se obtuvo la secuencia intergénica repetitiva consenso.

4-Amplificación y secuenciación del gen N de los distintos aislamientos del MYSV. Una vez obtenida la secuencia genómica viral completa,

mediante el uso del software AmplifX (Nicolas Julien 2004-2008, versión 1.5.0) y teniendo en cuenta entre 70 y 95 nucleótidos adicionales en los extremos 3' y 5' del gen, se diseñaron cuatro cebadores específicos para el gen N (Callaghan & Dietzgen 2005; Revill *et al.* 2005) del MYSV, dos externos (Ef y Er) que amplifican 1.502 pb y contienen al gen N completo y dos internos (Ir e If), los cuales en combinación con los externos amplifican dos segmentos de 870 pb y 820 pb, respectivamente (Tabla 4). Se extrajeron ARN totales de cada uno de los 7 aislamientos espacio temporales del MYSV (Tabla 3), con CTAB y LiCl según Doyle & Doyle (1994). Con el ARN total extraído se realizó una reacción de retrotranscripción (RT). En la RT se utilizaron de 2 - 5 µg de ARN molde, 0,2 mM de mezcla de dNTPs, 10 µl de Tampón 5 x incoloro, 400 u de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI), 2,5 µg de cada uno de los cebadores externos específicos diseñados para el gen N (forward y reverse) que amplifican un segmento de alrededor de 1.500bp, en un volumen final de 25 µl. Se incubó la reacción a 42 °C durante 60 min y esta fue inactivada a 70 °C durante 15 min. Se realizó una reacción de PCR, con 20 µl del producto de la reacción de RT, 20 µl de tampón 5 x incoloro, 0,4 mM de mezcla de dNTPs, 0,1 µM de cada uno de los cebadores específicos para el gen N (Ef y Er), 2,5 u de GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), en un volumen final de 100 µl. El ciclado fue realizado en un T3000 Thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany) y las condiciones fueron las siguientes: un paso de 4 min a 94 °C, 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C, 1 min 30 seg a 68 °C y un paso final de 11 min a 68 °C. Los amplicones fueron visualizados en gel de agarosa al 1,4 % en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE), teñidos con Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., Hayward, CA) y observados bajo luz UV en un analizador de imágenes Universal Hood II (BioRad, Hercules, US). Se sembraron alrededor de 100 µl del producto de esa reacción de PCR en gel de agarosa al 1,4 %, se tiñó 3 min con Gel Red, se observó bajo luz UV y se cortaron las bandas correspondientes a 1.500bp. Estas fueron purificadas con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean - Up System (Promega Corp., Madison, WI), cuantificadas en un espectrofotómetro NanoDrop ND - 1000, y secuenciadas en ambas direcciones con los cebadores específicos (externos e internos) diseñados para el gen N viral, mediante la metodología Sanger (Ruralex S.R.L). De cada uno los aislamientos del MYSV secuenciados se obtuvieron 4 secuencias de nucleótidos: dos secuencias de alrededor de 1.200 pb, producto de la secuenciación con los cebadores externos; y dos secuencias de cerca de 800 pb producto de la secuenciación con los cebadores internos. Estas secuencias fueron analizadas con el paquete de software Staden Package 1.9 (Bonfield *et al.* 1995) para determinar su nivel de

confianza y en base a ello realizar un ensamblado de las 4 secuencias disponibles para cada aislamiento y obtener una secuencia consenso que contuviese al gen completo de la proteína N viral. Para determinar el marco abierto de lectura de esta secuencia consenso, correspondiente a la proteína N, se utilizó el software Open Reading Frame Finder (ORF Finder).

Tabla 4. Cebadores específicos para el gen N del maize yellow striate virus diseñados en esta tesis.

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
Ef	TGGTGATCCTTAGCCTCTTC	Ef/Er 1.502
Er	CGACAGACGATTCAAGGGAT	Ef/Er 1.502
If	CTGGAATGAAATCACGGTTCAC	If/Er 820
Ir	CCCAGCCGTATTTTCACTCA	Ef/Ir 870

5-Análisis de la estructura demográfica de los diferentes aislamientos espacio temporales del MYSV. Se seleccionaron 1.296 pb de cada secuencia consenso para cada uno de los aislamientos espacio temporales del MYSV, correspondientes a la secuencia completa del gen N, y con ellos se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (Clustal X2, Larkin *et al.*, 2007). A partir de este alineamiento se reconstruyó la filogenia mediante metodología Bayesiana (Holder & Lewis 2003) y se realizó un análisis de coalescencia con el software Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST v 1.6.2, Drummond *et al.*, 2011) para tratar de reconstruir la historia poblacional del MYSV a partir de las relaciones ancestrales estimadas mediante dichos análisis filogenéticos de secuencias nucleotídicas. Para ello se evaluó el modelo de sustitución nucleotídica utilizando el software jModel Test 0.1.1 (Posada 2008), como fue indicado en el capítulo II, determinando que el modelo de sustitución que mejor representaba a este grupo de datos era el GTR (Waddell & Steel 1997), utilizando un reloj molecular relajado no correlacionado de distribución lognormal (Drummond *et al.* 2006) y posteriormente mediante el cálculo del factor de Bayes para cada uno de los modelos, se evaluó la hipótesis de distintos modelos de crecimiento demográfico poblacional: constante, exponencial, en expansión, logístico y skyline utilizando criterios de

probabilidad bayesianos. Quedaron excluidos del análisis aquellos modelos que no llegaron a converger, luego de 2×10^9 generaciones y variando manualmente el muestreo. Se determinó el modelo que mejor representaba la curva poblacional del MYSV mediante la comparación de los distintos factores de Bayes (Suchard *et al.* 2001). Se determinó a su vez, la tasa de sustitución nucleotídica para los aislamientos del MYSV analizados, la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) a todos los aislamientos y el árbol datado de mayor credibilidad de clado (MCCT) (Beast v 1.6.2).

Resultados

2-Obtención de la secuencia genómica completa del MYSV.

Mediante los análisis de BLAST, se determinó que uno de los ensamblados obtenidos mostraba 71 % de identidad nucleotídica con el genoma completo de BYSMV, aislamiento Hebei (KM213865), con un porcentaje de cobertura del 87 %. Este ensamblado mostró además alta profundidad al ser analizado con el software Tablet, de 59.094 lecturas. El fragmento posee un tamaño total de 12.640 pb, el cual corresponde a la secuencia genómica del MYSV (Fig. 29). La cobertura global promedio de este ensamblado fue de 467,5 la misma fue calculada de la siguiente manera:

$$C = L \times N/G \text{ (Lander \& Waterman 1988)}$$

- C: cobertura global promedio
- L: longitud promedio de cada lectura (pb)
- N: profundidad (Cantidad total de lecturas del ensamblado)
- G: longitud total del ensamblado

3-Organización genómica del MYSV. Una vez predichos los marcos de lectura abiertos del MYSV mediante ORF Finder, estos fueron determinados mediante la comparación con los marcos abiertos de lectura del BYSMV. El genoma del MYSV está organizado en 10 marcos de lectura abiertos: N, 1.296 nt; P, 879 nt; proteína 3, 546 nt; proteína 4, 372 nt; proteína 5, 219 nt; proteína 6, 318 nt; M, 504 nt; G, 1.431 nt; proteína 9, 156 nt; y L, 6.171 nt. La organización genómica se presenta entonces como 3'1-N-P-3-4-5-6-M-G-9-L-t 5'. Las regiones codificantes se encuentran separadas por regiones

no codificantes de entre 5 y 144 nucleótidos y flanqueadas por una región “leader” 3’(l) y “tráiler” 5’(t) (Fig. 29).

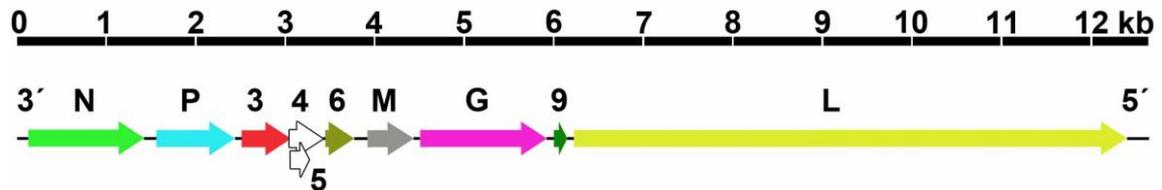


Fig. 29. Diagrama esquemático de la organización genómica del maíze yellow striate virus. Los ORF N, P, 3, 4, 5, 6, M, G, 9 y L se indican con flechas de colores. Las regiones intergénicas se muestran como barras.

Sólo en dos de las proteínas deducidas del genoma del MYSV se detectaron dominios transmembrana, las proteínas 5 y 9 (Tabla 5). La mayor identidad aminoacídicas observada entre MYSV y BYSMV fue de 80 %, entre las proteínas L de dichos virus (Tabla 5).

Tabla 5. Características de las proteínas deducidas del genoma del maíze yellow striate virus.

ORF	Peso molecular (kDa)	Dominio transmembrana	Identidad aa con BYSMV	Función putativa
1/N	48.3	No detectado	68%	Nucleocápside
2/P	33.4	No detectado	57%	Fosfoproteína
3	20	No detectado	60%	Desconocida
4	13.84	No detectado	37%	Desconocida
5	8.19	2	44%	Desconocida
6	11.5	No detectado	46%	Desconocida
7/M	19.11	No detectado	57%	Proteína de matriz
8/G	54.25	No detectado	57%	Glicoproteína
9	6.38	1	69%	Desconocida
10/L	234.7	No detectado	80%	Polimerasa

La secuencia intergénica repetitiva consenso del MYSV coincide con la reportada para BYSMV (Yan *et al.* 2015) (Tabla 6), aunque en particular las regiones entre algunos pares de genes varían considerablemente: en el genoma del MYSV: la región variable entre el “leader” y el gen N posee 4 nucleótidos en lugar de 19 como en BYSMV; las regiones ricas en U entre el “leader”-N y entre los genes M-G, G-9, 9-L y L-“tráiler” también difieren, al igual que la región variable entre L-“tráiler”. Las regiones conservadas se mantienen para los dos virus (Tabla 6).

Tabla 6. Regiones intergénicas repetitivas del ARN genómico del maize yellow striate virus (MYSV) en comparación con barley yellow striate mosaic virus (BYSMV).

Ubicación	MYSV				BYSMV			
	Elemento rico en U	Región variable	Región conservada	Elemento rico en U	Región variable	Región conservada		
“Leader”-N	3´ AUUUUUU	GUGA	CUC	AUUAUUUUU	N19*	CUC	5´	
N-P	3´ AUUAUUUUU	GA	CUC	AUUAUUUUU	GA	CUC	5´	
P-3	3´ AUUAUUUUU	GA	CUC	AUUAUUUUU	GA	CUC	5´	
3-4/5	3´ AUUAUUUUU	GUC	CUC	AUUAUUUUU	GUC	CUC	5´	
4/5-6	3´ AUUAUUUUU	GA	CUC	AUUAUUUUU	GA	CUC	5´	
6-M	3´ AUUUUUUUU	GA	CUC	AUUUUUUUU	GA	CUC	5´	
M-G	3´ AUUUCUUUU	GA	CUC	AUUUUUUUU	GA	CUC	5´	
G-9	3´ AUUUCUUUU	GA	CUC	AUUUGUUUU	GA	CUC	5´	
9-L	3´ AUUUAUUCAU UUU	GA	CUC	AUUAUUUUU	GA	CUC	5´	
L-“tráiler”	3´ AUUUUUUUU	GACCU	UAA	AUUAUUUUU	GG	UAA	5´	
Consenso	3´ AUUAUUUUU	GA	CUC	AUUAUUUUU	GA	CUC	5´	

*AACCUUUUCUAUUUUUUGA

El genoma del MYSV presenta complementariedad en 11 de los 20 nucleótidos terminales de las regiones “leader” y “tráiler”, conformando la estructura típica de “Panhandle” de los rhabdovirus (Fig. 30).

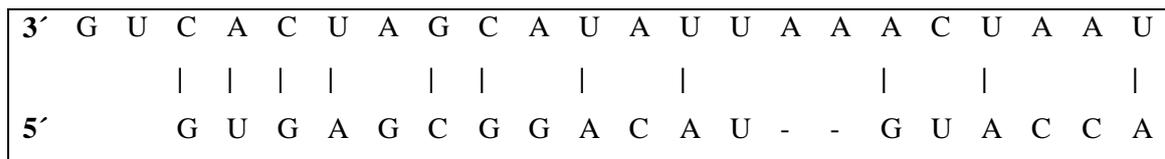


Fig. 30. Complementariedad de secuencias entre los extremos terminales 3' y 5' del genoma del maize yellow striate virus. Las líneas verticales indican los nucleótidos complementarios entre las regiones “leader” y “trailer”.

4-Amplificación y secuenciación de aislamientos del MYSV.

Los cebadores específicos diseñados en este trabajo de tesis para el gen N del MYSV externos (Ef y Er) amplificaron un segmento de 1.502 pb que abarca el gen de la proteína N completo (Fig. 31). Las secuencias de los mismos son: 5'-TGGTGATCCTTAGCCTCTTC-3' (Ef) y 5'-CGACAGACGATTCAAGGGAT-3' (Er).

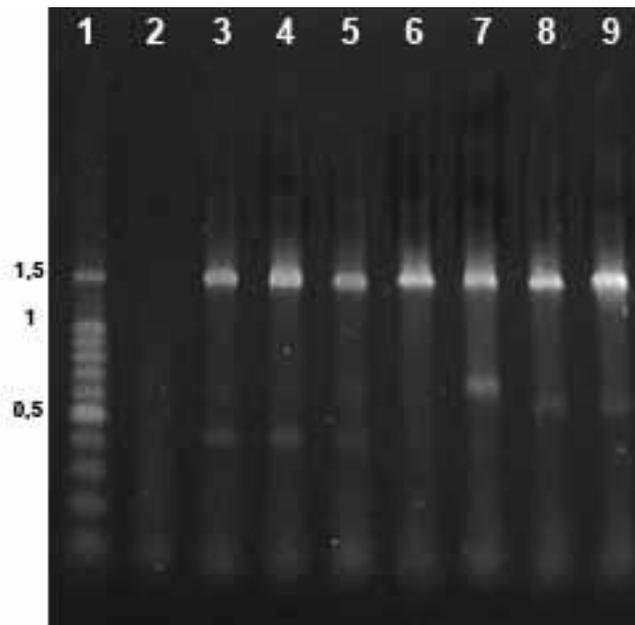


Fig. 31. Amplicones obtenidos por RT-PCR con los cebadores específicos externos (Ef y Er) para el gen N del maize yellow striate virus. Calles: 1: 100 bp DNA Ladder (Promega); 2: testigo sano; 3: aislamiento 1; 4: aislamiento 2; 5: aislamiento 3; 6: aislamiento 5; 7: aislamiento 4; 8: aislamiento 6; 9: aislamiento 7.

Los cebadores internos (If e Ir) al gen N diseñados amplifican, en combinación con los externos, un segmento de 870 pb desde el inicio hasta el nucleótido

870 del gen N (Ir) y 820 pb, desde el nucleótido 683 hasta el fin del gen N (If) (Fig. 32). Las secuencias de los mismos son: 5'-CCCAGCCGTATTTTCACTCA-3' (Ir) y 5'-CTGGAATGAAATCACGGTTCAC-3' (If). Mediante la secuenciación por el método Sanger con estos 4 cebadores específicos se logró reconstruir las secuencias del gen N completo de cada uno de los 7 aislamientos del MYSV estudiados.

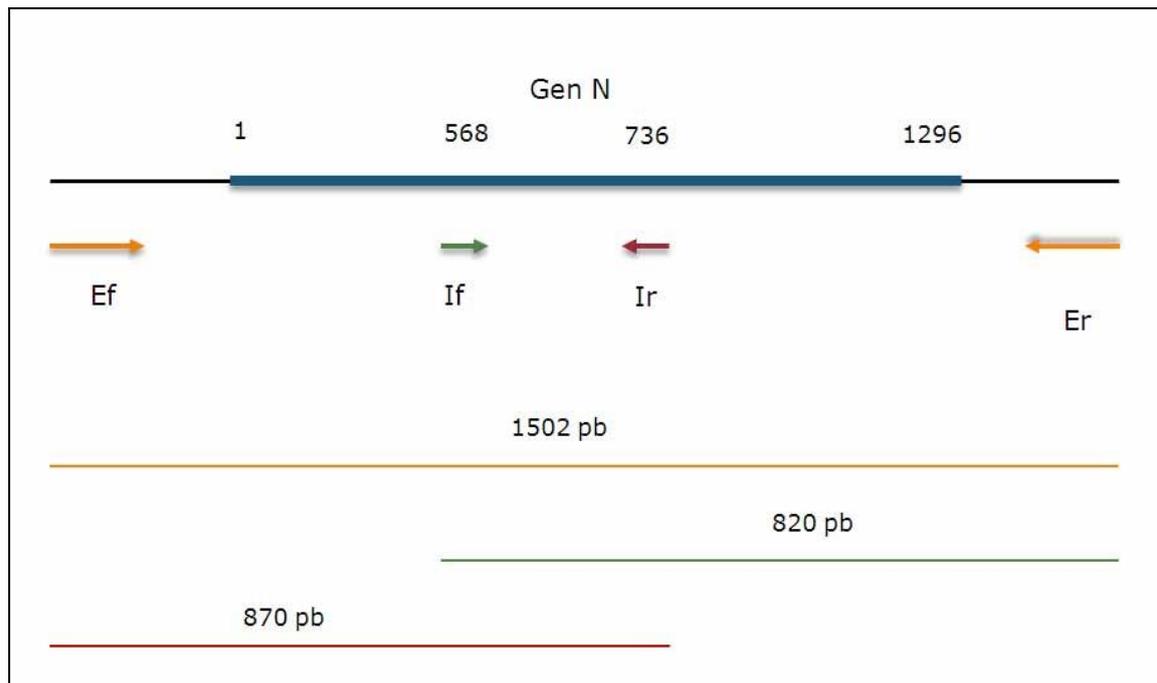


Fig. 32. Diagrama esquemático de las regiones amplificadas por los cebadores diseñados para el gen N del maize yellow striate virus. Ef: cebador externo forward; Er: cebador externo reverse; If: cebador interno forward; Ir: cebador interno reverse.

5-Análisis de estructura demográfica de los diferentes aislamientos espacio temporales del MYSV. Luego del alineamiento múltiple de las secuencias del gen N de los aislamientos espacio temporales del MYSV se obtuvieron los porcentajes de similitud relativa entre cada una de ellas, determinándose que existe una alta similitud de secuencia nucleotídica, entre 98,3 % y 99,6 % (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de similitud relativa de la secuencia nucleotídica del gen N entre los diferentes aislamientos del maize yellow striate virus (MYSV). 1-7: aislamientos espacio temporales de MYSV. 1: Santa Isabel, Santa Fe, 2010/11; 2: Sinsacate, Córdoba, 2011/12; 3: Sinsacate, Córdoba, 2012/13; 4: Cañada de Luque, Córdoba, 2012/13; 5: Los Toldos, Buenos Aires, 2012/13; 6: Los Toldos, Buenos Aires, 2013/14; 7: Sinsacate, Córdoba, 2014/15.

	1	2	3	4	5	6	7
1	-	-	-	-	-	-	-
2	99,3	-	-	-	-	-	-
3	99,0	99,3	-	-	-	-	-
4	99,3	99,3	99,3	-	-	-	-
5	99,3	99,3	99,3	99,6	-	-	-
6	99,0	99,3	98,9	99,1	99,1	-	-
7	99,3	99,6	99,2	99,4	99,4	99,3	-

Mediante el cálculo y comparación del factor de Bayes para los distintos modelos demográficos poblacionales evaluados, se determinó que el modelo exponencial es el que mejor representaría a los datos de dinámica poblacional del MYSV (Fig. 33).

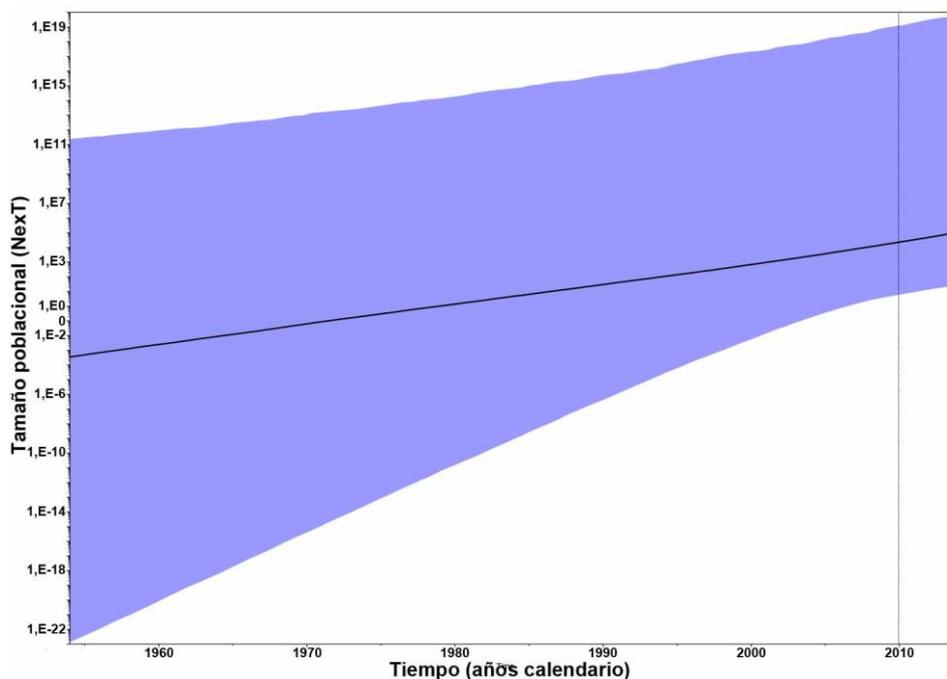


Fig. 33. Dinámica poblacional del maize yellow striate virus utilizando secuencias nucleotídicas del gen N viral. En el eje X se representa el tiempo en años calendarios, en el Y el tamaño poblacional como número efectivo por generación de tiempo ($N_e \times T$). La línea completa representa la mediana poblacional; el área coloreada el intervalo de confianza del 95 % del tamaño poblacional estimado; línea punteada sobre X edad de la secuencia muestreada más antigua.

La tasa de evolución de los aislamientos en estudio sería de $1,36E-4$ sustituciones/sitio/año (s/s/a) dentro de un rango de $4,27E-7$ y $7,67E-4$ s/s/a. La edad del ancestro común más reciente a todos los aislamientos espacio temporales analizados sería de 31,51 años, con un límite inferior de 4,05 y superior de 190,76 para un intervalo de confianza del 95 %. El árbol datado de máxima credibilidad de clado (MCCT) obtenido como resultado del análisis de coalescencia muestra una división de los 7 aislamientos estudiados en dos grandes nodos que datarían de 1.985 y 1.988 aproximadamente. Estos nodos parecieran no estar asociados ni a la variabilidad geográfica ni temporal ya que dentro de cada uno de ellos se encuentran aislamientos de distintas provincias y campañas agrícolas (Fig. 34).

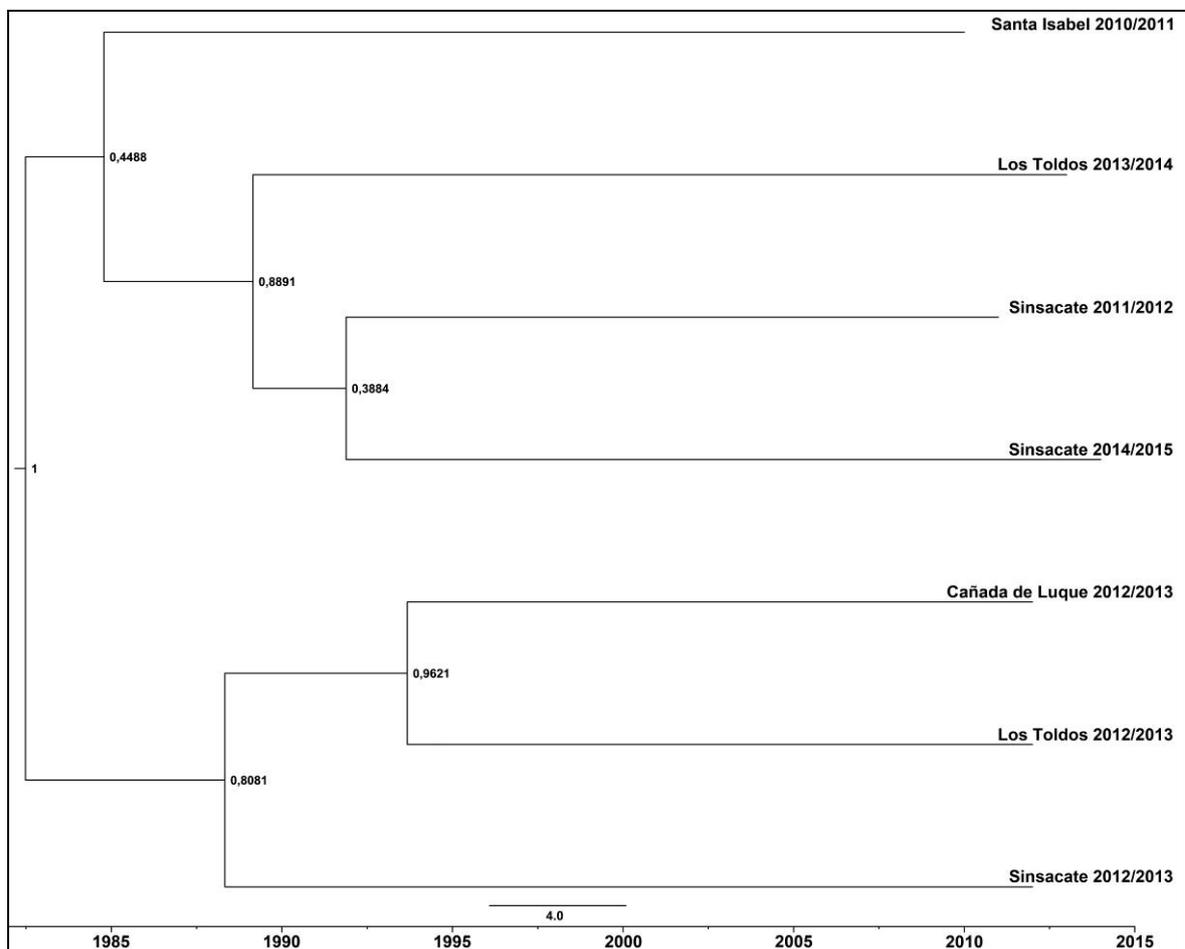


Fig. 34. Árbol datado de máxima credibilidad de clado del gen N viral del maize yellow striate virus en Argentina. El valor a la derecha de cada nodo corresponde a la probabilidad posterior del nodo. El eje X representa el tiempo en años calendario.

Conclusiones

A partir de pirosecuenciación genómica lograron reconstruirse 12.640 nt del genoma del MYSV, con una alta profundidad de lecturas y cobertura global. Se reafirmó la identidad obtenida previamente con la secuencia parcial de la proteína L, de alrededor de 70 % con BYSMV. Se definieron 10 marcos abiertos de lectura (N, P, 3, 4, 5, 6, M, G, 9 y L), regiones intergénicas repetitivas conservadas en la familia *Rhabdoviridae* y una estructura de “Panhandle” formada entre los extremos terminales 3' y 5' también característicos de la familia. Se diseñaron dos juegos de cebadores específicos para el gen N del MYSV: uno externo que amplifica el gen completo (~1.500 pb) y dos cebadores internos que, en combinación con los externos, también amplifican al gen completo (~800 pb) y quedan disponibles para su empleo en diagnóstico. Se obtuvo la secuencia nucleotídica del gen N completo de los 7 aislamientos espacio temporales del MYSV estudiados y se calculó la similitud nucleotídica entre ellos que varía entre 98,9 % y 99,6 %. Se determinó que la curva demográfica que mejor representaría la estructura poblacional dada por la variabilidad genómica de los aislamientos recolectados sería la exponencial. La tasa de evolución estimada para los aislamientos espacio temporales del MYSV sería de $1,36E-4$ (s/s/a). El ancestro común más reciente a dichos aislamientos dataría de alrededor de 31,5 años. El árbol datado de máxima credibilidad de clado mostró que no existiría relación entre la variabilidad genómica del MYSV y la distribución geográfica del mismo, en base a los datos recolectados.

Capítulo VI: Discusión y conclusión general

Los virus pertenecientes al género *Cytorhabdovirus* se replican en el citoplasma celular de las plantas de la misma manera que los rhabdovirus de vertebrados (Chambers *et al.* 1965). En una primera etapa se localizan en el retículo endoplásmico (RE) para formar los viroplasmos. Luego de la replicación de las proteínas virales y su acumulación para formar la nucleocápside viral dentro de los viroplasmos, la proteína G se dirige y acumula en vesículas citoplasmáticas asociadas al RE hacia donde también se dirige la nucleocápside. De allí luego emergen los viriones ya cubiertos por la membrana (Dietzgen & Kuzmin 2012; Mann & Dietzgen 2014). Mientras que los rhabdovirus que infectan vertebrados poseen forma de bala o cono, los que afectan a plantas pueden ser baciliformes, con forma de bala o pleomórficos (Dietzgen 2012). Los cortes ultrafinos de tejido foliar de maíz infectado con el virus en estudio mostraron partículas baciliformes, siempre recubiertas por membrana, de la misma manera que había sido previamente registrado para especies de la familia *Rhabdoviridae* (Conti & Appiano 1973; Dietzgen 2012). Dichas partículas fueron encontradas únicamente en el citoplasma celular, lo que concuerda con lo observado para miembros del género *Cytorhabdovirus* (Dietzgen *et al.* 2011; Dietzgen 2012). En preparados a partir de purificaciones parciales de este virus se observaron las estriaciones características de la familia *Rhabdoviridae*, formadas por proyecciones de la glicoproteína viral (proteína G) a través de la membrana lipídica (Dietzgen *et al.* 2011; Dietzgen 2012).

Entre las diferentes especies de esta familia el tamaño de las partículas varía considerablemente, en un rango que va desde los 100 a 430 nm en longitud y 45 a 100 nm de diámetro (Dietzgen *et al.* 2011; Dietzgen 2012). Las dimensiones de las partículas virales observadas en esta tesis, estimadas a partir de cortes ultrafinos de tejido foliar infectado, se encuentran entre estos rangos, siendo de 401 ± 35 nm de longitud y 65 ± 7 nm de diámetro. La mayor similitud que presenta el patógeno en estudio en cuanto a las dimensiones de sus partículas virales se registra con northern cereal mosaic virus (NCMV), cuyas partículas miden 300-350 x 60 nm (Shikata & Lu 1967; Toriyama 1972). Sin embargo, el maíz no se encuentra dentro de la gran variedad de especies de gramíneas que este virus infecta natural y experimentalmente (Toriyama 1986).

A partir de las observaciones realizadas al microscopio electrónico sobre la morfología, tamaño y ubicación de los viriones, descriptas en el capítulo I, pudo concluirse que efectivamente el virus que infecta a cultivos de maíz en Argentina es un miembro de la familia *Rhabdoviridae*.

Basado en la información provista por el análisis filogenético de la secuencia parcial del gen de la polimerasa L del rhabdovirus estudiado en esta tesis, se logró determinar que los mayores valores de identidad nucleotídica se presentaron con miembros de la familia *Rhabdoviridae*, género *Cytorhabdovirus*, confirmando lo observado mediante técnicas de microscopía electrónica. Los virus que mostraron mayor similitud nucleotídica con el rhabdovirus en estudio fueron los cytorhabdovirus barley yellow striate mosaic virus aislamiento Zanja-1 (BYSMV; GenBank accession FJ665628) y NCMV (GenBank accession NC002251). Sin embargo, los valores observados (72,4% y 68,3%, respectivamente), fueron considerados insuficientes como para asumir que el cytorhabdovirus en estudio se trataba de alguno de estos dos virus. De esta manera la secuencia parcial del gen L del rhabdovirus del maíz fue subida a Genbank con una identificación única, como maize yellow striate virus MYSV (JQ715419). Posteriormente 3 nuevas secuencias parciales del gen de la polimerasa L fueron reportadas como aislamientos del MYSV de trigo (KM009143, KM097989 y KF430632). Las identidades nucleotídicas con estas secuencias fueron 92,6 %, 96,2% y 90,7%, respectivamente y estarían indicando que se trataría del mismo virus en diferentes hospedantes. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Dumón y colaboradores (2015) quienes observaron la presencia de MYSV en cultivos de trigo y obtuvieron porcentajes levemente mayores de identidad nucleotídica con la región conservada de la polimerasa del MYSV obtenida en esta tesis. Esta diferencia puede deberse a que estos autores emplearon un tamaño diferente, al considerado en esta tesis, de las regiones nucleotídicas para su análisis de similitud. La reconstrucción filogenética obtenida con ambos algoritmos (máxima verosimilitud y bayesiano), para la secuencia parcial del gen L, agrupa a la secuencia del MYSV del maíz aquí estudiada con los aislamientos de trigo, con un ancestro común y formando un clado separado del virus con mayor similitud (BYSMV), con un alto soporte (98%). Por otra parte, strawberry crinkle virus (SCV), alfalfa dwarf virus (ADV), lettuce necrotic yellow virus (LNYV) y lettuce yellow mottle virus (LYMV) conforman un clado hermano, lo que concuerda con las identidades con MYSV observadas para estos virus. Estos grupos reconstruidos filogenéticamente a partir de esta secuencia parcial del gen L resultan consistentes con el tipo de hospedante y vector: el grupo al cual pertenece MYSV contiene virus transmitidos por hemípteros que infectan a monocotiledóneas, mientras que el clado hermano contiene miembros transmitidos por áfidos e infectan a dicotiledóneas (Ammar *et al.* 2009), indicando que estos serían dos linajes que evolucionaron de un ancestro en común. Este agrupamiento concuerda con lo observado anteriormente en

análisis filogenéticos de rhabdovirus de plantas utilizando secuencias del gen N y L para los géneros *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus* (Jackson *et al.* 2005; Almasi *et al.* 2010; Bejerman *et al.* 2015; Babaie *et al.* 2015). En futuros estudios filogenéticos sería de interés adicionar al análisis las secuencias génicas de los recientemente clasificados géneros de rhabdovirus *Dichorhavirus* y *Varicosavirus*, a los fines de intentar reconstruir las relaciones entre el MYSV y estos dos grupos de rhabdovirus que difieren de los géneros aquí analizados por poseer genoma segmentado y cuyos vectores no son insectos.

Este trabajo de tesis se desarrolló bajo la hipótesis de que la transmisión del MYSV dependería de insectos vectores de la familia *Delphacidae* (Jackson *et al.* 2005; Hogenhout *et al.* 2008; Ammar *et al.* 2009; Mann & Dietzgen 2014). Mediante los ensayos de transmisión realizados, se demostró que al menos tres especies de insectos delfácidos, *Peregrinus maidis*, *Delphacodes kuscheli* y *Metadelphax propinqua*, son capaces de transmitir este virus en condiciones experimentales con eficiencias del 6.58%, 10.71% y 12.5%, respectivamente. Estas tres especies de hemípteros están ampliamente distribuidas en el territorio de la República Argentina (Marino de Remes Lenicov & Virla 1999; Marino de Remes Lenicov *et al.* 2006) y se ha demostrado además que son capaces de transmitir otras especies de rhabdovirus como el maize Iranian mosaic virus (MIMV) (Ammar *et al.* 2005), cynodon chlorotic streak virus (CCSV) (Lockhart *et al.* 1985), BYSMV (Dumón, Argüello Caro, *et al.* 2011), maize mosaic virus (MMV) (Tsai 1996) corn chlorotic vein banding virus (CCVBV) (Kitajima & Costa 1982), lo cual los posiciona como posibles candidatos de ser efectivamente vectores naturales del MYSV. De hecho, la transmisión del MYSV en plantas de trigo, cebada y avena por la especie *D. kuscheli* fue recientemente reportada por Dumón *et al.* (2015) con una eficiencia del 45%. La diferencia en los porcentajes de transmisión reportados por estos autores y los obtenidos en esta tesis puede deberse a que este insecto tiene preferencia por los cereales de invierno. Este patrón ya ha sido observado para virus como el mal de Río Cuarto virus, para el cual *D. kuscheli* transmite experimentalmente el virus a plantas de maíz con una eficiencia del 14%, mientras que la eficiencia de transmisión experimental a los cereales de invierno avena, cebada y trigo es de entre 46% y 52% (Truol *et al.* 2001).

En esta tesis, se desarrollaron 3 reactivos de diagnóstico específicos para MYSV: dos sueros de purificaciones parciales de la nucleoproteína viral (N1 y N2); y un juego de cebadores que amplifican una región del bloque III de la polimerasa L del MYSV (MYSV L). Se comprobó que estos reactivos detectan específicamente al MYSV y de manera muy leve al ADV, lo que los constituye en una herramienta de gran utilidad para el

diagnóstico viral tanto serológico como molecular. La reacción positiva con las muestras enfermas de trigo y cebada del MYSV (KM097989), que presentaron tanto los sueros como los cebadores en reacciones *in silico*, sería consistente con los porcentajes de identidades nucleotídicas obtenidos en esta tesis con dichos aislamientos (capítulo II). Estos resultados confirmarían que se trata del mismo virus presente en diferentes hospedantes, lo cual concuerda con lo observado por Dumón y colaboradores (2015). El hecho de que se detectara el MYSV por RT-PCR, con los cebadores específicos diseñados en esta tesis, en plantas transmitidas experimentalmente, pero que no mostraban síntomas visibles ni reaccionaron con los sueros específicos para MYSV también desarrollados en esta tesis, podría indicar que el patógeno se encontraba en muy bajas concentraciones en dichas plantas. Este evento podría también estar ocurriendo a campo, y de esta manera subestimando la real extensión de esta enfermedad y su riesgo potencial. Estudios futuros que involucren el análisis de muestras de campo tomadas al azar y analizadas con los cebadores específicos para MYSV diseñados, podrían proveer de una más acertada perspectiva de esta virosis.

Los rhabdovirus tienen un genoma de entre 11 kb a 15 kb formado por una única molécula lineal de ARN de cadena simple y sentido negativo. Todos los rhabdovirus descritos hasta la actualidad poseen los genes en el siguiente orden: 3'-N-P-M-G-L-5' (Kuzmin *et al.* 2009; Dietzgen *et al.* 2011). Algunos rhabdovirus poseen genes adicionales entre estos. Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva como la de pirosecuenciación genómica WGS Illumina Hiseq 1500 utilizada en esta tesis, resultaron una muy buena herramienta para la obtención del genoma viral del MYSV de forma rápida y confiable, mostrando una alta profundidad y cobertura global de las lecturas obtenidas. De esta manera, a partir del material analizado, se obtuvo un genoma de 12,6 kb organizado en 10 marcos de lectura abiertos: N, P, 3, 4, 5, 6, M, G, 9 y L. Esta organización es compartida con los cytorhabdovirus BYSMV y NCMV (Yan *et al.* 2015). Una observación importante es el hecho de que las proteínas 4 y 5 del MYSV son traducidas a partir del mismo ARNm en diferentes marcos de lectura. Esto también fue reportado para BYSMV (Yan *et al.* 2015), constituyéndose junto con el MYSV en los únicos representantes de la familia *Rhabdoviridae* que presentan esta característica. El porcentaje de identidad nucleotídica obtenido mediante la comparación de los genomas completos del MYSV y BYSMV es del 71%, coincidiendo con lo observado en esta tesis mediante la comparación de regiones conservadas de la polimerasa L en maíz y por otros autores en aislamientos de trigo (Dumón *et al.* 2015). Resultados similares se observaron al comparar individualmente cada

una de las proteínas deducidas del genoma de MYSV y BYSMV: la mayor similitud se observó entre las proteínas L de estos virus, siendo del 80% a nivel aminoacídico. La menor identidad observada fue entre las proteínas 4, 5 y 6 de estos dos virus, siendo entre el 37% y 46%. Estas proteínas estarían involucradas en el movimiento intercelular y/o en la supresión del silenciamiento del ARN (Walker *et al.* 2011; Mann & Dietzgen 2014). La similitud entre estas tres proteínas del MYSV y BYSMV parecieran ser únicas en *Rhabdoviridae*, si bien la especie NCMV posee estas proteínas, estas no comparten ninguna identidad con las presentes en los dos primeros. Esto coincidiría con los resultados obtenidos del análisis filogenético con la secuencia parcial de la proteína L, que indicaban que MYSV y BYSMV poseen un ancestro común más cercano que con NCMV, su clado más próximo.

En la familia *Rhabdoviridae* los ORFs se encuentran separados por regiones conservadas intergénicas constituidas por un elemento rico en U en el extremo 3' del ARNm de dicha secuencia intergénica, una secuencia corta variable y una región conservada en el extremo 5' (Tsai *et al.* 2005; Heim *et al.* 2008; Massah *et al.* 2008; Bejerman *et al.* 2015; Yan *et al.* 2015; Babaie *et al.* 2015). La secuencia intergénica consenso del MYSV coincide con la reportada para BYSMV, al igual que cada uno de los elementos constantes de dichas regiones (Yan *et al.* 2015) (capítulo V). Sin embargo, en particular cinco de las regiones entre algunos pares de genes varían considerablemente en el genoma del MYSV con respecto a BYSMV.

Los extremos terminales de la molécula de ARN de la mayoría de los rhabdovirus presentan la característica de poseer secuencias complementarias invertidas formando una estructura típica de “Panhandle” (Kuzmin *et al.* 2009; Dietzgen *et al.* 2011). El genoma del MYSV presenta esta complementariedad en 11 de los 20 nucleótidos terminales de su genoma.

Diferentes investigaciones que incluían análisis filogenéticos del gen N de aislamientos de los rhabdovirus LNYV y taro vein chlorosis virus (TaVVCV) lograron encontrar subgrupos dentro de estas dos especies en cuanto a su variabilidad génica (Callaghan & Dietzgen 2005; Revill *et al.* 2005). Los aislamientos de LNYV, que pertenecían a diferentes hospedantes y localidades de Australia colectados a lo largo de 18 años, presentaban una variabilidad nucleotídica intra grupo menor al 4% y entre grupos del 20% (Callaghan & Dietzgen 2005). 14 aislamientos de TaVVCV fueron recolectados de los países Estados Federados de Micronesia, Fiji, Nueva Caledonia, Papua Nueva Guinea, Islas Solomon y Vanuatu, de las Islas Pacífico y se observó una variabilidad nucleotídica

máxima de 19,3% entre ellos (Revill *et al.* 2005). Los aislamientos del MYSV colectados durante cinco años de cuatro localidades de Argentina varían en 1% en cuanto al gen N viral, lo cual probablemente estaría indicando que la amplitud espacio temporal recolectada no fue lo suficientemente amplia como para detectar variabilidad. Sería de gran interés incluir una mayor cantidad de muestras que abarquen una escala espacial más amplia para futuros análisis de variabilidad del MYSV.

Los estudios filodinámicos intentan de alguna manera unificar los procesos epidemiológicos y evolutivos que interactúan para dar lugar a las incidencias espacio-temporales y patrones filogenéticos. Los retrovirus, debido a que poseen altas tasas de mutación, tamaños poblacionales grandes y tiempos generacionales cortos, son un buen modelo para el uso de estas herramientas, ya que los procesos epidemiológicos y de genética de poblaciones pueden ocurrir en una escala temporal similar (Grenfell *et al.* 2004). De esta manera se ha intentado reconstruir al menos de manera parcial, la historia y mecanismos involucrados en la evolución de retrovirus como hepatitis C (Magiorkinis *et al.* 2009; Golemba *et al.* 2010; Culasso *et al.* 2014), HIV (Gilbert *et al.* 2007; Faria *et al.* 2014), influenza (Rambaut *et al.* 2008) y rabia (Seetahal *et al.* 2013). Culasso y colaboradores (2014) modelaron la historia reciente de dos subtipos de hepatitis C en las provincias de Córdoba y Buenos Aires, en Argentina, a partir de análisis de coalescencia bayesianos de secuencias nucleotídicas del gen E2. Utilizando las mismas herramientas bioinformáticas y datos de secuencias del gen *env* C2V3 del virus HIV-1, Faria y colaboradores (2014) reconstruyeron la dinámica temprana de este virus en poblaciones humanas africanas. Seetahal y colaboradores (2013) analizaron secuencias nucleotídicas del gen N purificado de tejido animal enfermo con el rhabdovirus de la rabia de distintas regiones de Trinidad y Tobago entre 1997 y 2010, y secuencias de América Central y del Sur disponibles en GenBank. Dichos investigadores lograron estimar el origen espacio temporal del virus de la rabia en Trinidad y Tobago a través de análisis bayesianos de coalescencia y filogeográficos. En este marco, mediante el análisis de los aislamientos espacio temporales del MYSV con herramientas bioinformáticas basadas en probabilidades bayesianas, en esta tesis se obtuvo la tasa de sustitución nucleotídica para el gen N del MYSV, con una estimación de $1,36E-4$ (s/s/a). Este valor se encuentra dentro del rango observado para otros virus a ARNss tales como dengue (Carrington *et al.* 2005), HIV (Worobey *et al.* 2008), hepatitis C (Magiorkinis *et al.* 2009), hepatitis B (Torres *et al.* 2011) y rhabdovirus como el de la rabia (Seetahal *et al.* 2013). Se logró reconstruir la curva demográfica poblacional del virus en estudio en el área central maicera del país. Los

procesos evolutivos del MYSV, expresados como cambios mutacionales en función del tiempo, muestran un crecimiento que se ajustaría a una curva exponencial. Esto podría indicar que se trata de un virus con un rápido y constante aumento del tamaño poblacional. Esto también puede evidenciarse en el árbol datado de máxima credibilidad de clado (MCCT), en donde se observa una diversificación génica a partir del ancestro común más reciente, en los aislamientos estudiados en función del tiempo, más que un agrupamiento de los mismos. Este tipo de dinámica poblacional, que se refleja de esta manera en la filogenia, es característica de los virus persistentes, en donde la dinámica poblacional dentro del hospedante es grande, y la estructura filogenética refleja la historia demográfica y espacial de los procesos de transmisión (Grenfell *et al.* 2004). Si bien los porcentajes de identidad entre los diferentes aislamientos del MYSV estudiados son altos indicando una gran similitud nucleotídica entre ellos, la tasa mutacional por unidad de tiempo evidenciada en el gráfico de estructura poblacional, es relativamente alta. La ampliación de la escala espacio temporal de los aislamientos para futuros estudios podría evidenciar una mayor variabilidad. Se conoce que los virus de ARN, debido a la falta de mecanismos de corrección de errores por las polimerasas, se caracterizan por poseer una alta tasa de mutaciones durante la replicación (Drake & Holland 1999), lo cual les confiere un alto potencial para una rápida evolución. Por otra parte, factores como la larga co evolución con sus vectores y la alta adaptación a sus hospedantes que han desarrollado los rhabdovirus en comparación con otros virus a ARN, hace que estos evolucionen mucho más lento en comparación a virus como el de la influenza (Kuzmin *et al.* 2009).

El MCCT obtenido en esta tesis mediante análisis de coalescencia del gen N del MYSV muestra que aparentemente no habría un definido agrupamiento entre los diferentes aislamientos, no evidenciando una estructura espacial clara de los mismos. La adición de nuevos aislamientos que abarquen una escala espacial más amplia para estudios futuros, podría arrojar resultados que ayuden a dilucidar si existe una estructuración espacial en la variabilidad genética del MYSV. El ancestro común más reciente de los aislamientos utilizados en este estudio dataría de alrededor de 1984.

Como resultado de la caracterización morfológica, biológica, serológica y molecular realizada en esta tesis se confirmó la hipótesis planteada, al demostrarse que los síntomas observados en plantas de maíz en Argentina desde la campaña 2000/01 hasta 2015/16 son causados por un miembro de la familia *Rhabdoviridae*, género *Cytorhabdovirus* nunca antes descrito, para el cual se propone aquí el nombre de maize yellow striate virus (MYSV). Este patógeno se encuentra presente en las localidades de

Santa Isabel y Venado Tuerto provincia de Santa Fe; Sinsacate, Río Cuarto, Jesús María, Río Segundo, Sampacho y Cañada de Luque, Provincia de Córdoba; y Pedro Luro y Los Toldos Provincia de Buenos Aires.

El Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV, 2015) ha clasificado diez especies virales dentro del género de patógenos de plantas *Cytorhabdovirus* (Afonso *et al.* 2016), de ellas las únicas especies reportadas que infectan al maíz son BYSMV (Milne & Conti 1986) y WASMV (Sinha & Behki 1972). Asimismo se ha reportado la ocurrencia de una enfermedad en cultivos de maíz en Brasil causada por un rhabdovirus que inicialmente se identificó como MMV (Kitajima *et al.* 1976; Kitajima & Van der Pahlen 1977; Kitajima & Costa 1982). En estudios posteriores, se reveló que se trataba de un nuevo miembro del género *Cytorhabdovirus* al cual se denominó CCVBV, (Kitajima 1998). De las especies de rhabdovirus anteriormente mencionadas para las cuales la infección natural o experimental de plantas de maíz ha sido mencionada, WASMV sólo ha sido reportado en Estados Unidos y Canadá, y es transmitido por los cicadélidos (Hemiptera-Cicadellidae) *Endria inimica* y *Elymana virescens*. Ya que los virus transmitidos por cicadélidos raramente son transmitidos por delfácidos (Nault & Ammar 1989; Ammar & Nault 2002b; Redinbaugh *et al.* 2002), y en esta tesis se ha demostrado que el MYSV es transmitido por al menos tres especies de la familia *Delphacidae*, es poco probable que se tratase del mismo virus. Por otra parte, aunque Kitajima (1998) se ha referido al CCVBV como un miembro de *Cytorhabdovirus*, no existe suficiente evidencia molecular o biológica que permita una comparación entre ellos.

La presencia de BYSMV fue detectada en cultivos de trigo en Argentina en 2011 (Dumón, Argüello Caro, *et al.* 2011), y una cepa de este virus había sido previamente descrita infectando naturalmente cultivos de maíz en Marruecos (Lockhart *et al.* 1986). Sin embargo, las identidades nucleotídicas de regiones conservadas del gen de la polimerasa L entre BYSMV (FJ665628) y MYSV (JQ715419) fueron de 72,4 %, porcentaje que resulta insuficiente para ser considerados el mismo virus. Este porcentaje de identidad fue confirmado al compararse los genomas completos de dichos virus, determinándose también que la mayor similitud se presenta entre las proteínas L, alcanzando un 80% a nivel de aminoácidos.

En este trabajo de tesis se ha purificado parcialmente una proteína viral de alrededor de 50 kDa de plantas enfermas con MYSV, valor que se encuentra en el rango reportado para la proteína N en *Rhabdoviridae* (47-62 kDa) (Ammar *et al.* 2005; Dietzgen

et al. 2011; Bejerman *et al.* 2015). Se desarrollaron dos antisueros específicos, con una alta sensibilidad para MYSV. Se dispone de 33 ml de antisuero específico para este virus.

Se determinó la ubicación, forma y tamaño de las partículas del rhabdovirus en estudio y se observó que estas presentan la mayor similitud con las partículas del cytorhabdovirus NCMV (Shikata & Lu, 1967; Toriyama, 1972). Sin embargo, este virus infecta natural y experimentalmente a una gran variedad de especies de gramíneas entre las cuales no se encuentra al maíz (Toriyama, 1986).

Lograron reconstruirse 12640 nt del genoma del MYSV, lo cual se encuentra dentro del rango reportado para todas las especies de *Rhabdoviridae*, de 11 a 15 kb (Dietzgen 2012). La presencia y orden de los marcos abiertos de lectura definidos para MYSV son compartidos con BYSMV y NCMV (N, P, 3, 4, 5, 6, M, G, 9 y L), aunque sólo con BYSMV comparten la característica distintiva de que las proteínas 4 y 5 se traduzcan a partir del mismo ARNm en diferentes marcos de lectura (Yan *et al.* 2015). Este hecho aportaría más evidencia a la aportada mediante análisis filogenéticos y de identidades nucleotídicas y aminoacídicas, acerca de que la especie más cercanamente emparentada al MYSV sería BYSMV.

En base a toda la evidencia presentada en esta tesis, se propone que el rhabdovirus que infecta cultivos de maíz en Argentina sea considerado una nueva especie del género *Cytorhabdovirus*, familia *Rhabdoviridae* y se sugiere el nombre de maize yellow striate virus. El estriado amarillo que afecta a cultivos de maíz y trigo en Argentina es una enfermedad emergente que presenta un riesgo económico potencial para estos cultivos ampliamente distribuidos.

Referencias

- Afonso C.L., Amarasinghe G.K., Bányai K., Bào Y., Basler C.F., Bavari S., Bejerman N., Blasdell K.R., Briand F.-X., Briese T., Bukreyev A., Calisher C.H., Chandran K., Chéng J., Clawson A.N., Collins P.L., Dietzgen R.G., Dolnik O., Domier L.L., Dürrwald R., Dye J.M., Easton A.J., Ebihara H., Farkas S.L., Freitas-Astúa J., Formenty P., Fouchier R.A.M., Fù Y., Ghedin E., Goodin M.M., Hewson R., Horie M., Hyndman T.H., Jiāng D., Kitajima E.W., Kobinger G.P., Kondo H., Kurath G., Lamb R.A., Lenardon S., Leroy E.M., Li C.-X., Lin X.-D., Liú L., Longdon B., Marton S., Maisner A., Mühlberger E., Netesov S. V., Nowotny N., Patterson J.L., Payne S.L., Paweska J.T., Randall R.E., Rima B.K., Rota P., Rubbenstroth D., Schwemmle M., Shi M., Smither S.J., Stenglein M.D., Stone D.M., Takada A., Terregino C., Tesh R.B., Tian J.-H., Tomonaga K., Tordo N., Towner J.S., Vasilakis N., Verbeek M., Volchkov V.E., Wahl-Jensen V., Walsh J.A., Walker P.J., Wang D., Wang L.-F., Wetzel T., Whitfield A.E., Xiè J., Yuen K.-Y., Zhang Y.-Z., Kuhn J.H. (2016) Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Archives of Virology*
- Allison A.B., Mead D.G., Palacios G.F., Tesh R.B., Holmes E.C. (2014) Gene duplication and phylogeography of North American members of the Hart Park serogroup of avian rhabdoviruses. *Virology* **448**:284-92.
- Almasi R., Afsharifar A., Niazi A., Pakdel A., Izadpanah K. (2010) Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of the Polymerase Gene of *Barley yellow striate mosaic virus* - Iranian Isolate. *Journal of Phytopathology* **158**:351-356.
- Ammar E.D., Gomez-Luengo R.G., Gordon D.T., Hogenhout S.A. (2005) Characterization of *Maize iranian mosaic virus* and comparison with hawaiian and other isolates of *Maize Mosaic Virus (Rhabdoviridae)*. *Journal of Phytopathology* **153**:129-136.
- Ammar E.D., Hogenhout S. A. (2005) Use of Immunofluorescence Confocal Laser Scanning Microscopy to study distribution of the bacterium Corn Stunt Spiroplasma in vector leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) and in host plants. *Annals of the Entomological Society of America* **98**:820-826.
- Ammar E., Meulia T., Özbek E., Hogenhout S.A. (2004) Assembly and accumulation sites of *Maize mosaic virus (Rhabdoviridae)* in plant host and insect vector using

- transmission electron and confocal laser scanning microscopy. En: Méndez-Vilas A, Labajos Broncano L (eds) Formatex Microscopy book series, N° 2. Badajoz, pp 56-64.
- Ammar E.D., Nault L.R. (2002a) Virus transmission by leafhoppers, planthoppers and treehoppers (*Auchenorrhyncha*, *Homoptera*). *Advances in Botanical Research* **36**:141-167.
- Ammar E.D., Nault L.R. (2002b) Virus transmission by leafhoppers, planthoppers and treehoppers (*Auchenorrhyncha*, *Homoptera*). *Advances in Botanical Research* **36**:141-167.
- Ammar E.D., Tsai C., Whitfield A.E., Redinbaugh M.G., Hogenhout S. (2009) Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactions with insect and plant hosts. *Annual Review of Entomology* **54**:447-68.
- Anklam E., Gadani F., Heinze P., Pijnenburg H., Van Den Eede G.P. (2002) Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology* **214**:3-26.
- Babaie G., Kouhi Habibi M., Massah A., Dizadji A., Izadinejad L., Simon A. (2015) Complete Genome Sequence and Genome Analysis of *Eggplant mottled dwarf virus* - Iranian Isolate. *Journal of Phytopathology* **163**:331-341.
- Ball L.A. (2005) Part I: The Universal Taxonomy of Viruses in Theory and Practice. En: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus Taxonomy*. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. ELSEVIER Academic Press, San Diego, CA, pp 3-8.
- Bejerman N., Giolitti F., De Breuil S., Trucco V., Nome C., Lenardon S., Dietzgen R.G. (2015) Complete genome sequence and integrated protein localization and interaction map for alfalfa dwarf virus, which combines properties of both cytoplasmic and nuclear plant rhabdoviruses. *Virology* **483**:275-283.
- Bejerman N., Nome C., Giolitti F., Kitajima E., de Breuil S., Pérez-Fernández J., Basigalup D., Cornacchione M., Lenardon S. (2011) First Report of a Rhabdovirus Infecting Alfalfa in Argentina. *Plant Disease* **95**:771.
- Benitez-Alfonso Y., Faulkner C., Ritzenthaler C., Maule A.J. (2010) Plasmodesmata:

- gateways to local and systemic virus infection. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI **23**:1403-1412.
- Betancourt M., Fereres A., Fraile A., García-Arenal F. (2008) Estimation of the effective number of founders that initiate an infection after aphid transmission of a multipartite plant virus. *Journal of virology* **82**:12416-12421.
- Bock J.O., Lundsgaard T., Pedersen P. a, Christensen L.S. (2004) Identification and partial characterization of Taastrup virus: a newly identified member species of the Mononegavirales. *Virology* **319**:49-59.
- Bonfield J.K., Smith K.F., Staden R. (1995) A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research* **23**:4992-4999.
- Bourhy H., Cowley J.A., Larrous F., Holmes E.C., Walker P.J. (2005) Phylogenetic relationships among rhabdoviruses inferred using the L polymerase gene. *Journal of General Virology* **86**:2849-58.
- Callaghan B., Dietzgen R.G. (2005) Nucleocapsid gene variability reveals two subgroups of *Lettuce necrotic yellows virus*. *Archives of Virology* **150**:1661-1667.
- Carrington C.V.F., Foster J.E., Pybus O.G., Bennett S.N., Holmes E.C. (2005) Invasion and Maintenance of Dengue Virus Type 2 and Type 4 in the Americas. *Journal of Virology* **79**:14680-14687.
- Chambers T.C., Crowley N.C., Francki R.I.B. (1965) Localization of Lettuce necrotic yellows virus in host leaf tissue. *Virology* **27**:320-328.
- Childers C.C., Derrick K.S. (2003) Brevipalpus Mites as Vectors of Unassigned Rhabdoviruses in Various Crops. *Experimental and Applied Acarology* **30**:1-3.
- Chi-Wei Tsai M. (2006) *The molecular basis of the interactions of rhabdoviruses with their insect and plant hosts*. Trabajo de tesis, The Ohio State University. P.170
- Choi K.H. (2012) Viral polymerases. En: Rossmann MG, Rao VB (eds) *Viral Molecular Machines*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, pp 267-304.
- Choi T.J., Wagner J.D., Jackson A.O. (1994) Sequence analysis of the trailer region of Sonchus yellow net virus genomic RNA. *Virology* **202**:33-40.
- Conti M., Appiano A. (1973) Barley yellow striate mosaic virus and associated viroplasmas in barley cells. *Journal of General Virology* **21**:315-22.

- Creamer R. (1992) Purification and protein characterization of Sorghum stunt mosaic rhabdovirus. *Phytopathology* **82**:1473-1476.
- Culasso A.C.A., Farías A., Di Lello F.A., Golemba M.D., Ré V., Barbini L., Campos R. (2014) Spreading of hepatitis C virus subtypes 1a and 1b through the central region of Argentina. *Infection, Genetics and Evolution* **26**:32-40.
- Delarue M., Poch O., Tordo N., Moras D., Argos P. (1990) An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Engineering Design & Selection* **3**:461-467.
- Dhillon J., Cowley J.A., Wang Y., Walker P.J. (2000) RNA polymerase (L) gene and genome terminal sequences of ephemeroviruses bovine ephemeral fever virus and Adelaide River virus indicate a close relationship to vesiculoviruses. *Virus research* **70**:87-95.
- Dietzgen R.G. (2012) Morphology, genome organization, transcription and replication of Rhabdoviruses. En: Dietzgen RG, Kuzmin I V (eds) *Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, Host-vector Interactions, Cytopathology, and Control*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp 5-11.
- Dietzgen R.G., Calisher C.H., Kurath G., Kuzmin I. V, Rodriguez L.L., Stone D.M., Tesh R.B., Tordo N., Walker P.J., Wetzel T., Whitfield A.E. (2011) Family Rhabdoviridae. En: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus Taxonomy*. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. ELSEVIER Academic Press, San Diego, CA, pp 686-713.
- Dietzgen R., Callaghan B., Wetzel T., Dale J.L. (2006) Completion of the genome sequence of *Lettuce necrotic yellows virus* , type species of the genus *Cytorhabdovirus*. *Virus Research* **118**:16-22.
- Dietzgen R.G., Kuhn J.H., Clawson A.N., Freitas-Astúa J., Goodin M.M., Kitajima E.W., Kondo H., Wetzel T., Whitfield A.E. (2014) Dichorhavirus: A proposed new genus for Brevipalpus mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. *Archives of Virology* **159**:607-619.
- Dietzgen R., Kuzmin I. V (2012) Taxonomy of Rhabdoviruses. En: Dietzgen RG, Kuzmin I V (eds) *Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, Host-vector Interactions, Cytopathology, and Control*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp 13-22.

- Doyle J., Doyle M. (1994) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**:13-15.
- Drake J.W., Holland J.J. (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:13910-13913.
- Drummond A.J., Ho S.Y.W., Phillips M.J., Rambaut A. (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* **4**:699-710.
- Drummond A.J., Rambaut A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees BEAST. *BMC Evolutionary Biology* **7**:214.
- Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B., Pybus O.G. (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution* **22**:1185-92.
- Dumón A.D., Argüello Caro E.B., Alemandri M. V, Bainotti C., Mattio M.F., Rodríguez S.M., Vas M., Truol G.A.M. (2011) Identificación y caracterización biológica del Barley yellow striate mosaic virus (BYSMV): Nueva enfermedad del trigo en Argentina. *Tropical Plant Pathology* **36**:374-382.
- Dumón A.D., Argüello Caro E.B., Rodríguez S.M., Mattio M.F., Alemandri V., Truol G.A.M. (2011) Determinación de *Delphacodes kuscheli* (Fennah) como vector natural del Barley yellow striate mosaic virus. 2º Congreso Argentino de Fitopatología, Mar del Plata, Argentina: 249.
- Dumón A.D., Mattio M.F., Argüello Caro E.B., Alemandri M. V, Puyané N., Del Vas M., López Lambertini P., Truol G. (2015) Occurrence of a closely-related isolate to Maize yellow striate virus in wheat plants. *Agriscientia* **32**:107-112.
- Easton A.J., Pringle C.R. (2011) Order Mononegavirales. En: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus Taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. ELSEVIER Academic Press, San Diego, CA, pp 653-657.
- Elliott R.M., Dunn E., Simons J.F., Pettersson F. (1992) Nucleotide sequence and coding strategy of the Uukuniemi virus L RNA segment. *Journal of General Virology* **73**:1745-1752.
- Eyhéride G.H. (2012) El maíz y su cultivo en Argentina. Contexto general y tecnológico. En: Giménez Pecci MP, Laguna IG, Lenardon S (eds) *Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina*. INTA, pp 7-24.

- Falk B.W., Tsai J.H. (1983) Physicochemical Characterization of Maize Mosaic Virus. *Phytopathology* **73**:1536-1539.
- Faria N.R., Rambaut A., Suchard M.A., Baele G., Bedford T., Ward M.J., Tatem A.J., Sousa J.D., Arinaminpathy N., Pepin J., Posada D., Peeters M., Pybus O.G., Lemey P. (2014) The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* **346**:56-61.
- Flanagan N.S., Tobler A., Davison A., Pybus O.G., Kapan D.D., Planas S., Linares M., Heckel D., McMillan W.O. (2004) Historical demography of Mullerian mimicry in the neotropical *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:9704-9709.
- Fraile A., Escriu F., Aranda M.A., Malpica J.M., Gibbs A.J., Garcia-Arenal F. (1997) A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *Journal of virology* **71**:8316-8320.
- Fraile Pérez A., García Arenal Rodríguez F. (2005) Las virosis de las plantas y su control. *Phytoma* **169**:79-81.
- García Arenal F., Fraile A. (2011) Population dynamics and genetics of plant infection by viruses. En: Caranta C, Aranda MA, Tepfer M, López-Moya JJ (eds) *Recent Advances in Plant Virology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp 263-281.
- García Arenal F., Fraile A., Malpica J.M. (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* **39**:157-186.
- Gergerich R.C., Dolja V. V. (2006) *Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe*. The Plant Health Instructor <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/plantviruses.aspx>
- Gerónimo Gómez L. (2012) El maíz en áreas de trópico. En: Giménez Pecci MP, Laguna IG, Lenardon SL (eds) *Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina*. INTA, pp 25-30.
- Gilbert M.T.P., Rambaut A., Wlasiuk G., Spira T.J., Pitchenik a. E., Worobey M. (2007) The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:18566-18570.
- Giménez Pecci M.P. (2010) Enfermedades de maíz transmitidas por vectores en la República Argentina. *MAIZ Actualización* 2010:21-27.

- Giménez Pecci M.D.L.P., Laguna I.G., Lenardon S.L. (2012) Mal de Río Cuarto del maíz. En: Giménez Pecci MDLP, Laguna IG, Lenardon SL (eds) Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina. INTA, pp 41-56.
- Giménez Pecci M.P., Nome S.F., Milne R.G. (1986) Purificación y obtención de antisuero de las partículas del virus causal del Mal de Río Cuarto. En: II Congreso Argentino de Virología.p 23.
- Golemba M.D., Di Lello F.A., Bessone F., Fay F., Benetti S., Jones L.R., Campos R.H. (2010) High prevalence of hepatitis C virus genotype 1b infection in a small town of Argentina. Phylogenetic and Bayesian coalescent analysis. PloS One **5**:e8751.
- Greber R.S. (1982a) Maize sterile stunt-a delphacid transmitted rhabdovirus disease affecting some maize genotypes in Australia. Australian Journal of Agricultural Research **33**:13-23.
- Greber R.S. (1982b) Cereal chlorotic mottle virus. Descriptions of Plant Viruses. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=251>
- Greber R.S. (1990) Discrimination by gel-diffusion serology of digitaria striate, maize sterile stunt and other rhabdoviruses of Poaceae. Annals of Applied Biology **116**:259-264.
- Grenfell B.T., Pybus O.G., Gog J.R., Wood J.L.N., Daly J.M., Mumford J.A., Holmes E.C. (2004) Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. Science **303**:327-332.
- Guindon S., Gascuel O. (2003) A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. Systematic Biology **52**:696-704.
- Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series **41**:95-98.
- Heim F., Lot H., Delecolle B., Bassler A., Krczal G., Wetzell T. (2008) Complete nucleotide sequence of a putative new *Cytorhabdovirus* infecting lettuce. Archives of Virology **153**:81-92.
- Hogenhout S.A., Ammar E.D., Whitfield A.E., Redinbaugh M.G. (2008) Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. Annual Review of Phytopathology **46**:327-59.
- Hogenhout S.A., Redinbaugh M.G., Ammar E.D. (2003) Plant and animal rhabdovirus

- host range: a bug's view. *Trends in Microbiology* **11**:264-271.
- Holder M., Lewis P.O. (2003) Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature reviews Genetics* **4**:275-84.
- Hull R. (2009) Overview of plant viruses: Introduction to plant viruses. En: Hull R (ed) *Comparative Plant Virology*, Second edi. Academic Press, San Diego, CA., pp 23-41.
- ICTV Online (2016) International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Jackson A.O., Dietzgen R., Fang R.-X., Goodin M.M., Hogenhout S.A. (2008) Plant Rhabdoviruses. En: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (eds) *Encyclopedia of Virology*, 3^o Edition. ELSEVIER Academic Press, San Diego, CA, pp 187-196.
- Jackson A.O., Dietzgen R.G., Goodin M.M., Bragg J.N., Deng M. (2005) Biology of plant rhabdoviruses. *Annual Review of Phytopathology* **43**:623-60.
- Joy D. a, Feng X.R., Mu J.B., Furuya T., Chotivanich K., Krettli A.U., Ho M., Wang A., White N.J., Suh E., Beerli P., Su X.Z. (2003) Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science* **300**:318-321.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (2011) *Virus Taxonomy-Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, & E.J. Lefkowitz, Eds.), 9^o edn. ELSEVIER Academic Press, San Diego, CA.
- Kitajima E.W. (1998) Maize viruses and mollicutes : interactions between the host and pathogens. En: Casela C, Renfro R, Krattiger AF (eds) *Diagnosing Maize Diseases in Latin America*. ISAAA Briefs No 9, Ithaca, New York, pp 22-26.
- Kitajima E.W., Alba A.P.C., Costa A.S. (1976) Morfología e purificação parcial de partículas baciliformes associadas a faixa clorótica das nervuras do milho. *Fitopatologia Brasileira* **1**:34-38.
- Kitajima E.W., Costa A.S. (1982) The ultrastructure of the Corn chlorotic vein banding (Brazilian Maize mosaic) virus-infected corn leaf tissues and viruliferous vector. *Fitopatologia Brasileira* **7**:247-259.
- Kitajima E.W., Nome C.F. (1999) Microscopía electrónica en virología vegetal. En: Docampo DM, Lenardón SL (eds) *Métodos para detectar patógenos sistémicos*. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) INTA-JICA, Córdoba,

- Argentina, pp 59-87.
- Kitajima E.W., Van der Pahlen A. (1977) Ocorrência do vírus da faixa clorótica das nervuras do milho no Distrito Federal e em Manaus. *Fitopatologia Brasileira* **2**:83-84.
- Kitajima E.W., Rodrigues J.C.V., Freitas-Astua J. (2010) An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. *Scientia Agricola* **67**:348-371.
- Klerks M.M., Lindner J.L., Vaskova D., Spak J., Thompson J.R., Jelkmann W., Schoen C.D. (2004) Detection and tentative grouping of *Strawberry crinkle virus* isolates. *European Journal of Plant Pathology* **110**:45-52.
- Kondo H., Maeda T., Shirako Y., Tamada T. (2006) Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. *Journal of General Virology* **87**:2413-2421.
- Kuhn J.H., Jahrling P.B. (2010) Clarification and guidance on the proper usage of virus and virus species names. *Archives of virology* **155**:445-453.
- Kuwata S., Kubo S., Yamashita S., Yoji D. (1983) Rod-shaped Particles, a Probable Entity of Lettuce Big Vein Virus. *Annual Phytopathology Society Japan* **49**:264-251.
- Kuzmin I. V, Novella I.S., Dietzgen R.G., Padhi A., Rupprecht C.E. (2009) The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infection, genetics and evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* **9**:541-53.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Laguna I.G., Giménez Pecci M.P. (2004) Cultivo de maíz en Argentina. Enfermedades causadas por virus. *IDIA XXI*:158-162.
- Laguna I.G., Giménez Pecci M.P. (2012) Panorama mundial de las enfermedades causadas por virus y mollicutes en el cultivo de maíz. En: Giménez Pecci MP, Laguna IG, Lenardon S (eds) *Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina*. INTA, Buenos Aires, Argentina, pp 31-40.
- Lamprecht R.L., Kasdorf G.G.F., Stiller M., Staples S.M., Nel L.H., Pietersen G. (2010) *Soybean blotchy mosaic virus*, a new *Cytorhabdovirus* found in South Africa. *Plant Disease* **94**:1348-1354.
- Lamprecht R.L., Pietersen G., Kasdorf G.G.F., Nel L.H. (2009) Characterisation of a

- proposed Nucleorhabdovirus new to South Africa. *European Journal of Plant Pathology* **123**:105-110.
- Lander E.S., Waterman M.S. (1988) Genomic mapping by fingerprinting random clones: A mathematical analysis. *Genomics* **2**:231-239.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan, P.A. McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**:2947-2948.
- Lipman N.S., Jackson L.R., Trudel L., Weis-Garcia F. (2005) Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **46**:258-68.
- Lockhart B.E.L., Khales N., El Maataoui M., Lastra R. (1985) *Cynodon* chlorotic streak virus, a previously undescribed plant rhabdovirus infecting bermuda grass and maize in the mediterranean area. *Phytopathology* **75**:1094-1098.
- Lockhart B.E.L., El Maataoui M., Carroll T.W., Lennon A.M., Zaske S.K. (1986) Identification of Barley yellow striate mosaic virus in Morocco and its field detection by enzyme immune assay. *Plant Disease* **70**:1113-1117.
- Louie R. (1995) Vascular puncture of maize kernels for the mechanical transmission of *Maize white line mosaic virus* and other viruses of maize. *Phytopathology* **85**:139-143.
- Madriz Ordenana K., Rojas Montero R., Lundsgaard T., Ramirez P., Thordal Christensen H., Collinge D.B. (2000) Mechanical transmission of *Maize rayado fino marafivirus* (MRFV) to maize and barley by means of the vascular puncture technique. *Plant Pathology* **49**:302-307.
- Magiorkinis G., Magiorkinis E., Paraskevis D., Ho S.Y.W., Shapiro B., Pybus O.G., Allain J.-P., Hatzakis A. (2009) The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS medicine* **6**:e1000198.
- Mann K.S., Dietzgen R.G. (2014) Plant rhabdoviruses: new insights and research needs in the interplay of negative-strand RNA viruses with plant and insect hosts. *Archives of Virology* **159**:1889-1900.
- March G., Lenardon S. (2012) Manejo de enfermedades causadas por virus y mollicutes en

- maíz. En: Giménez Pecci MP, Laguna IG, Lenardon SL (eds) Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina. INTA, Buenos Aires, Argentina, pp 191-207.
- March G.J., Oddino C.M., Marinelli A.D. (2010) *Manejo de enfermedades de los cultivos según parámetros epidemiológicos* (G.J. March, C.M. Oddino, & A.D. Marinelli, Eds.). INTA, Córdoba, Argentina.
- Marino de Remes Lenicov A.M., Maciá A., Mariani R., Foieri A., Brentassi M.E., Toledo A. V, Rossi Batiz M., Paradell S. (2014) Diversidad de fulgoromorpha (Insecta-Hemiptera) y fluctuaciones poblacionales de especies vectoras asociadas con el agrosistema maíz en tres áreas agrológicas del NOA. X Congreso Nacional de Maíz. Rosario. <http://www.congresodemaiz.com.ar/areas/proteccion/DIVERSIDAD-DE-FULGOROMORPHA-Y-FLUCTUACIONES-POBLACIONALES-DE-ESPECIES-VECTORAS-ASOCIADAS-CON-EL-AGROSISTEMA-MAIZ-EN-TRES-AREAS-AGROLOGICAS-DEL-NOA.pdf>
- Marino de Remes Lenicov A.M., Virla E.G. (1999) Delfácidos asociados al cultivo de maíz en la República Argentina (Insecta - Homoptera - Delphacidae). Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata **104**:1-15.
- Marino de Remes Lenicov A.M., Virla E., Varela G. (1997) Descripción de los estados inmaduros de *Toya propinqua* (Fieber) y notas acerca de su comportamiento en condiciones experimentales (Insecta: Homoptera: Delphacidae). Neotrópica **43**:85-91.
- Massah A., Izadpanah K., Afsharifar A.R., Winter S. (2008) Analysis of nucleotide sequence of *Iranian maize mosaic virus* confirms its identity as a distinct *Nucleorhabdovirus*. Archives of Virology **153**:1041-7.
- Maurino M.F., Nome C.F., Carloni E., Giolitti F., Bisonard E.M., Laguna I.G., Giménez Pecci M.P. (2011) Rhabdovirus causal de mosaico estriado amarillo en maíz (*Zea mays*) en Argentina. 2º Congreso Argentino de Fitopatología, Mar del Plata, Argentina:153.
- McGavin W.J., Cock P.J.A., MacFarlane S.A. (2011) Partial sequence and RT-PCR diagnostic test for the plant rhabdovirus *Raspberry vein chlorosis virus*. Plant Pathology **60**:462-467.
- Milne R.G., Conti M. (1986) Barley yellow striate mosaic virus. Descriptions of Plant Viruses. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=312>.

- Milne I., Stephen G., Bayer M., Cock P.J.A., Pritchard L., Cardle L., Shaw P.D., Marshall D. (2013) Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in bioinformatics* **14**:193-202.
- Moya A., Holmes E.C., González-Candelas F. (2004) The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature reviews Microbiology* **2**:279-288.
- Nagy P.D. (2008) Recombination in plant RNA viruses. En: Roossinck MJ (ed) *Plant Virus Evolution*. Springer, Heidelberg, Berlin, pp 133-156.
- Nault L.R., Ammar E.D. (1989) Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annual Review of Entomology* **34**:503-529.
- Nemchinov L., Hadidi A., Maiss E., Cambra M., Candresse T., Damsteegt V. (1996) Sour cherry strain of plum pox potyvirus (PPV): Molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology* **86**:1215-1221.
- Nome C.F., Giménez Pecci M.P., Laguna I.G. (1999) Detección de partículas tipo rhabdovirus en cebada (*Hordeum vulgare* L.) infectada con el virus del Mal de Río Cuarto. X Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Jujuy:76.
- Oliveira E., Resende R.O., Giménez Pecci M.P., Laguna I.G., Herrera P., Cruz I. (2002) Doenças causadas por mollicutes e por virus na cultura do milho no Paraná. *Fitopatología* **37**:11.
- Pennazio S., Roggero P., Conti M. (1996) Yield losses in virus-infected crops. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **30**:283-296.
- Permar T.A., Garnsey S.M., Gumpf D.J., Lee R.F. (1990) A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **80**:224-228.
- Perotto M.C., Luciani C., Celli M.G., Torrico A., Conci V.C. (2014) First report of *Strawberry crinkle virus* in Argentina. *New Disease Reports* **30**:5.
- Poch O., Blumberg B.M., Bougueleret L., Tordo N. (1990) Sequence Comparison of Five Polymerases (L proteins) of Unsegmented Negative-strand RNA Viruses: Theoretical Assignment of Functional Domains. *Journal of General Virology* **71**:1153-1162.
- Poch O., Sauvaget I., Delarue M., Tordo N. (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO Journal* **8**:3867-3874.
- Posada D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and*

- evolution **25**:1253-6.
- 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 Pathology* **51**:266-274.
- Presello D., Constamagna A., Conci L.R., Marino de Remes Lenicov A.M., Guzmán F.A., Herrera P. (1997) Mal de Río Cuarto del Maíz. Estudio de la capacidad vectora de la poblaciones de *Toya propinqua* presentes en el área de Pergamino. En: VI Congreso Nacional de Maíz. Rosario, Santa Fe, p Sección II 1-5.
- Ramalho T.O., Figueira A.R., Sotero A.J., Wang R., Geraldino Duarte P.S., Farman M., Goodin M.M. (2014) Characterization of Coffee ringspot virus-Lavras: A model for an emerging threat to coffee production and quality. *Virology* **464-465**:385-396.
- Rambaut A., Pybus O.G., Nelson M.I., Viboud C., Taubenberger J.K., Holmes E.C. (2008) The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* **453**:615-619.
- Ré V.E., Culasso A.C.A., Mengarelli S., Farías A.A., Fay F., Pisano M.B., Elbarcha O., Contigiani M.S., Campos R.H. (2011) Phylodynamics of hepatitis C virus subtype 2c in the province of Córdoba, Argentina. *PloS One* **6**:e19471.
- Redinbaugh M.G., Seifers D.L., Meulia T., Abt J.J., Anderson R.J., Styer W.E., Ackerman J., Salomon R., Houghton W., Creamer R., Gordon D.T., Hogenhout S.A. (2002) Maize fine streak virus, a new leafhopper-transmitted rhabdovirus. *Phytopathology* **92**:1167-1174.
- Redinbaugh M.G., Whitfield A.E., Ammar E.-D. (2012) Insect vector interaction and transmission of cereal-infecting rhabdoviruses. En: Dietzgen RG, Kuzmin I V (eds) *Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, Host-vector Interactions, Cytopathology, and Control*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp 147-163.
- van Regenmortel M.H. V, Burke D.S., Calisher C.H., Dietzgen R.G., Fauquet C.M., Ghabrial S.A., Jahrling P.B., Johnson K.M., Holbrook M.R., Horzinek M.C., Keil G.M., Kuhn J.H., Mahy B.W.J., Martelli G.P., Pringle C., Rybicki E.P., Skern T., Tesh R.B., Wahl-Jensen V., Walker P.J., Weaver S.C. (2010) A proposal to change existing virus species names to non-Latinized binomials. *Archives of Virology* **155**:1909-1919.

- Reich D.E., Goldstein D.B. (1998) Genetic evidence for a Paleolithic human population expansion in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:8119–8123.
- Remes Lenicov A.M.M. de, Paradell S.L., Catalano M.I. (2006) Hemípteros auquenorrincos asociados al cultivo de sorgo en la Argentina (Insecta-Hemiptera). *Revista de Investigaciones Agropecuarias* **35**:3-20.
- Remes Lenicov A.M., Tesón A., Dagoberto E., Huguet N. (1985) Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto virus en maíz. *Gac Agron* **5**:251-258.
- Remes Lenicov A.M., Virla E.G., Dagoberto E. (1991) Cambios estacionales en la población del vector del «Mal de Río Cuarto» del maíz (*Delphacodes kuscheli* Fennah, 1955) en cultivos de avena y sus malezas circundantes en Sampacho, Córdoba. (Insecta-Homoptera-Fulgoroidea). En: *Proceedings of Taller de actualización sobre Mal de Río Cuarto, Argentina*. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, pp 116-129.
- Revell P., Trinh X., Dale J., Harding R. (2005) *Taro vein chlorosis virus*: characterization and variability of a new *Nucleorhabdovirus*. *Journal of General Virology* **86**:491-499.
- Rodriguez Pardina P.E., Gimenez Pecci M.P., Laguna I.G., Dagoberto E., Truol G. (1998) Wheat: a new natural host for the mal de rio cuarto virus in the endemic disease area, Río Cuarto, Córdoba Province, Argentina. *Plant Disease* **82**:149-152.
- Roman J., Palumbi S.R. (2003) Whales before whaling in the North Atlantic. *Science* **301**:508-510.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572-1574.
- Roossinck M.J. (2003) Plant RNA virus evolution. *Current Opinion in Microbiology* **6**:406-409.
- Sacristán S., Malpica J.M., Fraile A., García-Arenal F. (2003) Estimation of population bottlenecks during systemic movement of *Tobacco mosaic virus* in tobacco plants. *Journal of virology* **77**:9906-9911.
- Sasaya T., Ishikawa K., Koganezawa H. (2002) The nucleotide sequence of RNA1 of *Lettuce big-vein virus*, genus *Varicosavirus*, reveals its relation to nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology* **297**:289-297.

- Schnell M.J., Conzelmann K. (1995) Polymerase Activity of *in Vitro* Mutated Rabies Virus L Protein. *Virology* **214**:522-530.
- Schoen C.D., Limpens W., Moller I., Groeneveld L., Klerks M.M., Lindner J.L. (2004) The complete genomic sequence of Strawberry crinkle virus, a member of the Rhabdoviridae. En: X International Symposium on Small Fruit Diseases. pp 45-50.
- Seetahal J.F.R., Velasco-Villa A., Allicock O.M., Adesiyun A. a, Bissessar J., Amour K., Phillip-Hosein A., Marston D. a, McElhinney L.M., Shi M., Wharwood C.-A., Fooks A.R., Carrington C.V.F. (2013) Evolutionary history and phylogeography of rabies viruses associated with outbreaks in Trinidad. *PLoS neglected tropical diseases* **7**:e2365.
- Sharma K., Misra R.S. (2011) Molecular approaches towards analyzing the viruses infecting maize (*Zea mays* L.). *Journal of General and Molecular Virology* **3**:1-17.
- Shi C., Wei Q., Gin K.Y.H., Lam T.J. (2003) Production and characterization of monoclonal antibodies to a grouper *Iridovirus*. *Journal of Virological Methods* **107**:147-154.
- Shikata E., Lu Y.T. (1967) Electron microscopy of Northern cereal mosaic virus in Japan. *Proc Japan Acad* **43**:918.
- Shurtleff M.C., Edwards D.I., Noel G.R., Pedersen W.L., White D.G. (1993) Diseases of Corn or Maize (*Zea mays* L.). American Phytopathological Society. <http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/CornorMaize.aspx>
- Sinha R.C., Behki R.M. (1972) American wheat striate mosaic virus. *Descriptions of Plant Viruses*. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=99>
- Sleat D.E., Banerjee A.K. (1993) Transcriptional Activity and Mutational Analysis of Recombinant Vesicular Stomatitis Virus RNA Polymerase. *Journal of Virology* **67**:1334-1339.
- Suchard M. a, Weiss R.E., Sinsheimer J.S. (2001) Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Molecular biology and evolution* **18**:1001-1013.
- Sylvester E.S., Richardson J. (1992) Aphid-borne rhabdoviruses relationships with their vectors. En: Harris KF (ed) *Advances in Disease Vector Research-Vol 9*. Springer-Verlag: New York, New York, USA, pp 313-341.
- Tanno F., Nakatsu A., Toriyama S.S., Koyima M. (2000) Complete nucleotide sequence of

- Northern cereal mosaic virus and its genome organization. *Archives of virology* **145**:1373-1384.
- Todd J.C., Ammar E.D., Redinbaugh M.G., Hoy C., Hogenhout S.A. (2010) Plant host range and leafhopper transmission of *Maize fine streak virus*. *Phytopathology* **100**:1138-1145.
- Tordo N., Benmansour A., Calisher C., Dietzgen R.G., Fang R.-X., Jackson A.O., G K., Nadin-Davis S., Tesh R.B., Walker P.J. (2005) Family Rhabdoviridae. En: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus Taxonomy*. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA, pp 623-644.
- Toriyama S.S. (1972) Purification and some properties of *Northern cereal mosaic virus*. *Uirusu* **22**:114-124.
- Toriyama S.S. (1986) *Northern cereal mosaic virus*. *Descriptions of Plant Viruses*. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=322>
- Torres C., Piñeiro y Leone F.G., Pezzano S.C., Mbayed V.A., Campos R.H. (2011) New perspectives on the evolutionary history of hepatitis B virus genotype F. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **59**:114-22.
- Truol G.A.M., Usugi T., Hirao J., Arneodo J.D., Giménez Pecci M.P., Laguna I.G. (2001) Transmisión experimental del virus del Mal de Río Cuarto por *Delphacodes kuscheli*. *Fitopatología Brasileira* **26**:39-44.
- Tsai J.H. (1996) Development and oviposition of *Peregrinus maidis* (Homoptera: Delphacidae) on various host plants. *Florida Entomologist* **79**:19-26.
- Tsai C.W., Redinbaugh M.G., Willie K.J., Reed S., Goodin M., Hogenhout S.A. (2005) Complete Genome Sequence and In Planta Subcellular Localization of Maize Fine Streak Virus Proteins. *Journal of Virology* **79**:5304-5314.
- United States Department of Agriculture (2016) Production, Supply and Distribution Online. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/>
- Velázquez P.D., Conci L.R., Truol G.A.M. (2001) *Toya propinqua* (Hemiptera: Delphacidae): especie vectora del virus del mal de Río Cuarto (MRCV) en transmisiones experimentales. En: XI Congreso Latinoamericano de Fitopatología e XXXIV Congreso Brasileiro de Fitopatología. São Pedro, SP, Brasil

- Virla E.G., Remes Lenicov A.M. (1991) Ciclo de vida de *Delphacodes kuscheli* criado sobre diferentes hospedantes en condiciones de laboratorio (Insecta, Homoptera, Delphacidae). En: Proceedings of Taller de actualización sobre Mal de Rio Cuarto, Argentina. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, pp 104-115.
- Waddell P.J., Steel M.A. (1997) General Time-Reversible Distances with Unequal Rates across Sites: Mixing Γ and Inverse Gaussian Distributions with Invariant Sites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **8**:398-414.
- Walker P.J., Dietzgen R.G., Joubert D.A., Blasdell K.R. (2011) Rhabdovirus accessory genes. *Virus Research* **162**:110-125.
- Walsh J.A., Verbeek M. (2011) Genus *Varicosavirus*. En: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus Taxonomy*. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 9th edn. ELSEVIER Academic Press, San Diego, CA, pp 777-781.
- Worobey M., Gemmel M., Teuwen D.E., Haselkorn T., Kunstman K., Bunce M., Muyembe J.-J., Kabongo J.-M.M., Kalengayi R.M., Van Marck E., Gilbert M.T.P., Wolinsky S.M. (2008) Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* **455**:661-4.
- Yan T., Zhu J.-R., Di D., Gao Q., Zhang Y., Zhang A., Yan C., Miao H., Wang X.-B. (2015) Characterization of the complete genome of *Barley yellow striate mosaic virus* reveals a nested gene encoding a small hydrophobic protein. *Virology* **478**:112-122.