



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE VIRUS QUE AFECTAN A CUCURBITÁCEAS EN ARGENTINA

Elíizabeth Alicia Pozzi

Tesis

Para optar al Grado Académico de

Doctora en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2020

IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE VIRUS QUE AFECTAN A CUCURBITÁCEAS EN ARGENTINA

Elíizabeth Alicia Pozzi

Comisión Asesora de Tesis

Directora: Dra. María Cecilia Perotto

Codirectora: Dra. Vilma Cecilia Conci

Asesora: Dra. Cecilia Bruno

Tribunal Examinador de Tesis

Lic. (Dra.) Ernestina Galdeano

.....

Ing. Agr. (Dra.) Cecilia Bruno

.....

Biól. (Dr.) Fabián Giolitti

.....

Presentación formal académica

Fecha:

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Cecilia Perotto, directora de esta tesis, por ser un ejemplo a seguir en lo personal y laboral, por dedicarme su tiempo, su confianza, y brindarme herramientas materiales e intelectuales para el desarrollo como investigadora.

A la Dra. Vilma Conci, codirectora de esta tesis, por darme su apoyo desde un comienzo y brindarme todo su respeto y cariño.

A la Dra. Cecilia Bruno, miembro de la comisión asesora y evaluadora de tesis por la colaboración permanente durante estos años de trabajo.

A la Dra. Ernestina Galdeano, Dr. Giolitti Fabián y Patricia Fichetti, miembros de la comisión evaluadora, por los importantes aportes realizados a esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Al Centro de Investigaciones Agropecuarias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (CIAP-INTA).

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC-FCA).

Al Ing. Agr. Federico Ricart, por contribuir con muestras y asesoramiento en el manejo del cultivo.

Al Especialista e Ing. Agr. Pedro Della Gaspera, por su colaboración en muestreos e información necesaria para posteriores análisis.

A la Ing. Agr. Carolina Sosa, por su importante colaboración en los muestreos.

A la Dra. Cecilia Luciani, por su amistad incondicional.

A la Ing. Agr. Andrea Rubenacker e Ing. Agr. Carla Dionisi, por brindarme hermosos momentos de felicidad.

Ing. Agr. María Luz Jovtis, por los días de sonrisas y anécdotas compartidas.

A la Ing. Agr. María José Girotti, por demostrarme que la distancia no es un obstáculo para nuestra amistad.

A los profesionales técnicos de laboratorio Lourdes Villafañe y Franco Gutiérrez, por su importante colaboración en el trabajo de laboratorio.

A mis compañeros del CIAP-INTA, por los imborrables y hermosos momentos vividos.

A mi familia, por ser mi mayor tesoro.

A Nico, por estar siempre a mi lado...

RESUMEN

Las enfermedades virales, se consideran los principales factores limitantes en la producción de cucurbitáceas, las cuales causan significativas pérdidas en el rendimiento. En Argentina, fueron detectados dentro de los géneros *Potyvirus*, watermelon mosaic virus (WMV), papaya ringspot virus (PRSV) y zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) y dentro del *Cucumovirus*, cucumber mosaic virus (CMV). El objetivo de esta tesis fue identificar y caracterizar virus que afectan a cucurbitáceas, conocer su epidemiología y procesos evolutivos. Para ello, en el Capítulo 1 se presenta la descripción del cultivo de cucurbitáceas, su producción, comercialización y los principales patógenos que lo afectan. En el Capítulo 2 se informan las virosis emergentes, tales como un inédito potyvirus denominado cucurbit vein banding virus (CVBV), y dos tospovirus: zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) el cual no estaba reportado en Argentina y groundnut ringspot virus (GRSV) que fue detectado en el cultivo de sandía. El Capítulo 3 muestra la incidencia relativa, la distribución de los virus WMV, ZYMV, PRSV y CMV y su relación con variables bio-meteorológicas. En esta misma sección se estudia la curva de progreso de la enfermedad de WMV, su relación con los vectores de virus tales como los pulgones y las variables meteorológicas. La variabilidad genética de los potyvirus (WMV y ZYMV) y su relación con los procesos evolutivos, se estudian en el Capítulo 4. Por último, en el Capítulo 5 se presentan las conclusiones generales de cada sección. La importancia de este trabajo de tesis fue haber contribuido a generar conocimientos acerca de la incidencia, prevalencia y distribución geográfica de los virus presentes, así como su relación con variables meteorológicas, detectar virosis emergentes y realizar estudios de evolución genética de los virus más relevantes detectados hasta la actualidad para el cultivo de cucurbitáceas.

Palabras clave: *Cucurbitaceae*, *Potyvirus*, virosis, variabilidad.

ABSTRACT

Viral diseases are considered the main limiting factors in the production of cucurbits, which cause significant yield losses. In Argentina, were detected within the genera *Potyvirus*, watermelon mosaic virus (WMV), papaya ringspot virus (PRSV) and zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) and within the *Cucumovirus*, cucumber mosaic virus (CMV). The objective of this thesis was to identify and characterize viruses that affect Cucurbitaceae, to know their epidemiology and evolutionary processes. To this end, Chapter 1 presents a description of the cucurbit crops, its production, commercialization and the main pathogens that affect it. In Chapter 2, emerging viruses are reported, such as an unpublished potyvirus called cucurbit vein banding virus (CVBV), and two tospoviruses: zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) which was not reported in Argentina and groundnut ringspot virus (GRSV) which was detected in watermelon cultivation. Chapter 3 shows the relative incidence, distribution of WMV, ZYMV, PRSV and CMV viruses and their relationship with bio-meteorological variables. In this same section, the disease progress curve of WMV, its relationship with virus vectors such as aphids and meteorological variables is studied. The genetic variability of potyvirus (WMV and ZYMV) and its relationship with evolutionary processes are studied in Chapter 4. Finally, the general conclusions of each section are presented in Chapter 5. The importance of this thesis work was to have contributed to generate knowledge about the incidence, prevalence and geographical distribution of the viruses present, as well as their relationship with meteorological variables, to detect emerging viruses and to carry out genetic evolution studies of the most relevant viruses detected so far for cucurbit crops.

Key words: *Cucurbitaceae*, *Potyvirus*, viruses, variability.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| EL CULTIVO DE CUCURBITÁCEAS | 1 |
| Características, origen y taxonomía | 1 |
| Producción y comercialización de cucurbitáceas | 2 |
| Principales patógenos que afectan al cultivo de cucurbitáceas | 4 |
| HIPÓTESIS | 6 |
| OBJETIVO GENERAL | 6 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 6 |
| CAPÍTULO 2 | 7 |
| IDENTIFICACIÓN DE VIROSIS EMERGENTES EN CUCURBITÁCEAS PRESENTES EN ARGENTINA | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| 2.1.-IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO POTYVIRUS INFECTANDO CUCURBITÁCEAS | 8 |
| Materiales y métodos | 10 |
| Resultados | 12 |
| Discusión | 17 |
| Conclusión | 19 |
| 2.2.- DETECCIÓN DE TOSPOVIRUS INFECTANDO CUCURBITÁCEAS EN ARGENTINA | 19 |
| 2.2.1.-DETECCIÓN DE GRSV | 22 |
| Materiales y métodos | 22 |
| Resultados | 24 |
| Discusión | 26 |
| Conclusión | 28 |
| 2.2.2.-PRIMER REPORTE DE ZUCCHINI LETHAL CHLOROSIS VIRUS (ZLCV) EN ARGENTINA INFECTANDO CULTIVOS DE ZAPALLO | 29 |
| Materiales y métodos | 29 |
| Resultados | 30 |
| Discusión | 34 |
| Conclusión | 36 |
| CAPÍTULO 3 | 37 |
| IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS VIRUS QUE AFECTAN A LAS CUCURBITÁCEAS, SU RELACIÓN CON VARIABLES BIO-CLIMÁTICAS Y CURVAS DE PROGRESO DE ENFERMEDAD | 37 |
| INTRODUCCIÓN | 37 |
| 3.1.-INCIDENCIA RELATIVA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS VIRUS DE CUCURBITÁCEAS, Y SU RELACIÓN CON VARIABLES BIO-METEOROLÓGICAS | 38 |

| | |
|---|------------|
| Materiales y métodos | 39 |
| <i>Áreas de estudio</i> | 39 |
| <i>Recolección de muestras</i> | 41 |
| <i>Identificación de virus, estimación de la incidencia e índice de dispersión relativa</i> | 42 |
| <i>Análisis estadísticos</i> | 43 |
| <i>Estudio de verificación</i> | 44 |
| Resultados | 45 |
| Discusión | 51 |
| Conclusión | 56 |
| 3.2.-CURVA DE PROGRESO DE LAS INFECCIONES VIRALES | 56 |
| Materiales y métodos | 57 |
| Resultados | 58 |
| Discusión | 60 |
| Conclusión | 62 |
| CAPÍTULO 4 | 63 |
| VARIABILIDAD GENÉTICA DE POTYVIRUS DE CUCURBITÁCEAS Y SU RELACIÓN CON EVENTOS EVOLUTIVOS | 63 |
| INTRODUCCIÓN | 63 |
| 4.1.-VARIABILIDAD MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE WMV EN ARGENTINA | 64 |
| Materiales y métodos | 64 |
| Resultados | 70 |
| Discusión | 73 |
| Conclusión | 76 |
| 4.2.-EVOLUCIÓN MOLECULAR DE ZYMV | 76 |
| Materiales y métodos | 76 |
| Resultados | 78 |
| Discusión | 79 |
| Conclusión | 81 |
| CAPÍTULO 5 | 82 |
| CONCLUSIONES GENERALES | 82 |
| FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN | 84 |
| BLIBLIOGRAFÍA | 85 |
| ANEXO 1 | 99 |
| EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES CTAB MODIFICADO | 99 |
| ANEXO 2 | 101 |
| PROTOCOLO TRIZOL (MANACORDA, 2013) | 101 |

| | |
|--|-----|
| ANEXO 3 | 104 |
| PROCOLO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES MODIFICADO DE GAMBINOET AL. (2008) | 104 |
| ANEXO 4 | 106 |
| PROCEDIMIENTOS PARA OBSERVACIONES EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO | 106 |
| A- INMUNO-ELECTROMICROSCOPIA MÁS DECORACIÓN (ISEM-D) | 107 |
| B-CORTES ULTRAFINOS | 108 |
| ANEXO 5 | 110 |
| PLACA TAPIZADA CON ANTÍGENO (<i>PLATE-TRAPPED ANTIGEN</i> , PTA-ELISA)..... | 110 |
| ANEXO 6 | 114 |
| DOBLE SANDWICH DE ANTICUERPOS (<i>ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY DOUBLE SANDWICH ANTIBODY</i> , DAS-ELISA) | 114 |
| ANEXO 7 | 117 |
| TABLA DE VARIABLES METEOROLÓGICAS | 117 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Muestras de hojas de cucurbitáceas evaluadas por análisis serológicos y moleculares para diferentes potyvirus. | 16 |
| Tabla 2. Hospedantes y número de plantas que resultaron positivas a zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV)..... | 31 |
| Tabla 3. Valores medios de las variables bio-meteorológicas temperaturas máximas, medias, mínimas, valores acumulados de precipitaciones y humedad relativa registradas durante 120 días del ciclo de cultivo en 14 ambientes, conformados por la combinación de tipo de clima y campaña agrícola, de 2010 a 2016. | 41 |
| Tabla 4. Cebadores utilizados para la detección de WMV, PRSV, ZYMV y CMV | 42 |
| Tabla 5. Análisis de correlación de Pearson entre las variables bio-meteorológicas y los 4 virus en estudio (WMV, watermelon mosaic virus; ZYMV, zucchini yellow mosaic virus; PRSV, papaya ringspot virus; CMV, cucumber mosaic virus). | 49 |
| Tabla 6. Año de muestreo, tipo de trampa utilizada y número de pulgones recolectados. | 59 |
| Tabla 7. Muestras de cucurbitas recolectadas y secuenciadas de 10 provincias diferentes de Argentina, desde los años 2011 a 2018. Se indica número de acceso a la secuencia, año de recolección, provincia, identificación de la muestra y hospedante..... | 66 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig. 1. Mapa genómico típico del género de <i>Potyvirus</i> | 9 |
| Fig. 2. Representación de la organización del genoma de cucurbit vein banding virus (CVBV). | 13 |
| Fig. 3. Árbol de máxima verosimilitud condensado inferido a partir de secuencias completas de aminoácidos del género <i>Potyvirus</i> utilizando el modelo JTT (+G+I). | 15 |
| Fig. 4. Corrida de electroforesis de producto de RT-PCR en gel de agarosa 2% de dos muestras infectadas con cucurbit vein banding virus (CVBV). | 16 |
| Fig. 5. Planta de zapallo que presenta síntomas de clorosis nerval, engrosamiento de las nervaduras y ampollado de la lámina foliar provenientes de la provincia de Córdoba infectadas con cucurbit vein banding virus (CVBV)..... | 17 |
| Fig. 6. Representación esquemática de un virión del género <i>Tospovirus</i> | 21 |
| Fig. 7. Lesiones necróticas y mosaico en las hojas de sandía en el campo causadas por groundnut ringspot virus (GRSV). | 23 |
| Fig. 8. Árbol filogenético Maximum Likelihood utilizando modelo Tamura-Nei construido con las secuencias parciales de nucleótidos de la proteína N de groundnut ringspot virus (GRSV)..... | 25 |
| Fig. 9. (A) Clorosis severa de las hojas y curvatura apical ascendente de las hojas de <i>Cucurbita maxima</i> var. <i>zapallito redondo del tronco</i> debido a la infección con zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV). (B) Síntomas de malformación del fruto en <i>C. maxima</i> var. <i>zapallito redondo del tronco</i> (arriba) y <i>C. pepo</i> (abajo) | 31 |
| Fig. 10. Fotografía de secciones ultrafinas de hojas de zapallo (<i>Cucurbita maxima</i>) posiblemente infectadas por zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) mostrando partículas similares a las de tospovirus rodeadas por membranas..... | 32 |
| Fig. 11. Corrida de electroforesis de producto de RT-PCR con cebadores específicos en gel de agarosa 2% para zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV). | 33 |
| Fig. 12. Árbol filogenético Maximum Likelihood utilizando modelo Tamura-Nei construido con las secuencias parciales de nucleótidos de la proteína N de zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV)..... | 34 |
| Fig. 13. Ubicación geográfica de los ambientes evaluados en los diferentes climas estudiados. | 40 |
| Fig. 14. Establecimiento productivo ubicado en la Provincia de Santa Fe con siete surcos por planchada. | 45 |

| | |
|---|----|
| Fig. 15. Incidencia relativa de los virus watermelon mosaic virus (WMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), papaya ringspot virus (PRSV) y cucumber mosaic virus (CMV). | 46 |
| Fig. 16. Porcentaje de plantas de cucurbitáceas infectadas con los virus watermelon mosaic virus (WMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), papaya ringspot virus (PRSV) y cucumber mosaic virus (CMV)..... | 47 |
| Fig. 17. Análisis de componentes principales considerando las variables bio-meteorológicas, los virus presentes (watermelon mosaic virus-WMV, zucchini yellow mosaic virus-ZYMV, papaya ringspot virus-PRSV, cucumber mosaic virus- CMV) y los diferentes ambientes..... | 48 |
| Fig. 18. Diagrama de dispersión para variables canónicas que representa la presencia de virus vs. las variables canónicas de variables bio-meteorológicas..... | 49 |
| Fig. 19. Árboles de regresión para cada virus y variables bio-meteorológicas..... | 50 |
| Fig. 20. Trampa de agua (izquierda) y trampa pegajosa (derecha) colocadas en el campo para el monitoreo de vectores..... | 58 |
| Fig. 21. A) Curva de progreso por semana de watermelon mosaic virus (WMV) en el cultivo de zapallo. B) Curva de progreso por semana de watermelon mosaic virus (WMV) en cultivo de melón..... | 59 |
| Fig. 22. Variación de población de áfidos (línea continua de color ojo) en función de las variables meteorológicas mensuales desde la campaña 2013/2014 a 2016/2017 inclusive..... | 60 |
| Fig. 23. Mapa de Argentina indicando (en gris) las provincias incluidas en este capítulo. | 65 |
| Fig. 24. Árbol filogenético de secuencias de watermelon mosaic virus (WMV). | 71 |
| Fig. 25. Árbol filogenético para zucchini yellow mosaic virus (ZYMV). | 79 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| °C | Grados centígrados |
| μl | Micro litro |
| μM | Micromolar |
| aa | Aminoácidos |
| ADN | Ácido desoxiribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ICTV | Comité Internacional de Taxonomía de Virus |
| CTAB | Bromuro de hexadecilmetilamonio |
| dNTP | Deoxinucleótido trifosfato |
| DAS-ELISA | Inmuno ensayo de doble sándwich de antisuero |
| ha | Hectárea |
| INDEAR | Instituto de Agrobiotecnología Rosario |
| IPAVE | Instituto de Patología Vegetal |
| INTA | Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria |
| min | Minuto |
| s | Segundo |
| NCBI | Centro Nacional de Información Biotecnológica |
| nm | Nanómetro |
| nt | Nucleótido |
| CP | Capsid Protein |
| NIb | Nuclear inclusion protein b |
| HC-Pro | Componente auxiliar proteinasa |
| ORF | Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>) |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| RT | Retro transcripción |
| t | Tonelada |
| kg | Kilogramo |
| pb | Pares de bases |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| WMV | <i>Watermelon mosaic virus</i> |
| ZYMV | <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> |
| PRSV | <i>Papaya ringspot virus</i> |

| | |
|------|--|
| CMV | <i>Cucumber mosaic virus</i> |
| CVBV | <i>Cucurbit vein banding virus</i> |
| ZLCV | <i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> |
| GRSV | <i>Groundnut ringspot virus</i> |

EL CULTIVO DE CUCURBITÁCEAS

Características, origen y taxonomía

Las cucurbitáceas (*Cucurbitaceae*) constituyen un grupo de especies cultivadas muy diverso alrededor del mundo, se cultivan bajo condiciones diferentes y son utilizadas para múltiples propósitos. Se originaron tanto en el Viejo Mundo (África, Asia y Europa) como en el Nuevo Mundo (América y Oceanía). *Cucurbita* spp., género originario del “Nuevo Mundo”; el cual luego del contacto europeo, se desarrollaron centros de selección en Turquía (*C. pepo*), India y Birmania (*C. maxima*), Japón y China (*C. moschata*). Los géneros *Cucumis* (pepino y melón) y *Citrullus* (sandía) son originarios del Viejo Mundo (Zitter *et al.*, 1996). *C. maxima* fue la única especie cultivada restringida a América del Sur, en las áreas templadas cálidas de Uruguay y Argentina. *C. moschata* es nativa de las tierras bajas de América tropical y subtropical (México y América del Sur), *C. argyrosperma* oriunda de la costa del Pacífico que va desde México a Nicaragua, y *C. pepo* de las altas elevaciones de México y el norte de América Central. Además, *C. moschata* fue la única que se encontraba distribuida en dos áreas nativas distintas, una importante en México y una menor en el norte de Sudamérica (Bisognin, 2002).

En relación a su morfología el sistema radical de las cucurbitáceas cultivadas es en general extenso, pero poco profundo, con la mayoría de las raíces en el metro superior del suelo. Tras la germinación, la raíz primaria crece vigorosamente y alcanzará una profundidad de 1 metro en *Cucumis* spp. y 2 metros o más en *Cucurbita* spp. El tallo principal puede tener unas pocas a muchas (ocho o más) ramas laterales que emergen de los nodos cerca de la base del tallo. Las ramas laterales casi pueden igualar el tallo principal en tamaño y pueden tener ramas secundarias bien desarrolladas (Zitter *et al.*, 1996).

Las hojas son simples, de tres o cinco lóbulos, y se producen por separado. Tanto las hojas como las flores varían mucho en tamaño, forma y color. Dan flores

perfectas e imperfectas en varias combinaciones de tipos sexuales: las flores hermafroditas (perfectas) son capaces de autopolinizarse, y las flores imperfectas son pistiladas (hembras) o estaminadas (masculinas) (Zitter *et al.*, 1996).

La expresión sexual se refiere a la combinación de tipos de flores formados en una planta y está controlado genéticamente. Los tipos de sexualidades comunes de las cucurbitáceas cultivadas son los tipos monoico, andromonoico y ginomonoicas (Zitter *et al.*, 1996).

Ya sea una flor hermafrodita o pistilada, los procesos de polinización, fertilización y desarrollo de la fruta son los mismos. El polen de cucurbitáceas es generalmente grande y pegajoso, y por lo tanto, los insectos deben transportarlo desde las anteras hasta el estigma para que ocurra la polinización y la fertilización. Las abejas (*Apis* spp) son los polinizadores más importantes para la producción de frutas y semillas (Zitter *et al.*, 1996). *Cucumis melo* (melón), *C. sativus* (pepino), *Citrullus lanatus* (sandía) y *Cucurbita* sp. no permiten la fertilización cruzada (Zitter *et al.*, 1996).

El fruto se clasifica botánicamente como pepónide. Las cucurbitáceas incluyen aproximadamente 120 géneros y 800 especies (Romay *et al.*, 2014). Los géneros cultivados más importantes son *Cucurbita* L., *Cucumis* L., y *Citrullus* L. Las especies *C. maxima* Duch., *C. moschata* (Duch. Ex Lam.), *C. pepo* L. son las más importantes del género *Cucurbita* las cuales son conocidas vulgarmente como calabazas y zapallos. Dentro del género *Cucumis*, *C. sativus* L. y *C. melo* L. denominados pepino y melón respectivamente, son las principales, mientras que en el caso del género *Citrullus*, la especie *C. lanatus* conocida como sandía es la más distinguida (Zitter *et al.*, 1996).

Producción y comercialización de cucurbitáceas

Se estima que la producción de hortalizas en Argentina es de 7 a 8 millones de t, ocupando una superficie aproximada de 600.000 has. El destino principal de estos productos es el mercado interno (93%). El 7% restante se exporta y está concentrado en pocas especies, tales como ajo, papa, cebolla, zanahoria, batata, espárrago, zapallo, entre otras (Ministerio de Economía, 2009). Debido a la corta vida de los productos hortícolas, hace que su comercialización sea compleja y por esta razón se diferencia de otras actividades agrícolas. Puede estimarse que, en promedio, el 85% del volumen de

hortalizas producidas es consumido en fresco, y sólo el 8 % restante se industrializa (Ministerio de Educación, 2010). Argentina produce 266.878 t de zapallo, 126.379 t de sandía y 82.495 t de melón (FAOSTAT, 2017).

Particularmente, el zapallo es una hortaliza tradicional en nuestro país, de gran importancia económica, social y alimenticia. Se estima que toda la cadena moviliza 434.000.000 \$USD (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, 2019). Durante la segunda quincena de noviembre, diciembre y enero ingresan al Mercado Central de Buenos Aires (MCBA) frutos producidos a contra estación en el norte del país, Salta, Jujuy, Chaco y Formosa. Cuando estas zonas no logran abastecer el mercado, se importa zapallo desde Brasil. Como se mencionó con anterioridad, el principal destino de la producción es el mercado interno. Debido a los altos precios de venta, la exportación en los meses de enero y marzo a países europeos hace redituable este mercado, aunque las exigencias de calidad e inocuidad del producto sean altas. Las provincias de Mendoza y Buenos Aires son las que más aportan zapallo al MCBA. En el tercer lugar se encuentra la provincia de Santiago del Estero con un volumen mucho menor (9%). La mayor oferta desde las provincias de Salta y Formosa ingresa hacia fines de invierno (agosto-septiembre), con zapallo anquito cosechado inmaduro. Una pequeña parte de la producción nacional (1,5%) es destinada a la industria del deshidratado. En relación a la producción de semilla, se logra producir en el país aproximadamente el 75% y el resto se completa con semilla importada que generalmente son cultivares híbridos tipos Tetsukabuto y Zucchini (Della Gaspera *et al.*, 2013).

En el caso del cultivo de sandía las variedades comerciales más cultivadas son: Favorita de Florida, Charleston Gray, Crimson Sweet, Jubilee, Sugar Baby. Las principales provincias productoras son Formosa, Chaco, Corrientes, Entre Ríos y Misiones. Durante el año 2014, se exportaron 260 kg de semillas de sandía con destino a Paraguay. En el mismo período se importaron 99 t procedentes de EEUU (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, 2019).

El cultivo de melón se encuentra difundido en las provincias de San Juan, Santiago del Estero, Entre Ríos, Mendoza, Buenos Aires, Río Negro y en menor medida en Salta. La provincia que concentra la mayor superficie cultivada es San Juan, le

siguen en importancia Santiago del Estero y Mendoza. La producción en Entre Ríos se circunscribe al cultivo bajo invernadero. A este fruto se lo puede utilizar para elaborar jugos, dulces, conservas, congelados y su consumo es principalmente en fresco. En la actualidad se cultivan principalmente dos tipos comerciales de melón: Tipo Honey Dew o Rocío de Miel, el cual es el más usado comercialmente en la Argentina y el Tipo Amarillo. Aunque los melones se pueden producir en cualquier época del año, las estaciones de producción están determinadas en gran parte por la demanda en el mercado interno. Los precios del mercado usualmente son más altos a finales de primavera y otoño cuando la disponibilidad de melones procedentes de otras regiones es limitada. San Juan y Mendoza representan casi el 40 % del volumen que ingresa por temporada al MCBA desde todo el país y donde también participa en ese volumen Brasil (Gacetilla Informativa del Sector Agroalimentario, 2006).

Principales patógenos que afectan al cultivo de cucurbitáceas

Las enfermedades de las cucurbitáceas pueden ser causadas por bacterias, fitoplasmas, hongos, virus, viroides, nemátodos e insectos. Muchos de estos patógenos son transmitidos por vectores, los cuales pueden desempeñar un papel fundamental en el desarrollo y la propagación de enfermedades. Esto resulta especialmente importante en las enfermedades producidas por virus y bacterias.

Dentro de las enfermedades causadas por bacterias, la mancha angular de la hoja, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* es la enfermedad más extendida de las cucurbitáceas. Se ha reportado en todo el mundo y principalmente afecta a pepinos cultivados en regiones cálidas, húmedas y semi-húmedas. La enfermedad aparece primero en las hojas, infectando luego las frutas y contaminando las semillas (Zitter *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2016).

La mancha bacteriana de la hoja de las cucurbitáceas fue identificada como *Xanthomonas campestris* Dowson pv. *cucurbitae*. Los brotes de esta enfermedad han sido esporádicos, siendo considerada una enfermedad poco común, pero puede ocurrir durante condiciones persistentes de calor y humedad, afectando diferentes cultivos de cucurbitáceas (Zitter *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2016).

Las enfermedades causadas por fitoplasmas en las hortalizas, afectan principalmente a especies vegetales que pertenecen a las familias apiáceas, fabáceas, asteráceas, solanáceas y cucurbitáceas (Kumari *et al.*, 2019). Aster yellows (AY) es producido por un fitoplasma que puede infectar una amplia gama de especies de plantas silvestres y cultivadas, causando un intenso amarilleo, una proliferación excesiva de ramas y filodios. El AY se encuentra en los Estados Unidos y en muchos otros países del mundo, donde puede causar pérdidas significativas en cultivos económicamente importantes como cucurbitáceas (Zitter *et al.*, 1996).

Las enfermedades causadas por hongos en melones, pepinos y sandías con producidas *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Fusarium spp.*, y *Rhizoctonia solani*, las cuales pueden afectar a la raíz. Entre las enfermedades fúngicas que pueden provocar daños foliares, el tizón de la hoja causado por *Alternaria sp* es una enfermedad que puede afectar a la mayoría de los cultivos de cucurbitáceas. El mildiú es una de las enfermedades más importantes que puede afectar a esta familia. Este patógeno se ha reportado en todo el mundo en áreas de producción donde la humedad y la temperatura favorecen su establecimiento, y todas las cucurbitáceas son susceptibles (Zitter *et al.*, 1996).

En relación a las enfermedades causadas por virus, se ha reportado que son difíciles de controlar y pueden ser muy destructivas (Zitter *et al.*, 1996). Se sabe que más de 70 especies de virus, transmitidos por varios insectos vectores, infectan cultivos de cucurbitáceas en todo el mundo (Lecoq y Katis, 2014), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini tigré mosaic virus* (ZTMV), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Squash leaf curl virus* (SLCV), *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV), *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCuV), *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV), *Melon yellowing-associated virus* (MYaV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), *Melon severe mosaic virus* (MeSMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Melon necrotic spot virus* (MNSV), *Squash necrosis virus* (SqNV), *Chayote mosaic virus* (ChMV), fueron reportados en América Latina. Ellos son transmitidos por diferentes

vectores, tales como áfidos, moscas blancas, nemátodos, trips, hongos y escarabajos (Romay *et al.*, 2014).

La incidencia y gravedad producida por enfermedades virales pueden variar, dependiendo de las complejas relaciones entre los patógenos, hospedantes, vectores y el entorno en las que ocurren (Zitter *et al.*, 1996). Los síntomas producidos por los virus son muy variables, tales como mosaico, deformación, clorosis, curvatura y coloración amarillenta de las hojas, aclarado de nervaduras y deformación de los frutos (Romay *et al.*, 2014). Entre ellos, WMV, ZYMV y PRSV pertenecientes al género *Potyvirus* y CMV del género *Cucumovirus*, son cuatro de los virus más comunes y prevalentes en el mundo (Lecoq *et al.*, 1998, 2003; Vučurović *et al.*, 2012), los cuales también fueron reportados infectando cultivos de cucurbitáceas en Argentina (Perotto *et al.*, 2016). Estos virus son transmitidos eficientemente por diferentes especies de áfidos de manera no persistente.

HIPÓTESIS

Los cultivos de cucurbitáceas en Argentina están infectados por numerosos virus con una alta incidencia, la cual se encuentra relacionada con las variables meteorológicas. Estos virus presentan variabilidad molecular que evidencia un proceso evolutivo.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar virus que afectan a cucurbitáceas, conocer su epidemiología y procesos evolutivos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar virosis emergentes en cucurbitáceas presentes en Argentina.
2. Conocer la importancia y distribución de los virus que afectan a las cucurbitáceas, su relación con variables bio-meteorológicas y curvas de progreso de enfermedad.
3. Detectar la variabilidad genética de potyvirus y su relación con eventos evolutivos.

IDENTIFICACIÓN DE VIROSIS EMERGENTES EN CUCURBITÁCEAS PRESENTES EN ARGENTINA

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades, incluidas las enfermedades virales, son uno de los factores limitantes de la producción de cucurbitáceas en todo el mundo (Romay *et al.*, 2014). Existe un importante número de virus que han sido reportados infectando cucurbitáceas en las diferentes regiones productoras en el mundo. En las últimas dos décadas se ha detectado un llamativo aumento de estos patógenos afectando a las distintas especies de cucurbitas (Ibaba *et al.*, 2016).

Los *Potyvirus* son uno de los géneros más grandes de virus que afectan a las plantas. Infectan a una amplia gama de especies de plantas mono y dicotiledóneas y han sido encontrados en todas partes del mundo (Gibbs y Ohshima, 2010). Además, es una de las familias más grandes de virus de plantas y más importante desde el punto de vista económico (Ksenofontov *et al.*, 2013; Scholthof *et al.*, 2011). Por otro lado, los *Tospovirus* en un género que causa algunas de las enfermedades más destructivas en importantes plantas de cultivo y las pérdidas anuales en todo el mundo podrían llegar a los 1.000 millones de dólares (Pappu *et al.*, 2009) posiblemente, debido a su creciente diversidad, que se ha atribuido a los cambios en la producción de cultivos, a la diferente especificidad de los vectores y a la naturaleza segmentada del genoma viral que podría dar lugar a reordenamientos genéticos (Bag *et al.*, 2012). En Argentina, las enfermedades virales, especialmente las diseminadas por áfidos, se consideran los principales factores limitantes en términos de rendimiento y calidad de la fruta de cucurbitáceas (Perotto *et al.*, 2016).

Los síntomas virales típicos en estas especies generalmente se encuentran dentro de tres categorías principales (Blancard *et al.*, 1994). 1) Mosaicos en hojas que están acompañados por deformaciones como reducción del tamaño o de las hojas, rugosidad, enaciones. El fruto puede desarrollar una gama de decoloraciones y deformaciones que

no hacen posible su comercialización. 2) Amarillamiento, que afecta generalmente a las hojas más viejas, pero eventualmente todas las hojas pueden estar amarillentas y acompañadas por engrosamiento. En este caso, la producción de fruta puede reducirse significativamente, pero su calidad generalmente no se ve afectada. 3) Necrosis, ya sea como manchas necróticas de diferentes tamaños en las hojas o como una necrosis generalizada que eventualmente causa la muerte de la planta. Las frutas generalmente no alcanzan la madurez y también pueden desarrollar síntomas necróticos. Algunas veces, las reacciones necróticas ocurren solo en ciertas combinaciones de virus/huésped, especialmente con potyvirus (Lecoq *et al.*, 1998).

Frecuentemente, en los muestreos realizados en campos de producción, las plantas están infectadas con más de un virus, por lo cual lleva a una combinación de estos tres tipos principales de síntomas tanto en hojas como en frutos.

Además, la presencia de síntomas distintos a los típicos y de vectores diferentes a los áfidos, tales como trips y moscas blancas, que observamos en los muestreos realizados durante el desarrollo de esta tesis, hizo sospechar que podríamos encontrar virus pertenecientes a otros géneros transmitidos por estos grupos de vectores. Aunque, hasta el momento, no hemos detectado virus transmitidos por mosca blanca, este posible vector estuvo presente en la mayoría de los cultivos evaluados.

2.1.-IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO POTYVIRUS INFECTANDO CUCURBITÁCEAS

Entre los virus que infectan las cucurbitáceas, los potyvirus son algunos de los más importantes debido al daño que causan y al número de especies que se han reportado, el que aumenta constantemente. Se ha informado que trece potyvirus infectan de forma natural las cucurbitáceas: algerian watermelon mosaic virus (AWMV), clover yellow vein virus (CIYVV), melon vein-banding mosaic virus (MVBMV), moroccan watermelon mosaic virus (MWMV), PRSV, turnip mosaic virus (TuMV), watermelon leaf mottle virus (WLMV), telfairia mosaic virus (TeMV), WMV, zucchini yellow feck virus (ZYFV), ZYMV y más recientemente, zucchini tigré mosaic virus (ZTMV) y zucchini shoestring virus (ZSTV) (Lecoq y Desbiez, 2012; Ibaba *et al.*, 2016; Mofunanya *et al.*, 2014; Perotto *et al.*, 2016).

Los miembros del género *Potyvirus* se transmiten de manera no persistente por diferentes especies de áfidos. La adquisición y la transmisión pueden ocurrir durante la picadura de prueba en cortos períodos de tiempo (menos de un minuto) y tienen la capacidad de ser infectivos durante unas pocas horas (Lecoq y Desbiez, 2012). Los viriones son filamentos flexuosos, de 680–900 nanómetros de largo, contienen una molécula única de ARN de cadena simple de sentido positivo y contienen una sola capa de proteína, que constituye la cápside proteica (CP). El fragmento genómico que codifica para la CP es utilizado para definir la especie (Wylie *et al.*, 2017). Tienen una cola poliadenilada (polyA) en su extremidad 3' y una proteína viral (VPg) unida en la extremidad 5' del genoma, esta última, se supone que actúa como el límite de los ARN mensajeros. Las dos proteínas en la parte N-terminal de la poliproteína se escinden por la actividad de la proteasa que actúa en cis, mientras que las otras proteínas son liberadas por la proteasa de acción en cis y trans NIa-Pro. La proteína P1 es la fracción más variable en tamaño y secuencia entre los potyvirus. El componente auxiliar proteinasa (HC-Pro) es una proteinasa multifuncional requerida para el movimiento a larga distancia en plantas y el mantenimiento de la replicación del genoma a nivel de una sola célula. La HC-Pro también funciona con capacidad defensiva como supresor del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS; Kasschau y Carrington, 2001). Las funciones de la proteína P3 son poco conocidas, pero se cree que está involucrada en la replicación y desempeña un papel en la sintomatología. La proteína CI es necesaria para la replicación del virus y es responsable de formar inclusiones citoplásmicas en forma de molinete en células de plantas infectadas que constituyen un sello distintivo de la familia *Potyviridae*. La proteína NIB es la ARN-polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp). Por último, la secuencia de codificación PIPO, se considera una región conservada y posee una fuerte codificación bioinformática en toda esta familia (Chung *et al.*, 2008), Fig.1.

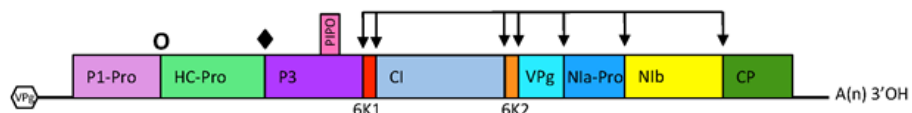


Fig. 1. Mapa genómico típico del género de *Potyvirus*.

Nota: El genoma del ARN está representado por una línea y la poliproteína ORF por una caja abierta con los productos proteolíticos maduros denominados. VPg (proteína viral ligada al genoma), P1-Pro (proteína 1 proteasa); HC-Pro (componente ayudante proteasa), una proteína con actividad en la transmisión por áfidos y actividad proteolítica de cisteína responsable del clivaje en Gly-Gly (◆); P3 ; PIPO; 6K (péptido de seis kilodalton); CI (inclusión citoplasmática); NIa-Pro (inclusión nuclear A proteasa), actividad proteolítica similar a la cisteína responsable de la división en Gln/Glu-(Ser/Gly/Ala) (↓); Nib (inclusión nuclear B); CP (proteína de cubierta). Se

indican los sitios de clivaje de P1-Pro, (O), HC-Pro (◆) y NIa-Pro (↓). Fuente: ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/potyviridae. Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV)

Con el objetivo de identificar virosis emergentes en los cultivos de cucurbitáceas se procedieron a realizar muestreos en áreas productoras con este fin.

Materiales y métodos

En muestreos realizados en el año 2012 se recolectaron 9 muestras de *C. maxima*, en la Localidad de San Pedro, provincia de Buenos Aires (1BA a 9BA) y posteriormente se recogieron 2 muestras de la misma especie, en la provincia de Córdoba, en el año 2017, una proveniente de Córdoba Capital (L1) y otra de San José de la Dormida (MPR). Las 11 muestras presentaban síntomas sistémicos, severos y típicos de virus, siendo negativas para los virus conocidos aquellas provenientes de Córdoba. Las hojas mostraban bandeado, engrosamiento de nervaduras y ampollado. Particularmente, las muestras provenientes de Córdoba presentaban un bandeado muy marcado y no observado en otros materiales recolectados, mientras que las muestras recolectadas en la provincia de Buenos Aires mostraban este mismo bandeado junto con otros síntomas típicos mencionados anteriormente. Por estas razones, se decidió investigar si existía algún virus diferentes a los virus identificados durante los muestreos habituales.

Para la extracción de ARN total se utilizó un mini kit RNeasy Plant (QIAGEN, Hilden, Alemania) a partir de 100 mg de tejido. El extracto de una muestra procedente de San Pedro (3BA) fue enviado a INDEAR (Plataforma de Genómica y Bioinformática, INDEAR Inc., Rosario, Argentina) para secuenciar por Secuenciación de Nueva Generación (NGS) a través del método Illumina HiSeq 1500 con un promedio de longitud de lectura de 100 pb (Minoche *et al.*, 2011).

Las lecturas obtenidas fueron ensambladas de *novo* usando el programa Mira 4 (Chevreux *et al.*, 2004). Se utilizó la herramienta BLAST del NCBI para la identificación de los contigs obtenidos. Además, los ensamblados se hicieron manualmente utilizando Geneious 9.1 (Kearse *et al.*, 2012). Las secuencias completas de 103 potyvirus, obtenidas de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), se utilizaron para la comparación con los dos nuevos aislados virales mediante BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool).

Se estimó la posición taxonómica molecular con Pairwise Sequence Comparison (PASC) de los aislados con 1273 secuencias que representan la familia *Potyviridae*, utilizando alineaciones basadas en BLAST (Bao *et al.*, 2014).

Se probaron los posibles eventos de recombinación dentro de la secuencia del genoma utilizando genomas completos de 26 potyvirus y el software RDP4. Se utilizaron siete programas con los parámetros predeterminados y un valor-p<0,01 corregido por Bonferroni, específicamente RDP, GENECONV, MaxChi, Quimera, 3Seq, BootScan y SiScan (Martin *et al.*, 2015). Un patrón de recombinación se considera un evento positivo si es detectado por cuatro o más de estos programas con alta probabilidad (Kehoe *et al.*, 2014; Wylie y Jones, 2009).

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Para construir un árbol filogenético se usaron las secuencias completas de los aislamientos obtenidas en esta tesis y 103 secuencias completas del genoma de otros potyvirus publicadas en el GenBank. Agropyron mosaic virus y hordeum mosaic virus se utilizaron como grupos externos, ya que están clasificados en el género *Rymovirus*, considerado el pariente más cercano de los potyvirus (French y Stenger, 2005). Luego se construyó un árbol de máxima verosimilitud basado en el modelo basado en matriz JTT (+ G + I) y 500 réplicas de bootstrap (Jones *et al.*, 1992). El modelo JTT + G + I se seleccionó utilizando el criterio de información de Akaike (AIC), GTR + G + I también se seleccionó para los datos de nucleótidos y ambos modelos de sustitución se infirieron con MEGA. Los marcos abiertos de lectura (ORF) dentro del genoma del nuevo virus detectado se predijeron utilizando ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los datos proporcionados por Adams *et al.* (2005b) se usaron para la identificación de los sitios de escisión, a si mismo se identificaron los sitios conservados típicos de la polyproteína de potyvirus. El ORF Pretty Interesting potyviridae ORF (PIPO) fue identificado según lo reportado por Chung *et al.* (2008) para potyvirus.

Para verificar y confirmar la identidad de los aislamientos se diseñaron cebadores específicos en base a las secuencias de los dos aislamientos. Se realizó RT-PCR utilizando dos pares de cebadores específicos. Los mismos fueron, CPF (5'-CAACAGGGCACACATTCTCGCTCGCTC-3') y CPR (5'-GCAAGGTCGTTTTGGGCATTC-3') para la amplificación de un fragmento de 357 pb

de la región CP. P1F (5'- CAAACATTCAGCGCAAAC-3') y P1R (5'- CCATTTTTGTCTCACGCTGGTTT-3') para amplificar un fragmento de 400pb de la región P1. Se realizó un protocolo RT-PCR de un solo paso en un volumen total de 25 µl, como se describe en Mohammed *et al.* (2014). Los productos de RT-PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE y se visualizaron bajo luz ultra violeta después de tinción con bromuro de etidio. Los mismos fueron purificados utilizando Genomic DNA Clean & Concentrator Zymo y secuenciados mediante secuenciación Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología-INTA (Argentina). Pruebas serológicas se realizaron mediante DAS-ELISA (Anexo 6) usando antisueros específicos para la detección de WMV, ZYMV y PRSV (BIOREBA SRL Latin América, Mar del Plata, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

Dos aislamientos se ensamblaron con una cobertura de 8823 y 2430 lecturas/nt presentes en la misma muestra 3BA. De este modo, se generaron dos grandes contigs virales de 9968 y 9813 nt, Seq3.1 y Seq4.1, siendo la región de la CP la que presentaba más de un 80% de similitud entre ambos aislamientos. Las secuencias se depositaron en GenBank con los números de acceso KY657266 y KY657267, respectivamente.

Los mayores porcentajes de identidades obtenidos para estos dos contigs, utilizando BLASTn y los datos de GenBank, fueron del 77% con sweet potato virus c SPVC-Arg (KF386015.1) (5% de cobertura) para el aislamiento 3.1 y 73% con un segmento de 884 nt de tomato necrotic stunt virus - TNSV (JX846918.1) (9% de cobertura) para el aislamiento 4.1. Por otro lado, el análisis BLASTx (herramienta básica de búsqueda de alineación local-traducción de nucleótidos a proteínas) de las poliproteínas codificadas completas mostró que el virus más relacionado es el plum pox virus (AB576074), con identidades de secuencia de aminoácidos del 48% para ambos aislamientos. Los genomas completos de los CVBV presentaron las máximas identidades con el soybean mosaic virus (50,85%) y el turnip mosaic virus (50,32%), para el aislamiento de Seq3.1 y Seq4.1 respectivamente, estos son otros miembros clasificados dentro del género *Potyvirus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/pasc/>). Cuando se alinearon entre sí, las dos secuencias compartieron 87,82% de identidad nt y 93,07% de identidad aa. Además, Seq3.1 fue el genoma más cercano a Seq4.1 y mostró

una identidad de 86,23% utilizando el método de alineación basado en BLAST realizado por PASC (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/pasc/>). No se detectaron evidencias de recombinaciones dentro de las secuencias de los genomas de CVBV estudiadas.

En este trabajo se encontró un solo ORF en las secuencias de nucleótidos de ambos aislamientos, lo que confirma una organización genómica de potyvirus. Se identificaron nueve sitios de escisión probables en cada secuencia del CVBV mediante referencia a un estudio de sitios de escisión de proteasas (Fig. 2). Los ORFs encontrados (9507nt) codifican sendas poliproteínas de 3168 aa cada una, con pesos moleculares estimados de 359,5 kDa (http://web.expase.org/compute_pi/) (169-9675 Seq4.1 y 164-9670 Seq3.1). Estas poliproteínas probablemente se dividen en un conjunto de diez proteínas funcionales cada una: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, Nib y CP (Fig. 2).

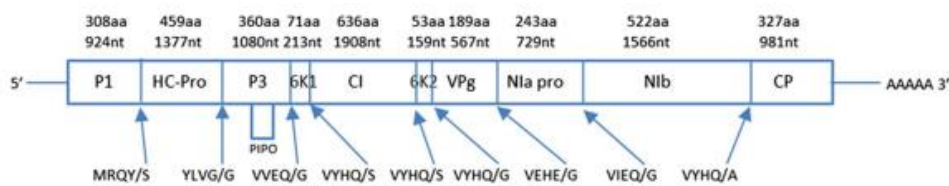


Fig. 2. Representación de la organización del genoma de cucurbit vein banding virus (CVBV).

Nota: Se muestran las posiciones predichas del sitio de clivaje, basadas en la secuencia de aminoácidos del aislamiento de Seq3.1 (KY657266). Las regiones analizadas son: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, Nib y CP.

Además, se identificaron los ORF de la proteínas PIPO (60aa) de ambos aislamientos, secuencia debajo de los motivos altamente conservados GA6, en la posición nt 2967-3147 en la Seq. 3.1 y la posición nt 2963-3143 de la Seq4.1. Se identificaron los motivos de aminoácidos conservados, incluyendo Hx8Dx32SG21RG. El motivo FVLRG se detectó en sentido descendente en Seq3.1 y FILRG en Seq 4.1, presentes en P1, en lugar del FIVRG más común, que tiene actividad de proteinasa y características estructurales.

Los motivos conservados FRNKX12CDN y KITC, estaban presentes en las regiones N terminales de la proteína HC-Pro y se encontraron en ambos aislamientos. Los motivos GAVGSGKST y EPTRPL fueron localizados en la región de la proteína

CI. Los motivos conservados QPSTVVDN y GDD se observaron en la proteína de inclusión nuclear b (NIB). Los motivos DAG, estuvieron presentes en los extremos N de las CPs. Finalmente, otros motivos fueron encontrados en la CP: MVW-CIENGTSP, AFDF y QMKAAAL. Todos ellos se localizaron en ambos aislamientos del CVBV.

Cuando los aislamientos del CVBV fueron analizados filogenéticamente, se detectó que este virus no se incorpora a ninguno de los dos grandes grupos PVYsupergroup y BCMVsupergroup. El análisis realizado en este trabajo mostró que este virus forma un nuevo grupo dentro del género junto con catharanthus mosaic virus (CatMV) y que se separan del resto con un alto nivel de confianza (100%) (Fig.3). La divergencia inicial dio lugar al grupo del onion yellow dwarf virus, seguido del donkey orchid virus A, hippeastrum mosaic virus y el nuevo grupo CatMV, seguido del grupo del sugarcane mosaic virus, y los dos súper grupos, potato virus Y y bean common mosaic virus (BCMV) (Fig.3).

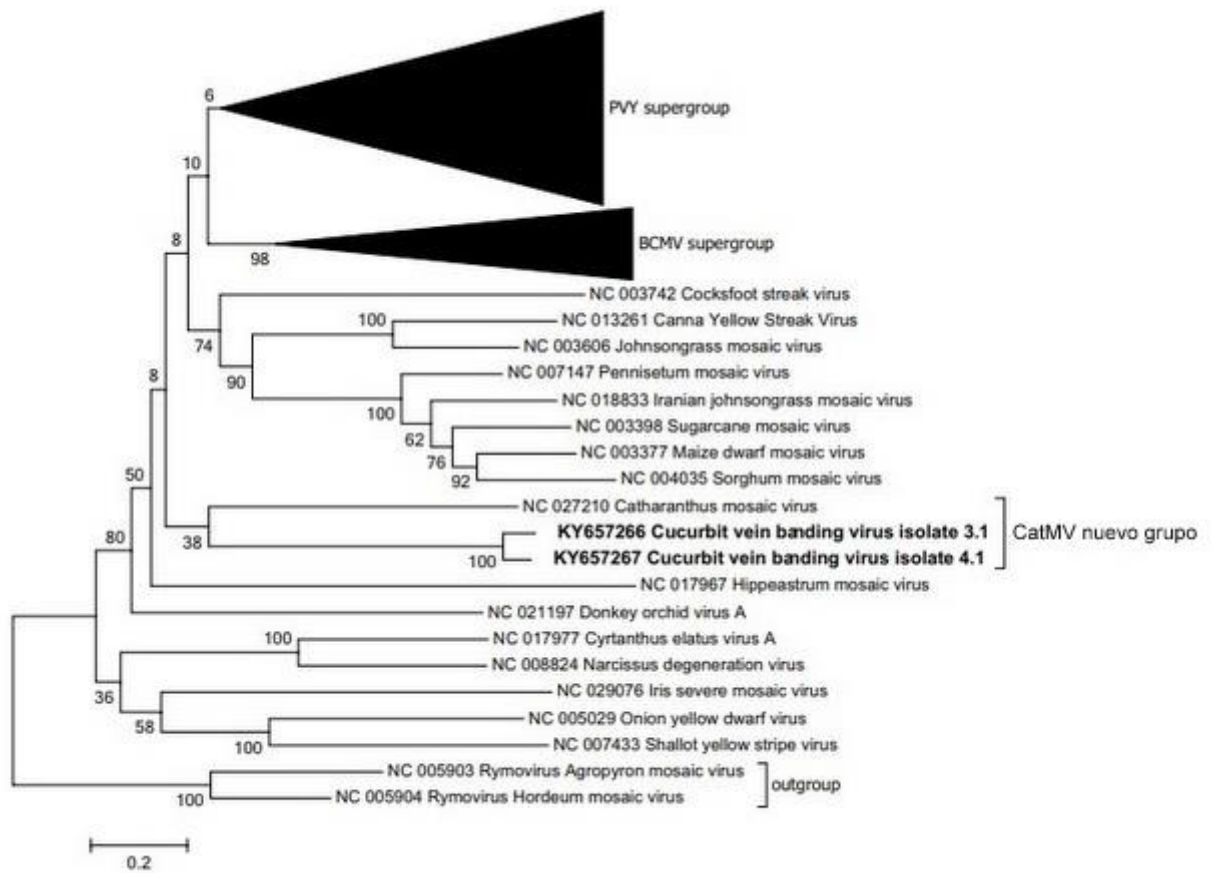


Fig. 3. Árbol de máxima verosimilitud condensado inferido a partir de secuencias completas de aminoácidos del género *Potyvirus* utilizando el modelo JTT (+G+I). Nota: el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. El árbol se dibuja a escala, con las longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 103 secuencias de aminoácidos del género *Potyvirus*. Secuencias de las especies *Agropyron mosaic virus* y *Hordeum mosaic virus* (género *Rymovirus*, familia *Potyviridae*) se usaron como fuera de grupos. Los supergrupos PVY y BCMV están indicados con triángulos.

Las secuencias obtenidas a partir de la RT-PCR para la muestra 3BA fueron idénticas a las secuencias de ambos aislamientos (obtenidos por NGS). El RT-PCR realizado, ratificó la presencia de CVBV por otro método de validación, a partir del cual se utilizó como herramienta para el diagnóstico de este virus en sucesivos análisis. La presencia de CVBV fue confirmada en las restantes 8 muestras de Buenos Aires correspondientes al muestreo 2012 y en 2 muestras de Córdoba del muestreo efectuado en el 2017 (Fig. 4).

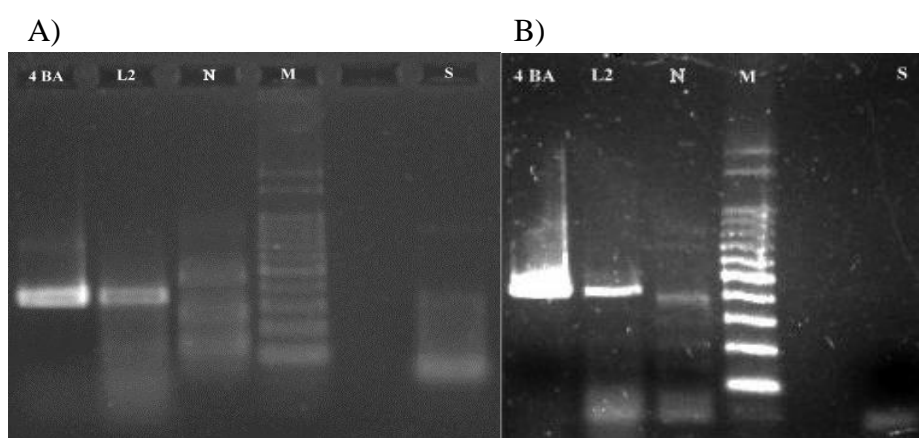


Fig. 4. Corrida de electroforesis de producto de RT-PCR en gel de agarosa 2% de dos muestras infectadas con cucurbit vein banding virus (CVBV).

Nota: RT-PCR con cebadores específicos: (A) Muestras probadas con cebadores CP de 357 pb. (B) Muestras probadas con cebadores P1 de 400 pb. 4BA y L2 muestras infectadas con CVBV, (N) Muestra negativa a CVBV, (S) planta de cucurbita utilizada como control sano; (M) marcador de peso molecular de 100 pb (Embiotec).

Con las pruebas serológicas (WMV, PRSV y ZYMY) y RT-PCR (CVBV) se pudo detectar coinfección del CVBV con otros potyvirus. Las muestras provenientes de Córdoba fueron las únicas infectada con el virus CVBV en forma aislada, las cuales se tomaron como referencia para darle el nombre a este nuevo patógeno (Fig.5). Las nueve muestras provenientes de San Pedro presentaban a este virus en coinfección con alguno de los demás potyvirus analizados (Tabla 1), por lo que los síntomas que mostraban posiblemente eran causados por el sinergismo de los virus que las infectaban.

Tabla 1. Muestras de hojas de cucurbitáceas evaluadas por análisis serológicos y moleculares para diferentes potyvirus.

| ID | WMV | PRSV | ZYMY | CVBV |
|------|-----|------|------|------|
| 4 BA | + | - | + | + |
| 5 BA | + | - | - | + |

| | | | | |
|------|---|---|---|---|
| 7 BA | + | + | + | + |
| L2 | - | - | - | + |
| MPR | - | - | - | + |

ID, Identificación de la muestra; WMV, watermelon mosaic virus; PRSV, papaya ringspot virus; ZYMV, zucchini yellow mosaic virus; CVBV, cucurbit vein banding virus.



Fig. 5. Planta de zapallo que presenta síntomas de clorosis nerval, engrosamiento de las nervaduras y ampollado de la lámina foliar provenientes de la provincia de Córdoba infectadas con cucurbit vein banding virus (CVBV).

Discusión

Los criterios de demarcación de especies para potyvirus sugeridos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) son <76% de identidad de nucleótidos y <82% de identidad de aminoácidos (Adams *et al.*, 2005b). Teniendo en cuenta nuestros análisis, donde las mayores identidades obtenidas de nucleótidos son del 77% (para el aislamiento 3.1) y 73% (para el aislamiento 4.1) y 48% de aminoácidos para ambos aislamientos con miembros del género *Potyvirus*. Por otro lado, las identidades entre Seq3.1 y Seq4.1 son del 87,82% y 93,07% para nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, por lo que se sugiere que estas dos secuencias pertenecen a la misma especie, concluyendo que Seq3.1 y Seq4.1 son miembros de una especie distinta y nueva del género *Potyvirus* (Bao *et al.*, 2014).

Si bien, se conocía que los potyvirus contenían un ORF principal que codifica una poliproteína la cual es clivada en diez proteínas funcionales por acción de tres proteasas virales, con un orden genético que es conservado en toda la familia (Adams *et al.*, 2005b). Los análisis realizados mostraron que las secuencias de Seq3.1 y Seq4.1

presentan los genes que codifican las 10 proteínas funcionales y además se identificó la Proteína PIPO reportada por Chung *et al.* (2008), lo que demostraría que estas secuencias corresponden a la de los potyvirus.

En las secuencias de ambos aislamientos se observaron los motivos conservados FRNKX12CDN que en otros potyvirus fueron asociado al desarrollo de síntomas (Gal-On, 2000; Shibolet *et al.*, 2007) y a la transmisión por áfidos (KITC) (Mangrauthia *et al.*, 2008). Además, como también se observó que el dominio PTK altamente conservado presente en la región HC-Pro, involucrado en la transmisión por áfidos, cambió a PTR. Esto también fue observado en MWMV y AWMV, dos potyvirus que infectan cultivos de cucurbitáceas (Yakoubi *et al.*, 2008a; Yakoubi *et al.*, 2008b).

Los motivos conservados GAVGSGKST y EPTRPL, fueron localizados en la región de la proteína CI e implicados en la unión de NTP y la actividad helicasa, respectivamente; QPSTVVDN y GDD, necesarios para la actividad de la ARN polimerasa y DAG, involucrado en la transmisión de áfidos, mencionados para otros potyvirus (Atreya *et al.*, 1991) también fueron identificados en las secuencias aquí estudiadas.

Aunque el vector viral de CVBV aún no se ha identificado, la presencia de los motivos conservados relacionados con la transmisión por áfido, KITC (Mangrauthia *et al.*, 2008), PTR (HC-Pro) (Yakoubi *et al.*, 2008a; Yakoubi *et al.*, 2008b) y DAG (CP) (Atreya *et al.*, 1991) mencionados anteriormente, sugieren que el virus es transmitido por estos vectores. Como ocurre con todos los miembros del género *Potyvirus*, género al que se asignó el CVBV.

Observando el árbol filogenético se detecta que el CVBV, está más estrechamente relacionado con la especie *Catharanthus mosaic virus* (CatMV), que hasta ahora estaba formando un grupo solo (Koh *et al.*, 2015). Se ha sugerido que hubo una introducción inicial de potyvirus hace 7000 años como resultado de la adaptación a la agricultura. Posteriormente, todos los potyvirus parecieron evolucionar a la misma velocidad, mostrando la misma distancia desde este punto de inicial (Gibbs y Ohshima, 2010). Teniendo en cuenta este nuevo grupo encontrado y analizando todas las secuencias completas de potyvirus disponibles en GenBank (103), se propone una mejora en la sucesión de linaje propuesta por Gibbs y Ohshima (2010), considerando

que CVBV se encontró formando un nuevo grupo con otro miembro del género *Potyvirus*.

Conclusión

Se confirmó la presencia de un nuevo virus (provenientes de dos aislamientos) para cucurbitáceas cuyo nombre propuesto es cucurbit vein bandig virus (CVBV) de acuerdo a los síntomas que presentaban las plantas de zapallo infectadas sólo con aislamientos de este nuevo patógeno.

Fue detectado en las provincias argentinas de Córdoba y Buenos Aires. El CVBV fue encontrado en infecciones simples y mixtas con otros potyvirus, WMV, ZYMV y PRSV.

Se implementó un sistema de diagnóstico para el virus mediante RT-PCR con cebadores específicos diseñados en base a este trabajo de tesis.

2.2.- DETECCIÓN DE TOSPOVIRUS INFECTANDO CUCURBITÁCEAS EN ARGENTINA

La introducción de frutos de cucurbitas provenientes del Norte de Argentina en el MCBA, alertó en el año 2015/2016 la presencia de frutos con síntomas característicos de virosis, lo cual provocaba severas pérdidas de la mercadería para la comercialización y su consecuente pérdida económica. Muestreos de plantas en lotes de producción en las provincias de Salta, Santiago del Estero y Jujuy fueron realizados para evaluar la presencia de virosis que serían las capaces de haber causado estos graves daños.

Las muestras fueron analizadas mediante DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) (Anexo 6) utilizando un reactivo para la detección del género *Tospovirus* de amplio espectro (BIOREBA SRL Latin América, Mar del Plata, Argentina), que confirmó la presencia de virus de este género en los cultivos de cucurbitáceas.

Las enfermedades provocadas por los tospovirus causan importantes daños en los cultivos en todo el mundo generando graves pérdidas económicas (Goldbach y Kuo, 1996; Mumford *et al.*, 1996; Pappu *et al.*, 2009). Estos virus infectan principalmente cultivos ornamentales y hortícolas, siendo el único género de la familia

Peribunyaviridae (Maes *et al.*, 2019) cuyos miembros infectan plantas, mientras que los virus de otros géneros infectan invertebrados (Holkar *et al.*, 2019). Se transmiten exclusivamente por trips (Thysanoptera: Thripidae) de manera persistente y propagativa (Jones, 2005), por lo que el virus se replica en el insecto, circula a través del cuerpo, y persiste a través de las diferentes etapas de desarrollo. La adquisición del virus depende de la etapa de desarrollo del vector, sólo los trips que adquieren el virus en el primer estadio larvario son capaces de transmitirlo y a medida que se desarrollan, la eficiencia de la adquisición disminuye (Rotenberg *et al.*, 2015). De las 1.710 especies conocidas de Thripidae, sólo 14 especies transmiten actualmente los tospovirus (Riley *et al.*, 2011).

El genoma de tospovirus tiene una organización conservada compuesto por tres segmentos genómicos clasificados como pequeño (S), medio (M) y grande (L). El segmento S codifica la proteína nucleocápside (N) y la proteína no estructural (NS) (Turina *et al.*, 2012) (Fig. 6). Tanto la proteína N como la NSs, juegan un importante rol en la infección viral, la patogénesis y el ensamblaje de la partícula viral (Olaya *et al.*, 2019).

Las especies se definen en función de su especificidad de vector, su rango de hospedante vegetal, las relaciones serológicas de la proteína N y la secuencia de esta proteína debe mostrar menos del 90% de identidad con la de cualquier otra especie descrita de tospovirus según el ICTV (Plyusnin *et al.*, 2012). Se han reportado varias especies de tospovirus que infectan las cucurbitáceas, tales como *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) (Yeh *et al.*, 1992), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) (Bezerra *et al.*, 1999), *Watermelon bud necrosis virus* (WBNV) (Jain *et al.*, 1998), *Melon yellow spot virus* (MYSV) (Kato *et al.*, 2000), *Melon severe mosaic virus* (MeSMV) (Ciuffo *et al.*, 2009) y *Groundnut ringspot virus* (GRSV) (Spadotti *et al.*, 2014).

Por otro lado, se encontró que los tospovirus están vinculados en clados al grupo de origen geográfico, en función de la similitud de secuencia y tienden a compartir distribuciones geográficas y vectores, es decir, que particularmente con este género existen relaciones vectoriales y geográficas según el virus (Oliver y Whitfield, 2016).

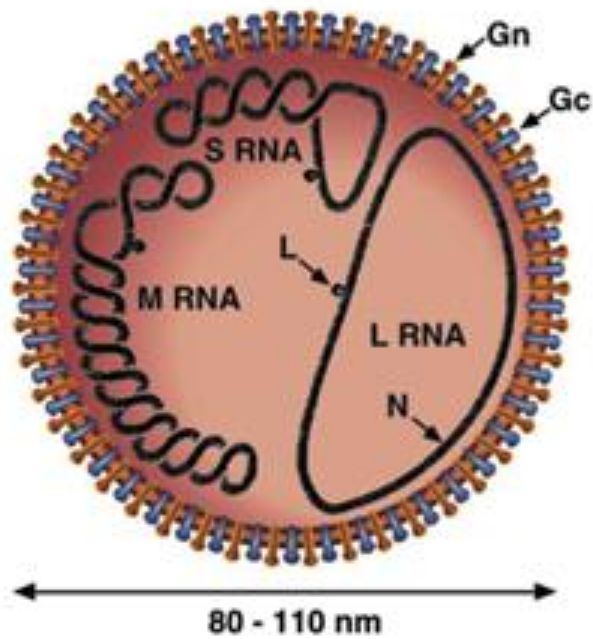


Fig. 6. Representación esquemática de un virión del género *Tospovirus*.

Nota: Los picos de superficie comprenden dos glicoproteínas denominadas Gn y Gc. Las tres nucleocápsidas helicoidales son circulares y comprenden cada uno de los segmentos únicos de ssRNA (L, grande; M, mediano; S, pequeño) encapsulados por la proteína N y asociados con la proteína L. Fuente: Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) 9th Report.

2.2.1.-DETECCIÓN DE GRSV

El GRSV se reportó por primera vez como una especie distinta de tospovirus del maní en Sudáfrica y Brasil (de Avila *et al.*, 1993). Más tarde, se informó que GRSV infectaba cultivos hortícolas en Argentina (Dewey *et al.*, 1996). Recientemente, se han detectado infecciones naturales de sandía y pepino con este virus en Brasil (Leão *et al.*, 2015; Spadotti *et al.*, 2014). Todo esto indica que este patógeno ha mostrado un aumento en su distribución geográfica y rango de hospedantes (Lecoq y Katis, 2014).

Frankliniella schultzei transmite muy eficientemente el GRSV y también puede ser transmitido por *F. occidentalis* con menos eficiencia (Nagata *et al.*, 2004; Wijkamp *et al.*, 1995). La presencia de trips se observó en el campo durante el muestreo en flores de sandía. Se sabe que ambas especies de trips se encuentran frecuentemente alimentándose de las partes florales de la planta y *F. schultzei* es una especie polifágica que se extiende por toda la región argentina de cultivo de maní (de Breuil *et al.*, 2015) por lo que podría ser responsable de la propagación de GRSV. Síntomas de mosaicos y lesiones necróticas en las hojas, malformaciones foliares y manchas necróticas en los frutos (Leão *et al.*, 2015), distintos a los ocasionados por otros virus en sandía, hicieron sospechar que este cultivo podía estar infectado con GRSV.

Materiales y métodos

Se realizaron muestreos durante la campaña 2017/2018 en la provincia de Santiago del Estero (región central) y se recolectaron muestras (hojas) de un total de 90 plantas de sandía (*Citrullus lanatus*) con síntomas. El material presentaba deformaciones, reducción de la lámina foliar, manchas amarillas y puntos necróticos (Fig. 7).

Se realizó una prueba DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) (Anexo 6) utilizando un reactivo para la detección de tospovirus de amplio espectro (BIOREBA SRL Latin América, Mar del Plata, Argentina). Este reactivo reconoce los serogrupos I, II y III en los que se divide a los miembros del género *Tospovirus*. El GRSV pertenece al serogrupo II.

Para la confirmación del análisis serológico, se utilizaron muestras de hojas individuales para la extracción de ARN total. Tres métodos de extracción fueron probados, entre ellos CTAB realizado por Chang *et al.* (2007) modificado (Anexo 1), otro método reportado por Manacorda (2013) donde el reactivo utilizado era TRIzol® (Invitrogen) (Anexo 2) y un protocolo de Gambino *et al.* (2008) modificado (Anexo 3).

Una RT-PCR se realizó en las muestras extraídas utilizando cebadores específicos para GRSV reportados por Boari *et al.* (2002). Se purificaron dos productos de PCR con el kit de Zymo (DNA clean & concentrator) y fueron enviados para secuenciar a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología - INTA (Argentina).

Las alineaciones de secuencia se realizaron utilizando Clustal W. Todos los análisis moleculares se realizaron utilizando MEGA versión 7 (Kumar *et al.*, 2016). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con 18 secuencias parciales (seleccionadas en base al mayor porcentaje de cobertura) de nucleótidos de la proteína N de GRSV publicadas en GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA), utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se efectuaron observaciones de cortes ultrafinos a partir de tejido infectado siguiendo el protocolo descrito en el Anexo 4 de esta tesis.



Fig. 7. Lesiones necróticas y mosaico en las hojas de sandía en el campo causadas por groundnut ringspot virus (GRSV).

Resultados

Un total de 7 muestras de sandía fueron positivas en la prueba de DAS-ELISA con antisuero para tospovirus y confirmadas por RT-PCR que permitieron detectar la presencia de GRSV. El método de extracción propuesto por Gambino *et al.* (2008) modificado (Anexo 3) fue el que arrojó resultados satisfactorios para la detección molecular de este virus. La presencia de viriones característicos de tospovirus fueron observados al microscopio electrónico en las plantas infectadas (resultados no mostrados).

Se obtuvieron secuencias de fragmentos del gen N de aproximadamente de 800 pb de dos aislamientos virales. Estas fueron publicadas en GenBank con números de accesos MK680832 y MK680833. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para el aislamiento MK680832 en comparación con otros aislamientos de GRSV, depositados en GenBank, revelaron que comparten el mayor porcentaje de identidad de nucleótidos con un aislamiento de Brasil (MG797643) con un 97,62% y el mayor porcentaje de identidad de aminoácidos con un aislamiento de EE.UU (YP004421857.1) con un 98,74%. El segundo aislamiento obtenido, cuyo número de acceso fue MK680833, reveló una identidad de secuencia de nucleótidos de 97,36% y de aminoácidos de 98,33%, con los mismos aislamientos mencionados para MK680832. Las restantes relaciones de identidades para nucleótidos y aminoácidos no se muestran.

El análisis filogenético de las secuencias parciales de nucleótidos de la proteína N mostró que los dos aislamientos de GRSV provenientes de muestras de sandía de Argentina fueron agrupados con el máximo nivel de confianza (Fig. 8). Estas secuencias se ubicaron dentro del clúster formado por la mayoría de las secuencias provenientes del continente americano.

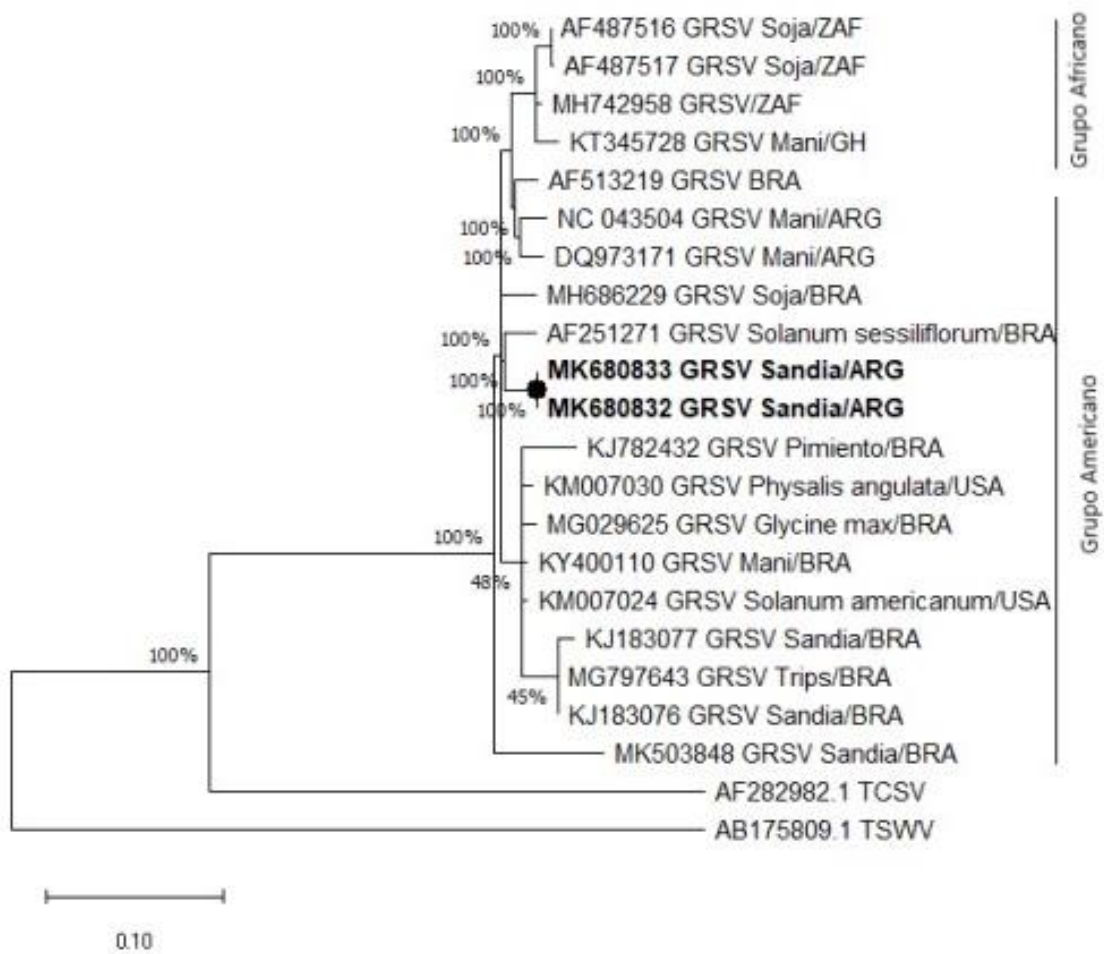


Fig. 8. Árbol filogenético Maximun Likelihood utilizando modelo Tamura-Nei construido con las secuencias parciales de nucleótidos de la proteína N de groundnut ringspot virus (GRSV).
 Nota: En el árbol se observan los aislamientos de sandía Argentinos (resaltados), secuencias de otros GRSV reportados (ZAF: Sudáfrica; GH: Ghana; USA: Estados Unidos; BRA: Brasil y ARG: Argentina), hospedantes de donde fueron aislados (cuando se cuenta con el mismo) y números de acceso (1000 bootstrap).

Discusión

Los tospovirus causan graves daños económicos a una amplia gama de cultivos en muchas partes del mundo (Bag *et al.*, 2012), siendo una limitación importante para la productividad y la calidad de los cultivos en muchas regiones del mundo (Yin *et al.*, 2014).

El GRSV es un virus, que según nuestros resultados, actualmente se encuentra infectando plantas de sandía. Los síntomas observados en este hospedante fueron similares a los reportados en Brasil cuando el GRSV infecta a esta especie (Leão *et al.*, 2015), además los análisis de identidades de secuencias parciales del gen N, obtenidas como resultado de este trabajo, mostraron que superan el 97% con los tospovirus comparados, el ICTV indica que para que dos tospovirus sean considerados de la misma especie deben compartir identidades superiores al 90% (Plyusnin *et al.*, 2012). Todo esto, indica que este patógeno está aumentando el número de huéspedes en el país a los cuales infecta. La presencia de reservorios que actúen como hospedantes para posibilitar que el patógeno sobreviva cuando el cultivo no está en producción y un insecto vector que se alimente tanto del reservorio como del cultivo sería uno de los factores que permitirían la expansión del virus en las producciones anuales (Webster *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que los agrupamientos de otras especies de *Tospovirus* no está afectados por el paso del tiempo sino que las poblaciones están agrupadas geográficamente (Tsompana *et al.*, 2005). Otros trabajos reportan que la dispersión geográfica del virus está relacionada con el hospedante que infecta y la distribución sus vectores (Oliver y Whitfield, 2016), esto no coincide con los resultados de análisis filogenéticos obtenidos en este trabajo, en el cual los aislamientos de soja y maní están en ambos grupos geográficos y nuestros aislamientos de sandía comparten grupo con una solanácea, al igual que los de maní de Argentina con el aislamiento brasilero de tabaco (AF513219).

Se considera que la aparición de las enfermedades causadas por tospovirus es un proceso multifactorial que incluye virus, vectores, huéspedes, medio ambiente y comportamiento humano (Yin *et al.*, 2014), considerando estos factores la emergencia de esta nueva enfermedad en los cultivos de sandía constituye una potencial amenaza para otros cultivos y áreas geográficas.

Posiblemente sería oportuno pensar que estas enfermedades sean fáciles de manejar debido a que se transmiten de manera persistente y un adecuado control químico del vector limitaría su dispersión, pero debido a la alta capacidad para reproducirse de estos insectos en las zonas agrícolas hacen que las aplicaciones no sean altamente efectivas, normalmente los productores llevan a cabo aplicaciones semanalmente durante el ciclo del cultivo (Michelotto *et al.*, 2019). Además, los vectores pueden adquirir Tospovirus sólo durante los estadios larvarios, mientras que tanto los trips larvales en estadios más avanzados como los adultos son capaces de transmitirlos (Loebenstein y Lecoq, 2012), por otro lado, se ha reportado que algunos trips disminuyen la capacidad para transmitir los virus durante el desarrollo de adultos (German *et al.*, 1992).

Para conocer el sistema agrícola en su conjunto y tomar decisiones de manejo que permitan obtener una producción económicamente rentable y sustentable, prácticas agronómicas como la utilización de agroquímicos para el control total y semanal de trips trae aparejado consecuencias importantes a contemplar a la hora del manejo de la enfermedad. Se necesitan nuevos enfoques que integren los procesos biológicos y ecológicos en la producción de alimentos, minimicen el uso de aquellos insumos que causan daños al medio ambiente, salud de los agricultores y los consumidores (Pretty, 2008). Además, se generan excesivos gastos al realizar aplicaciones frecuentes para el control de los vectores y también existe la posibilidad de que éstos (independientemente de la especie de que se trate) se tornen resistentes/tolerantes a los productos químicos utilizados, siendo esto una amenaza potencial para futuros controles de las virosis transmitidos por ellos. Por otro lado, se conoce que el uso de productos agroquímicos con el objetivo de intensificar la producción ha tenido un efecto perjudicial reduciendo la biodiversidad (Giomi *et al.*, 2018).

Conclusión

Este es el primer reporte de GRSV en una cucurbitácea en Argentina. El virus fue detectado en plantas de sandía y a partir de su detección, el análisis de este patógeno se incorporó como rutina para el cultivo.

2.2.2.-PRIMER REPORTE DE ZUCCHINI LETHAL CHLOROSIS VIRUS (ZLCV) EN ARGENTINA INFECTANDO CULTIVOS DE ZAPALLO

El ZLCV es un miembro del género *Tospovirus* que fue reportado en diferentes regiones productoras de cucurbitáceas (Yuki *et al.*, 2000; Giampan *et al.*, 2007; Camelo-García *et al.*, 2015). Este virus se presenta frecuentemente con una alta incidencia y se asocia con severas pérdidas de rendimiento en los cultivos de cucurbitáceas (Moreira *et al.*, 2014a; Giampan *et al.*, 2009).

Los síntomas causados por la infección por ZLCV pueden incluir clorosis y necrosis sistémica en las hojas, curvatura apical hacia arriba de la hoja, reducción del limbo y malformación del fruto (Giampan *et al.*, 2007). La presencia de plantas con síntomas similares hizo sospechar que este virus podría estar infectando los cultivos en Argentina.

Materiales y métodos

Se recolectaron hojas sintomáticas de un total de 90 plantas de zapallo de las provincias de Salta y Jujuy durante la campaña 2015/2016, las cuales presentaban clorosis, enrollamiento apical y reducción de la lámina de la hoja, mientras que los frutos mostraban malformaciones, síntomas similares a los reportados en Brasil por (Giampan *et al.*, 2007). Del total de plantas evaluadas (90) 30 plantas eran de *Cucurbita maxima* var. *zapallito redondo del tronco*, 18 de *C. maxima* var. *zapallo plomo*, 19 de *C. pepo*, 18 de *C. ficifolia* y 5 plantas de *C. moschata*. Para una evaluación inicial de la presencia de ZLCV se realizó un ensayo inmunoenzimático indirecto Placa Tapizada con Antígeno (PTA-ELISA) (Lommel *et al.*, 1982) (Anexo 5). Para esta prueba se usó antisuero contra ZLCV, amablemente proporcionado por el Dr. Jorge A. M. Rezende de la Universidad de São Paulo, Brasil.

Para confirmar la presencia del virus, se realizó un RT-PCR en un solo paso a partir de las extracciones de ARN de las muestras de plantas de zapallo, las cuales fueron realizadas con el Mini Kit de la Planta RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania). Para el desarrollo de la prueba se usaron cebadores específicos de ZLCV diseñados utilizando el programa Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar y Remm, 2007) para la amplificación directa de un fragmento de la región génica de la nucleocápside

(ZLCV-F ATCATGCTGTCCAGTCTCCT y ZLCV-R CCCACATTTTGCACTTGCGA). La reacción de RT-PCR consistió en la transcripción inversa a 46°C durante 30 min, seguida de la desnaturalización a 94°C durante 3 min y 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 30 s, un paso de 55°C durante 45 s y un paso para la actividad de la polimerasa a 72°C durante 45 s.

Se purificaron dos productos de PCR de *C. maxima* con el kit de Zymo (DNA clean & concentrator) y por método Sanger (Sanger *et al.*, 1977) fueron secuenciados los amplicones en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología - INTA (Argentina).

Las alineaciones de secuencia se realizaron utilizando Clustal W. Todos los análisis moleculares se realizaron utilizando MEGA versión 7 (Kumar *et al.*, 2016).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias parciales de nucleótidos de la proteína N de ZLCV publicadas en GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA), utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Un árbol evolutivo fue inferido usando la Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993; Kumar *et al.*, 2016).

Se realizaron observaciones de cortes ultrafinos a partir de tejido infectado siguiendo el protocolo descrito en el Anexo 4 de esta tesis.

Resultados

De un total de 90 muestras, 54 reaccionaron positivamente al antisuero específico del ZLCV, las cuales se detallan en la Tabla 2, las que presentaban síntomas característicos de tospovirus (Fig. 9).



Fig. 9. (A) Clorosis severa de las hojas y curvatura apical ascendente de las hojas de *Cucurbita maxima* var. *zapallito redondo del tronco* debido a la infección con zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV). (B) Síntomas de malformación del fruto en *C. maxima* var. *zapallito redondo del tronco* (arriba) y *C. pepo* (abajo) .

Tabla 2. Hospedantes y número de plantas que resultaron positivas a zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV).

| Hospedantes | Número de plantas positivas |
|--|-----------------------------|
| <i>Cucurbita maxima</i> var. <i>zapallito redondo del tronco</i> | 18 |
| <i>Cucurbita maxima</i> var. <i>zapallo plomo</i> | 11 |
| <i>C. pepo</i> | 11 |
| <i>C. ficifolia</i> , var. "cayote" | 11 |
| <i>C. moschata</i> | 3 |

Se examinaron secciones ultrafinas de muestras de hojas de plantas naturalmente infectadas, mediante microscopía electrónica de transmisión y se observaron partículas presuntamente de tospovirus (Fig.10).

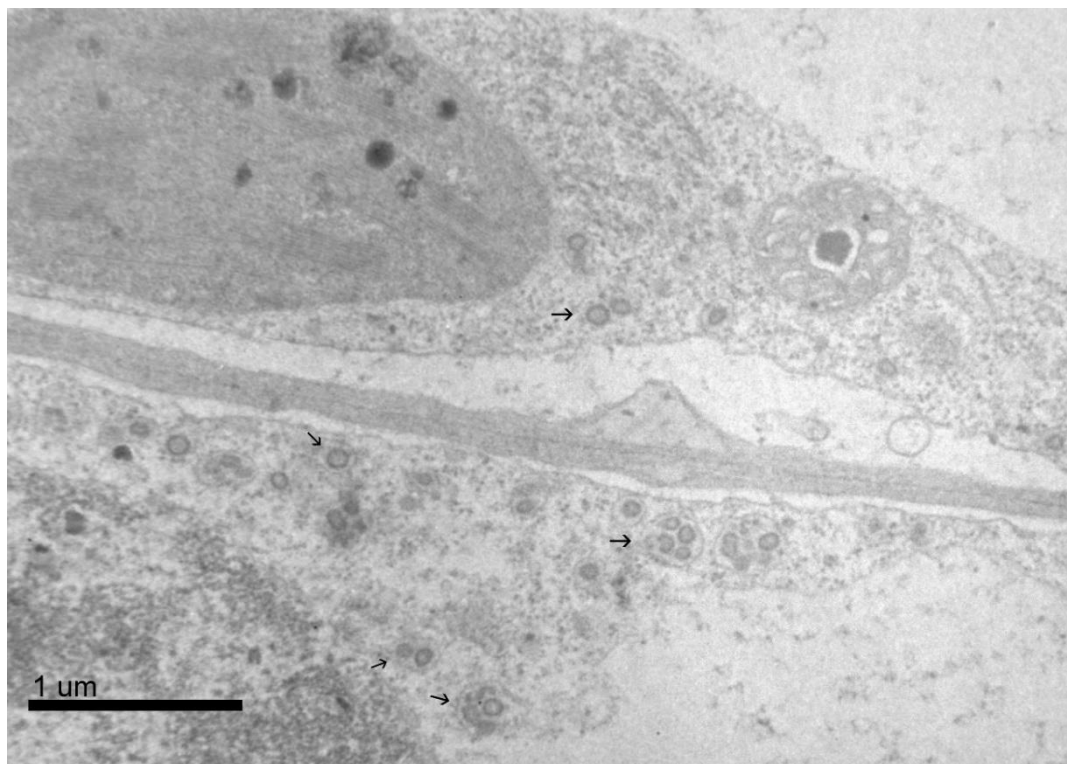


Fig. 10. Fotografía de secciones ultrafinas de hojas de zapallo (*Cucurbita maxima*) posiblemente infectadas por zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) mostrando partículas similares a las de tospovirus rodeadas por membranas. Nota: Las flechas indican supuestos viriones.

Los pares de cebadores específicos diseñados amplificaron los fragmentos de tamaños esperados de 488 pb (Fig. 11). Los amplicones de dos aislamientos, fueron secuenciados y fueron depositadas en el GenBank: MK680830 (L5) y MK680831 (L6). Las alineaciones de las secuencias del gen N de estos aislados mostraron una identidad de secuencia de nucleótidos superior al 94% con otros aislamientos de ZLCV disponibles en la base de datos GenBank. Además, la secuencia de aminoácidos mostró una identidad superior al 97% con regiones equivalentes del segmento S del aislado de ZLCV de *Cucumis sativus* (AOZ65584) y *Cucurbita pepo* (AKA60050), ambos provenientes de Brasil.

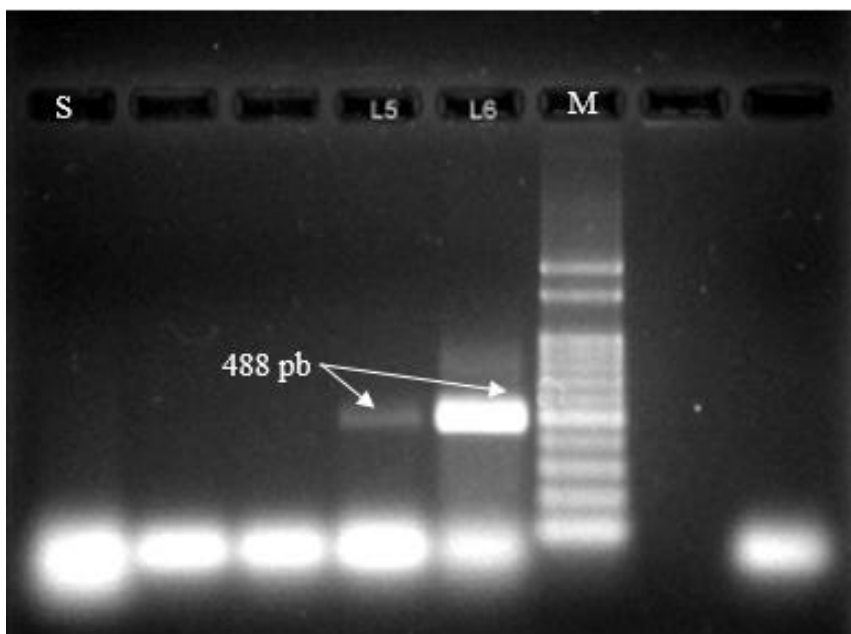


Fig. 11. Corrida de electroforesis de producto de RT-PCR con cebadores específicos en gel de agarosa 2% para zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV).
 Nota: (S) Planta de Cucurbita utilizada como control sano; (M) marcador de peso molecular de 100 pb (Embiotec); (L5 y L6) Plantas de *C. maxima* respectivamente, que fueron positivas para el virus zucchini lethal chlorosis virus, mostrando amplificación de fragmento del tamaño esperado.

El análisis filogenético, de las secuencias obtenidas de ZLCV y otras secuencias relacionadas del GenBank, ubicó con 100% de confianza a los aislamientos Argentinos con el ZLCV-DF obtenido de *Cucumis sativus* (KU681011) en Brasil (Fig. 12).

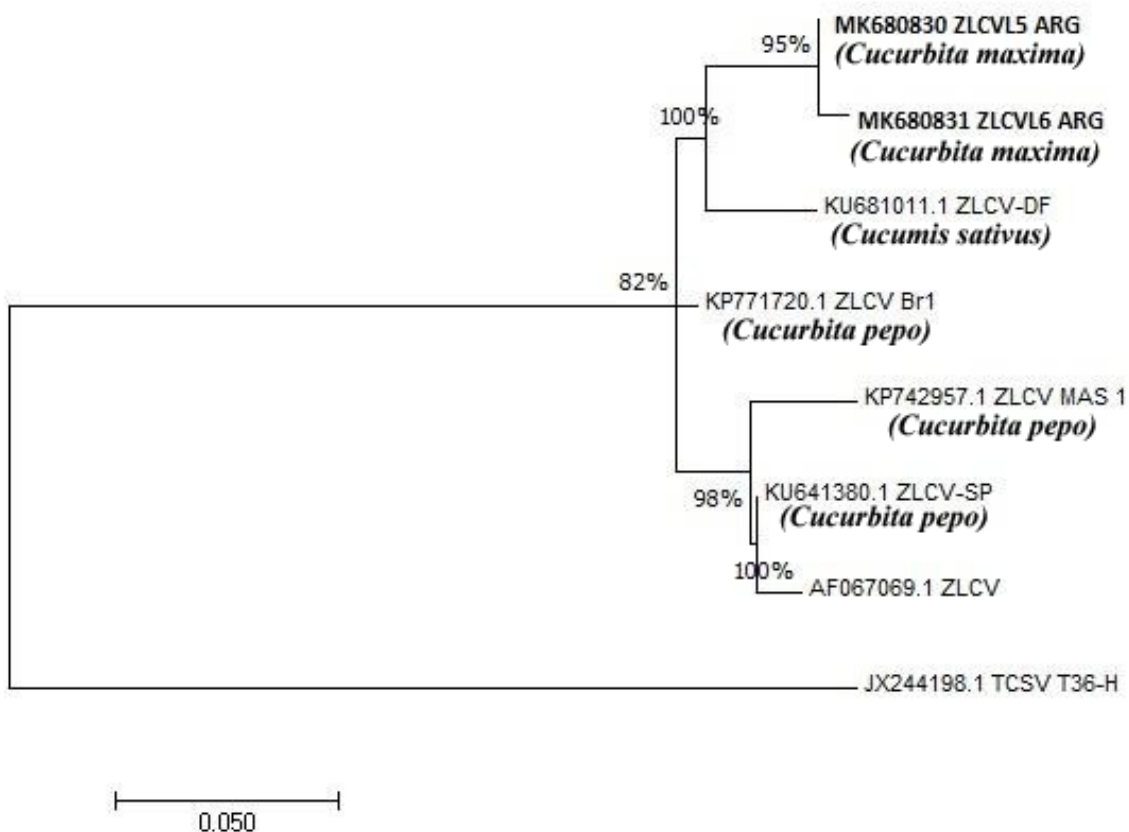


Fig. 12. Árbol filogenético Maximun Likelihood utilizando modelo Tamura-Nei construido con las secuencias parciales de nucleótidos de la proteína N de zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV).
 Nota: las secuencias (MK680830 y MK680831) provenientes de *C. maxima* obtenidas para este estudio fueron incluídas en el árbol junto con otras secuencias del virus y sus hospedantes reportados (1000 bootstrap).

Discusión

Hasta el presente, ZLCV ha sido publicado afectando solamente a miembros de la familia *Cucurbitaceae* (Bezerra *et al.*, 1999), y fue informado como uno de los patógenos más importantes que causan problemas económicos debido a las severas pérdidas de rendimiento que produce, especialmente en los cultivos de zapallo (Moreira *et al.*, 2014a).

Hasta la actualidad, había sido reportado un único cultivar resistente proveniente de *Cucurbita maxima* (Lima *et al.*, 2016), esto debería ser tenido en cuenta si se quiere realizar algún plan de mejoramiento genético ya que puede iniciarse la búsqueda de genes de resistencia/tolerancia en cultivares dentro de esta especie pero contemplando que según los resultados obtenidos en este trabajo, ZLCV, fue detectado en una amplia gama de especies y al menos en dos variedades de *C. maxima*.

Las muestras evaluadas presentaban síntomas similares a los reportados para ZLCV (Giampan *et al.*, 2007) y el 60% de las mismas reaccionaron con un antisuero específico para este virus. Además, los cortes ultrafinos de hojas infectadas permitieron observar al microscopio electrónico partículas virales presuntamente rodeadas por retículo endoplásmico, similar a lo que ocurre con otros tospovirus (ICTV, 9th Report 2011).

Los análisis de identidad de secuencias del gen N son superiores a los que indica el ICTV para que dos tospovirus sean considerados de la misma especie (Plyusnin *et al.*, 2012), ya que superan el 90% de lo reportado.

Este trabajo constituye el primer informe de ZLCV en Argentina, el cual hasta la fecha, sólo había sido mencionado en Brasil (Nakahara y Monteiro, 1999). Además, se detectó que el virus infecta naturalmente a *C. maxima*.

Trabajos realizados en Brasil sobre ZLCV mencionan a *Frankliniella zucchini* como único vector (Nakahara y Monteiro, 1999). Esta especie no fue citada hasta ahora en Argentina, pero quizás la presencia del virus podría estar indicando que este vector ha ingresado al país (debido a la cercanía que existen entre Argentina y Brasil), o que otra especie de trips, pueda ser capaz de transmitirlo. De todas maneras, existen estudios que confirman que al menos *Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei* y *Thrips tabaci*, no fueron vectores de ZLCV (Bezerra *et al.*, 1999). Estos insectos pueden provocar daños a nivel de calidad de la fruta a causa de su alimentación y la oviposición (Childers y Achor, 1995). Particularmente, en los muestreos realizados en Salta y Jujuy, hemos observado síntomas de lesiones graves en los frutos de cucurbitáceas recolectados ocasionados por los trips. Esta enfermedad emergente en cultivos de cucurbitas, posiblemente ocurrió a causa de los factores mencionados anteriormente tales como: el ingreso del vector a nuestro país, o porque este virus fue transmitido por otra especie o vector, o por la utilización de semillas infectadas, hechos que aún deben estudiarse, pero que serían de suma utilidad para conocer cuál fue el “origen” de ZLCV en Argentina.

La detección de este virus, infectando a una nueva especie de cucurbita y la posibilidad de considerar la entrada del vector a nuestro país, evidencia la capacidad que tienen los virus para instalarse en una nueva área geográfica, lo cual depende tanto de

los hospedantes disponibles en ese lugar como de los vectores que se alimenten y se reproduzcan en ellos (Webster *et al.*, 2015).

En el análisis filogenético, se observa que las dos secuencias de ZLCV obtenidas en Argentina hallados en *C. maxima* se encuentran separadas con un 95% de confianza del aislamiento obtenido a partir del hospedante *Cucumis sativus* (KU681011), a su vez, estos tres se distancian del aislamiento de *C. pepo* (KP771720) y de los demás aislamientos analizados, todos provenientes Brasil, esto podría deberse a que la distribución geográfica de este virus se ajusta perfectamente a la posición filogenética (Nagata *et al.*, 2007). Estudios recientes revelaron que los tospovirus pueden dividirse en dos grupos geográficos, aquellos que forman clados con secuencias de diferentes especies de virus provenientes de Europa/Asia denominado “clado euroasiático” y otro proveniente de América llamado “clado americano” (Lima *et al.*, 2016).

En cuanto al control de la enfermedad, es conocida su dificultad por la limitada información disponible respecto a la caracterización del patógeno, estudios temporales y espaciales de la enfermedad, su manejo, estudios del vector, hospedantes alternativos y evaluación de cultivares resistentes/tolerantes. Por otro lado, la eficiencia del control químico sobre el vector es dificultosa debido al momento de adquisición tospovirus y a su comportamiento; por consiguiente el control químico debe recomendarse siempre que las ninfas estén presentes en las plantas, por lo cual, se propone la eliminación de la fuente de inóculo como medida principal a tener en cuenta antes de comenzar nuevas plantaciones (Moreira *et al.*, 2014a), sumado a este manejo, la búsqueda y utilización de material resistente/tolerante podría ser una práctica adecuada para el control de esta virosis.

Conclusión

Este es el primer informe de ZLCV fuera de Brasil.

Aunque no hemos observado en Argentina la presencia de su vector, (*Frankliniella zucchini*) sería importante considerar la presunta entrada del mismo en el país.

IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS VIRUS QUE AFECTAN A LAS CUCURBITÁCEAS, SU RELACIÓN CON VARIABLES BIO-CLIMÁTICAS Y CURVAS DE PROGRESO DE ENFERMEDAD

INTRODUCCIÓN

Un conjunto de herramientas epidemiológicas incluye metodologías para analizar el progreso de la enfermedad en el tiempo y espacio y el grado de control necesario para el control de la enfermedad (Jeger, 2009). En tal sentido, es importante comprender la epidemiología para el manejo de las enfermedades que afectan a los cultivos agrícolas en general y en particular a los cultivos hortícolas que nos incumben en este trabajo de tesis. Por consiguiente, conocer el desarrollo de una virosis puede llevar a realizar un manejo adecuado de la enfermedad y poder llegar a controlar la infección. Los rápidos cambios en la agricultura hacen que el escenario en el cual se propagan las enfermedades se modifique junto a ellos, esto impone nuevas exigencias si queremos manejar las enfermedades de manera eficiente para lograr su control, ya sea por medios genéticos, químicos, biológicos o culturales (Gilligan, 2008).

Los objetivos de este capítulo de la tesis fueron estudiar virus asociados a la heterogeneidad de ambientes en los cultivos de cucurbitáceas, a través del análisis de la distribución de los virus a lo largo del área de producción comercial en Argentina y las relaciones de los virus con las variables bio-meteorológicas. Además, determinar los valores de incidencia de los virus más frecuentes reportados hasta el momento. Por otro lado se analizó la presencia de las virosis y su relación con distintas formas de manejo del cultivo. Esto se llevó a cabo considerando dos estudios, uno realizado durante 6 años consecutivos en diferentes regiones (estudio multiambiental) y otro en una sola localidad, en un solo ciclo de cultivo a contra-estación (estudio de verificación), realizado con el objetivo de poder cotejar los resultados obtenidos en estudio multiambiental (en el apartado 3.1. se aborda este objetivo). Por otra parte, se procedió a investigar sobre la curva de progreso de la enfermedad de aquel virus detectado en mayor porcentaje en la Provincia de San Juan, analizar la distribución de los vectores a

lo largo del año y su relación con variables meteorológicas (en el apartado 3.2. se desarrolla este objetivo).

3.1.-INCIDENCIA RELATIVA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS VIRUS DE CUCURBITÁCEAS, Y SU RELACIÓN CON VARIABLES BIOMETEOROLÓGICAS

Comprender la relación entre las enfermedades virales asociadas a la heterogeneidad de los ambientes tiene por objeto prevenir la aparición de virus o atenuar su efecto en la producción agrícola, i.e., disminuir su incidencia y severidad. La heterogeneidad ambiental definida por factores bióticos y abióticos afecta los patrones de infección y los cambios genéticos en los virus (Archie *et al.*, 2009; Biek y Real, 2010; Meentemeyer *et al.*, 2012; Fraile *et al.*, 2017).

Entre las limitantes que afectan, principalmente, la producción de cucurbitáceas se encuentran las enfermedades virales y en particular aquellas que son transmitidas por áfidos. En Argentina, en algunas campañas los rendimientos fueron muy bajos (posiblemente a causa de la gran cantidad de virosis detectada en el cultivo en etapas tempranas) y por consiguiente el productor decidía no cosechar ya que no era rentable, esta circunstancia se observó en lotes en producción en la provincia de Santiago del Estero durante el año 2012 (Perotto, comunicación personal) y hechos similares han sido reportados en otras partes del mundo (Abou-Jawdah *et al.*, 2000; Coutts *et al.*, 2011).

En nuestro país, las plantas cultivadas de cucurbitáceas provienen, en el 75% de los casos, de semillas de origen nacional y hasta el momento no existen cultivares tolerantes/resistentes a virosis (Della Gaspera *et al.*, 2013). Por lo general, la semilla utilizada para la siembra de cucurbitas es frecuentemente intercambiada por los productores locales y no posee ningún control fitosanitario.

Los virus WMV, PRSV, ZYMV y CMV, son los más comunes y prevalentes en Argentina (Feldman y Gracia, 1992; Gracia y Feldman, 1986; Nome *et al.*, 1974; Gracia, 2000; Perotto *et al.*, 2016). Además, estos virus están presentes en la mayoría de las zonas de cultivo de cucurbitáceas en todo el mundo, todos ellos son transmitidos por áfidos de manera no persistente siendo la causa de graves epidemias cuando están

presentes. Numerosos estudios epidemiológicos se han realizado para determinar la distribución de estas enfermedades (Alonso-Prados *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2012; Ibaba *et al.*, 2015; Lecoq y Katis, 2014; Moreira *et al.*, 2014b).

Es conocido que las condiciones ambientales afectan la presencia de patógenos. Existen diferentes clasificaciones climáticas, una de la más utilizada es la clasificación climática de Köppen (Köppen *et al.*, 1936). Esta clasificación se actualizó recientemente para el período 1951-2000 y describe los ecosistemas con capacidad variable para soportar diferentes vectores, huéspedes y patógenos (Reisen, 2010).

Materiales y métodos

Áreas de estudio

El estudio multiambiental se realizó en lotes de cultivo ubicados en las principales zonas productoras de cucurbitáceas de Argentina que corresponden a los siguientes tipos de clima según la clasificación de Köppen: semiáridos cálido (BSh), árido frío (BWk), clima templado cálido con invierno seco y verano caluroso (Cwa) y clima templado cálido con verano caluroso y húmedo (Cfa) (Fig. 13). Las precipitaciones en Cfa se distribuyen más uniformemente a lo largo del año, mientras que en Cwa se producen principalmente en verano (Köppen *et al.*, 1936; Kottek *et al.*, 2006).

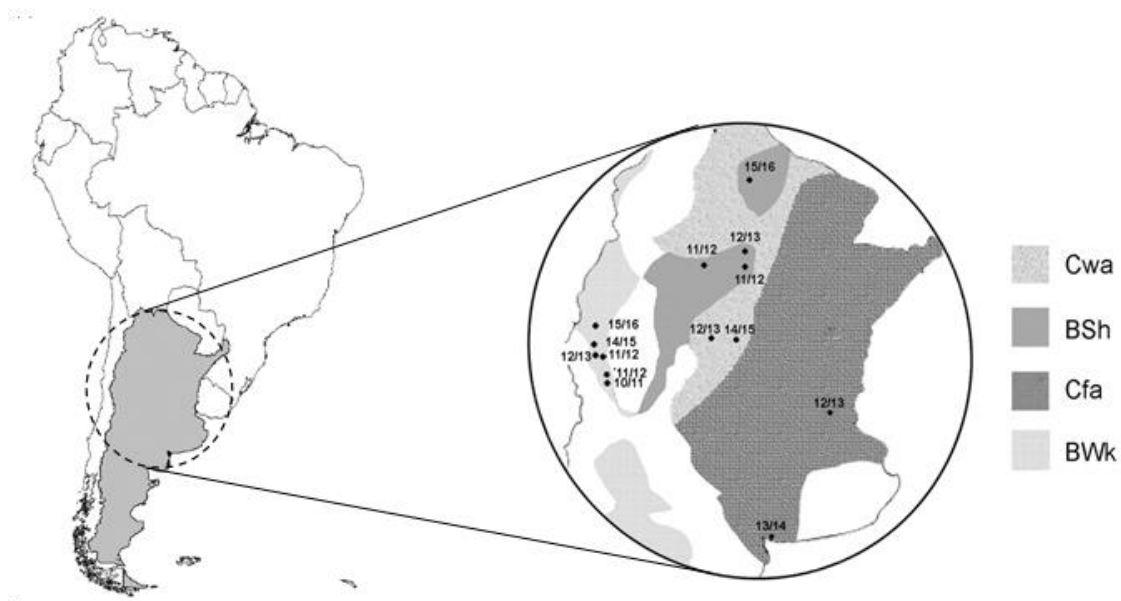


Fig. 13. Ubicación geográfica de los ambientes evaluados en los diferentes climas estudiados.
 Nota: Se destacan las zonas áridas (BSh y BWk) y zonas cálidas (Cwa y Cfa) en seis ciclos de cultivo (2010 a 2016), identificándose a los ambientes con un punto.

Los muestreos se llevaron a cabo entre 2010 y 2016 durante la temporada primavera-verano (entre septiembre y marzo). Se consideró un ciclo promedio de cultivo aquel con una duración de 120 días, desde el trasplante hasta la primera cosecha. Catorce ambientes se definieron como el resultado de una combinación de los tipos climáticos (según Köppen) con el ciclo de cultivo. Se consideraron las variables meteorológicas (bio-meteorológicas) para cada ambiente, las que incluyen el valor medio de: la temperatura mínima (T_{mmin}), la temperatura media (T_{mmd}) y la temperatura máxima (T_{mmax}); la humedad relativa (HR) y la precipitación acumulada (PPacum).

Los datos meteorológicos fueron proporcionados por el Instituto del Agua y el Clima del INTA (Tabla 3).

Tabla 3. Valores medios de las variables bio-meteorológicas temperaturas máximas, medias, mínimas, valores acumulados de precipitaciones y humedad relativa registradas durante 120 días del ciclo de cultivo en 14 ambientes, conformados por la combinación de tipo de clima y campaña agrícola, de 2010 a 2016.

| Ambientes | | Variables bio-meteorológicas | | | | |
|---------------|------------------|------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|------|
| Tipo de Clima | Campaña Agrícola | T _{mmax} | T _{mmd} | T _{mmin} | PP _{acum} | HR |
| Cfa | 12/13 | 28.6 | 22.7 | 16.8 | 477.1 | 59.3 |
| Cfa | 13/14 | 30.8 | 23.0 | 15.1 | 143.4 | 49.6 |
| Cwa | 12/13 | 28.6 | 21.6 | 15.5 | 373.2 | 63.2 |
| Cwa | 14/15 | 28.6 | 22.1 | 15.6 | 767.1 | 71.1 |
| BWk | 10/11 | 28.9 | 20.6 | 12.2 | 105.3 | 44.9 |
| BWk | 14/15 | 29.6 | 21.2 | 12.8 | 148.8 | 54.0 |
| BWk | 11/12 | 34.0 | 26.5 | 19.0 | 69.0 | 43.8 |
| BWk | 12/13 | 32.9 | 25.6 | 18.3 | 87.5 | 47.3 |
| BWk' | 14/15 | 32.7 | 25.7 | 18.7 | 35.9 | 48.2 |
| BWk | 15/16 | 32.3 | 25.6 | 18.8 | 51.8 | 54.7 |
| BSh | 11/12 | 33.9 | 26.6 | 19.3 | 412.8 | 62.8 |
| BSh' | 11/12 | 32.2 | 25.6 | 19.1 | 287.4 | 62.8 |
| BSh | 12/13 | 34.4 | 27.2 | 20.0 | 143.8 | 61.8 |
| BSh | 15/16 | 31.4 | 25.7 | 20.0 | 523.8 | 69.3 |

T_{mmin}, temperatura mínima media; T_{mmd}, temperatura media media; T_{mmax}, temperatura media máxima; HR, humedad relativa media; PP_{acum}, precipitaciones acumuladas producidas durante el ciclo de cultivo en los ambientes evaluados.

Recolección de muestras

Se recogieron muestras de hojas en cada uno de los 14 ambientes definidos, llegando a un total de 491 plantas de melón y zapallo. Se identificaron muestras con y sin síntomas, las que fueron procesadas en el laboratorio para los análisis de virus.

El tamaño de lote muestreado en cada ambiente fue diferente (se recolectaron las muestras de un total de 18 lotes). Se tomaron entre 10 y 50 muestras foliares (una muestra por planta), dependiendo del tamaño del lote, siguiendo una transecta diagonal al mismo.

Identificación de virus, estimación de la incidencia e índice de dispersión relativa

La presencia de cada virus fue determinada por DAS-ELISA (Anexo 6) usando antisueros específicos para la detección de WMV, ZYMV, PRSV y CMV (BIOREBA SRL Latin América, Mar del Plata, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, análisis moleculares fueron realizados para confirmar los resultados serológicos. Cebadores específicos fueron diseñados para la amplificación de fragmentos genómicos mediante RT-PCR (Tabla 4).

Tabla 4. Cebadores utilizados para la detección de WMV, PRSV, ZYMV y CMV

| Cebadores | Secuencia | Tamaño | Tm (°C) | Referencia |
|------------------|------------------------------------|--------|---------|------------------------|
| WCP _r | GCACTAGTCGACCCGAAATGCTAACTG | 950 | 61 | Mohammed et al. (2014) |
| WCP _d | GACCTAGTGAYGGKTGCTGTGAATCAG | | | |
| PRSVCP326 | TCGTGCCACTCAATCACAAT | 475 | 57 | Mohammed et al. (2012) |
| PRSVCP800 | GTTACTGACACTGCCGTCCA | | | |
| ZYMVCP117 | TGTCACGAAGGACAAGGATG | 549 | 57 | Este estudio |
| ZYMVCP665 | TCMGGAGTTTTGGAATTGAC | | | |
| CMV5CP | CTCGAATTCGGATCCGCTTCTCCGCGAG | 870 | | Anónimo (1998) |
| CMV3CP | GGCGAATTCGAGCTCGCCGTTAAGCTGGATGGAC | | | |

T_m, temperatura de desnaturalización; WMV, watermelon mosaic virus; PRSV, papaya ringspot virus; ZYMV, zucchini yellow mosaic virus; CMV, cucumber mosaic virus.

Del total de muestras analizadas, 323 resultaron positivas al menos para un virus, y solo estas se tuvieron en cuenta para el cálculo de la incidencia relativa (IR). La IR se calculó para cada virus a través de los ambiente, según la siguiente formula:

$$IR(\%) = \frac{n}{N} \times 100$$
 Donde “n” es el número de hojas positivas para cada virus; N es el número total de muestras positivas.

Se estimó el Índice de Dispersión Relativa (IDR) para estudiar la dispersión de los 4 virus en cada ambiente, según Moreira *et al.*, (2014b). El IDR fue estimado

considerando solamente plantas infectadas Este índice es una función de la varianza observada (V_{obs}) y de la varianza esperada según una distribución binomial de presencia/ausencia de al menos uno de los cuatro virus (V_{bin}). $IDR = V_{obs}/V_{bin}$

donde,

$$V_{obs} = \sum [(X_i - np)^2 / n^2 (N - 1)]$$

$$V_{bin} = p(1 - p)/n$$

El IDR estima la dispersión comparando la varianza de la incidencia observada con la varianza esperada. La hipótesis nula postula una distribución aleatoria de los virus. Dicha hipótesis fue probada mediante chi-cuadrado con n-1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0,05. Los valores de IDR iguales a 1,0 indican distribución aleatoria, los valores de RDI > 1,0 indican agregación y los inferiores a 1,0 indican regularidad.

Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de correspondencias múltiples para datos categóricos en las muestras provenientes de melón y zapallo para los virus estudiados.

Se calculó la frecuencia de cada virus para los cultivos de cucurbitáceas en cada uno de los ambientes. El Análisis de Componentes Principales (ACP) fue realizado con el fin de estudiar la variabilidad de los ambientes considerando las variables bio-meteorológicas y la incidencia relativa de cada uno de los cuatro virus. El Biplot de ACP (Gabriel, 1971) permite visualizar el comportamiento de los ambientes debido a la incidencia relativa de todos los virus en estudio y las variables bio-meteorológicas al mismo tiempo.

El Análisis de Correlaciones Canónicas (ACC) se realizó con el propósito de relacionar el virus con variables bio-meteorológicas mediante el cálculo de combinaciones desiguales y poder determinar la correlación que existe entre los dos conjuntos de variables (incidencia relativa y condiciones ambientales), dando un fuerte soporte estadístico a la relación encontrada.

Los análisis CART se realizaron para estudiar el impacto de cada variable bio-meteorológica para cada virus por separado e identificar las variables bio-meteorológicas que más influyeron en su incidencia relativa. Los umbrales y condiciones bio-meteorológicas que favorecieron el aumento de la incidencia de cada virus se establecieron a través de estos algoritmos.

Finalmente, se ajustó un modelo lineal mixto para el virus más prevalente en Argentina (WMV), tomando como efecto aleatorio los ambientes y como efectos fijos todas las variables bio-meteorológicas.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2018).

Estudio de verificación

Se realizaron muestreos en el año 2017 en la Provincia de Santa Fe, en tres establecimientos productivos distintos. Los mismos se diferenciaban según fechas de siembra (15/06/2017, 26/06/2017 y 10/08/2017) y estrategias de manejo (surcos entre planchadas) (Fig. 14). Se recolectaron 20 muestras por lote en producción, espaciados cada un mes durante tres meses consecutivos (desde agosto hasta octubre inclusive), en diferentes estadios fenológicos (desarrollo de las hojas y formación de brotes laterales, floración y formación de fruto) (Enz y Dachler, 1998).

Las muestras recolectadas fueron identificadas y conservadas a -80°C para luego ser analizadas por DAS-ELISA para WMV, ZYMV, PRSV y CMV. Posteriormente se realizaron análisis moleculares por RT-PCR para constatar los resultados obtenidos por serología (tal como se describió en el apartado del Capítulo 3 para la identificación de virus).

El rendimiento del cultivo fue determinado en gr/pl/día, el mismo se evaluó eligiendo una hilera al azar de cultivo en el lote. Estas hileras estaban dispuestas en un largo de 50 metros, con una distancia entre plantas de 80 centímetros. Se procedió a la cosecha de una sola hilera, y se obtuvieron los g/pl/día desde la última cosecha. El cultivo a lo largo de 90 días, se evaluó al menos 3 veces. Estos valores de rendimientos fueron relacionados con los porcentajes de infección viral. Análisis de la Varianza

(ANAVA) fueron llevados a cabo para observar si existían diferencias significativas entre el manejo del cultivo (utilización de planchadas) y el porcentaje de infección viral.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2018).



Fig. 14. Establecimiento productivo ubicado en la Provincia de Santa Fe con siete surcos por planchada.

Resultados

Los cuatro virus analizados (WMV, ZYMV, PRSV y CMV) fueron detectados en todas las muestras recolectadas. El análisis de correspondencia múltiple determinó que la presencia de los cuatro virus fue independiente del hospedante (melón y zapallo), i.e., la infección de los virus afectan igualmente a plantas de melón y de zapallo (resultado no mostrado). Por ello, para los análisis subsiguientes se consideró un único data set que incluyó muestras tanto de melón como de zapallo.

Los análisis, basados en serología e identificación molecular, mostraron que el virus WMV estaba presente con el porcentaje más alto, presentando una IR del 46%, por el contrario, la incidencia del CMV fue la más baja (IR=9%). Por otro lado, PRSV y

ZYMV tuvieron una incidencia similar entre ellos, resultando sus valores de IR iguales a 20 y 24%, respectivamente (Fig. 15).

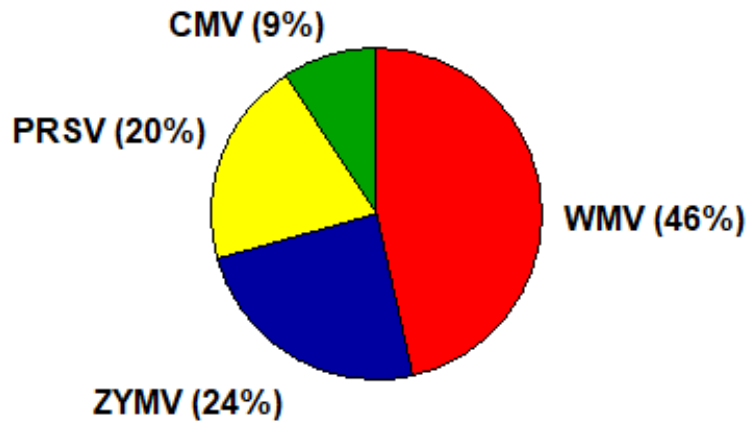


Fig. 15. Incidencia relativa de los virus watermelon mosaic virus (WMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), papaya ringspot virus (PRSV) y cucumber mosaic virus (CMV).

En todos los ambientes estudiados siempre se detectó más de un virus infectando los cultivos. El WMV estuvo presente en todos los ambientes, con un alto porcentaje de frecuencia, donde la misma superó el 50%, excepto en el BSh'11/12 donde fue cercana al 25%. En el caso de ZYMV y PRSV, estuvieron presentes en 11 de los 14 ambientes, con valores de infección que varió entre 12,5 y 100%. El CMV estuvo presente en 7 de 14 ambientes, todos pertenecientes al tipo de clima árido (BSh y BWk). La presencia de los cuatro virus juntos solo fue detectada en 6 ambientes, todos correspondientes al tipo climático árido (BSh y BWk) (Fig. 16).

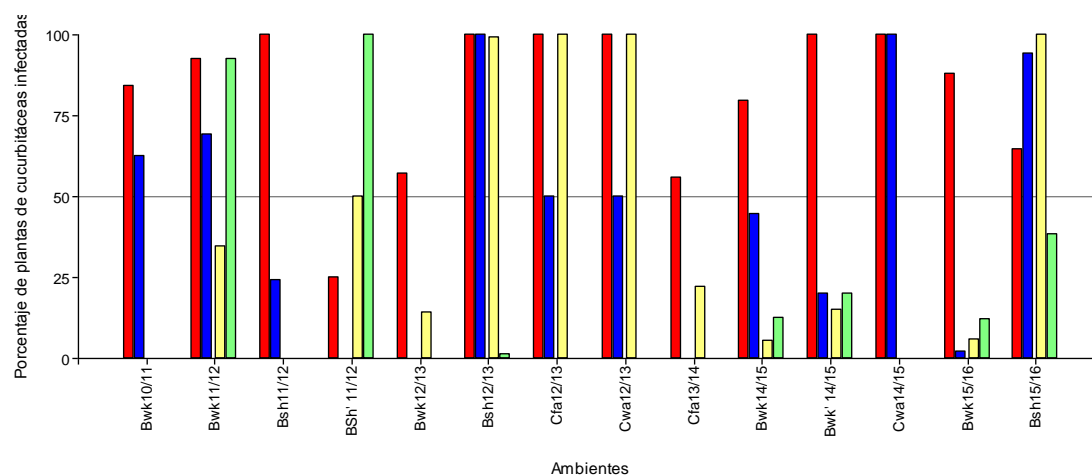


Fig. 16. Porcentaje de plantas de cucurbitáceas infectadas con los virus watermelon mosaic virus (WMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), papaya ringspot virus (PRSV) y cucumber mosaic virus (CMV).
 Nota: WMV (watermelon mosaic virus- color rojo), ZYMV (zucchini yellow mosaic virus- color azul), PRSV (papaya ringspot virus – color amarillo) y CMV (cucumber mosaic virus – color verde) distribuidos en diferentes ambientes, formados por la combinación del ciclo de cultivo evaluado (de 2010 a 2016) y la provincia.

El IDR de nuestro estudio fue igual a uno (IDR=1), lo que significa que la distribución de las plantas infectadas fue aleatoria. Dicho de otra forma, la infección viral no tiene un patrón agregado de dispersión.

El biplot del ACP realizado (Fig. 17) explica el 68,7% de la variabilidad total de los datos estandarizados con los dos primeros componentes principales (CP). El primer CP (CP 1), que expresa la mayor variabilidad total de los datos, mostró que los ambientes BSh'11/12, BWk11/12, BWk12/13, BWk14/15 y BWk15/16 variaban con respecto a los ambientes Cfa12/13, Cwa12/13, Cfa13/14 y Cwa14/15. La presencia del virus CMV mostró alta correlación positiva con las temperaturas (Tmmd, Tmmin y Tmmax). Por el contrario, los virus ZYMV y PRSV mostraron alta correlación con las precipitaciones acumuladas (PPacum) y la humedad relativa (HR). Además, hubo correlación negativa entre los potyvirus (WMV, ZYMV y PRSV) con las variables de temperatura.

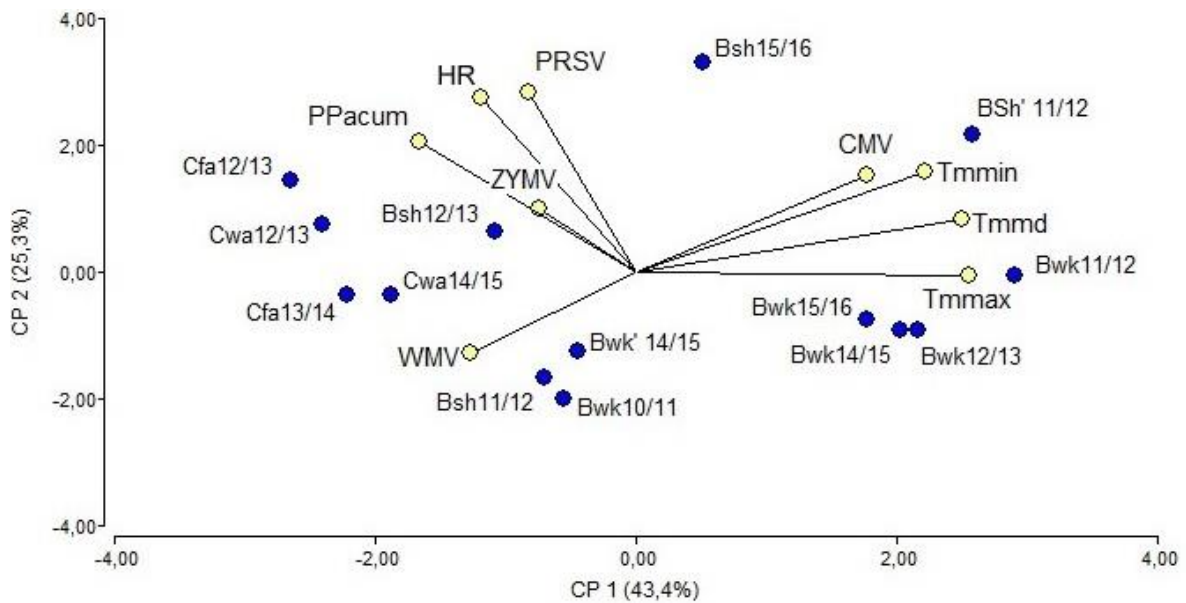


Fig. 17. Análisis de componentes principales considerando las variables bio-meteorológicas, los virus presentes (watermelon mosaic virus-WMV, zucchini yellow mosaic virus-ZYMV, papaya ringspot virus-PRSV, cucumber mosaic virus- CMV) y los diferentes ambientes.

El gráfico de dispersión del ACC muestra una alta correlación entre los virus presentes y las variables bio-meteorológicas (Fig. 18). Este resultado está fuertemente apoyado por el análisis de regresión de Pearson (Pearson's $r = 0,96$, $P < 0,001$). Además, el ACC proporcionó datos con los valores para cada una de las variables. Las temperaturas estaban correlacionadas negativamente para los tres potyvirus, sin embargo, la relación observada entre estas variables y WMV fue la que mejor contribuyó a explicar su presencia ($P=0,0083$). Para el CMV, las variables de temperatura se correlacionaron positivamente con él y fueron las que más contribuyeron a explicar esta correlación. Por otro lado, la HR mostró una correlación positiva con la presencia de potyvirus y ninguna correlación con CMV (Tabla. 5).

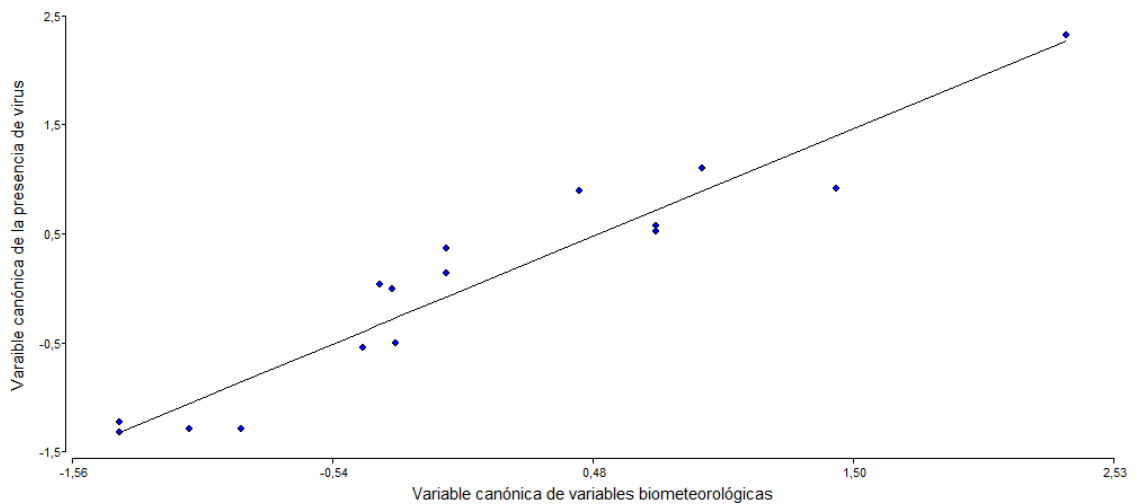


Fig. 18. Diagrama de dispersión para variables canónicas que representa la presencia de virus vs. las variables canónicas de variables bio-meteorológicas.

Nota: Se muestra polinomio de orden 1.

Tabla 5. Análisis de correlación de Pearson entre las variables bio-meteorológicas y los 4 virus en estudio (WMV, watermelon mosaic virus; ZYMV, zucchini yellow mosaic virus; PRSV, papaya ringspot virus; CMV, cucumber mosaic virus).

| | <u>Tmmax</u> | <u>Tmmd</u> | <u>Tmmin</u> | <u>PPacum</u> | <u>HR</u> |
|------|--------------|-------------|--------------|---------------|-----------|
| WMV | -0,19 | -0,29 | -0,39 | -0,14 | 0,20 |
| ZYMV | -0,06 | -0,06 | -0,08 | 0,14 | 0,42 |
| PRSV | -0,31 | -0,16 | -0,01 | 0,44 | 0,73 |
| CMV | 0,52 | 0,54 | 0,52 | -0,14 | -0,26 |

Tmmax, temperatura media máxima; Tmmd, temperatura media media; Tmmin, temperatura mínima media; PPacum, precipitaciones acumuladas; HR, humedad relativa media; producidas durante el ciclo de cultivo en los ambientes evaluados.

Los resultados de los algoritmos CART mostraron los valores de predicción de incidencia relativa más altos para cada virus a lo largo de un ciclo de 120 días (Fig. 19).

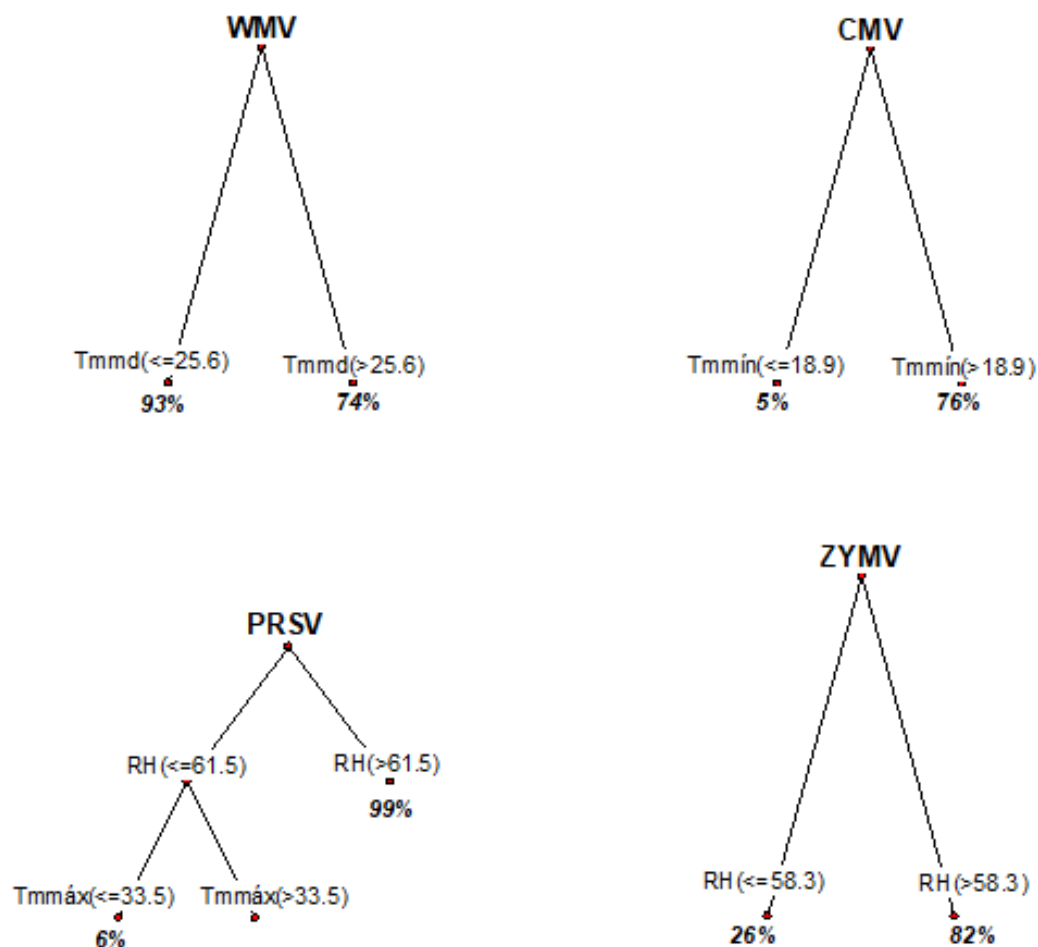


Fig. 19. Árboles de regresión para cada virus y variables bio-meteorológicas.

Nota: Se muestran porcentajes de incidencia para las condiciones meteorológicas predisponentes. Watermelon mosaic virus (WMV), arriba a la izquierda, cucumber mosaic virus (CMV) arriba a la derecha, papaya ringspot virus (PRSV) abajo a la izquierda y zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) abajo a la derecha.

La variable bio-meteorológica de mayor peso para explicar la presencia del virus WMV fue la temperatura media (Tmmd). Para valores de Tmmd por debajo de 25,6°C, la probabilidad de hallar este virus infectando plantas de cucurbitas es de 0,93, mientras que si las Tmmd son superiores a 25,6°C, dicha probabilidad desciende a 0,74 (Fig. 19 izquierda arriba).

En el caso del CMV, la Tmmin fue la variable bio-meteorológica que más contribuyó a explicar la presencia de este virus, Tmmin bajas, por debajo o igual a 18,9°C, se espera una presencia muy baja (5%), mientras que con Tmmin que superan el valor mencionado, la predicción para este virus alcanza una probabilidad de 0,76 (Fig. 19 derecha arriba).

Mientras que para los virus WMV y CMV la temperatura fue la variable que determinó una mayor predisposición a la presencia de dichos virus, para los virus PRSV y ZYMV fue la HR la variable bio-meteorológica que describió la presencia de dichos virus.

Valores de HR inferiores o iguales al 58,3%, la predisposición para la presencia de ZYMV es 26%. Mientras que si las condiciones de HR se encuentran por encima de dicho valor, la probabilidad de encontrar este virus alcanza valores de 0,82 (Fig 19. derecha abajo). El mismo comportamiento respecto a HR manifiesta PRSV, aunque con umbrales diferentes y en conjunto con valores de temperatura máxima (T_{max}). Así, en ambientes donde la HR fue inferior al 61,5% y la T_{max} menor a 33,5°C, la predisposición para la presencia de PRSV es baja (0,06). Por el contrario, valores de HR superior al 61,51% predisponen a una alta presencia del virus, 0,99 (Fig 19. izquierda abajo).

El modelo lineal mixto ajustado para WMV fue estadísticamente significativo, mostró una alta correlación entre este virus y las temperaturas siendo significativas las T_{max} y T_{med}.

En el estudio de verificación fue posible detectar que los virus más frecuentes fueron ZYMV (51%), seguido de PRSV (35%).

Fechas de siembra más tempranas (15/06), tuvieron menores porcentajes de infección viral (24%) mientras que en las más tardías fueron de 68% (26/06) y 82,5% (10/08). Se observó una evidente relación negativa entre el rendimiento obtenido (g/pl/día) y los porcentajes de infección viral y no se evidenciaron diferencias significativas entre lotes con y sin planchadas (resultados no mostrados).

Discusión

La heterogeneidad de los ambientes puede moldear la relación planta-virus, favoreciendo la aparición de nuevas enfermedades en los cultivos, o bien alterando su incidencia y severidad. El medio ambiente puede modular las interacciones planta-virus sin inducir cambios genéticos ni en el virus ni en el huésped (Fraile *et al.*, 2017). Con la intención de abordar los factores que intervienen en la relación entre la heterogeneidad

ambiental y la incidencia del virus, desarrollamos estudios durante seis años en diferentes ambientes.

Cabe señalar que los virus considerados para este trabajo son transmitidos eficientemente por varias especies de áfidos, en particular *Myzus-persicae*, *Aphis gossypii*, *Macrosiphum euphobiaceae*, de manera no persistente (Lecoq y Desbiez, 2012.; Francki *et al.*, 1979; Gal-On, 2007), pero la eficiencia con que son transmitidos los virus en estudio, difieren según el vector (Alonso-Prados *et al.*, 2003). Es bien sabido que el medio ambiente afecta a la dinámica poblacional de los vectores; de ello depende, en gran medida, la transmisión del virus con la consiguiente aparición de enfermedades. Estudios previos han reportado que los cambios en las condiciones ambientales pueden afectar a los huéspedes, patógenos y vectores, y que los factores ambientales pueden generar variaciones periódicas en la biología de los huéspedes y los patógenos (Altizer *et al.*, 2006). Trabajos recientes sobre patógenos humanos, vegetales y forestales, han demostrado alta sensibilidad de algunos patógenos y vectores a los factores climáticos (Harvell *et al.*, 2002). Otros trabajos han demostrado que es posible hacer inferencias sobre la dinámica de las enfermedades virales y el medio ambiente (Fraile *et al.*, 2017; Kone *et al.*, 2017; Roossinck *et al.*, 2015). En este estudio fue posible inferir la relación entre los virus que infectan cucurbitáceas y el medio ambiente con un alto soporte estadístico a través de técnicas de análisis multivariado y mediante el modelado de la incidencia relativa en función de variables bio-meteorológicas.

El análisis de correspondencia múltiple determinó que la presencia de los cuatro virus fue independiente de los hospedantes analizados, esto permitió considerar las muestras de zapallo y melón en forma conjunta. Trabajar con ambos cultivos juntos permitió aumentar el tamaño de muestras total que beneficio directamente el análisis estadístico proporcionando mayor potencia.

Se ha reportado que WMV, PRSV, ZYMV y CMV son los virus más importantes en todas las regiones productoras de cucurbitas en el mundo (Alonso-Prados *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2012; Bananej y Vahdat, 2008; Lecoq y Desbiez, 2012; Vučurović *et al.*, 2012). También se ha informado que estos virus causan importantes daños, hasta un 100% de pérdidas de rendimiento y hasta un 95% de reducción en el valor de mercado a nivel mundial (Massumi *et al.*, 2007; Lecoq y Desbiez, 2012;

Desbiez *et al.*, 2009; Köklü y Yilmaz, 2006; Luis-Arteaga *et al.*, 1998; Lecoq *et al.*, 1998; Vučurović *et al.*, 2012). Los resultados demostraron que Argentina no es una excepción ya que ellos fueron detectados en las distintas regiones con porcentajes variables en los 6 años de muestreo, lo cual reafirmaría los importantes daños que estarían ocasionando en la producción de cucurbitáceas de nuestro país.

El WMV fue el virus más comúnmente detectado en cucurbitáceas cultivadas en Argentina (Perotto *et al.*, 2016), en este trabajo se detectó en todos los ambientes y con alta incidencia relativa (46%) confirmando lo observado anteriormente. Este alto valor se observa en todos los ambientes de estudio del presente trabajo, independientemente de si pertenece a un clima árido o templado, B o C, respectivamente según la clasificación de Köppen. Además, de nuestros resultados se desprende que aún con valores de umbral desfavorables (T_{med} mayores a 25,6°C) se predice una alta presencia de este virus (74%).

ZYMV y PRSV mostraron incidencias medias y muy similares (24% y 20% respectivamente), mientras que el CMV reveló la incidencia más baja, ya que es el virus menos común; los mismos resultados se observaron en estudios realizados en Sudáfrica (Ibaba *et al.*, 2015).

A partir de estos estudios, es posible inferir la presencia de enfermedades virales considerando la relación entre los virus y el ambiente, avalada por los resultados obtenidos con un alto soporte estadístico. Algunas especies de virus (CMV y WMV) están más influenciadas por variables de temperatura, mientras que otras por variables de precipitaciones y humedad relativa (PRSV y ZYMV), como se vio en este trabajo.

Además, los resultados muestran que cada ambiente presentaba más de un virus, independientemente de su heterogeneidad o variaciones de sus variables meteorológicas. Es posible atribuir esto a una disminución de la biodiversidad en las condiciones agrícolas, ya que la pérdida de biodiversidad en los agroecosistemas, entre otros factores, está correlacionada con los riesgos de infección y el desarrollo de la enfermedad en un determinado cultivo (Fraile *et al.*, 2017). A pesar de existir alrededor de 120 géneros de cucurbitáceas, en Argentina, el principal cultivo es el zapallo con 27.000 ha, de las cuales el 70% son del tipo *C. moschata*, el 30% restante son *C. maxima*. El hecho de que se utilice una misma especie en los distintos ambientes

evaluados y que en todos haya habido infección de más de un virus, podría indicar baja o nula interacción genotipo-ambiente. Además, se evidencia que todos los ambientes en estudio poseen un alto porcentaje de enfermedades virales, esto puede deberse a que la diversidad de especies y la composición de las comunidades vegetales afectan significativamente la prevalencia de los virus en los sistemas productivos (Power *et al.*, 2011). Por otro lado, existen prácticas de manejo habituales que no contemplan medidas de manejo integrado, tales como monitoreo de vectores, eliminación de plantas enfermas y de reservorios como pueden ser las malezas (Thresh, 2003; Scursoni *et al.*, 2019), siendo estas medidas necesarias para morigerar el impacto de las enfermedades virales en la producción de cucurbitas.

Si bien, en todos los ambientes evaluados, se encontró más de un virus, no todos se expresaron en la misma magnitud. Las variaciones en los porcentajes de infección de WMV, ZYMV, PRSV y CMV, entre los diferentes climas secos o templados podrían deberse a las condiciones climáticas que afectan a la transmisión del virus, la replicación viral, su incidencia, la gravedad de la enfermedad, el comportamiento de las plantas huéspedes y/o la biología de los vectores (Hull, 2009; Fajinmi, 2011).

El patrón espacial de regularidad proporciona información sobre la dinámica del patógeno. El IDR indicó una distribución al azar de los virus. Esta distribución puede ser atribuida a la disminución de la biodiversidad en las condiciones agrícolas, sumada a la falta de especies cultivadas mejoradas para resistencia/tolerancia a virus. El hecho que una práctica habitual entre los productores de cucurbitáceas, sea el intercambio de semillas, podría hacernos pensar en la contribución de ésta al aumento de la diversidad genética, sin embargo, la utilización de cultivares de origen nacional que no han sido mejoradas para resistencia/tolerancia a estos virus (Della Gaspera *et al.*, 2013), podría favorecer a la distribución aleatoria de los mismos. Dicho de otra forma, si el IDR hubiera alertado un patrón agregado de los virus, esto podría haber sido un indicio de que los factores ambientales se encontraban confundidos con la predisposición genética (susceptibilidad) a los virus.

Las altas temperaturas durante los 120 días del ciclo de cultivo favorecen la infección por CMV, lo que es consistente con otras observaciones (Alonso-Prados *et al.*, 2003), donde la incidencia de CMV se correlacionó positivamente con las temperaturas

máximas medias y las temperaturas medias, por otro lado, recientes trabajos han revelado que la temperatura elevada provocó un aumento de los síntomas y del título de este virus (del Toro *et al.*, 2017). Por el contrario, para WMV se observó una correlación negativa con las temperaturas, pero estos resultados no fueron coincidentes con lo reportado por otros autores (Alonso-Prados *et al.*, 2003), donde las temperaturas mínimas en invierno y primavera no favorecieron la epidemia. Esta contradicción podría deberse a que el período estudiado en nuestro trabajo es primavera-verano, no coincidiendo con las estaciones reportadas por Alonso-Prados *et al.* (2003). Estos resultados confirman que la temperatura es una variable que afecta diferencialmente a la interacción de huéspedes con diferentes virus de ARN (del Toro *et al.*, 2015). Por otro lado, ZYMV y PRSV, para ambos virus, la incidencia de las epidemias fue positiva correlacionándose con altas precipitaciones y humedad. Estas relaciones están fuertemente soportadas por los análisis multivariados (algoritmos CART) desarrollados en este capítulo que permitieron identificar las variables de mayor peso para explicar la presencia de cada virus y el valor (umbral) asociado a una probabilidad esperada.

Pueden presentarse situaciones donde en ambientes con condiciones favorables, según los algoritmos CART, no se detecte la presencia del virus. Estos ambientes deberán ser considerados como “ambientes de riesgo para el desarrollo de la enfermedad”. La información del algoritmo CART permitió obtener un valor de referencia que puede ser utilizado para anticipar una alta incidencia de la enfermedad de acuerdo con las condiciones ambientales prevalecientes durante el ciclo del cultivo.

El análisis de ACC evidenció correlación entre las variables bio-meteorológicas y las enfermedades virales, sugiriendo que el ambiente puede influir sobre el comportamiento de las enfermedades virales, lo cual es coincidente con lo reportado por Roossinck y García Arenal (2015), donde afirman que el medio ambiente favorece la dinámica epidémica de la infección viral.

El análisis estadístico inferencial basado en Modelos Lineales Mixtos, el cual fue ajustado para WMV, apoya los análisis exploratorios realizados donde se observa correlación entre las temperaturas y este virus.

Los resultados del estudio de verificación coinciden con lo observado en el estudio multiambiental donde se determinó que ZYMV y PRSV se encuentran en mayor proporción en zonas con altas humedad y precipitaciones durante el ciclo del cultivo.

Conclusión

Existe una fuerte relación entre la heterogeneidad ambiental y la aparición de las enfermedades virales estudiadas.

En todos los ambientes estudiados siempre se detectó más de un virus infectando los cultivos. El virus WMV estaba presente con el porcentaje más alto, seguido de ZYMV, PRSV y por último CMV.

La temperatura fue la variable que determinó una mayor predisposición a la presencia de WMV y CMV, mientras que la humedad relativa fue la variable biometeorológica que mejor describió la presencia de PRSV y ZYMV.

Una alta y significativa correlación fue detectada entre WMV y las temperaturas (T_{max} y T_{med}).

Los porcentajes de infección para los cuatro virus analizados son menores para fechas de siembras tempranas, mientras que las fechas de siembra tardías favorecen la presencia de tres de ellos (ZYMV, PRSV y WMV), para Santa Fe.

3.2.-CURVA DE PROGRESO DE LAS INFECCIONES VIRALES

Comprender la relación de la dinámica temporal de las enfermedades es necesario para conocer la forma en que se desarrollan las enfermedades en las poblaciones de los cultivos que son huéspedes. Una forma de medir el desarrollo de las enfermedades es evaluar varias veces la cantidad de enfermedad presente en una población de plantas, estos datos pueden presentarse en una curva de progreso de enfermedad (Xu, 2006).

Entender cómo se desarrollan las enfermedades a lo largo del tiempo, sería sumamente útil para elaborar estrategias de manejo que sean eficientes y eficaces de manera que sea una práctica sostenible.

Por otro lado, la información de la dinámica de la población de plagas junto con los parámetros climáticos predominantes (los cuales también influyen en el crecimiento y desarrollo del cultivo) es un requisito ineludible si se quiere lograr comprender interacciones que se pueden llevar a cabo en el agro-ecosistema (Sathyan *et al.*, 2018).

El propósito de este capítulo de tesis fue conocer como son las curvas de progreso de enfermedades virales que afectan cucurbitáceas y determinar cuáles eran las variables meteorológicas que más influenciaban a la dinámica poblacional de áfidos.

Materiales y métodos

Se efectuó un muestreo durante la campaña 2015/2016 en dos lotes en producción de cultivos, uno de zapallo y otro de melón en la Localidad de Pocito, Provincia de San Juan.

Se recolectaron 50 hojas (una por planta) en cada muestreo de cada cultivo, se identificaron y acondicionaron en el laboratorio para su posterior análisis para los virus WMV, PRSV, ZYMV y CMV (debido a que estos virus eran los que se detectaban con mayor porcentaje en San Juan) por DAS-ELISA y por RT-PCR (tal como se describió en el apartado del Capítulo 3 para la identificación de virus).

Se efectuaron 7 muestreos a partir de trasplante, siguiendo una transecta diagonal en los lotes, durante 7 semanas consecutivas. El porcentaje de incidencia se determinó en base a la relación entre el número de muestras positivas y el total de muestras recolectadas.

En el campo se colocaron trampas de agua tipo “Moericke” (Moericke, 1951) y trampas pegajosas para el monitoreo de pulgones (Fig. 20). El mismo se realizó mensualmente desde la campaña 2013/2014 hasta la campaña 2016/2017, la sumatoria de áfidos por año también fue obtenida según el tipo de trampa utilizada.

Las variables meteorológicas (T_{min}: temperatura mínima media; T_{md}: temperatura media media; T_{max}: temperatura media máxima; HR: humedad relativa media, TVAP: temperatura de vapor de agua; VV: velocidad del viento y PPacum: precipitaciones acumuladas producidas durante el ciclo de cultivo y el día de la

recolección de pulgones. Ver anexo 7), fueron suministradas por el Instituto de Clima y Agua de INTA Castelar

Se realizó estadística descriptiva calculando medidas resúmenes y tablas de frecuencia para las variables meteorológicas y el número de áfidos registrados durante las campañas 2013/2014 y 2016/2017. Para visualizar de la distribución del número total de áfidos respecto a las variables meteorológicas se realizó un gráfico de dispersión. Se realizó una comparación interanual de la cantidad de pulgones considerando variables meteorológicas como covariables a través de un ANCOVA. Los análisis estadísticos fueron realizados con InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2018). Para obtener las curvas promedio de progreso de la enfermedad se ajustaron modelos no lineales usando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2018) y su interface con el paquete R (R Core Team, 2018).



Fig. 20. Trampa de agua (izquierda) y trampa pegajosa (derecha) colocadas en el campo para el monitoreo de vectores.

Resultados

En el cultivo de melón se detectó mayor porcentaje de infección viral que en zapallo (92% y 86%, respectivamente). WMV fue el virus con mayor incidencia tanto en melón (92%) como en zapallo (86%), ZYMV y PRSV solo se detectaron en melón y con muy baja incidencia, siendo la misma del 4% y 10%, respectivamente, mientras que CMV también se detectó en este cultivo con baja incidencia (20%). En ambos cultivos se observaron las mayores incidencias de WMV al alcanzar la cuarta semana (Fig. 21). El modelo que mejor explicó el progreso de la enfermedad en el cultivo Gompertz, el cual fue seleccionado en base los criterios de información de Akaike (AIC) y Bayes

(Bayesian Information Criterion –BIC-), cuya regla de selección indica que el mejor modelo es aquel en el cual se estiman valores más bajos de AIC y BIC.

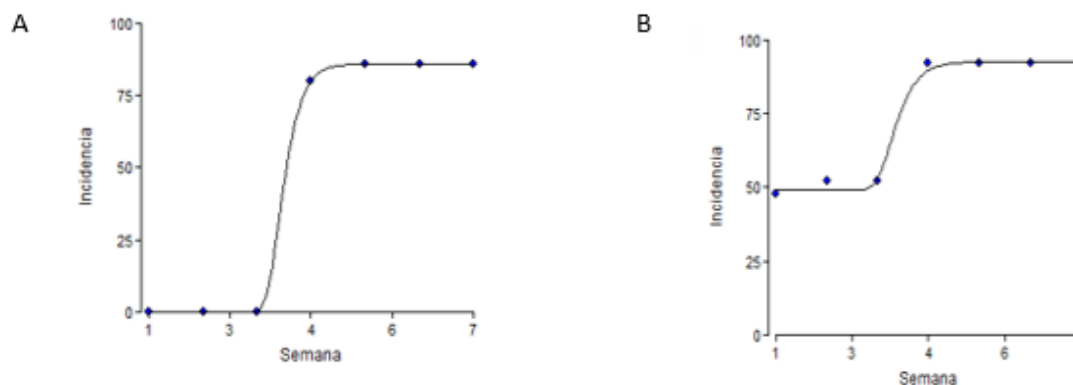


Fig. 21. A) Curva de progreso por semana de watermelon mosaic virus (WMV) en el cultivo de zapallo. B) Curva de progreso por semana de watermelon mosaic virus (WMV) en cultivo de melón.

El número de pulgones recolectados durante los años de muestreo y el tipo de trampa utilizada se detallaron en la Tabla 6. En el año 2014 y 2017 se obtuvo el mayor número de áfidos.

Tabla 6. Año de muestreo, tipo de trampa utilizada y número de pulgones recolectados.

| Año de muestreo | Tipo de trampa | N° de pulgones |
|-----------------|----------------|----------------|
| 2013 | TAA | 927 |
| 2014 | TAA | 1296 |
| 2015 | TAA | 595 |
| 2015 | TAP | 77 |
| 2016 | TAA | 403 |
| 2016 | TAP | 404 |
| 2017 | TAA | 1917 |

TAA: Trampa de agua. TAP: Trampa amarilla pegajosa.

Con respecto a la variación de la población de vectores en función de variables meteorológicas, se observó que aquellas que más influyeron en el número de áfidos fueron las PPacum y las Tmmin ambas variables con un p-valor <0,05. Los resultados expresan que existe una variación interanual o diferencias entre los años de la cantidad mensual de pulgones. Se determinó que la población de áfidos disminuye a medida que las PPacum y la variable de temperatura aumentan. En años con mayores precipitaciones, la cantidad de pulgones disminuye a una tasa de 0,58 (resultados no mostrados).

Además se observan picos de pulgones que luego caen de manera abrupta en los meses de Dic/13, May/14, Dic/14, Feb/16 (Fig. 22).

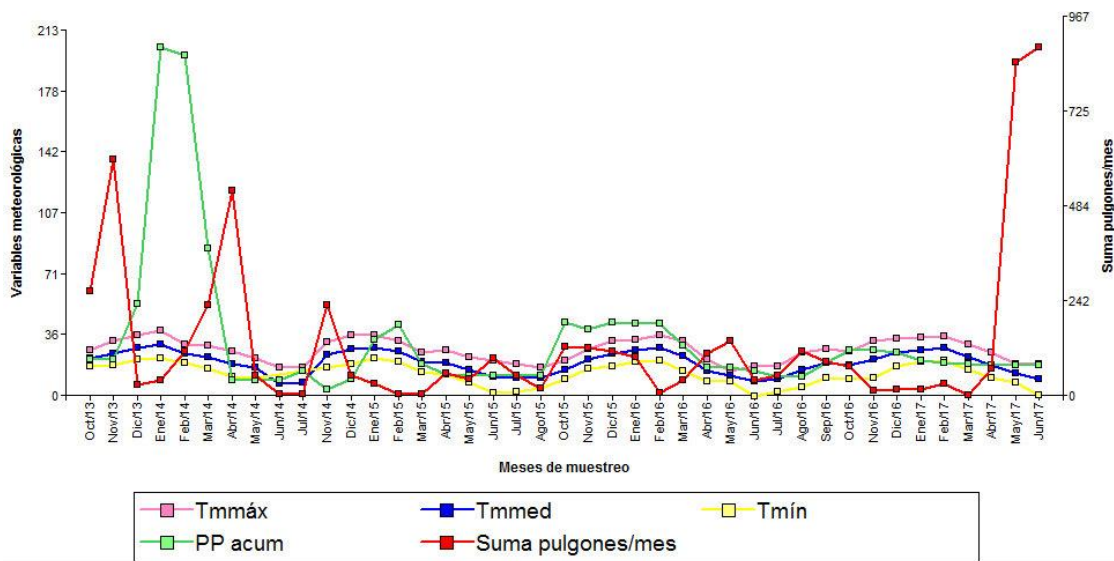


Fig. 22. Variación de población de áfidos (línea continua de color rojo) en función de las variables meteorológicas mensuales desde la campaña 2013/2014 a 2016/2017 inclusive.

Por otra parte, se detectó que el mayor número de pulgones se encuentra en las estaciones de primavera y otoño (resultados no mostrados).

Discusión

La curva de progreso de la enfermedad muestra el avance de la epidemia a través del tiempo representando el patrón de comportamiento de una epidemia en función del número de plantas enfermas. Estas curvas muestran las complejas interacciones entre el hospedante, el patógeno y el ambiente (Xu, 2006).

El estudio de las curvas de progreso de la enfermedad y la relación de las poblaciones de pulgones es uno de los primeros pasos para diseñar estrategias y técnicas de manejo necesarias para el control de una enfermedad. La curva de Gompertz mostró un incremento rápido de la enfermedad y una disminución en la tasa de infección a medida que aumenta la intensidad de la enfermedad. Trabajos recientes sobre modelos matemáticos aplicados a epidemias virales que han demostrado en cultivos de *C. pepo*, que mientras más plantas se infectan, la probabilidad de nuevas infecciones disminuye, ya que baja la proporción de plantas sanas no infectadas en el campo posibles de ser

infectadas, esto explica la disminución de la tasa de infección aparente a medida que aumenta la intensidad de la enfermedad (Gyamera *et al.*, 2015).

Diversas causas pudieron influir en la alta incidencia de WMV (92% para melón y 86% para zapallo) alcanzada en la cuarta semana luego del trasplante, como por ejemplo: la presencia de otras plantas de cucurbitas próximas al lote pueden ser consideradas como fuentes de inóculo para la diseminación del virus, en este sentido Kucharek y Purcifull (2001) mencionan que el inóculo primario de los virus transmitidos por áfidos de manera no- persistente proviene de huéspedes como las malezas, de campos de cucurbitáceas abandonados o cercanos al lote en producción. Por otro lado, la utilización de plantines infectados con WMV pudo ser otra de las causas que contribuyó a dispersar la enfermedad, considerando esta última posibilidad se observa que las plantas de melón ya comienzan con un porcentaje del 50% de incidencia en la primer semana lo cual podría ser una hipótesis válida contemplar que la introducción de WMV al lote de melón fue a partir de los plantines ya enfermos y tal vez a partir de éstos se diseminó la enfermedad al lote de zapallo.

Por otro lado, los insectos son considerados los principales vectores de virus y, entre ellos, los áfidos, mosca blanca y trips son los vectores más importantes. Los virus transmitidos por áfidos, como los potyvirus, son más extendidos y dañinos para los cultivos en las regiones templadas (Jones y Barbetti, 2012).

La sumatoria de pulgones obtenido por año de muestreo, es variable, esto puede deberse tanto a factores bióticos como abióticos y se observa que existen cambios rápidos en la población dependiendo de los meses de muestreo, esto concuerda con Kindlmann y Dixon (2010) quienes afirman que las oscilaciones extremadamente bruscas en el número de áfidos están causadas por factores intrínsecos (tamaño, fecundidad, mortalidad, tasa de migración) y externos (el clima, especialmente la temperatura).

En los años 2014 y 2017 existe un pico de pulgones en los meses de abril, estos aumentos coinciden con la disminución de las PPacum y Temperaturas. Como se mencionó anteriormente, WMV es transmitido por pulgones de manera no persistente y el pico de incidencia que se observa en la cuarta semana de muestreo (15/12/2015) coincide con los meses donde existe un aumento del número de vectores, luego a partir

de enero de 2016 esta población comienza a disminuir, posiblemente debido a los aumentos de temperatura (coincidiendo con los meses de verano). En particular, los áfidos son muy sensibles frente a pequeños cambios en las temperaturas ya que se ve afectada su tasa de reproducción y comportamiento (Jones, 2016), por ende la dinámica poblacional de los áfidos depende en gran medida de la temperatura (Wains *et al.*, 2010). Otros trabajos, afirman que las precipitaciones influyen sobre la dinámica de la población de áfidos, de hecho estas variables fueron significativas para nuestros estudios y éstas podrían ser también uno de los factores por los cuales las poblaciones de áfidos disminuyen, esto concuerda con Sathyan *et al.* (2018) donde reporta que la población de áfidos tuvo una asociación negativa con las lluvias. Numerosos trabajos han demostrado que existe una relación directa entre las lluvias y las temperaturas sobre parámetros entomológicos y el aumento del riesgo para contraer una enfermedad (Caminade *et al.*, 2019, Alonso-Prados *et al.*, 2003), de hecho, sólo estas dos variables fueron las únicas que influyeron significativamente en el número de áfidos. Además, otros factores propios de los vectores, tales como la eficiencia con la que adquieren un patógeno de huéspedes infectados puede variar con la temperatura debido a las diferencias en la actividad de alimentación del vector (Daugherty *et al.*, 2017).

Conclusión

Las variables que más afectaron al comportamiento de los vectores fueron las precipitaciones y temperaturas.

El pico de incidencia de WMV se observó a partir de la cuarta semana post-trasplante y fue el virus con mayor incidencia.

El cultivo de melón presentó mayor porcentaje de infección viral comparado con zapallo.

VARIABILIDAD GENÉTICA DE POTYVIRUS DE CUCURBITÁCEAS Y SU RELACIÓN CON EVENTOS EVOLUTIVOS

INTRODUCCIÓN

El estudio de las poblaciones de virus vegetales puede proporcionar información para comprender la estabilidad genética de la mayoría de los virus del ARN de las plantas a pesar de su elevado potencial de variación. Se conoce que la recombinación es un proceso que favorece la evolución mediante la generación de variación genética y es de sumo interés evaluar el impacto de la recombinación en la formación de las poblaciones de potyvirus. Sin embargo, se desconocen los procesos evolutivos que pueden determinar la estructura de la población de especies de *Potyvirus* en cucurbitas en Argentina.

La determinación de la variabilidad dentro de un grupo de virus y la comprensión de los mecanismos y factores que afectan a esta variabilidad tiene una importancia agronómica considerable, en particular para detectar genes de resistencia. (Safaeizadeh, 2008). Es por ello que el análisis de la variabilidad molecular y la estructura genética de los virus ayuda a comprender la historia evolutiva de los virus en relación con su virulencia, dispersión y aparición de nuevas epidemias (Seo *et al.*, 2009).

Por estas razones este capítulo de tesis tiene como finalidad estudiar la variabilidad molecular de WMV contemplando su genética poblacional, analizando procesos de recombinación y de selección, considerando que hasta la actualidad, no existen en Argentina estudios evolutivos sobre la estructura de la población de este virus. WMV fue elegido para hacer este análisis considerando que él es responsable de importantes daños en el cultivo, que es el más abundante en el país y por lo tanto, el causante de gran impacto en la producción (Perotto *et al.*, 2016). Además, se muestran resultados sobre análisis de procesos evolutivos de ZYMV.

4.1.-VARIABILIDAD MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE WMV EN ARGENTINA

El WMV es considerado uno de los más importantes potyvirus de Argentina, donde su presencia fue siempre confirmada en todos los muestreos desde su primera detección en 1971 (Nome *et al.*, 1974). La caracterización molecular del WMV se basa en la región de la inclusión nuclear de la proteína b (NIb) - proteína de la cápside (CP) (NIb-CP) que muestra una importante variabilidad genética, con tres grupos moleculares distintos: grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) y grupo 3 (G3) (Desbiez *et al.*, 2007). Posteriormente, G1 fue llamado clásico (CL), mientras que los aislamientos pertenecientes a G3 fueron llamados emergentes (EM) ya que corresponden a aislamientos más recientes de Europa (sólo identificados desde 1999) reemplazando progresivamente a los CL. Los G3 causan síntomas muy graves y se dividen en cuatro subgrupos, EM1 a EM4 (Desbiez *et al.*, 2009).

Debido a los rápidos cambios observados en este virus, la información disponible sobre la variabilidad genética necesita ser actualizada continuamente para una correcta interpretación de su complejidad. En este estudio, evaluamos la variabilidad molecular de los aislamientos de WMV de Argentina en base a las secuencias parciales de la región NIb-CP y los comparamos con los aislamientos previamente reportados a nivel mundial.

Materiales y métodos

Aislamientos virales

Se obtuvieron 46 aislamientos del WMV, provenientes de zapallos, calabazas, zucchinis y melones infectados naturalmente por el patógeno. Estos fueron recolectados entre 2011 y 2018 en las principales zonas de cultivo de cucurbitáceas del país, que incluyeron diez diferentes provincias de Argentina: Salta, Mendoza, San Juan, La Rioja, Tucumán, Santiago del Estero, Córdoba, Jujuy, Buenos Aires y Santa Fe (Fig. 23).



Fig. 23. Mapa de Argentina indicando (en gris) las provincias incluidas en este capítulo.
Nota: ST: Salta, MZA: Mendoza, SJ: San Juan, LR: La Rioja, TUC: Tucumán, SDE: Santiago del Estero, CBA: Córdoba, JUJ: Jujuy, BA: Buenos Aires, StaFe: Santa Fe.

Las muestras se etiquetaron y se registró la fecha de muestreo, la especie de cultivo, la fecha de plantación, las condiciones de crecimiento y los síntomas foliares. Las mismas se almacenaron a -80°C en bolsas de plástico selladas herméticamente hasta su uso posterior (Tabla 7). Posteriormente, se liofilizaron para realizar el análisis molecular.

Tabla 7. Muestras de cucurbitas recolectadas y secuenciadas de 10 provincias diferentes de Argentina, desde los años 2011 a 2018. Se indica número de acceso a la secuencia, año de recolección, provincia, identificación de la muestra y hospedante.

| Número de acceso | Año | Provincia | ID muestra | Hospedante |
|-------------------------|------------|------------------|-------------------|----------------------------|
| MN006911 | 2011/2012 | SDE | 13SDE | <i>Cucumis melo</i> |
| MN006932 | 2011/2012 | SJ | 4SJ | <i>Cucumis melo</i> |
| MN006934 | 2011/2012 | SJ | 5SJ | <i>Cucumis melo</i> |
| MN019129 | 2012/2013 | SJ | MQ57 | <i>Cucumis melo</i> |
| MN006909 | 2015/2016 | SJ | 10SJ | <i>Cucumis melo</i> |
| MN006925 | 2015/2016 | SJ | 26.1SJ | <i>Cucumis melo</i> |
| MN006937 | 2015/2016 | SJ | 6SJ | <i>Cucumis melo</i> |
| MN019130 | 2015/2016 | SJ | MQ4 | <i>Cucumis melo</i> |
| MN006945 | 2016/2017 | SJ | SJ2016 | <i>Cucumis melo</i> |
| MN006946 | 2016/2017 | SJ | SJLanda | <i>Cucumis melo</i> |
| MN006913 | 2017/2018 | CBA | 14CBA | <i>Cucumis melo</i> |
| MN006907 | 2017/2018 | SDE | 100SDE | <i>Cucumis melo</i> |
| MN006914 | 2017/2018 | LR | 150LRA | <i>Cucurbita lagenaria</i> |
| MN006915 | 2017/2018 | LR | 150LRA | <i>Cucurbita lagenaria</i> |
| MN006939 | 2011/2012 | SDE | 82SDE | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006940 | 2011/2012 | SDE | 83SDE | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006941 | 2011/2012 | SDE | 84SDE | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006942 | 2012/2013 | BA | 9BA | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN019131 | 2015/2016 | BA | ZQ80 | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006912 | 2015/2016 | ST | 13ST | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006921 | 2016/2017 | StaFe | 1StaFe | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006904 | 2017/2018 | CBA | 1.3CBA | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006905 | 2017/2018 | CBA | 1.8CBA | <i>Cucurbita maxima</i> |

| | | | | |
|----------|-----------|-------|---------|--|
| MN006928 | 2017/2018 | JUJ | 3.1JUJ | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006929 | 2017/2018 | JUJ | 3.5JUJ | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006930 | 2017/2018 | JUJ | 3.6JUJ | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006938 | 2017/2018 | TUC | 7.3TUC | <i>Cucurbita maxima</i> |
| MN006935 | 2016/2017 | CBA | 6CBA | <i>Cucurbita maxima</i> subs. <i>Andreana</i> |
| MN006916 | 2015/2016 | MZA | 1516MZA | <i>Cucurbita moschata</i> |
| MN006944 | 2015/2016 | SJ | SJ2015 | <i>Cucurbita moschata</i> |
| MN006920 | 2015/2016 | ST | 1ST | <i>Cucurbita moschata</i> |
| MN006931 | 2016/2017 | StaFe | 3StaFe | <i>Cucurbita moschata</i> |
| MN006919 | 2017/2018 | MZA | 19MZA | <i>Cucurbita moschata</i> |
| MN006922 | 2017/2018 | MZA | 21MZA | <i>Cucurbita moschata</i> |
| MN006908 | 2017/2018 | SDE | 10SDE | <i>Cucurbita moschata</i> |
| MN006910 | 2017/2018 | SDE | 12SDE | <i>Cucurbita moschata</i> |
| MN006917 | 2015/2016 | MZA | 1529MZA | <i>Cucurbita pepo</i> |
| MN006918 | 2015/2016 | MZA | 1538MZA | <i>Cucurbita pepo</i> |
| MN006943 | 2015/2016 | MZA | MZA2015 | <i>Cucurbita pepo</i> |
| MN006927 | 2015/2016 | SJ | 28SJ | <i>Cucurbita pepo</i> |
| MN006923 | 2015/2016 | ST | 23ST | <i>Cucurbita pepo</i> |
| MN006924 | 2015/2016 | ST | 24ST | <i>Cucurbita pepo</i> |
| MN006926 | 2015/2016 | ST | 27ST | <i>Cucurbita pepo</i> |
| MN006933 | 2016/2017 | MZA | 5MZA | <i>Cucurbita pepo</i> |
| MN006936 | 2016/2017 | MZA | 6MZA | <i>Cucurbita pepo</i> |
| MN006906 | 2017/2018 | TUC | 1.8TUC | <i>Cucurbita</i> sp. |

ST: Salta, MZA: Mendoza, SJ: San Juan, LR: La Rioja, TUC: Tucumán, SDE: Santiago del Estero, CBA: Córdoba, JUJ: Jujuy, BA: Buenos Aires, StaFe: Santa Fe.

Las muestras de hojas se analizaron para detectar la presencia de WMV mediante DAS-ELISA, según Clark y Adams (1977) (Anexo 6), utilizando anticuerpos policlonales de Bioreba (BIOREBA SRL Latin América, Mar del Plata, Argentina). Todas las muestras que resultaron positivas al WMV fueron sometidas a análisis moleculares para su caracterización genética.

Análisis molecular

A partir de hojas liofilizadas de plantas de cucurbitáceas infectadas por WMV se realizó la extracción del ARN total usando el kit de ARN total de tejidos y células (Real, Valencia, España). Las extracciones de ARN fueron analizadas por RT-PCR en un solo paso usando los cebadores WMV Nib-CP 5': CGTGCTGTAARCAAGGGKTGGGTC y WMV Nib-CP 3': CCATTCATWATCACACACCCCCATTTGMTC que amplifican un fragmento de ~943 pb de las regiones Nib y CP (Nib-CP). Se realizó un protocolo RT-PCR de un paso en un volumen total de 25 µl que contenía 2 µl de extracto total de ARN, 1X de buffer de reacción GoTaq® (Promega), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador 0,75 U de GoTaq®G2 DNA Polymerase (Promega), 1,2U de transcriptasa reversa AMV (Promega) y 20U RNase RNaseOUT™ inhibidor de ribonucleasa recombinante *Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). La amplificación se realizó de acuerdo con las siguientes condiciones: transcripción inversa a 46°C durante 30 min, seguida de desnaturalización a 95°C durante 5 min, y 34 ciclos de los siguientes pasos: 30 s a 94°C, 30 s a 56°C y 45 s a 72°C con extensión final de 10 min a 72°C.

Los productos RT-PCR fueron secuenciados (EUROFINS GENOMICS, Milán) en ambas direcciones y las secuencias ensambladas se depositaron en GenBank (NCBI; números de acceso en la Tabla 7).

Análisis de secuencias

Los fragmentos de Nib-CP fueron alineados por los programas Muscle y MAFF incluidos en el software Geneious R9 (Kearse *et al.*, 2012). Se incluyeron en el análisis otras secuencias de WMV disponibles en GenBank, para un total de 79 secuencias de nucleótidos. Un árbol evolutivo fue inferido usando la Maximum Likelihood basado en

el modelo Tamura-Nei y una distribución Gamma discreta (Tamura y Nei, 1993; Kumar *et al.*, 2016). El mejor método y modelo de sustitución de nucleótidos se seleccionó con el programa MEGA7. Se realizó un remuestreo de bootstrap (n=1000 bootstraps) en los árboles de distancia y parsimonia, Maximum Likelihood (ML), Neighbor Joining (NJ), y Maximum Parsimony (MP) para evaluar la significancia de las ramas de los árboles.

La distancia media de entre y dentro de los grupos (G1, G2 y G3) y subgrupos (EM1, EM2, EM3, EM4, EMArg) se calculó basándose en las distancias p dentro del el programa MEGA7.

Genética poblacional

Con el fin de calcular la diversidad de nucleótidos dentro de cada subgrupo se usaron la prueba D' de Tajima y la prueba de Fu para secuencias haploides (Tajima, 1989; Fu, 1997) utilizando el software Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Estas pruebas permiten comparar el número de mutaciones de baja frecuencia e intermedia en una alineación y detectar la selección natural en las secuencias de genes.

La extensión de la diferenciación genética, así como los niveles de flujo genético entre poblaciones (provincias) fueron estimados por el índice de fijación (FST) usando el software Arlequin 3.5. El valor absoluto de FST oscila entre 0 y 1 para poblaciones indiferenciadas y totalmente diferenciadas. Normalmente, un valor absoluto de $FST > 0,33$ sugiere un flujo genético poco frecuente, mientras que un valor absoluto de $FST < 0,33$ sugiere un flujo genético frecuente entre las poblaciones (Rozas *et al.*, 2003, 2017).

La distribución de la variabilidad genética entre las muestras argentinas se probó mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) implementado en el software Arlequin 3.5. Las provincias fueron consideradas como poblaciones. El nivel de significancia de los análisis se obtuvo mediante la realización de 1023 permutaciones.

Análisis de selección

Se estimó la relación entre la tasa de sustitución no sinónima (dN) y la sustitución sinónima (dS) por sitio (dN/dS), que proporciona una medida de la presión

de selección a nivel de proteína. Las sustituciones no sinónimas a una secuencia de nucleótidos causan un cambio en la secuencia de aminoácidos traducida, mientras que la sustitución sinónima no altera la secuencia de aminoácidos. Los eventos de selección de sitios específicos se identificaron incluyendo el conteo de ancestros de probabilidad única (SLAC), la probabilidad de efectos aleatorios (REL) y la prueba estadística de diversificación episódica sin restricciones en las ramas (BUSTED). Todos los métodos mencionados están disponibles en el servidor en línea de Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>) (Weaver *et al.*, 2018).

Análisis de recombinación

La búsqueda de eventos de recombinación en el fragmento analizado primero se realizó en forma visual con SimPlot (Ray, 1998), utilizando el modelo NJ y estableciendo 1000 réplicas de bootstrap. El análisis se realizó en la secuencia alineada (ventana 200 pb, paso 20 pb), con una corrección de Kimura (2 parámetros) para sustituciones múltiples.

Posteriormente, se evaluaron las pruebas de recombinación utilizando diferentes algoritmos compilados en el software RDP4 (Martin *et al.*, 2015): RDP, GENECONV, Chimaera, MaxChi, BOOTSCAN, SISCAN, LARD, PhylPro y 3Seq, con un valor límite de p corregido por Bonferroni de 0,05.

Cabe mencionar, que parte de la metodología desarrollada en este capítulo fue realizada por la doctorando durante una estadía en el “Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria – CREA; Centro di Ricerca Difesa e Certificazione - CREA-DC” en Roma, Italia.

Resultados

Análisis de secuencias

Se obtuvo un fragmento de ~943-bp NIB-CP para los 46 aislamientos de WMV argentinos recolectados entre 2011 y 2018. Se construyó un árbol filogenético ML a partir de la alineación de las secuencias nucleotídicas de estos aislamientos y otros disponibles en GenBank (Fig.24).

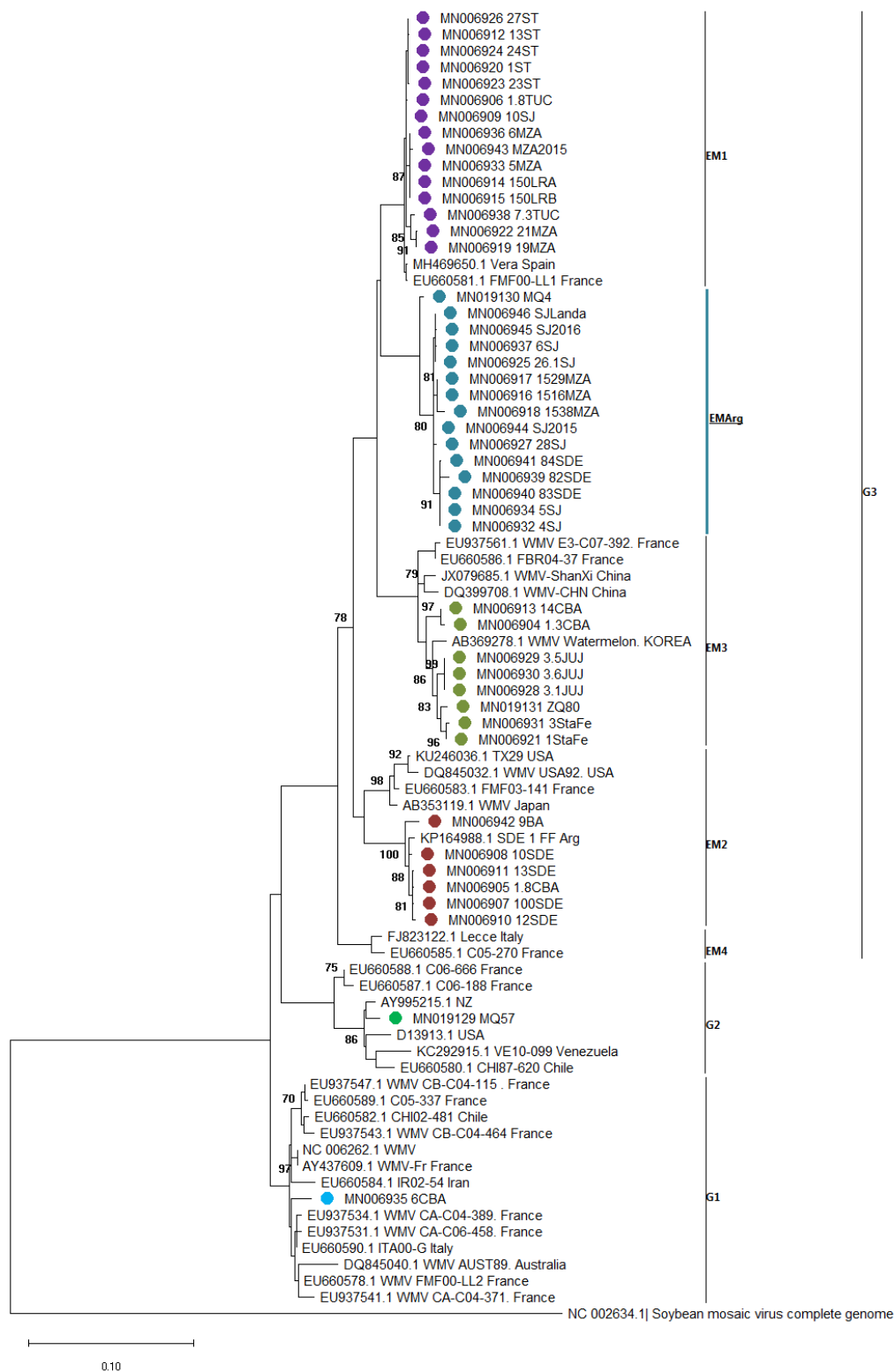


Fig. 24. Árbol filogenético de secuencias de watermelon mosaic virus (WMV).

Nota: árbol obtenido por el método de Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre los sitios. El árbol se muestra con el soybean mosaic virus como un outgroup. Se indican valores de bootstrap (1000 bootstraps) superiores al 70% para cada nodo. Los aislamientos argentinos obtenidos en este estudio se identificaron con un círculo completo.

Todos los árboles construidos han revelado el mismo resultado (los resultados para NJ y MP no se muestran). Los aislamientos de WMV fueron agrupados en 3 clados principales distintos que representan los grupos genéticos G1 a G3. Entre las muestras argentinas, el aislamiento MN006935 6CBA se agrupó en G1 y MN019129 MQ57 en G2, mientras que los 44 aislamientos restantes se incluyeron en G3. La traducción de la proteína confirma la disposición de los aislamientos en el árbol filogenético. Además, quince muestras de las provincias SJ, MZA y SDE formaron un sub-clúster separado, al que se denominó "EMArg".

La distancia p media intragrupo de las secuencias NIB-CP fue mayor en G3 ($0,045 \pm 0,012$) que en G1 y G2 ($p=0,031 \pm 0,009$ y $p=0,015 \pm 0,007$, respectivamente). La variabilidad de los intergrupos fue mayor entre G1 y G3 ($p=0,089 \pm 0,022$) que entre G1 y G2, y entre G2 y G3 ($p=0,057 \pm 0,019$ y $p=0,073 \pm 0,021$, respectivamente). Considerando sólo las secuencias de G3 de Argentina, el EMArg con los aislamientos de EM1, mostró una de las más bajas variabilidad en el intrasubgrupo $p = 0.007 \pm 0.001$ y $p = 0.005 \pm 0.001$ respectivamente, seguido por EM2 ($p = 0.008 \pm 0.002$) y EM3 ($p = 0.013 \pm 0.003$). La distancia genética de los aislamientos de EMArg fue de $0,05 (\pm 0,008)$ de los subgrupos EM1 y EM2, y de $0,07 (\pm 0,009)$ de EM3.

Genética de poblaciones y análisis de selección

El análisis de selección natural, la prueba D' de Tajima y la prueba de Fu, realizadas para las secuencias argentinas que conforman el grupo emergente (G3) fueron negativas y estadísticamente significativas ($D' = -2,03481$, $P = 0,005$; $FS = -12,63464$, $P = 0,0000$). Además, el nuevo subgrupo EMArg también fue significativamente negativo para la prueba Tajima D ($D' = -2,43774$, $P = 0,000$).

Los análisis de AMOVA mostraron que la mayor parte de la variabilidad genética total de los aislamientos argentinos estaba distribuida dentro de cada provincia (76,98%) y no entre ellas (valor de $P < 0,05$, 1023 permutaciones). El valor de F_{ST} entre los aislamientos de WMV fue de $0,23024$, lo que sugiere un flujo genético frecuente entre provincias.

Se investigó la tasa de dN/dS para evaluar la presencia de presión selectiva que influyó en la composición de la población de WMV. En todos los casos, analizando

solamente los subgrupos con las secuencias argentinas, la presión evolutiva fue la de selección negativa (purificadora), con una media de $dN/dS < 1$ que sugiere una tasa de fijación de reemplazo lenta, donde esa selección negativa ha actuado más fuertemente sobre los cambios de reemplazo. Entre los subgrupos del G3, el EMArg mostró un mayor número de mutaciones dN. Por otro lado, G1 y G2 mostraron valores de dN/dS (0,087 y 0,067 respectivamente) inferiores a G3 (0,125). No se encontraron pruebas que demostraran que la selección positiva actuaba sobre la NIB-CP de WMV mediante los métodos SLAC, REL o BUSTED.

Análisis de recombinación

Se detectó un evento mediante tres métodos diferentes, MaxChi, Chimaera y 3Seq, con valores de $P < 1 \times 10^{-3}$ para la agrupación de aislamientos en EM2. Se identificó un fragmento recombinante de 389nt entre las posiciones 119 y 508 de la región terminal de NIB. Los posibles parentales fueron MN006939 82SDE (padre mayor) y MN006922 21MZA (padre menor), ambos de Argentina y pertenecientes a los subgrupos EMArg y EM1 respectivamente.

Discusión

WMV es uno de los virus vegetales de importancia económica en el mundo y tiene una amplia gama de huéspedes, incluyendo al menos 170 especies y 27 familias de plantas (Niu *et al.*, 2017) y Argentina no es la excepción (Perotto *et al.*, 2016). Se sabe que los tres grupos moleculares del WMV muestran origen y sintomatología diferentes. Los aislamientos pertenecientes a G1 se consideran aislamientos "clásicos" debido a su temprana aparición en la cuenca mediterránea, y se asocian a síntomas leves. El G2 representa una clase molecular distinta y se originó en diferentes partes del mundo. Los aislamientos emergentes pertenecientes a G3 aparecieron desde principios del año 2000 en Europa, donde se correlacionaron con un aumento en la gravedad de los síntomas y reemplazaron rápidamente a los aislamientos de CL (Desbiez *et al.*, 2007, 2009; Wang *et al.*, 2017).

En estudios previos se obtuvo una secuencia completa de un aislamiento de WMV argentino recolectado en 2012, que pertenecía al G3 (Perotto *et al.*, 2016). En el análisis realizado en esta tesis, la mayoría de los aislamientos argentinos se ubicaron en los grupos emergentes (G3) con alto nivel de confianza. Un solo aislamiento fue agrupado en G1 (clásico) y otro en G2 (Fig.24), por otro lado, los tres grupos se correlacionaron con un motivo aminoacídico en la extremidad N-terminal de la CP. El grupo 1 suele tener un motivo "KEA", mientras que el grupo 2 muestra un "KET" y el grupo 3 un "KEKET" (Desbiez *et al.*, 2007), estos datos sugieren que la competencia entre los aislamientos de CL y los aislamientos de EM han llevado a la casi desaparición de los aislamientos de CL en Argentina como ya ocurrió en el mediterráneo (Perotto *et al.*, 2016; Lecoq y Desbiez, 2012; Joannon *et al.*, 2010). Además, las cepas de WMV-EM son más virulentas que las cepas de WMV-CL y la acumulación de virus es mayor que en las cepas de CL. Una mayor acumulación de virus puede estar asociada con mayores probabilidades de transmisión, lo que explicaría la rápida expansión de las cepas EM (Juarez *et al.*, 2013). Sin embargo, se dispone de poca información sobre la evolución temporal de las poblaciones de WMV en Argentina, ya que sólo se cuenta con un aislamiento argentino antiguo recolectado en 1994 (número de acceso DQ845043) perteneciente a G1 (Desbiez *et al.*, 2007). Por eso, es difícil decir si este grupo ha estado en Argentina desde hace mucho tiempo.

En el árbol filogenético, los clusters correspondientes a los principales grupos G1-G3 eran genéticamente homogéneos y no fragmentados. Por otro lado, la variabilidad inter-grupo fue mayor que la variabilidad intra-grupo, similar a lo reportado en otros estudios (Desbiez *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta estos resultados, es posible especular que las cepas emergentes pueden originarse a través de nuevas introducciones o ser el resultado de la evolución de las poblaciones locales. En el árbol filogenético, fue posible observar la separación de un nuevo subgrupo argentino (EMArg), diferente del ya descrito para los aislados europeos (Desbiez *et al.*, 2007), con alto nivel de confianza. Las pruebas estadísticas evaluadas utilizando D' y F_u de Tajima fueron significativamente negativas para G3 y EMArg, indicando la ocurrencia de la reciente expansión de la población de este grupo y subgrupo.

La comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos de las cepas aisladas de virus de plantas de diferentes orígenes geográficos ha permitido el análisis de la

estructura genética de algunas especies de virus de plantas en la mayor parte de su área de distribución geográfica (Moreno *et al.*, 2004). En este estudio, el análisis de AMOVA mostró que la mayor parte de la variabilidad genética de las muestras argentinas estaba distribuida dentro de las provincias y no entre ellas, lo que indicó que la agrupación molecular de los aislamientos no estaba bien correlacionada con su origen geográfico. La ausencia de diferenciación espacial de las poblaciones fue consistente con las observaciones realizadas en Francia y España por Desbiez *et al.* (2007) y Moreno *et al.* (2004) respectivamente. Análogamente, el valor de F_{ST} entre los aislamientos de WMV de las diferentes provincias de Argentina fue inferior a 0,33, lo que indicó un flujo genético relativamente frecuente entre provincias.

Se encontró que los valores medios de la relación dN/dS eran <1 , lo que indicó que la selección genética fue principalmente contra los cambios de aminoácidos, es decir, "selección negativa" o "selección purificadora", SLAC, REL y BUSTED, confirmaron la ausencia de eventos de selección positiva. Aunque las secuencias analizadas aquí son muy cortas para detectar una supuesta selección positiva, vale la pena notar que en otros estudios basados en las secuencias completas de WMV no se observaron pruebas sólidas de selección positiva (Desbiez y Lecoq, 2008), esto hace suponer que los virus de ARN, a pesar de su mayor tasa de mutación, son conocidos por mostrar una selección purificadora más fuerte que los virus de ADN (Hughes y Hughes, 2007).

Los eventos de recombinación representan una importante fuente de variación genética para los potyvirus (Gibbs y Ohshima, 2010). En este estudio, se detectaron siete recombinantes posibles entre 46 cepas de WMV. Curiosamente, el evento de recombinación involucró sólo a los aislamientos argentinos que pertenecen al grupo EM2 ya que no se detectaron indicios de recombinación para otras cepas de EM2 de EE.UU, Francia o Japón. Los posibles padres pertenecían a diferentes provincias, uno de Santiago del Estero (mayor parental) y otro de Mendoza (menor parental). Esto corroboró el flujo de genes entre diferentes orígenes geográficos.

Conclusión

Los aislamientos de WMV fueron agrupados en 3 clados principales distintos que representan los grupos genéticos G1 a G3. De las 46 muestras argentinas, 44 se agruparon en G3, mientras que los dos aislamientos restantes se incluyeron en G1 y G2. Dentro de G3, las muestras argentinas se distribuyeron en los subgrupos EM1, EM2 y EM3, ya descritos para las cepas europeas. Además, quince muestras argentinas formaron un sub-clúster separado, denominado "EMArg". Este es el primer estudio sobre la estructura poblacional de WMV en Sudamérica.

Los análisis de AMOVA mostraron que la mayor parte de la variabilidad genética de los aislamientos argentinos estaba distribuida dentro de cada provincia (76,98%) y no entre ellas.

Se detectó un evento recombinante para la agrupación de aislamientos en EM2, donde los posibles parentales fueron ambos de Argentina.

4.2.-EVOLUCIÓN MOLECULAR DE ZYMV

La proteína no estructural P3 de los potyvirus influye en la interacción virus-planta y una mutación simple en este fragmento puede causar síntomas más severos. Una sola mutación dentro de la proteína P3 del ZYMV fue suficiente para inducir una pérdida total de la tolerancia en *C. pepo* (Desbiez *et al.*, 2003).

Materiales y métodos

En el año 2015, se recolectaron hojas de un total de 10 plantas de *C. pepo* de lotes de cultivo de Mendoza y Salta que fueron analizadas serológicamente mediante DAS ELISA (Anexo 6) con antisuero para ZYMV (BIOREBA SRL Latin América, Mar del Plata, Argentina).

Las muestras positivas a los análisis serológicos (5), fueron utilizadas para la extracción de ARN total usando el kit de ARN total de tejidos y células (Real, Valencia, España). Las extracciones de ARN fueron analizadas por RT-PCR en un solo paso usando los cebadores que amplifican dos fragmentos de la P3, estos cebadores (aún no publicados) fueron diseñados y suministrados por el *Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria – CREA; Centro di Ricerca Difesa e Certificazione - CREA-DC*” en Roma.

Uno de ellos amplifica un fragmento de ~500 pb y otro de ~750, el primer par de cebadores fue P3F1-TGGTTATCACGTGCTCAAGG y P3R1-TTGCTGCAAATCTGC, mientras que el segundo par utilizado fue P3F2-TGCGCTGCATTTACTAACGA y P3R2-GGCGTCAAAGCACATAGT. Se realizó un protocolo RT-PCR de un paso en un volumen total de 25 µl que contenía 2 µl de extracto total de ARN, 1X de buffer de reacción GoTaq® (Promega), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador 0,75 U de GoTaq®G2 DNA Polymerase (Promega), 1,2U de transcriptasa reversa AMV (Promega) y 20U RNase RNaseOUT™ inhibidor de ribonucleasa recombinante *Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). La amplificación se realizó de acuerdo con las siguientes condiciones: transcripción inversa a 46°C durante 30 min, seguida de desnaturalización a 95°C durante 5 min, y 34 ciclos de los siguientes pasos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 45 segundos a 72°C con extensión final de 10 min a 72°C. Los productos RT-PCR (5 en total) fueron secuenciados (EUROFINS GENOMICS, Milán) en ambas direcciones.

Las secuencias fueron alineadas por los programas Muscle incluido en el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Se incluyeron en el análisis otras secuencias de ZYMV disponibles en GenBank y algunas aún sin publicar provenientes estudios realizados en el CREA-DC, con un total de 92 secuencias del fragmento P3. Un árbol evolutivo fue inferido usando la Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993; Kumar *et al.*, 2016). El mejor método y modelo de sustitución de aminoácidos se seleccionó con el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

El análisis de mutaciones se realizó mediante el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

Resultados

Cinco de las plantas de *C. pepo* provenientes de Argentina resultaron infectadas con ZYMV. El virus fue detectado en una planta perteneciente a una línea estabilizada obtenida en la Estación Experimental Agropecuaria de INTA La Consulta Mza (ZAC6-línea local), y otras provinieron de cultivares comerciales (ST6, ST23, ST24, ST25). De los 5 aislamientos argentinos en estudio, 3 de ellos presentaron una mutación en la posición 917 de la proteína P3, existió un cambio de R por G en los cultivares ST23 y ST24 y de R por N en el cultivar ST25. Esta mutación en los cultivares ST23 y ST24 fue acompañada por otra en la posición 242, mostrando un cambio de una G por S.

El análisis filogenético realizado con un total de 97 secuencias del fragmento en estudio, permitió determinar que la mutación en P3 no era la causante del agrupamiento de los aislamientos en el árbol filogenético. También permitió visualizar una gran variabilidad de los 5 aislamientos argentinos (Fig. 25).

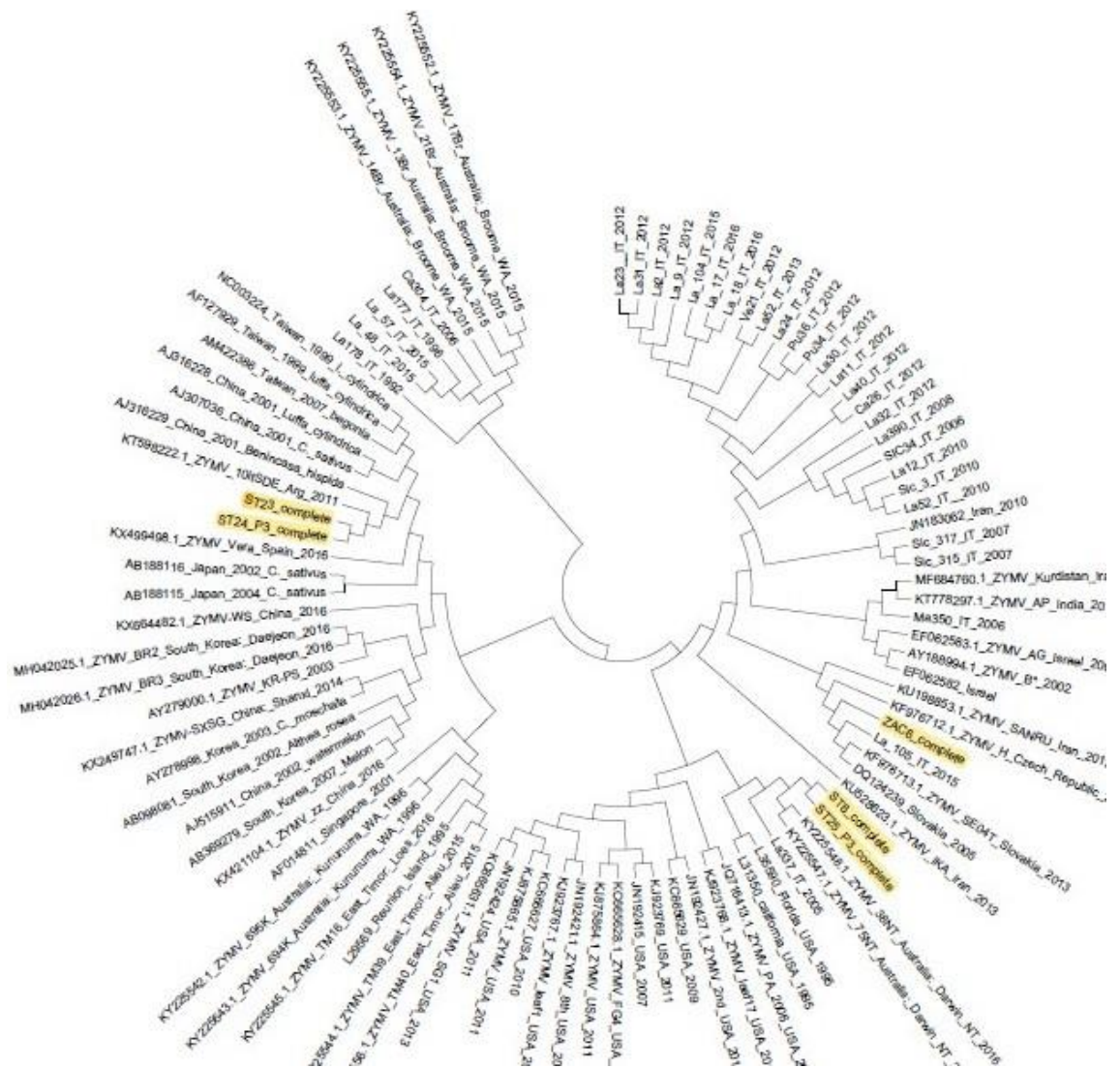


Fig. 25. Árbol filogenético para zucchini yellow mosaic virus (ZYMV).
 Nota: árbol obtenido por el método de Maximum Likelihood, realizado con 1000 bootstraps. Se indican resaltados en amarillo los aislamientos argentinos.

Discusión

ZYMV es uno de los virus más perjudiciales que afecta a las cucurbitáceas, produce mosaicos muy severos y distorsiones tanto en las hojas como en los frutos de las plantas infectadas (Desbiez *et al.*, 2002). Dentro del genoma del género *Potyvirus*, la proteína P3 se encuentra entre las proteínas más variables y se considera un factor clave en la virulencia (Desbiez *et al.*, 2003).

Una sola mutación en la P3 de ZYMV fue suficiente para superar la tolerancia en cultivos de zucchini (Desbiez *et al.*, 2003), esta mutación (R₉₁₇ N) en el motivo

MREK fue la que se encontró en los aislamientos virales que infectan líneas argentinas de *C. pepo* las cuales se comercializan actualmente, otros estudios revelan que existe un importante potencial de variabilidad en este motivo de la proteína P3 el cual puede superar rápidamente la tolerancia/resistencia natural en estos huéspedes (Yakoubi *et al.*, 2008c). Estas investigaciones sugieren que el cambio de aminoácidos particulares en el extremo N-terminal de la P3 puede inducir la ruptura de la resistencia. Además, se ha verificado que la infectividad del virus también cambia de forma parcial a completa en líneas de sandía susceptibles (Kang *et al.*, 2018), lo cual también refuerza la idea de numerosos trabajos donde se menciona que este fragmento puede estar relacionado con la interacción virus-patógeno.

Por otro lado, las dos mutaciones R₉₁₇ G en los aislamientos virales que infectan hospedantes comerciales argentinos también fue reportada en Túnez por Yakoubi *et al.* (2008c), estas alteraciones en el genoma son muy frecuentes en virus ARN que tienen una alta capacidad para generar divergencia genética a causa de una rápida replicación viral combinada con altas tasas de mutación (Duffy *et al.*, 2008) además, en este trabajo de tesis, se reporta por primera vez que esta mutación en la proteína P3 está acompañada por otro cambio secuencia arriba de una G por una S.

En el árbol filogenético se observa que las secuencias no se agrupan por la mutación en el fragmento P3, es decir la distribución de la mutación en la filogenia observada en este estudio posiblemente ocurrió al azar.

Si bien, en ninguno de los casos donde se detectaron las mutaciones se procedió a la inoculación y posterior evaluación del comportamiento sobre diferentes cultivares u hospedantes, en las muestras obtenidas a campo a partir del 2015, donde se detectó que las plantas estaban infectadas con ZYMV, se observaron síntomas muy severos y llamativos de la virosis. Estos resultados apoyan la teoría que la variabilidad de un virus es de gran importancia agronómica, en especial para buscar genes de resistencia, ya que la resistencia natural del hospedante puede ser rápidamente superada mediante la adaptación o divergencia del virus (Bananej *et al.*, 2008).

Conclusión

Los aislamientos obtenidos del ZYMV presentan mutaciones en la proteína P3, lo que le permite quebrar la tolerancia/resistencia a sus huéspedes.

Con sólo unos pocos aislamientos argentinos se detecta una gran variabilidad genética del virus.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

- Se identificó un nuevo miembro del género *Potyvirus*, para el cual se propuso el nombre cucurbit vein banding virus (CVBV). Este fue encontrado en infecciones simples y mixtas con otros potyvirus, watermelon mosaic virus (WMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) y papaya ringspot virus (PRSV).
- Se reportó por primera vez al groundnut ringspot virus (GRSV) infectando naturalmente el cultivo de cucurbitas (sandía) en Argentina.
- Se detectó por primera vez a zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) en Argentina.
- El virus más frecuente en cucurbitáceas en Argentina es watermelon mosaic virus con un 46% de incidencia, seguido por zucchini yellow mosaic virus y papaya ringspot virus en un 24 y 20%, respectivamente, y el menos frecuente es el cucumber mosaic virus presentándose en un 9%. Normalmente se detecta más de un virus infectando al cultivo.
- Watermelon mosaic virus estuvo presente en todas las regiones productoras, mientras que cucumber mosaic virus se presentó solo en los ambientes áridos.
- Cucumber mosaic virus se correlaciona positivamente con las temperaturas, mientras que watermelon mosaic virus lo hace en forma negativa.
- Condiciones de alta humedad relativa favorece el establecimiento de zucchini yellow mosaic virus y papaya ringspot virus.
- En la provincia de Santa Fe el virus más frecuente fue zucchini yellow mosaic virus, seguido de papaya ringspot virus y por último watermelon mosaic virus. Existieron diferencias entre la incidencia de los virus, la fecha de siembra y el rendimiento. Fechas de siembra más tempranas tuvieron menores porcentajes de infección viral. Se observó una evidente relación negativa entre el rendimiento obtenido y los porcentajes de infección viral. No se evidenciaron diferencias significativas entre lotes con y sin las diferentes formas de manejo de planchadas.
- En la provincia de San Juan, el cultivo de melón reveló mayor porcentaje de infección viral que el de zapallo. Watermelon mosaic virus fue el virus con

mayor incidencia en ambos cultivos, mientras que zucchini yellow mosaic virus, papaya ringspot virus y cucumber mosaic virus, sólo se detectaron en melón con muy baja incidencia. En ambos cultivos se observó la mayor incidencia de watermelon mosaic virus a la cuarta semana luego de la siembra, o post - trasplante.

- En la provincia de San Juan el número de áfidos se modificó por las precipitaciones y las temperaturas mínimas, durante las cuatro campañas evaluadas.
- El 95,7% de los aislamientos argentinos de watermelon mosaic virus estudiados, pertenecen al grupo de los que manifiestan síntomas más severos (grupo emergente, G3), mientras que los dos aislamientos restantes pertenecen a los grupos menos severos (G1 y G2). El 34% de los aislamientos emergentes formaron un nuevo sub-clúster, con escasa variabilidad intragrupal.
- La mayor parte de la variabilidad genética total de los aislamientos argentinos de watermelon mosaic virus está distribuida dentro de cada provincia y existe flujo génico relativamente frecuente entre las mismas.
- La población del grupo emergente de aislamientos argentinos de watermelon mosaic virus, incluyendo al subgrupo EMArg, se encuentran en reciente expansión en nuestro territorio.
- Existe un evento de recombinación detectado en siete aislamientos de watermelon mosaic virus, de los 46 evaluados.
- Tres aislamientos de zucchini yellow mosaic virus presentaron una mutación en la proteína P3 que les permitiría superar la tolerancia/resistencia del hospedante.
- La mutación en P3 en los aislamientos de zucchini yellow mosaic virus no fue la causa de la distribución de los aislamientos en el árbol filogenético.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

- Generar un sistema de pronóstico que permita adelantarse a las epidemias de los virus más importantes de cucurbitáceas de nuestro país.
- Cuantificar las pérdidas de rendimiento frente a las virosis
- Continuar con los monitoreos en áreas productoras para detectar nuevas virosis emergentes.
- Detectar otros hospedantes de los nuevos virus hallados en el capítulo 2 de esta tesis y estudiar sus variantes.
- Relacionar la sintomatología viral con las variantes virales, ya sea de los patógenos emergentes (como los identificados en el capítulo 2) o de los ya existentes en nuestro país pero que evidenciaron mutaciones en su genoma (como lo reportado en el capítulo 4 para la especie *Zucchini yellow mosaic virus*).
- Detectar fuentes de resistencia/tolerancia genética frente a virosis.
- Continuar con estudios moleculares y filogenéticos para detectar variabilidad genética.

BLIBLIOGRAFÍA

- Abou-Jawdah Y., Sobh H., El-Zammar S., Fayyad A. and Lecoq H. 2000. Incidence and management of virus diseases of cucurbits in Lebanon. *Crop Protection* 19: 217-224.
- Adams M.J., Antoniw J.F. and Beaudoin F. 2005a. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology* 6:471–487.
- Adams M.J., Antoniw J.F. and Fauquet C.M. 2005b. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology* 150: 459–479.
- Ali A., Mohammad O., Khattab A. and Science B. 2012. Distribution of viruses infecting cucurbit crops and isolation of potential new virus-like sequences from weeds in Oklahoma. *Plant Disease* 96: 243–248.
- Alonso-Prados J.L., Luis-Arteaga M., Alvarez J.M., Moriones E., Batlle A., Laviña A., García-Arenal F. and Fraile A. 2003. Epidemics of aphid-transmitted viruses in melon crops in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 109: 129–138.
- Altizer S., Dobson A., Hosseini P., Hudson P., Pascual M. and Rohani P. 2006. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecology letters* 9: 467-484.
- Archie E.A., Luikart G. and Ezenwa V.O. 2009. Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 21–30.
- Atreya P.L., Atreya C.D. and Pirone T.P. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 88:7887–7891
- Bag S., Mitter N., Eid S., and Pappu H.R. 2012. Complementation between Two Tospoviruses Facilitates the Systemic Movement of a Plant Virus Silencing Suppressor in an Otherwise Restrictive Host. *PLoS ONE* 7: e44803.
- Bananej K and Vahdat A. 2008. Identification, distribution and incidence of viruses in field-grown cucurbit crops of Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 247–257.
- Bananej K., Keshavarz T., Vahdat A., Hosseini Salekdeh G. and Glasa M. 2008. Biological and molecular variability of Zucchini yellow mosaic virus in Iran. *Journal of Phytopathology* 156: 654-659.
- Bao Y., Chetvernin V. and Tatusova T. 2014. Improvements to pairwise sequence comparison (PASC): a genome-based web tool for virus classification. *Archives of Virology* 159:3293–3304.
- Bezerra I.C., Resende R., Pozzer L., Nagata T., Kormelink R. and De Avila A.C. 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new Tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology* 89:823-830.

- Biek R. and Real L.A. 2010. The landscape genetics of infectious disease emergence and spread. *Molecular Ecology* 19: 3515–3531.
- Bisognin D. A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural* 32: 715-723.
- Blancard D., Lecoq H. and Pitrat M. 1994. A colour atlas of cucurbit diseases: observation, identification and control. Manson Publishing Ltd, London, UK, 299 pp.
- Boari A.J., Maciel-Zambolim E., Lau D.D., Lima G. S.A., Kitajima E.W., Brommonschenkel S. S. H. and Zerbini F.M. 2002. Detection and partial characterization of an isolate of Groundnut ringspot virus in *Solanum sessiliflorum*. *Fitopatologia Brasileira* 27: 249–253.
- Camelo-García V., Lima É. and Rezende J. 2015. Identification of natural hosts of Zucchini lethal chlorosis virus. *Tropical Plant Pathology* 40: 345-349.
- Caminade C., McIntyre K. and Jones A. 2019. Impact of recent and future climate change on vector borne diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1436: 157-173.
- Chang L., Zhang Z., Yang H., Li H. and Dai H. 2007. Detection of strawberry RNA and DNA viruses by RT-PCR using total nucleic acid as a template. *Journal of Phytopathology* 155: 431-436.
- Chevreux B., Pfisterer T., Drescher B., Driesel A.J., Muller W.E.G., Wetter T. and Suhai S. 2004. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome Research* 14: 1147-1159.
- Childers C. C. and Achor D.S. 1995. Thrips feeding and oviposition injuries to economic plants, subsequent damage and host responses to infestation, pp. 31-50. Parker B.L., Skinner M., Lewis T. (eds) *Thrips Biology and Management*. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 276. Springer, Boston, MA
- Chung B., Miller W., Atkins J. F. and Firth A.E. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 5897-5902.
- Ciuffo M., Kurowski C., Vivoda E., Copes B., Masenga V., Falk B.W. and Turina M. 2009. A new Tospovirus sp. in cucurbit crops in Mexico. *Plant Disease* 93: 467-474.
- Clark M.F. and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Coutts B.A., Kehoe M.A. and Jones R.A.C. 2011. Minimising losses caused by Zucchini yellow mosaic virus in vegetable cucurbit crops in tropical, sub-tropical and Mediterranean environments through cultural methods and host resistance. *Virus Research* 159: 141–160.
- Daugherty M., Zeilinger A. and Almeida R. 2017. Conflicting effects of climate and vector behavior on the spread of a plant pathogen. *Phytobiomes* 1: 46-53.

- de Avila A.C., de Haan P., Kormelink R., Resende R.O., Goldbach R.W. and Peters D. 1993. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology* 74:153–159.
- de Breuil S., La Rossa F.R., Giudici A., Wulff A., Bejerman N., Giolitti F. y Lenardon, S. 2015. Phylogenetic analysis of Groundnut ringspot virus isolates from peanut and identification of potential thrips vectors in peanut crop in Argentina. *Agriscientia* 32: 77-82.
- de Breuil S., Abad J.A., Nome C.F., Giolitti F.J., Lambertini P. L. and Lenardon S. 2007. Groundnut ringspot virus: an emerging tospovirus inducing disease in peanut crops. *Journal of Phytopathology* 155: 251–254.
- del Toro F.J., Rakhshandehroo F., Larruy B., Aguilar E., Tenllado F. and Canto T. 2017. Effects of simultaneously elevated temperature and CO₂ levels on *Nicotiana benthamiana* and its infection by different positive-sense RNA viruses are cumulative and virus type-specific. *Virology* 511: 184-192.
- del Toro F.J., Aguilar E., Hernández-Walias F.J., Tenllado F., Chung B.N. and Canto T. 2015. High temperature, high ambient CO₂ affect the interactions between three positive-sense RNA viruses and a compatible host differentially, but not their silencing suppression efficiencies. *PLoS One* 10: e0136062.
- Della Gaspera P., Rodríguez R.A., Elisei V.R., Ayastuy M.E., Khier M., Miglierina A. M. y Delhey R. 2013. Manual del cultivo del zapallo anquito (*Cucurbita moschata Duch*). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Pedro Della Gaspera, Mendoza, Argentina, 175pp.
- Desbiez C., Joannon B., Wipf-Scheibel C., Chandeysson C. and Lecoq H. 2009. Emergence of new strains of Watermelon mosaic virus in South-eastern France: Evidence for limited spread but rapid local population shift. *Virus Research* 141: 201–208.
- Desbiez C. and Lecoq H. 2008. Evidence for multiple intraspecific recombinants in natural populations of Watermelon mosaic virus (WMV, Potyvirus). *Archives of Virology* 153: 1749–1754.
- Desbiez C., Costa C., Wipf-Scheibel C., Girard M. and Lecoq H. 2007. Serological and molecular variability of watermelon mosaic virus (genus *Potyvirus*). *Archives of Virology* 152: 775-781.
- Desbiez C., Gal-On A., Girard M., Wipf-Scheibel C. and Lecoq H. 2003. Increase in Zucchini yellow mosaic virus symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Phytopathology* 93: 1478–1484.
- Desbiez C., Wipf-Scheibel C. and Lecoq H. 2002. Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus) with special reference to Caribbean islands. *Virus Research* 85: 5-16.
- Dewey R.A., Semorile L.C. and Grau O. 1996. Detection of Tospovirus species by RT-PCR of the N-gene and restriction enzyme digestions of the products. *Journal of Virological Methods* 56: 19–26.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo Y.C. 2018. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Duffy S., Shackelton L. and Holmes E. 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics* 9: 267–276.
- Enz M. and Dachler C. 1998. Compendio para la identificación de los estadios fenológicos de especies mono-y dicotiledóneas cultivadas. Escala BBCH extendida. BBA, BSA, IGZ, IVA, AgrEvo, BASF, Bayer y Novartis, 123 pp.
- Excoffier L., Smouse P. E. and Quattro J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier L. and Lischer H. E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Fajinmi A. 2011. Agro-ecological incidence and severity of Pepper veinal mottle virus, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*, on cultivated pepper (*Capsicum annuum* L.) in Nigeria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 44: 307-319.
- FAOSTAT, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division [<http://www.fao.org/faostat/en/#compare>]. Último acceso 08 julio 2019.
- Feldman J.M. and Gracia O. 1992. Un nuevo virus de cucurbitáceas en Argentina: el virus de la mancha anillada de la papaya. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 23: 63–67.
- Fraile A., McLeish M.J., Pagán I., González-Jara P., Piñero D. and García-Arenal F. 2017. Environmental heterogeneity and the evolution of plant-virus interactions: Viruses in wild pepper populations. *Virus Research* 241: 68–76.
- Francki R.I.B., Mossop D.W. and Hatta T. 1979. Cucumber mosaic virus CMI/AAB. *Description of Plant Viruses*. No. 213: 6 pp.
- French R. and Stenger D. 2005. Genome sequences of Agropyron mosaic virus and Hordeum mosaic virus support the reciprocal monophyly of the genera *Potyvirus* and *Rymovirus* in the family *Potyviridae*. *Archives of Virology* 150: 299–312
- Fu Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Gabriel K.R. 1971. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika* 58: 453-467.
- Gacetilla Informativa del Sector Agroalimentario. 2006. Publicado en internet, disponible en https://www.agroindustria.gob.ar/new/00/programas/dma/newsletters/nro15/newsletter_01_melon-2006-06-03.php. Activo julio 2019.
- Gal-On A. 2000. A point mutation in the FRNK motif of the potyvirus helper component-protease gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. *Phytopathology* 90:467–473

- Gal-On A. 2007. Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity—the tails of two proteins. *Molecular Plant Pathology* 8: 139–150.
- Gambino G., Perrone I. and Gribaudo I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis* 19: 520-525.
- German T., Ullman D. and Moyer J. 1992. Tospoviruses: Diagnosis, Molecular Biology, Phylogeny, and Vector Relationships. *Annual Review of Phytopathology* 30: 315–348.
- Giampan J.S., Rezende J.A. M. and Silva R.F. 2007. Reaction of cucurbits species to infection with Zucchini lethal chlorosis virus. *Scientia Horticulturae* 114: 129-132.
- Giampan J.S., Rezende J. and Piedade S. 2009. Danos causados pelo Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) sobre a produção de frutos comerciais de abobrinha de moita ‘Caserta’. *Summa Phytopathologica* 35: 223-225.
- Gibbs A.J. and Ohshima K. 2010. Potyviruses and the digital revolution. *Annual Review Phytopathology* 48: 205–223.
- Gilligan C. A. 2008. Sustainable agriculture and plant diseases: an epidemiological perspective. *Philosophical transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 363: 741–759.
- Giomi T., Runhaar P. and Runhaar H. 2018. Reducing agrochemical use for nature conservation by Italian olive farmers: An evaluation of public and private governance strategies. *International journal of agricultural sustainability* 16: 94-105.
- Goldbach R. and Kuo G. 1996. International Symposium on tospoviruses and thrips of floral and vegetable crops. Introduction. *Acta Horticulturae* 431: 21-26.
- Gracia O. 2000. First report of Zucchini yellow mosaic virus in Argentina. *Plant Disease* 84: 371-371.
- Gracia O. y Feldman J.M. 1986. Virus identificados en cultivos de cucurbitáceas. *IDIA*, 445-448: 1–6.
- Gyamera E., Amoatey H. and Owusu G. 2015. Spatial and Temporal Spread Patterns of Viral Diseases on a Zucchini Squash Field in the Coastal Savannah Zone of Ghana. *Plant Pathology Journal* 14: 58-64.
- Harvell C.D., Mitchell C.E., Ward J.R., Altizer S., Dobson A.P., Ostfeld R. S. and Samuel M.D. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296: 2158-2162.
- Holkar S.K., Mandal B., Reddy M. K. and Jain R.K. 2019. Watermelon bud necrosis orthotospovirus. An emerging constraint in the Indian subcontinent: An overview. *Crop protection* 117: 52-62.
- Hughes A. L. and Hughes M. A. 2007. More effective purifying selection in RNA viruses than in DNA viruses. *Gene* 404: 117–125.
- Hull R. 2009. *Comparative plant virology*, second edition. Academic press. Norwich, Reino Unido, 393 pp

- Ibaba J.D., Laing M. D. and Gubba A. 2015. Incidence and phylogeny of viruses infecting cucurbit crops in KwaZulu-Natal, Republic of South Africa. *Crop Protection* 75: 46–54.
- Ibaba J. D., Laing M. D. and Gubba A. 2016. Zucchini shoestring virus: a distinct potyvirus in the papaya ringspot virus cluster. *Archives of Virology* 161: 2321-2323.
- ICTV 9th Report 2011. Negative Sense RNA Viruses. Bunyaviridae – Figures. Publicado en internet, disponible en: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses/2011/w/negrna_viruses/206/bunyaviridae-figures. Activo en julio 2019.
- Jain R.K., Pappu H.R., Pappu S.S., Krishna Reddy M. and Vani A. 1998. Watermelon bud necrosis tospovirus is a distinct virus species belonging to serogroup IV. *Archives of Virology* 143:1637-1644.
- Jeger M. J. 2009. Epidemiology of Plant Disease. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0021268
- Joannon B., Lavigne C., Lecoq H. and Desbiez C. 2010. Barriers to gene flow between emerging populations of Watermelon mosaic virus in southeastern France. *Phytopathology* 100: 1373-1379.
- Jones D.R. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology* 113:119–157.
- Jones D.T., Taylor W.R. and Thornton J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8:275–282
- Jones R. and Barbetti M. 2012. Influence of climate change on plant disease infections and epidemics caused by viruses and bacteria. *Plant Sciences Reviews* 22: 1-31.
- Jones R. 2016. Future scenarios for plant virus pathogens as climate change progresses. *Academic Press. Advances in Virus Research* 95: 87-147.
- Juarez M., Legua P., Mengual C. M., Kassem M. A., Sempere R. N., Gómez P. and Aranda M. A. 2013. Relative incidence, spatial distribution and genetic diversity of cucurbit viruses in eastern Spain. *Annals of Applied Biology* 162: 362-370.
- Kang B., Peng B., Wu H., Liu L., Wu W. and Gu Q. 2018. Host-associated selection of a P3 mutant of zucchini yellow mosaic virus affects viral infectivity in watermelon. *Archives of virology* 163:1449-1454.
- Kasschau K. D. and Carrington J. C. 2001. Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* 285: 71-81.
- Kato K., Handa K. and Kameya-Iwaki M. 2000. Melon yellow spot virus: a distinct species of the genus Tospovirus isolated from melon. *Phytopathology* 90: 422-426.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., and Drummond A. 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software

- platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649
- Kehoe M.A., Coutts B.A., Buirchell B.J. and Jones R.A.C. 2014. Split personality of a potyvirus: to specialize or not to specialize. *PLoS One* 9:e105770
- Kindlmann P. and Dixon A.F. 2010. Modelling population dynamics of aphids and their natural enemies. In *Aphid biodiversity under environmental change* (pp. 1-20). Springer, Dordrecht.
- Koh S.H., Li H., Admiraal R., Jones M.G. K. and Wylie S.J. 2015. *Catharanthus* mosaic virus: a potyvirus from a gymnosperm, *Welwitschia mirabilis*. *Virus Research* 203:41–46.
- Köklü G. and Yilmaz Ö. 2006. Occurrence of cucurbit viruses on field-grown melon and watermelon in the Thrace region of Turkey. *Phytoprotection* 87: 123-130.
- Kone N., Asare-Bediako E., Koita O., Kone D. and Winter S. 2017. Seasonal and spatial variation in the prevalence of viral diseases and associated aphid-borne viruses in cucurbits in Cote d'Ivoire. *Annals of Agricultural Sciences* 62: 227-234.
- Köppen W. In: *Handbuch der Klimatologie*, B.d. 1, Teil C. Köppen W., and Geiger R., editor. Borntraeger, Berlin. 1936. *Das Geographische System der Klimate (The Geographic System of Climates)*.
- Kottek M., Grieser J., Beck C., Rudolf B., and Rubel F. 2006. World map of the Köppen- Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* 15: 259-263.
- Koressaar T. and Remm M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 23: 1289-1291.
- Kotten M., Grieser J., Beck C., Rudolf B. and Rubel F. 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* 15: 259–263.
- Ksenofontov A.L., Paalme V., Arutyunyan A.M., Semenyuk P.I., Fedorova N.V., Rumvold R., Baratova L., Järvekülg I. and Dobrov E. 2013. Partially Disordered Structure in Intraviral Coat Protein of Potyvirus Potato Virus A. *PLoS ONE* 8: e67830.
- Kucharek T.A. and Purcifull D.E. 2001. Aphid-transmitted viruses of cucurbits in Florida. *Florida Cooperative Extension Service Circular* 1184: 11.
- Kumar S., Stecher G. and Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874
- Kumari S., Nagendran K., Rai A.B., Singh B., Rao G.P., and Bertaccini A. 2019. Global Status of Phytoplasma Diseases in Vegetable Crops. *Frontiers in Microbiology* 10: 1349. doi:10.3389/fmicb.2019.01349
- Leão E., Spadotti D., Rocha K., Pantoja K., Rezende J., Pavan M., and Krause- Sakate R. 2015. *Citrullus lanatus* is a new natural host of Groundnut ringspot virus in Brazil. *Journal of Phytopathology* 163: 1014-1018.
- Lecoq H. and Katis N. 2014. Control of cucurbit viruses. *Academic Press. Advances in virus Research* 90: 255-296.

- Lecoq H. and Desbiez C. 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture. Academic Press. *Advances in Virus Research* 84: 67-126.
- Lecoq H. 2003. Cucurbits. *Virus and Virus-Like Diseases of Major Crops in Developing Countries*, Loebenstein, G. and G. Thottappilly (Eds.). Springer, New York, USA, ISBN-13: 9781402012303, pp: 665-687.
- Lecoq H., Wisler G. and Pitrat M. 1998. Cucurbit viruses: the classics and the emerging. *Cucurbitaceae* 98: 126-142.
- Lima R., De Oliveira A., Leastro M., Blawid R., Nagata T., Resende R. and Melo F. 2016. The complete genome of the tospovirus Zucchini lethal chlorosis virus. *Virology Journal* 13: 123.
- Loebenstein G. and Lecoq H. 2012. Viruses and virus diseases of vegetables in the Mediterranean basin. Academic Press. Groundnut ringspot virus in Brazil. *Journal of Phytopathology* 163: 1014-1018.
- Lommel S.A., McCain A.H. and Morris T.J. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* 72: 1018-1022.
- Luis-Arteaga M., Alvarez J.M., Alonso-Prados J.L., Bernal J.J., García-Arenal F., Laviña A., Batlle A. and Moriones E. 1998. Occurrence, distribution, and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. *Plant Disease* 82: 979-982.
- Maes P., Adkins S., Alkhovsky S. V., Avšič-Županc T., Ballinger M. J., Bente D. A., Beer M., Bergeron E., Blair C. D., Briese T., Buchmeier M. J. et al. 2019. Taxonomy of the order Bunyavirales: second update 2018. *Archives of Virology*, 164, 927-941.
- Maciel S.C., Silva R.F., Da Reis M.S., Jadão A.S., Rosa D.D., Giampan J.S., Kitajima E.W., Rezende J.A.M. and Camargo L.E. 2011. Characterization of a new potyvirus causing mosaic and flower variegation in *Catharanthus roseus* in Brazil. *Scientia Agricola* 68:687–690
- Manacorda C. 2013. Estudio de los cambios transcriptómicos producidos por infecciones virales en plantas, rol de fitohormonas y su vinculación con la progresión de síntomas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 252 pp.
- Mangrauthia, S. K., Jain, R. K., & Praveen, S. (2008). Sequence motifs comparisons establish a functional portrait of a multifunctional protein HC-Pro from papaya ringspot potyvirus. *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, 17: 201-204.
- Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A. and Muhire B. 2015. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1:1–5
- Massumi H., Samei A., Pour A. H., Shaabani M. and Rahimian H. 2007. Occurrence, distribution, and relative incidence of seven viruses infecting greenhouse-grown cucurbits in Iran. *Plant Disease*. 91: 159–163.
- Meentemeyer R. K., Haas S. E. and Vaclavik T. 2012. Landscape epidemiology of emerging infectious diseases in natural and human-altered ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 50: 379–402.

- Michelotto M., Carrega W., Lamana L., de Souza T., de Godoy I., dos Reis L., Menezes Sales A. and Carvalho R. 2019. Losses caused by Groundnut ringspot tospovirus in peanut crop in the State of São Paulo. *Semin. Ciências Agrárias* 40: 3429-3442.
- Miglino R., Drufel K. L. and Pappu H.R. 2010. Identification and molecular characterization of a new potyvirus infecting *Triteleia* species. *Archives of Virology* 155:441–443
- Ministerio de Economía. 2009. Plan de competitividad del Conglomerado Hortícola del Cinturón Verde de Resistencia, Chaco. Programa Competitividad Norte Grande, 42. Publicado en internet, disponible en http://www.mecon.gov.ar/programanortegrande/docs/chaco_hortic_pc_resumen.pdf. Ministerio de Economía y Finanzas Públicas Secretaría de Política Económica. Activo julio 2019.
- Ministerio de Educación 2010. La horticultura en Argentina, Informe Final. Catálogo Inet. Publicado en internet, disponible en catalogo.inet.edu.ar/files/pdfs/info_sectorial/horticultura-informe-sectorial.pdf. Activo julio 2019.
- Minoche A.E., Dohm J. C. and Himmelbauer H. 2011. Evaluation of genomic high-throughput sequencing data generated on Illumina HiSeq and Genome Analyzer systems. *Genome Biology* 12: R112.
- Moericke V. 1951. Eine Farbfalle zur Kontrolle des Fluges von Blattläusen, insbesondere der Pfirsichblattlaus, *Myzodes persicae* (Sulz.). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 3: 23-24.
- Mofunanya A. A. J., Owolabi A. T. and Nkang A. 2014. Effects of Telfairia mosaic virus (TeMV) on the chlorophyll content and photosynthetic capabilities of two ecotypes of *Telfairia occidentalis* Hook. f. (fluted pumpkin). *International Journal of Plant Pathology* 5: 54-62.
- Mohammed H.S., Zicca S., Manglli A., Mohamed M.E., El Siddig M. A., Tomassoli L. and El Hussein A.A. 2014. Identification and phylogenetic analysis of common pumpkin viruses in Sudan. *Journal of Plant Pathology* 96:77–84.
- Mohammed H., Manglli A., Zicca S., El Hussein A., Mohamed M. and Tomassoli L. 2012. First report of Papaya ringspot virus in pumpkin in Sudan. *New Disease Reports* 26: 26.
- Moreira A.S., Cônsoli R., Barbosa J., Filho A. and Rezende J. 2014a. Spatio temporal Dynamics of Zucchini Squash Lethal Chlorosis and its Relationship with the *Frankliniella zucchini* population. *Journal of Phytopathology* 162: 481–490.
- Moreira A.S., Filho A. B. and Rezende J.A.M. 2014b. Comparative Epidemiology of Three Virus Diseases on Zucchini Squash. *Journal of Phytopathology* 163: 386–394.
- Moreno I.M., Malpica J. M., Diaz-Pendón J. A., Moriones E., Fraile A. and Garcia-Arenal F. 2004. Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology* 318: 451-460.
- Mumford R. A., Barker I. and Wood K.R. 1996. The biology of the tospoviruses. *Annals of Applied Biology* 128: 159–183.

- Nagata T., Almeida A.C.L., Resende R.D. O. and De Ávila A.C. 2004. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. *Plant Pathology* 53: 136-140.
- Nagata T., Carvalho K., Sodr e R., Dutra L., Oliveira P., Noronha E., Lovato F., De Oliveira Resende R., De Avila A. and Inoue-Nagata, A. 2007. The glycoprotein gene of Chrysanthemum stem necrosis virus and Zucchini lethal chlorosis virus and molecular relationship with other tospoviruses. *Virus Genes* 35: 785–793.
- Nakahara S. and Monteiro R.C. 1999. *Frankliniella zucchini* (Thysanoptera: Thripidae), a new species and vector of Tospovirus in Brazil. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 101: 290- 294.
- Niu Y., Pang X., Cheng Y., Wang D., Guo S. and Liu, Y. 2017. Molecular detection of watermelon mosaic virus associated with a serious mosaic disease on *Cucurbita pepo* L. in Shanxi, China. *Virus Disease* 28: 315-319.
- Nome S. F., March G. J. y Giorda L.M. 1974. Disminución de la productividad de plantas de zapallito de tronco (*Cucurbita maxima* Duch var. *zapallito* (Carr. Mill n) infectadas con el virus del mosaico de la sandía, raza 2 (Watermelon Mosaic Virus-2). *IDIA*: 321–324.
- Olaya C., Adhikari B., Raikhy G., Cheng J. and Pappu H.R. 2019. Identification and localization of Tospovirus genus-wide conserved residues in 3D models of the nucleocapsid and the silencing suppressor proteins. *Virology Journal* 16: 7.
- Oliver J.E. and Whitfield A.E. 2016. The Genus Tospovirus : Emerging Bunyaviruses that Threaten Food Security. *Annual Review of Virology* 3: 101–124.
- Pappu H.R., Jones R.A. C. and Jain R.K. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141: 219–36.
- Perotto M.C., Pozzi E.A., Celli M.G., Luciani C.E., Mitidieri M.S., and Conci V.C. 2017. Identification and characterization of a new potyvirus infecting cucurbits. *Archives of Virology* 163: 719–724.
- Perotto M. C., Celli M. G., Pozzi E. A., Luciani C. E., and Conci V. C. 2016. Occurrence and characterization of a severe isolate of Watermelon mosaic virus from Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 146: 213-218.
- Plyusnin A., Beaty B.J., Elliott R.M., Goldbach R., Kormelink R., Lundkvist A., Schmaljohn C. S. and Tesh R .B. 2012. Bunyaviridae. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz (Eds.), *Virus taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (725-741)*. London, UK, Elsevier Academic Press. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/205/bunyaviridae
- Power A., Borer E., Hosseini P., Mitchell C. and Seabloom E. 2011. The community ecology of barley/cereal yellow dwarf viruses in Western US grasslands. *Virus Research* 159: 95-100.

- Pretty J. 2008. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363: 447-465.
- Ray S. C. 1998. SimPlot for Windows (version 1.6). Baltimore, Md. Distributed by author. Publicado en internet, disponible en: <http://www.welch.jhu.edu/sray/download>. Activo julio 2019.
- R Core Team 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en <https://www.R-project.org/>.
- Reisen W.K. 2010. Landscape Epidemiology of Vector-Borne Diseases. *Annual Review of Entomology* 55: 461-483.
- Riley D.G., Joseph S.V., Srinivasan R. and Diffie S. 2011. Thrips Vectors of Tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management* 2: I1-I10.
- Romay G., Lecoq H. and Desbiez C. 2014. Zucchini tigré mosaic virus is a distinct potyvirus in the papaya ringspot virus cluster: molecular and biological insights. *Archives of Virology* 159:277-289.
- Roossinck M.J. and García Arenal F. 2015. Ecosystem simplification, biodiversity loss and plant virus emergence. *Current Opinion in Virology* 10: 56-62.
- Rotenberg D., Jacobson A.L., Schneeweis D.J. and Whitfield A.E. 2015. Thrips transmission of tospoviruses. *Current Opinion in Virology* 15: 80-89.
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sanchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E. and Sanchez-Gracia A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299-3302.
- Rozas J., Sanchez-DelBarrio J. C., Messeguer X. and Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Scholthof K.B.G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saundners K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C. and Foster G.D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938-954.
- Safaeizadeh M. 2008. Comparative biological and molecular variability of Zucchini yellow mosaic virus in Iran. *Asian Journal of Plant Pathology* 2: 30-39.
- Sathyan T., Murugesan N., Elanchezhyan K., Shankarganesh E. and Arulkumar, G. 2018. Population dynamics of aphids, *Aphis gossypii glover* and their relation to meteorological parameters in cotton. YNAMICS OF APHIDS, APHIS GOSSYP II GLOVER AND THEIR RELATION TO METEOROLOGICAL PARAMETERS IN COTTON. *Journal of Applied Zoological Researches* 29: 30-38.
- Sharma A., Katoch V. and Rana C. 2016. Important diseases of cucurbitaceous crops and their management. In: Pessaraki, M. (Eds.), *Handbook of cucurbits growth, cultural practices, and physiology*, CRC press 2016, First edition, pp. 301-324.

- Shiboleth Y.M., Haronsky E., Leibman D., Arazi T., Wassenegger M., Whitham S. A., Gaba V. and Gal-On A. 2007. The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *Journal of Virology* 81: 13135-13148.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry* 74: 5463-5467.
- Scursioni J.A, Vera A.C.D., Oreja F.H., Kruk B.C., de la Fuente E.B. 2019. Weed management practices in Argentina crops. *Weed Technol* 33: 459–463. doi: 10.1017/ wet.2019.26
- Seo J.K., Ohshima K., Lee H-G., Son M., Cho H-S., Lee S.-H., Sohn S-H. and Kim K-H. 2009. Molecular variability and genetic structure of the population of Soybean mosaic virus based on the analysis of complete genome sequences. *Virology* 393: 91–103.
- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. Publicado en internet, disponible en: <https://www.sinavimo.gov.ar/>. Activo julio 2019.
- Spadotti D., Leão E., Rocha K., Pavan M. and Krause-Sakate R. 2014. First report of Groundnut ringspot virus in cucumber fruits in Brazil. *New Diseases Reports* 29: 25-25.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K. and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Thresh J. 2003. Control of plant virus diseases in sub-Saharan Africa: the possibility and feasibility of an integrated approach. *African Crop Science Journal* 11: 199-223.
- Tsompana M., Abad J., Purugganan M. and Moyer J.W. 2005. The molecular population genetics of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) genome. *Molecular Ecology*, 14, 53-66.
- Turina M., Tavella L. and Ciuffo M. 2012. Tosspoviruses in the Mediterranean area. In *Advances in Virus Research* 84: 403-437.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M. and Rozen S.G. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. Aug 1;40(15):e115.
- Untiveros M., Olsper A., Artola K., Firth A., Kreuze J. and Valkonen J. 2016. A novel sweet potato potyvirus open reading frame (ORF) is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing. *Molecular Plant Pathology* 17:1111-1123.
- Vučurović A., Bulajić A., Stanković I., Ristić D., Berenji J., Jović J. and Krstić B. 2012. Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and

- partial characterization of Zucchini yellow mosaic virus isolates. *European Journal of Plant Pathology* 133: 935–947.
- Wains M., Ali M., Hussain M., Anwar J., Zulkiffal M. and Sabir W. 2010. Aphid dynamics in relation to meteorological factors and various management practices in bread wheat. *Journal of Plant Protection Research* 50: 386-392.
- Wang D., Li G. and Du S.S. 2017. Occurrence of viruses infecting melon in Xinjiang of China and molecular characterization of Watermelon mosaic virus isolates. *European Journal of Plant Pathology* 147: 919–931.
- Webster, C. G., Frantz, G., Reitz, S. R., Funderburk, J. E., Mellinger, H. C., McAvoy, E., Turechek William W., Marshall Spencer H., Tantiwanich Y., McGrath M., Daughtrey M. L. and Adkins S. 2015. Emergence of Groundnut ringspot virus and Tomato chlorotic spot virus in vegetables in Florida and the southeastern United States. *Phytopathology* 105: 388-398.
- Weaver S., Shank S. D., Spielman S. J., Li M., Muse S. V. and Kosakovsky Pond S. L. 2018. *Molecular Biology and Evolution* 35: 773–777. Internet Resource: <http://www.datamonkey.org>
- Wijkamp I., Almarza N., Goldbach R. and Peters D. 1995. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* 85: 1069-1074.
- Wylie S. J., Adams M., Chalam C., Kreuze J., López-Moya J. J., Ohshima K. and Zerbini F. M. 2017. ICTV virus taxonomy profile: *Potyviridae*. *The Journal of General Virology* 98: 352-354.
- Wylie S. J. and Jones R.A.C. 2009. Role of recombination in the evolution of host specialization within Bean yellow mosaic virus. *Phytopathology* 99:512–518
- Xu X. 2006. Modelling and interpreting disease progress in time. *The Epidemiology of Plant Diseases*, Cooke B., Jones D. and Kaye B (Eds). Springer, Dordrecht, ISBN 978-1-4020-4581-3, pp 215–238.
- Yakoubi S., Desbiez C., Fakhfakh H., Wipf-Scheibel C., Marrakchi M. and Lecoq H. 2008a. Biological characterization and complete nucleotide sequence of a Tunisian isolate of Moroccan watermelon mosaic virus. *Archives of Virology* 153:117–125.
- Yakoubi S., Lecoq H. and Desbiez C. 2008b. Algerian watermelon mosaic virus (AWMV): a new potyvirus species in the PRSV cluster. *Virus Genes* 37:103–109.
- Yakoubi S., Desbiez C., Fakhfakh H., Wipf-Scheibel C., Fabre F., Pitrat M., Marrakchi M. and Lecoq H. 2008c. Molecular, biological and serological variability of Zucchini yellow mosaic virus in Tunisia. *Plant Pathology* 57: 1146-1154.
- Yeh S.D., Lin Y.C., Cheng Y.H., Jih C.L., Chen M. J. and Chen C.C. 1992. Identification of tomato spotted wilt-like virus on watermelon in Taiwan. *Plant Disease* 76: 835-840.
- Yin Y., Zheng K., Dong J., Fang Q., Wu S., Wang L. and Zhang Z. 2014. Identification of a new tospovirus causing necrotic ringspot on tomato in China. *Virology Journal*, 11: 213.

- Yuki V., Rezende J., Kitajima E., Barroso P., Kuniyuki H., Groppo G. and Pavan M. 2000. Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of Sao Paulo, Brazil. *Plant Disease* 84: 516-520.
- Zitter T. A., Hopkins D. L. and Thomas C. E. 1996. *Compendium of cucurbit diseases*. The American Phytopathological Society, 87 pp.

ANEXO 1

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES CTAB MODIFICADO

1. Colocar en un tubo de 1,5 ml, 0,05g de muestra molida con Nitrógeno líquido.
2. Agregar 500µl de tampón CTAB 2% y 10µl de β-mercapto.
3. Incubar 20 min a 65°C.
4. Agregar 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
5. Centrifugar 5 min a 11.000 g.
6. Colectar el sobrenadante en un nuevo tubo de 1,5 ml.
7. Repetir los pasos 4-6.
8. Agregar 1/10 v/v de acetato de sodio 3M pH 5,2 y agitar suavemente.
9. Agregar 2,5 v/v de etanol absoluto.
10. Mezclar por inversión 20 a 30 veces.
11. Incubar a -70°C por 40 min.
12. Centrifugar a 16.000 g 30 min.
13. Descartar el sobrenadante y agregar 1ml de etanol 70% sin resuspender el pellet.
14. Centrifugar a 16.000 g 10 min a 4°C.
15. Descartar el sobrenadante y secar el pellet en estufa a 37°C.
16. Resuspender toda la noche el pellet en 30µl de agua DEPC

ANEXO 2
PROTOCOLLO TRIZOL (Manacorda, 2013)

Se adapta la extracción original que parte de 1g de tejido vegetal y 10 ml de TRIzol® (Invitrogen) a una extracción a partir de menos masa. (Extraído de Manacorda, 2013)

1) Moler en eppendorf de 1,5 ml 20-100 mg de tejido con Tissue Lyser (Qiagen) utilizando nitrógeno líquido para enfriar.

2) Agregar enseguida 1 ml de TRIzol®

3) Homogeneizar usando vórtex o Tissue Lyser; luego incubar 5 min a Tamb.

4) Centrifugar a 12.000 g por 10 min a 4° C. Pasar el sobrenadante a tubos limpios. Enfriar mientras tanto a -20 °C isopropanol y EtOH 75% (25% H₂O DEPC + 75% EtOH de grado de Biología Molecular).

5) Agregar a los tubos nuevos un volumen de cloroformo igual a 3/10 del volumen del sobrenadante pasado.

6) Aplicar vórtex o Tissue Lyser por 15 s, luego incubar a Tamb por 3 min.

7) Centrifugar a 12.000 g por 15 min a 4° C. El RNA queda en fase acuosa (superior). Transferirla a nuevo tubo, y descartar apropiadamente el tubo con la fase orgánica con cloroformo (inferior).

8) Repetir con la fase acuosa pasos **5) al 7)**, siempre recuperando fase acuosa y eliminando apropiadamente la orgánica (inferior) con cloroformo. Esto aumenta la eficiencia de la separación. El volumen de cloroformo es el mismo que el del paso **5)** (3/10 del vol inicial del sobrenadante).

9) Pasar la fase acuosa a tubos limpios. Agregar 1 volumen de isopropanol frío. Poner los tubos por 30 min en hielo. Este paso precipita el RNA.

10) Centrifugar por 20 min a 4 °C y 12.000 g.

11) Descartar el sobrenadante. Lavar el pellet con aproximadamente 1 mL de EtOH 75% frío, agitando suavemente hasta desprender el pellet.

12) Centrifugar a 12.000 g por 15 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante con pipeta. Dejar secar el pellet al aire (5-10 min, no excederse).

13) Disolver el pellet en 20-30 µl H₂O DEPC o milliQ estéril. Si necesario, calentar a 65 °C por 5-10 min.

14) Cuantificar las extracciones en NanoDrop. Si tanto A_{260/280} como A_{260/230} son >1.8, termina aquí. Si A_{260/230} <1.8 indica contaminación con carbohidratos u otras moléculas orgánicas. En este caso, precipitar con LiCl.

15) Agregar 7.5 M LiCl Ambion hasta Cf= 2.5 M al RNA resuspendido en H₂O del paso **13)**. Dejar a -20°C por 30 min y centrifugar a 16.000 g a 4° C por 30 min (este paso es crítico para el rendimiento).

16) Descartar el sobrenadante y lavar con 1 ml EtOH 75% frío agitando suavemente hasta desprender el pellet.

17) Centrifugar a 12.000 g por 15 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante con pipeta. Dejar secar el pellet al aire (5-10 min, no excederse).

18) Disolver el pellet en 20µl H₂O DEPC o milliQ estéril. Si necesario, calentar a 65 °C por 5-10 min.

19) Cuantificar el RNA. Se necesita al menos 150 ng/µl. La A_{260/230} indica contaminación con compuestos orgánicos aparte de proteínas, y una relación cercana a 2 se recomienda. Después del paso de LiCl dicha relación suele ser mayor a 2.

ANEXO 3
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS
NUCLEICOS TOTALES MODIFICADO DE GAMBINO
et al. (2008)

- 1- Colocar en tubo de 1.5 µl 900 µl buffer extracción CTAB (2% p/v CTAB, 2.5 % PVP-40, 2 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0), y agregar 2% β.mercaotoethanol (justo antes de usar). Calentar a 65°C.
- 2- La muestra (100 mg) se debe moler con nitrógeno líquido, se agrega al buffer extracción y los tubos de 2 µl se incuban a 65°C por 10 min.
- 3- Agregar un volumen de 900 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclar vigorosamente por inversión el tubo, 10 minutos hasta obtener una emulsión.
- 4- Centrifugar a 11.000 g por 10 minutos a 4°C.
- 5- Recuperar el sobrenadante pasando a un nuevo tubo (2µl) y realizar una segunda extracción con cloroformo: alcohol isoamílico (igual volumen). Mezclar la muestra por inversión durante 5 min hasta obtener una emulsión.
- 6- Centrifugar a 11.000g por 10 minutos a 4°C.
- 7- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 µl y agregar CILi (3M) teniendo en cuenta un volumen final según lo extraído como sobrenadante.
- 8- Se incubó la muestra a -20°C por 30 min.
- 9- Centrifugar la muestra a 16.000 g por 20 min a 4°C.
- 10- Resuspender con vortex el pellet con 500 µl de buffer SSTE precalentado a 65°C.
- 11- Agregar a la muestra un volumen de 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico.
- 12- Centrifugar la mezcla a 11.000g por 10 min a 4°C.
- 13- El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de 1.5 µl y el ARN se precipita con 0.7 vol de isopropanol frío (-20°C) e inmediatamente centrifugar a 16.000 g durante 15 min a 4°C.
- 14- Descartar sobrenadante.
- 15- Lavar pellet con etanol 70% frío (-20°C) y centrifugar por 5 min a 13.000 rpm.
- 16- Secar el pellet a 37°C y resuspender en agua de DEPC (volumen según tamaño de pellet aproximadamente entre 30-40 µl).

ANEXO 4

PROCEDIMIENTOS PARA OBSERVACIONES EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

A- INMUNO-ELECTROMICROSCOPIA MÁS DECORACIÓN (ISEM-D)

Emplear rejillas porta espécimen para microscopio electrónico de cobre (300 *mesh*) cubiertas con una capa de colodión.

1- Poner sobre una rejilla 1 gota de antisuero diluido según se especifique para cada caso (generalmente entre 1/500 y 1/1000).

2- Mantener 5 minutos en cámara húmeda.

3- Lavar con tampón borato 0,05 M pH 8,1; 20 gotas.

4- Secar con papel de filtro.

5- Poner una gota de tejido vegetal macerado en tampón borato 0,05 M pH 8,1.

6- Colocar en cámara húmeda 15 minutos.

7- Lavar con 20 gotas de tampón borato 0,05 M pH 8,1.

8- Secar con papel de filtro.

9- Colocar antisuero diluido según se especifique en cada caso (generalmente entre 1/10-1/50).

10- Mantener en cámara húmeda 15 min.

11- Lavar con 60 gotas de agua.

12- Pasar 7 gotas de acetato de uranilo 2%.

13- Secar con papel de filtro.

Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico JEOL JEM-1200EX II dentro de un rango de ampliaciones que varió entre 15.000 y 50.000 X.

1. Cortar en fragmentos de aproximadamente 8x2 mm porciones de tejido infectado

2. Fijar las células en solución Karnovsky (2% paraformaldehído/2,5% glutaraldehído).

3. Tres lavados de 5 min. c/u con agua destilada, para eliminar los restos de solución.

4. Postfijar con una solución osmio 1% en tampón fosfato 1-2hs a T.a.

5. Tres lavados de 5 min. c/u con agua destilada, para eliminar los restos de solución.

6. Contrastar durante toda la noche en solución de acetato de uranilo 0,5% a T.a.
7. Tres lavados de 5 min. c/u con agua destilada, para eliminar los restos de solución.
8. Deshidratar en series de concentración creciente de acetona (50%, 70%, 90% y 100% a T.a. 10 min. c/u.
9. Preincluir mediante incubación en solución de resina y acetona en una proporción 1/1 a T.a. toda la noche, donde los solventes orgánicos se reemplazaron gradualmente por resina.
10. Incluir con resina pura toda la noche a T.a. si hace mucho calor a 4°C.
11. Polimerizar colocando las muestras en moldes de silicona con resina Spurr puro en estufa 60-80°C.

B-CORTES ULTRAFINOS

1. Eliminar la resina sobrante de la superficie de los bloques, con una cuchilla hasta la aparición del tejido. Con el fin de aislar la zona de interés y favorecer la obtención de secciones de mayor calidad, se realizaron serie de cortes en los laterales de la muestra hasta formar un trapecio que la enmarcase.
2. Cortar los bloques en un ultramicrotomo empleando una cuchilla de diamante secciones ultrafinas 70-90 nm seriadas.
3. Recoger las secciones en rejillas para MET recubiertas membrana de colodión y reforzadas con carbón. Previamente, los cortes serán expuestos a vapores de xileno para favorecer su extensión sobre la rejilla.

Contraste de secciones para microscopía electrónica de transmisión

1. Contrastar los cortes con citrato de plomo pH 12 en caja de Petri con perlas de hidróxido de sodio para evitar la precipitación de sales de este metal, se enjuagaron con agua destilada y recontrastaron nuevamente con una solución de acetato de uranilo 2%. Luego se secaron a temperatura ambiente y observados al microscopio electrónico de transmisión JEOL 1220 EXII.

Además se intentó visualizar presencia de agregados virales, cristales, viroplasmas, inclusiones cilíndricas u otras alteraciones en citoplasma y tejidos. Se realizaron los mismos procedimientos en plantas sanas como control.

ANEXO 5

PLACA TAPIZADA CON ANTÍGENO (*Plate-Trapped Antigen*, PTA- ELISA)

Cobertura de la placa con antígeno

1)- Se manchara el tejido en tampón carbonato (tampón de cobertura) en una relación p/v adecuada (generalmente entre 1 /2 a 1/10). Se colocan 200 µl de la dilución en cada celdilla. Se incuba a 37°C durante 30 minutos.

Lavado de la placa

2)- Vaciar la placa, luego llenar las celdillas con tampón de lavado, dejar reposar 3 minutos y vaciar la placa. Este procedimiento se repite tres o más veces hasta que no se observen restos vegetales.

Agregado del antisuero

3)- Se diluye el antisuero a la concentración de uso (determinada previamente) en tampón enzima. Se coloca 200 µl por celdilla. Se incuba a 37°C por una hora.

Lavado de la placa

4)- Lavar la placa de la manera ya descrita.

Agregado del anti-Ig conjugado con la enzima

5)- Se diluye la anti-Ig conjugado con la enzima en la concentración de empleo (especificada en el catálogo del producto) en tampón enzima. Se colocan 200 µl por celdilla. Se incuba a 37°C durante 1 hora.

6)- Lavar la placa como se describió, con la variante que el último lavado de este paso se realiza con tampón de sustrato.

Adición del sustrato

7)- En el tampón sustrato disolver entre 0.6 a 1 mg/ml de P-nitrofenilfosfato y colocar 200 µl en cada celdilla.

Dejar la placa en la oscuridad y observarla periódicamente. Identificar primero los testigos enfermos y sanos.

Tampones:

PBS (tampón fosfato salino) (en g/l)

| | |
|---|------|
| Cloruro de sodio (ClNa) | 8 |
| Fosfato de potasio (KH_2PO_4) | 0,20 |
| Fosfato de sodio (Na_2HPO_4) | 1,15 |
| Cloruro de potasio (KCl) | 0,20 |
| Azida sódica (NaN_3) | 0,20 |

Llevar a pH 7,4.

Tampón de lavado (PBS + Tween-20):

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

Tampón de sensibilización (tampón de cobertura) (en g/l)

| | |
|---|------|
| Carbonato de sodio (Na_2CO_3) | 1,59 |
| Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) | 2,93 |
| Azida sódica (NaN_3) | 0,20 |

Llevar a pH 9,6.

Tampón de extracción:

| | |
|-----------------------------|----------|
| PBS | 1 l |
| Tween-20 | 0,5 ml/l |
| Polivinil pirrolidona (PVP) | 20 g/l |

Agregar en el momento de usar 2% de leche.

Tampón de conjugado (tampón enzima):

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

Polivinil pirrolidona (PVP) 20 g/l

Ovoalbúmina 2 g/l

Agregar en el momento de usar 2% de leche.

Tampón de sustrato:

Dietanolamina 97 ml/l

H₂O 800 ml/l

Azida sódica (NaN₃) 0,2 g/l

Llevar a pH 9,8 y enrasar a 1 l. con H₂O.

ANEXO 6

DOBLE SANDWICH DE ANTICUERPOS (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay Double Sandwich Antibody, DAS-ELISA*)

Cobertura de la placa con anticuerpos (sensibilización de la placa)

1- Diluir la inmunoglobulina (IgG) en la dilución óptima (determinada en una placa de calibración) con el tampón de sensibilización (tampón de cobertura). Colocar 200 µl de esa dilución en cada celdilla.

Cubrir la placa con polietileno para evitar deshidrataciones e incubar durante 4 horas a 37°C.

Lavado de la placa

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

Preparación y agregado del antígeno

3- Identificar las muestras y macerarlas con tampón de extracción en una relación p/v adecuada generalmente entre 1/3 y 1/10) y mantenerla a 4°C hasta su utilización. Luego de lavada la placa, llenar las celdillas con 180 µl de cada muestra. Es necesario emplear varios testigos sanos y enfermos como controles negativos y positivos, respectivamente. Debe llenarse al menos una celdilla con tampón extracción como blanco. Cubrir la placa con polietileno para evitar la deshidratación y mantenerla a 4°C durante 16 a 18 horas (toda la noche).

Lavado de la placa

4- Lavar la placa de la manera ya descrita hasta que no se observen restos vegetales (3 ó más lavados) y en forma cuidadosa para evitar que el contenido de una celdilla pase a otra.

Agregado del conjugado enzimático

5- Diluir el conjugado (inmunoglobulina-enzima), según la concentración previamente determinada, en tampón de conjugado (tampón enzima).

Agregar 180 µl de esta dilución por celdilla. Cubrir la placa con polietileno para evitar deshidrataciones e incubar durante 4 horas a 37°C.

Lavado de la placa

6- Lavar la placa como se describió en el punto 2 y realizar un último lavado con tampón de sustrato (opcional).

Adición del sustrato

7- En el tampón sustrato disolver entre 0,6 a 1 mg/ml de P-nitrofenilfosfato y colocar 200 µl en cada celdilla.

8- Dejar la placa en oscuridad y observarla periódicamente cada 15 min. Identificar primero los testigos enfermos y sanos.

Las muestras infectadas (reacción positiva) son aquellas que presentan coloración amarilla, cuya intensidad varía de acuerdo a la concentración del virus en la muestra. Esta prueba cualitativa es además, cuantitativa si se estima concentración de virus indirectamente a través de la lectura de absorbencia a una longitud de onda de 405 nm (A_{405}) mediante el empleo de un espectrofotómetro vertical.

TAMPONES:

Son los empleados en la técnica de PTA-ELISA.

ANEXO 7
TABLA DE VARIABLES METEOROLÓGICAS

Pulgonos recolectados y valores medios de las variables meteorológicas medidas durante los días de recolección de pulgonos y ciclo de cultivo, de 2013 a 2017.

| Año | Pulgonos | Tmmáx | Tmed | Tmmín | PP acum | TVAP | HR | VV |
|------|----------|-------|------|-------|---------|------|----|----|
| 2013 | 0 | 35,4 | 25,7 | 15,9 | 0 | 11,1 | 43 | 14 |
| 2013 | 36 | 22,1 | 17,5 | 12,8 | 20,7 | 5,4 | 31 | 32 |
| 2013 | 239 | 30,4 | 25,5 | 20,6 | 20,7 | 7,9 | 28 | 15 |
| 2013 | 130 | 23,1 | 20,5 | 17,8 | 20,7 | 7,1 | 41 | 19 |
| 2013 | 90 | 35,5 | 25,3 | 15 | 20,7 | 10,3 | 32 | 14 |
| 2013 | 27 | 33,8 | 25,3 | 16,8 | 20,7 | 10,3 | 34 | 9 |
| 2013 | 24 | 29,6 | 23,2 | 16,8 | 20,7 | 8,7 | 37 | 15 |
| 2013 | 188 | 32,6 | 23,8 | 32,6 | 20,7 | 9,1 | 31 | 20 |
| 2013 | 10 | 33 | 22,3 | 11,5 | 20,7 | 9,4 | 35 | 13 |
| 2013 | 14 | 34,7 | 25,7 | 16,6 | 20,7 | 11,5 | 35 | 12 |
| 2013 | 15 | 34,4 | 25,2 | 15,9 | 20,7 | 10,7 | 36 | 9 |
| 2013 | 27 | 35 | 25,7 | 16,4 | 21 | 5,3 | 16 | 28 |
| 2013 | 90 | 27,3 | 22,5 | 17,6 | 21 | 3,9 | 18 | 13 |
| 2013 | 6 | 30,3 | 22,5 | 14,6 | 21 | 9,9 | 42 | 11 |
| 2013 | 1 | 37,9 | 30,5 | 23 | 21 | 8,5 | 21 | 9 |
| 2013 | 1 | 26,3 | 19,8 | 13,4 | 21 | 11,6 | 56 | 7 |
| 2013 | 7 | 31,5 | 25,1 | 18,7 | 21 | 5,1 | 16 | 24 |
| 2013 | 1 | 33,6 | 26,3 | 19,1 | 21 | 7,7 | 23 | 14 |
| 2013 | 8 | 35 | 25,4 | 15,8 | 21 | 8,1 | 25 | 15 |
| 2013 | 2 | 32,9 | 27,8 | 22,7 | 21 | 14,4 | 41 | 10 |
| 2013 | 5 | 37 | 27,8 | 18,5 | 21 | 16,4 | 44 | 7 |
| 2013 | 0 | 35,4 | 26,9 | 18,4 | 21 | 14,6 | 47 | 16 |
| 2013 | 4 | 35,1 | 29,8 | 24,6 | 21 | 16,4 | 41 | 27 |
| 2013 | 1 | 37 | 30,2 | 23,4 | 21 | 16,7 | 39 | 21 |
| 2013 | 0 | 36 | 28,1 | 20,2 | 21 | 18,2 | 48 | 19 |
| 2013 | 0 | 34,4 | 29,2 | 24 | 186,6 | 15,3 | 43 | 29 |
| 2013 | 1 | 36 | 28,8 | 21,5 | 214,5 | 17,8 | 45 | 16 |

| | | | | | | | | |
|------|----|------|------|------|-----|------|----|----|
| 2014 | 3 | 29,4 | 23,8 | 18,2 | 0 | 8,3 | 28 | 21 |
| 2014 | 0 | 40,8 | 31,1 | 21,4 | 0 | 14,4 | 32 | 11 |
| 2014 | 7 | 38 | 29,8 | 21,5 | 0 | 9,2 | 22 | 16 |
| 2014 | 2 | 38,3 | 31,3 | 24,2 | 0 | 13,7 | 32 | 31 |
| 2014 | 3 | 40,5 | 32,2 | 23,8 | 0 | 15,3 | 32 | 18 |
| 2014 | 11 | 34,4 | 29,6 | 24,7 | 0 | 9,7 | 26 | 12 |
| 2014 | 0 | 40,9 | 33,9 | 26,9 | 4 | 10,4 | 23 | 9 |
| 2014 | 0 | 42,5 | 32,7 | 22,8 | 4 | 21,2 | 43 | 7 |
| 2014 | 2 | 35,8 | 26,3 | 16,8 | 4 | 14 | 41 | 11 |
| 2014 | 0 | 33,8 | 26 | 18,2 | 4 | 13,2 | 42 | 20 |
| 2014 | 10 | 39 | 29,8 | 20,5 | 4 | 13,4 | 32 | 9 |
| 2014 | 1 | 38,4 | 29,5 | 20,5 | 4 | 11,9 | 36 | 10 |
| 2014 | 5 | 36 | 29 | 22 | 4 | 20,4 | 50 | 16 |
| 2014 | 1 | 37 | 30 | 23 | 4 | 18,1 | 45 | 26 |
| 2014 | 4 | 39,1 | 30,5 | 22 | 4 | 18,8 | 43 | 15 |
| 2014 | 1 | 32 | 27,7 | 23,4 | 4 | 17,6 | 54 | 32 |
| 2014 | 41 | 33,4 | 28 | 22,6 | 4 | 19,6 | 52 | 21 |
| 2014 | 4 | 24 | 19,5 | 15 | 4 | 17,2 | 77 | 12 |
| 2014 | 3 | 28 | 22,7 | 17,4 | 4 | 20,6 | 70 | 9 |
| 2014 | 5 | 28,6 | 23 | 17,6 | 4 | 21 | 75 | 6 |
| 2014 | 16 | 24,4 | 20,6 | 16,8 | 4 | 16 | 66 | 23 |
| 2014 | 13 | 24,4 | 20,6 | 16,8 | 4 | 16 | 66 | 23 |
| 2014 | 20 | 24 | 20,8 | 17,6 | 8,5 | 15,2 | 67 | 25 |
| 2014 | 2 | 27 | 20,6 | 14,2 | 8,5 | 17,5 | 72 | 26 |
| 2014 | 17 | 30,9 | 23,1 | 15,3 | 8,5 | 16,4 | 58 | 11 |
| 2014 | 38 | 26 | 22 | 18 | 8,5 | 15,4 | 57 | 24 |
| 2014 | 61 | 22 | 19 | 16 | 8,5 | 5,7 | 41 | 24 |
| 2014 | 81 | 33,2 | 23,5 | 13,9 | 8,5 | 16,3 | 56 | 7 |
| 2014 | 41 | 32 | 23,1 | 14,2 | 8,5 | 14,2 | 52 | 13 |
| 2014 | 65 | 25 | 21 | 17 | 8,5 | 17,4 | 73 | 16 |

| | | | | | | | | |
|------|-----|------|------|------|-------|------|----|----|
| 2014 | 341 | 26,8 | 14,8 | 2,9 | 8,5 | 8 | 58 | 5 |
| 2014 | 19 | 21,7 | 15,2 | 8,6 | 8,5 | 9 | 55 | 8 |
| 2014 | 116 | 30,1 | 22,1 | 14,1 | 8,5 | 14,4 | 62 | 5 |
| 2014 | 8 | 23,3 | 18,3 | 13,4 | 9 | 15,5 | 74 | 11 |
| 2014 | 18 | 24,2 | 18,3 | 12,3 | 9 | 12,4 | 62 | 24 |
| 2014 | 4 | 24,2 | 18,3 | 12,3 | 14 | 12,4 | 62 | 24 |
| 2014 | 2 | 18,9 | 10,6 | 2,4 | 14 | 7,7 | 61 | 4 |
| 2014 | 19 | 18 | 14,2 | 10,4 | 45,3 | 9,5 | 60 | 13 |
| 2014 | 2 | 16 | 6,8 | -2,5 | 45,3 | 5,8 | 59 | 6 |
| 2014 | 13 | 16,5 | 7,9 | -0,7 | 186,6 | 5 | 52 | 3 |
| 2014 | 6 | 16 | 6,4 | -3,2 | 186,6 | 6,6 | 71 | 11 |
| 2014 | 9 | 17,7 | 10,1 | 2,5 | 186,6 | 8 | 65 | 18 |
| 2014 | 53 | 33 | 21,5 | 10 | 186,6 | 10,3 | 40 | 11 |
| 2014 | 29 | 34 | 26 | 18,1 | 186,6 | 12,5 | 37 | 22 |
| 2014 | 63 | 34 | 26 | 18,1 | 186,6 | 12,5 | 37 | 22 |
| 2014 | 20 | 25,6 | 21,3 | 17 | 186,6 | 8,9 | 35 | 22 |
| 2014 | 19 | 31,8 | 23,5 | 15,3 | 186,6 | 9,5 | 42 | 13 |
| 2014 | 18 | 38 | 30,8 | 23,5 | 186,6 | 10,2 | 23 | 17 |
| 2014 | 0 | 38 | 30,8 | 23,5 | 186,6 | 10,2 | 23 | 17 |
| 2014 | 4 | 30,3 | 24 | 17,6 | 186,6 | 7,1 | 24 | 29 |
| 2014 | 2 | 24,8 | 19,5 | 14,2 | 186,6 | 11,3 | 50 | 26 |
| 2014 | 4 | 30 | 23,8 | 17,5 | 186,6 | 9,1 | 31 | 31 |
| 2014 | 13 | 33 | 23,1 | 13,2 | 214,5 | 10,2 | 36 | 15 |
| 2014 | 6 | 33,3 | 26,1 | 19 | 214,5 | 10,5 | 31 | 22 |
| 2014 | 0 | 33,7 | 21,4 | 9,1 | 214,5 | 6,9 | 35 | 11 |
| 2014 | 18 | 40 | 29 | 18,5 | 214,5 | 9,3 | 23 | 15 |
| 2014 | 7 | 39,1 | 28,1 | 17,2 | 214,5 | 11,9 | 39 | 15 |
| 2014 | 2 | 39,1 | 28,9 | 18,8 | 214,5 | 16,2 | 42 | 14 |
| 2014 | 5 | 32,6 | 28,6 | 24,7 | 214,5 | 7,3 | 23 | 17 |
| 2014 | 5 | 32,6 | 28,6 | 24,7 | 214,5 | 7,3 | 23 | 17 |

| | | | | | | | | |
|------|----|------|------|------|-------|------|----|----|
| 2014 | 1 | 32,9 | 25,6 | 18,2 | 214,5 | 16 | 49 | 21 |
| 2014 | 0 | 35 | 26,4 | 17,8 | 214,5 | 15,5 | 45 | 12 |
| 2014 | 3 | 38,8 | 28,5 | 18,1 | 214,5 | 13,1 | 39 | 18 |
| 2014 | 7 | 32,1 | 21,1 | 10,2 | 214,5 | 9 | 40 | 3 |
| 2014 | 3 | 33 | 27,9 | 22,8 | 214,5 | 18,1 | 53 | 29 |
| 2015 | 4 | 32,6 | 29,8 | 27,1 | 7 | 16,4 | 41 | 23 |
| 2015 | 0 | 34 | 19,5 | 25 | 7 | 16,5 | 40 | 24 |
| 2015 | 0 | 37 | 30 | 22,9 | 7 | 16,4 | 41 | 23 |
| 2015 | 1 | 37,7 | 28,2 | 18,6 | 7 | 18,7 | 49 | 13 |
| 2015 | 1 | 37,7 | 28,2 | 18,6 | 7 | 18,7 | 49 | 13 |
| 2015 | 11 | 34,6 | 28,3 | 21,9 | 7 | 21,3 | 57 | 13 |
| 2015 | 0 | 31,5 | 25,9 | 20,2 | 7 | 14,7 | 44 | 20 |
| 2015 | 10 | 33,6 | 25,3 | 17,1 | 7 | 16,6 | 55 | 3 |
| 2015 | 1 | 37,2 | 29,5 | 21,7 | 7 | 18,7 | 51 | 8 |
| 2015 | 0 | 31,5 | 25,9 | 20,2 | 7 | 14,7 | 44 | 20 |
| 2015 | 0 | 35,4 | 28,4 | 21,4 | 7 | 19,7 | 54 | 5 |
| 2015 | 2 | 37,2 | 30 | 22,8 | 7 | 18,2 | 43 | 16 |
| 2015 | 0 | 31,2 | 27,5 | 23,7 | 10,7 | 23,1 | 66 | 13 |
| 2015 | 3 | 36 | 29,9 | 23,7 | 10,7 | 24,4 | 58 | 20 |
| 2015 | 1 | 35,8 | 28,5 | 21,3 | 10,7 | 24,4 | 65 | 12 |
| 2015 | 0 | 33,8 | 25,5 | 17,2 | 10,7 | 14,6 | 46 | 6 |
| 2015 | 0 | 22,6 | 18,6 | 14,7 | 10,7 | 12,1 | 63 | 19 |
| 2015 | 0 | 29,7 | 23,2 | 16,6 | 10,7 | 16,5 | 60 | 9 |
| 2015 | 0 | 34,6 | 28,4 | 22,2 | 10,7 | 19,9 | 60 | 25 |
| 2015 | 0 | 16,3 | 14,8 | 13,3 | 10,7 | 14,4 | 86 | 18 |
| 2015 | 0 | 16,4 | 14,9 | 13,5 | 12 | 15,8 | 93 | 25 |
| 2015 | 2 | 28,4 | 18,9 | 9,4 | 12 | 12,7 | 58 | 11 |
| 2015 | 0 | 28 | 19,2 | 10,4 | 12 | 12,2 | 60 | 10 |
| 2015 | 0 | 31,5 | 23,3 | 15 | 12 | 16,2 | 57 | 10 |
| 2015 | 16 | 31 | 23,4 | 15,8 | 12 | 16,1 | 56 | 16 |

| | | | | | | | | |
|------|----|------|------|------|------|------|----|----|
| 2015 | 32 | 22,6 | 16,5 | 10,5 | 12 | 9,4 | 56 | 2 |
| 2015 | 0 | 23,2 | 15,6 | 8 | 12 | 10,1 | 57 | 17 |
| 2015 | 3 | 29,8 | 19,6 | 9,4 | 15,8 | 13,2 | 58 | 5 |
| 2015 | 2 | 29,8 | 19,9 | 10 | 15,8 | 13,3 | 60 | 1 |
| 2015 | 4 | 17,8 | 16,1 | 14,4 | 15,8 | 15,2 | 83 | 4 |
| 2015 | 2 | 18,3 | 13 | 7,7 | 15,8 | 7,8 | 52 | 12 |
| 2015 | 15 | 21 | 13,6 | 6,1 | 15,8 | 8,1 | 59 | 4 |
| 2015 | 4 | 25,6 | 17,4 | 9,2 | 15,8 | 13,1 | 66 | 7 |
| 2015 | 0 | 26,1 | 17,4 | 8,6 | 15,8 | 12 | 67 | 9 |
| 2015 | 7 | 19,1 | 14,4 | 9,7 | 15,8 | 11,7 | 71 | 15 |
| 2015 | 0 | 19,6 | 15,8 | 12 | 15,8 | 11,3 | 63 | 16 |
| 2015 | 3 | 22 | 12,8 | 3,1 | 15,8 | 9,6 | 65 | 11 |
| 2015 | 12 | 24 | 13,8 | 3,6 | 15,8 | 9,8 | 65 | 13 |
| 2015 | 54 | 21,9 | 12,8 | 3,6 | 15,8 | 10,6 | 71 | 17 |
| 2015 | 7 | 21,6 | 12,6 | 3,5 | 15,8 | 9,3 | 64 | 17 |
| 2015 | 7 | 20,4 | 10,9 | 1,5 | 16 | 7,6 | 67 | 11 |
| 2015 | 6 | 20,4 | 10,9 | 1,5 | 19,7 | 7,6 | 67 | 11 |
| 2015 | 4 | 16,4 | 8,6 | 0,7 | 19,7 | 5,5 | 54 | 21 |
| 2015 | 12 | 16,4 | 8,6 | 0,7 | 19,7 | 5,5 | 54 | 21 |
| 2015 | 5 | 21,1 | 10,7 | 0,2 | 19,7 | 7 | 64 | 8 |
| 2015 | 3 | 21,1 | 10,7 | 0,2 | 19,7 | 7 | 64 | 8 |
| 2015 | 0 | 15 | 8,4 | 1,7 | 19,7 | 4,6 | 42 | 14 |
| 2015 | 20 | 15,4 | 6,8 | -1,9 | 19,7 | 5,6 | 54 | 0 |
| 2015 | 17 | 14,9 | 8,6 | 2,4 | 41,8 | 6,8 | 66 | 7 |
| 2015 | 0 | 20,2 | 12,5 | 4,8 | 41,8 | 6,7 | 49 | 7 |
| 2015 | 5 | 20,5 | 9,4 | -1,7 | 41,8 | 5,8 | 49 | 14 |
| 2015 | 0 | 22 | 16 | 7 | 41,8 | 5,7 | 57 | 10 |
| 2015 | 1 | 14,8 | 7 | -0,9 | 41,8 | 6 | 65 | 1 |
| 2015 | 0 | 20,5 | 12,3 | 4 | 41,8 | 7,6 | 53 | 10 |
| 2015 | 8 | 19,4 | 12 | 4,6 | 42,6 | 7,4 | 59 | 1 |

| | | | | | | | | |
|------|----|------|------|------|------|------|----|----|
| 2015 | 15 | 16,6 | 12,4 | 8,2 | 42,6 | 9,6 | 70 | 11 |
| 2015 | 1 | 17,9 | 13,6 | 9,4 | 42,6 | 9,1 | 58 | 18 |
| 2015 | 0 | 14,8 | 8,1 | 1,4 | 42,6 | 8 | 71 | 2 |
| 2015 | 1 | 15,5 | 6,8 | -2 | 42,6 | 7,1 | 72 | 9 |
| 2015 | 0 | 14,4 | 11,6 | 8,9 | 42,6 | 9,7 | 74 | 16 |
| 2015 | 1 | 13,7 | 11,6 | 9,5 | 42,6 | 7,7 | 69 | 18 |
| 2015 | 31 | 20,2 | 14,2 | 8,2 | 42,6 | 6,8 | 49 | 13 |
| 2015 | 6 | 20,2 | 14,2 | 8,2 | 42,6 | 6,8 | 49 | 13 |
| 2015 | 47 | 26,2 | 19 | 11,8 | 42,6 | 12,7 | 61 | 20 |
| 2015 | 42 | 26,2 | 19 | 11,8 | 42,6 | 12,7 | 61 | 20 |
| 2015 | 0 | 26,8 | 18,7 | 10,6 | 42,6 | 13,7 | 63 | 1 |
| 2015 | 19 | 27,1 | 17,5 | 7,8 | 42,6 | 8,8 | 45 | 5 |
| 2015 | 87 | 30 | 24 | 18 | 42,6 | 11,9 | 40 | 20 |
| 2015 | 0 | 27,7 | 22,5 | 17,4 | 42,6 | 13,3 | 48 | 13 |
| 2015 | 2 | 25,1 | 21,3 | 17,5 | 42,6 | 14,4 | 66 | 19 |
| 2015 | 10 | 25,1 | 21,3 | 17,5 | 42,6 | 14,4 | 66 | 19 |
| 2015 | 0 | 27,5 | 21,9 | 16,3 | 45,3 | 15,3 | 67 | 6 |
| 2015 | 13 | 27,5 | 21,9 | 16,3 | 45,3 | 15,3 | 67 | 6 |
| 2015 | 10 | 35,3 | 24,8 | 14,4 | 45,3 | 11,9 | 45 | 4 |
| 2015 | 0 | 35,3 | 24,8 | 14,4 | 45,3 | 11,9 | 45 | 4 |
| 2015 | 0 | 35,3 | 24,8 | 14,4 | 45,3 | 11,9 | 45 | 4 |
| 2015 | 4 | 27,9 | 24,2 | 20,5 | 45,3 | 15 | 53 | 7 |
| 2015 | 9 | 32,9 | 25,7 | 18,4 | 45,3 | 15,2 | 49 | 10 |
| 2015 | 12 | 32,9 | 25,7 | 18,4 | 45,3 | 15,2 | 49 | 10 |
| 2015 | 8 | 25,1 | 21,3 | 17,5 | 45,3 | 14,4 | 66 | 19 |
| 2015 | 59 | 27,5 | 21,9 | 16,3 | 45,3 | 15,3 | 67 | 6 |
| 2015 | 4 | 35,3 | 24,8 | 14,4 | 45,3 | 11,9 | 45 | 4 |
| 2015 | 6 | 32,9 | 25,7 | 18,4 | 45,3 | 15,2 | 49 | 10 |
| 2016 | 10 | 33,1 | 25,6 | 18,2 | 11,1 | 16,9 | 55 | 8 |
| 2016 | | 36,8 | 31,3 | 25,8 | 11,1 | 21,1 | 46 | 15 |

| | | | | | | | | |
|------|----|------|------|------|------|------|----|----|
| 2016 | 3 | 28,3 | 23,1 | 17,9 | 11,1 | 12,7 | 56 | 12 |
| 2016 | 0 | 29,5 | 22,9 | 16,2 | 11,1 | 14,1 | 51 | 6 |
| 2016 | 0 | 34,6 | 25,8 | 16,9 | 11,1 | 16,3 | 55 | 3 |
| 2016 | 2 | 34,6 | 25,8 | 16,9 | 11,1 | 16,3 | 55 | 3 |
| 2016 | 2 | 36,7 | 29,4 | 22,1 | 11,1 | 23,8 | 51 | 9 |
| 2016 | 0 | 32,1 | 27,1 | 22,1 | 11,1 | 11,7 | 49 | 23 |
| 2016 | 0 | 36,1 | 29 | 21,9 | 11,1 | 23 | 66 | 8 |
| 2016 | 7 | 28,8 | 19,8 | 10,9 | 11,1 | 16,2 | 67 | 4 |
| 2016 | 0 | 30,8 | 23,6 | 16,5 | 11,1 | 6,9 | 43 | 24 |
| 2016 | 4 | 33,2 | 22 | 10,8 | 11,1 | 10,9 | 49 | 2 |
| 2016 | 5 | 33,1 | 24,2 | 15,3 | 11,1 | 17,1 | 59 | 1 |
| 2016 | 1 | 26,7 | 22 | 17,2 | 11,1 | 13,6 | 55 | 12 |
| 2016 | 12 | 23 | 17,6 | 12,3 | 11,1 | 13,2 | 65 | 2 |
| 2016 | 11 | 19,5 | 14,6 | 9,8 | 11,1 | 12,3 | 73 | 3 |
| 2016 | 25 | 23,4 | 14 | 4,7 | 11,1 | 10,4 | 64 | 0 |
| 2016 | 16 | 15,9 | 9,3 | 2,8 | 11,1 | 8,6 | 70 | 6 |
| 2016 | 28 | 16,2 | 12,7 | 9,2 | 11,1 | 13,3 | 85 | 3 |
| 2016 | 21 | 17,8 | 14,5 | 11,2 | 11,1 | 14,2 | 82 | 3 |
| 2016 | 15 | 13,3 | 10,6 | 7,9 | 11,1 | 11,3 | 86 | 8 |
| 2016 | 14 | 10,9 | 9,8 | 8,6 | 11,1 | 10,7 | 88 | 0 |
| 2016 | 1 | 15,1 | 10 | 4,8 | 11,1 | 9,8 | 76 | 5 |
| 2016 | 5 | 17,9 | 8,2 | -1,5 | 11,1 | 6,1 | 61 | 0 |
| 2016 | 6 | 12,8 | 5,4 | -2 | 11,1 | 6,7 | 72 | 2 |
| 2016 | 4 | 17,1 | 8,6 | 0,1 | 11,1 | 7,7 | 70 | 0 |
| 2016 | 1 | 19,1 | 14,5 | 9,9 | 11,1 | 7,3 | 64 | 2 |
| 2016 | 6 | 17,8 | 10 | 2,2 | 16 | 7 | 61 | 0 |
| 2016 | 0 | 16,4 | 8 | -0,4 | 16 | 7,2 | 68 | 1 |
| 2016 | 8 | 15,7 | 7,5 | -0,7 | 16 | 7,4 | 69 | 1 |
| 2016 | 10 | 20,8 | 11,8 | 2,7 | 16,1 | 9 | 67 | 2 |
| 2016 | 0 | 23,1 | 14,7 | 6,3 | 16,1 | 9,4 | 58 | 2 |

| | | | | | | | | |
|------|----|------|------|------|------|------|----|----|
| 2016 | 9 | 22,6 | 12,7 | 2,7 | 16,1 | 5,8 | 46 | 6 |
| 2016 | 7 | 32,3 | 19 | 5,7 | 16,1 | 7,4 | 44 | 2 |
| 2016 | 14 | 30,7 | 17,8 | 4,8 | 16,1 | 5,6 | 39 | 10 |
| 2016 | 13 | 27,6 | 15,6 | 3,5 | 16,1 | 6,8 | 45 | 1 |
| 2016 | 30 | 21,4 | 15 | 8,6 | 16,1 | 5,8 | 43 | 7 |
| 2016 | 38 | 29,8 | 19,9 | 10 | 16,1 | 11,6 | 52 | 1 |
| 2016 | 2 | 27,6 | 20,4 | 13,2 | 16,1 | 9,7 | 39 | 17 |
| 2016 | | 28,6 | 18 | 7,4 | 16,1 | 10,2 | 56 | 19 |
| 2016 | 21 | 29,4 | 22,4 | 15,3 | 16,1 | 12,7 | 41 | 11 |
| 2016 | 9 | 15,9 | 11,4 | 7 | 16,1 | 8,9 | 62 | 7 |
| 2016 | 27 | 28,2 | 18 | 7,7 | 16,1 | 9,9 | 53 | 11 |
| 2016 | 9 | 33,9 | 20,6 | 7,3 | 16,1 | 6,3 | 29 | 2 |
| 2016 | 1 | 34,3 | 23,1 | 11,9 | 16,1 | 10,2 | 46 | 18 |
| 2016 | 0 | 31,6 | 21,4 | 11,1 | 16,1 | 9,7 | 45 | 5 |
| 2016 | 2 | 27,3 | 18,5 | 9,6 | 16,1 | 14,5 | 63 | 3 |
| 2016 | 3 | 35,7 | 27,7 | 19,7 | 16,1 | 16 | 47 | 19 |
| 2016 | 0 | 35,7 | 27,2 | 18,7 | 16,1 | 14,8 | 41 | 14 |
| 2016 | 0 | 33 | 24,8 | 16,6 | 16,1 | 8,8 | 28 | 18 |
| 2016 | 1 | 32,7 | 23,3 | 13,8 | 16,1 | 10,3 | 40 | 22 |
| 2016 | 0 | 28,2 | 21,7 | 15,2 | 16,1 | 7,2 | 44 | 5 |
| 2016 | 0 | 30,4 | 23,9 | 17,4 | 16,1 | 5,3 | 18 | 23 |
| 2016 | 0 | 35 | 27,9 | 20,8 | 16,1 | 12 | 32 | 22 |
| 2016 | 0 | 33,7 | 26,5 | 19,3 | 16,1 | 13,4 | 48 | sd |
| 2016 | 0 | 34,4 | 23,6 | 12,8 | 16,1 | 11,7 | 47 | 2 |
| 2016 | 77 | 36,8 | 31,3 | 25,8 | 16,1 | 21,1 | 46 | 15 |
| 2016 | 0 | 28,3 | 23,1 | 17,9 | 16,1 | 12,7 | 56 | 12 |
| 2016 | 2 | 29,5 | 22,9 | 16,2 | 16,1 | 14,1 | 51 | 6 |
| 2016 | 0 | 31,1 | 24,5 | 17,9 | 16,1 | 16,4 | 62 | 6 |
| 2016 | 0 | 34,6 | 25,8 | 16,9 | 18,8 | 16,3 | 55 | 3 |
| 2016 | 2 | 36,7 | 29,4 | 22,1 | 18,8 | 23,8 | 51 | 9 |

| | | | | | | | | |
|------|----|------|------|-------|------|------|----|----|
| 2016 | 0 | 32,1 | 27,1 | 22,1 | 18,8 | 11,7 | 49 | 23 |
| 2016 | 0 | 36,1 | 29 | 21,9 | 26,1 | 23 | 66 | 8 |
| 2016 | 16 | 33,1 | 24,2 | 15,3 | 26,1 | 17,1 | 59 | 1 |
| 2016 | 7 | 23 | 17,6 | 12,3 | 26,1 | 13,2 | 65 | 2 |
| 2016 | 0 | 19,5 | 14,6 | 9,8 | 26,1 | 12,3 | 73 | 3 |
| 2016 | 28 | 15,9 | 9,3 | 2,8 | 26,1 | 8,6 | 70 | 6 |
| 2016 | 39 | 16,2 | 12,7 | 9,2 | 26,1 | 13,3 | 85 | 3 |
| 2016 | 7 | 17,8 | 14,5 | 11,2 | 26,1 | 14,2 | 82 | 3 |
| 2016 | 1 | 13,3 | 10,6 | 7,9 | 26,1 | 11,3 | 86 | 8 |
| 2016 | 5 | 10,9 | 9,8 | 8,6 | 26,1 | 10,7 | 88 | 0 |
| 2016 | 12 | 16,9 | 9,6 | 2,4 | 26,1 | 9,2 | 75 | 4 |
| 2016 | 16 | 17,9 | 8,2 | -1,5 | 26,1 | 6,1 | 61 | 0 |
| 2016 | 8 | 16,7 | 9,5 | 2,3 | 26,1 | 8,1 | 72 | 0 |
| 2016 | 1 | 17,1 | 8,6 | 0,1 | 26,1 | 7,7 | 70 | 0 |
| 2016 | 2 | 13,9 | 7,3 | 0,7 | 26,1 | 7,5 | 74 | 1 |
| 2016 | 8 | 19,1 | 14,5 | 9,9 | 26,1 | 7,3 | 64 | 2 |
| 2016 | 1 | 17,8 | 10 | 2,2 | 26,1 | 7 | 61 | 0 |
| 2016 | 9 | 16,4 | 8 | -0,04 | 26,1 | 7,2 | 68 | 1 |
| 2016 | 17 | 15,7 | 7,5 | -0,7 | 26,1 | 7,4 | 69 | 1 |
| 2016 | 10 | 20,8 | 11,8 | 2,7 | 26,1 | 9 | 67 | 2 |
| 2016 | 16 | 23,1 | 14,7 | 6,3 | 26,1 | 9,4 | 58 | 2 |
| 2016 | 2 | 32,3 | 19 | 5,7 | 26,1 | 7,4 | 44 | 2 |
| 2016 | 7 | 27,6 | 20,4 | 13,2 | 26,1 | 9,7 | 39 | 17 |
| 2016 | 0 | 35,7 | 27,7 | 19,7 | 26,1 | 16 | 47 | 19 |
| 2016 | 0 | 32,7 | 23,3 | 13,8 | 26,1 | 10,3 | 40 | 22 |
| 2016 | 1 | 34,3 | 26 | 17,7 | 26,1 | 15,5 | 46 | 4 |
| 2016 | 11 | 33,7 | 26,5 | 19,3 | 26,1 | 13,4 | 48 | sd |
| 2016 | 9 | 33,1 | 25,6 | 18,2 | 26,1 | 16,9 | 55 | 8 |
| 2016 | 0 | 36,8 | 31,3 | 25,8 | 26,1 | 21,1 | 46 | 15 |
| 2016 | 0 | 29,5 | 22,9 | 16,2 | 26,1 | 14,1 | 51 | 6 |

| | | | | | | | | |
|------|----|------|------|------|------|------|----|----|
| 2016 | 0 | 34,6 | 25,8 | 16,9 | 26,1 | 16,3 | 55 | 3 |
| 2016 | 0 | 36,7 | 29,4 | 22,1 | 41,8 | 23,8 | 51 | 9 |
| 2016 | 0 | 32,1 | 27,1 | 22,1 | 41,8 | 11,7 | 49 | 23 |
| 2016 | 0 | 36,1 | 29 | 21,9 | 41,8 | 23 | 66 | 8 |
| 2016 | 0 | 36,7 | 29,4 | 22,1 | 41,8 | 23,8 | 51 | 9 |
| 2016 | 9 | 30,8 | 23,6 | 16,5 | 41,8 | 6,9 | 43 | 24 |
| 2016 | 0 | 23,4 | 14 | 4,7 | 41,8 | 10,4 | 64 | 0 |
| 2016 | 11 | 15,9 | 9,3 | 2,8 | 41,8 | 8,6 | 70 | 6 |
| 2016 | 0 | 13,3 | 10,6 | 7,9 | 41,8 | 11,3 | 86 | 8 |
| 2016 | 0 | 10,9 | 9,8 | 8,6 | 41,8 | 11,3 | 88 | 0 |
| 2016 | 0 | 15,1 | 10 | 4,8 | 41,8 | 9,8 | 76 | 5 |
| 2016 | 0 | 17,1 | 8,6 | 0,1 | 41,8 | 7,7 | 70 | 0 |
| 2016 | 0 | 15,7 | 7,5 | -0,7 | 41,8 | 7,4 | 69 | 1 |
| 2016 | 9 | 20,8 | 11,8 | 2,7 | 41,8 | 9 | 67 | 2 |
| 2016 | 17 | 23,1 | 14,7 | 6,3 | 41,8 | 9,4 | 58 | 2 |
| 2016 | 23 | 22,6 | 12,7 | 2,7 | 41,8 | 5,8 | 46 | 6 |
| 2016 | 0 | 27,6 | 20,4 | 13,2 | 41,8 | 9,7 | 39 | 17 |
| 2016 | 21 | 28,6 | 18 | 7,4 | 41,8 | 10,2 | 56 | 19 |
| 2016 | 0 | 29,4 | 22,4 | 15,3 | 41,8 | 12,7 | 41 | 11 |
| 2016 | 0 | 15,9 | 11,4 | 7 | 41,8 | 8,9 | 62 | 7 |
| 2016 | 0 | 28,2 | 18 | 7,7 | 41,8 | 9,9 | 53 | 11 |
| 2016 | 0 | 33,9 | 20,6 | 7,3 | 41,8 | 6,3 | 29 | 2 |
| 2016 | 0 | 34,3 | 23,1 | 11,9 | 41,8 | 10,2 | 46 | 18 |
| 2016 | 0 | 31,6 | 21,4 | 11,1 | 41,8 | 9,7 | 45 | 5 |
| 2016 | 0 | 27,3 | 18,5 | 9,8 | 41,8 | 14,5 | 63 | 3 |
| 2016 | 0 | 35,7 | 27,7 | 19,7 | 41,8 | 16 | 47 | 19 |
| 2016 | 0 | 32,7 | 23,3 | 13,8 | 41,8 | 10,3 | 40 | 22 |
| 2016 | 0 | 28,2 | 21,7 | 15,2 | 41,8 | 7,2 | 44 | 5 |
| 2016 | 0 | 33,7 | 26,5 | 19,3 | 41,8 | 13,4 | 48 | sd |
| 2016 | 0 | 34,4 | 23,6 | 12,8 | 55,5 | 11,7 | 47 | 2 |

| | | | | | | | | |
|------|-----|------|------|------|------|------|----|----|
| 2017 | 10 | 30,5 | 23,1 | 15,8 | 0 | 11,9 | 42 | 12 |
| 2017 | 0 | 31,5 | 24 | 16,5 | 0 | 8,9 | 30 | 21 |
| 2017 | 0 | 38,4 | 30 | 21,6 | 0 | 14,4 | 34 | 8 |
| 2017 | 0 | 32,9 | 27,8 | 22,7 | 0 | 15,3 | 41 | 13 |
| 2017 | 2 | 31,7 | 26,5 | 21,3 | 0 | 14,9 | 43 | 20 |
| 2017 | 3 | 34,3 | 26 | 17,6 | 0 | 18,1 | 54 | 13 |
| 2017 | 10 | 33,8 | 25,6 | 17,5 | 0 | 18,4 | 56 | 4 |
| 2017 | 8 | 39 | 31,1 | 23,2 | 0 | 18,1 | 40 | 4 |
| 2017 | 0 | 32,1 | 25,4 | 18,7 | 0 | 19,8 | 61 | 26 |
| 2017 | 0 | 27,3 | 21,3 | 15,4 | 0 | 10,7 | 42 | 6 |
| 2017 | | 28,5 | 19,3 | 10,1 | 0 | 11,2 | 50 | 2 |
| 2017 | 0 | 28,7 | 20,4 | 12,1 | 0 | 14,1 | 59 | 2 |
| 2017 | 2 | 28,7 | 21,2 | 13,7 | 0 | 16,6 | 66 | 11 |
| 2017 | 21 | 28 | 17,3 | 6,6 | 0 | 9,3 | 47 | 12 |
| 2017 | 6 | 24,3 | 17,8 | 11,4 | 0 | 14,5 | 71 | 4 |
| 2017 | 29 | 18,7 | 13,6 | 8,4 | 0 | 11,3 | 73 | 12 |
| 2017 | 20 | 25,4 | 17 | 8,7 | 0 | 12,7 | 65 | 9 |
| 2017 | 143 | 17 | 14,9 | 12,7 | 0 | 13,3 | 78 | 8 |
| 2017 | 110 | 15,4 | 10 | 4,7 | 0 | 8,8 | 71 | 3 |
| 2017 | 86 | 14,2 | 10,8 | 7,4 | 0 | 8,1 | 61 | 3 |
| 2017 | 123 | 20,3 | 12,1 | 4 | 0 | 7,9 | 59 | 1 |
| 2017 | 32 | 17 | 8,1 | -0,9 | 0 | 6,6 | 64 | 7 |
| 2017 | 32 | 24,4 | 13,8 | 3,3 | 0 | 9 | 48 | 10 |
| 2017 | 14 | 14,3 | 5,4 | -3,6 | 17,3 | 4,4 | 53 | 1 |
| 2017 | 26 | 17,9 | 9,6 | 1,2 | 17,3 | 7,2 | 63 | 2 |
| 2017 | 0 | 30,5 | 23,1 | 15,8 | 17,3 | 11,9 | 42 | 12 |
| 2017 | 5 | 38,4 | 30 | 21,6 | 17,3 | 14,4 | 34 | 8 |
| 2017 | 0 | 32,9 | 27,8 | 22,7 | 17,3 | 15,3 | 41 | 13 |
| 2017 | 0 | 31,7 | 26,5 | 21,3 | 17,3 | 14,9 | 43 | 20 |
| 2017 | | 34,3 | 26 | 17,6 | 17,3 | 18,1 | 54 | 13 |

| | | | | | | | | |
|------|-----|------|------|------|------|------|----|----|
| 2017 | 1 | 33,8 | 25,6 | 17,5 | 17,3 | 18,4 | 56 | 4 |
| 2017 | 6 | 39 | 31,1 | 23,2 | 17,3 | 18,1 | 40 | 4 |
| 2017 | 0 | 32,1 | 25,4 | 18,7 | 17,3 | 19,8 | 61 | 26 |
| 2017 | 0 | 28,7 | 20,4 | 12,1 | 17,3 | 14,1 | 59 | 2 |
| 2017 | | 28,7 | 21,2 | 13,7 | 17,3 | 16,6 | 66 | 11 |
| 2017 | 4 | 28 | 17,3 | 6,6 | 18,8 | 9,3 | 47 | 12 |
| 2017 | 7 | 18,7 | 13,6 | 8,4 | 18,8 | 11,3 | 73 | 12 |
| 2017 | 0 | 25,4 | 17 | 8,7 | 18,8 | 12,7 | 65 | 9 |
| 2017 | 0 | 17 | 14,9 | 12,7 | 18,8 | 13,3 | 78 | 8 |
| 2017 | 39 | 15,4 | 10 | 4,7 | 18,8 | 8,8 | 71 | 3 |
| 2017 | 59 | 14,2 | 10,8 | 7,4 | 18,8 | 8,1 | 61 | 3 |
| 2017 | 302 | 20,3 | 12,1 | 4 | 18,8 | 7,9 | 59 | 1 |
| 2017 | 213 | 17 | 8,1 | -0,9 | 18,8 | 6,6 | 64 | 7 |
| 2017 | 250 | 24,4 | 13,8 | 3,3 | 18,8 | 9 | 48 | 10 |
| 2017 | 133 | 14,3 | 5,4 | -3,6 | 18,8 | 4,4 | 53 | 1 |
| 2017 | 221 | 17,9 | 9,6 | 1,2 | 25,3 | 7,2 | 63 | 2 |

Tmmax, temperatura media máxima; Tmmd, temperatura media media; Tmmin, temperatura mínima media; PPacum, precipitaciones acumuladas; TVA, Temperatura de vapor de agua; HR, VV, Velocidad del viento; obtenidas durante los días de la recolección de pulgones y ciclo de cultivo.

