

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Caracterización molecular y fisiológica
de distintos aislamientos argentinos del
Soybean mosaic virus en soja.**

Tesinista: Mariel Maugeri Suarez.

Firma:

Directora: Dra. Patricia Rodríguez Pardina.

Firma:

Co-Directora: Dra. Marianela Rodríguez.

Firma:

Instituto de Patología Vegetal - Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales
(CIAP-INTA).

2017

Caracterización molecular y fisiológica de distintos
aislamientos argentinos del *Soybean mosaic virus* en soja.

Tribunal Examinador

Nombre y Apellido: Firma:

Nombre y Apellido: Firma:

Nombre y Apellido: Firma:

Calificación:

Fecha:

Índice

Tribunal examinador.....	i
Índice.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	13
Materiales y métodos.....	15
Material biológico.....	16
Inóculo original de SMV.....	16
Cultivares de soja.....	16
Recuperación del inóculo.....	16
Análisis genético.....	17
Extracción ARN.....	17
Amplificación.....	17
Secuenciación.....	18
Análisis de recombinación.....	19
Análisis fisiológico.....	19
Área foliar.....	20
Fluorescencia de clorofilas.....	20
Clorofilas.....	20
Malondialdehído.....	21
Azúcares solubles y almidón.....	21
Contenido viral.....	21
Peso seco.....	21
Análisis estadístico.....	21
Resultados.....	23
Análisis genético.....	24
Análisis filogenético.....	24
Recombinación.....	27
Análisis fisiológico.....	30
Discusión.....	42
Anexo.....	48
Bibliografía.....	57

- A mi directora y co-directora, Patricia y Marianela, por aceptar que forme parte de sus equipos, enseñarme y ayudarme en cada una de las etapas de este trabajo, ayudarme a crecer en lo profesional y por sobre todo por su paciencia.

- A las técnicas de ambos laboratorios por enseñarme y ayudarme con los protocolos.

- A mis padres, Néstor y Mariví, por el amor, los consejos, el apoyo y la paciencia durante toda la carrera.

- A mis hermanos Gabriel y Ramiro.

- A mi tía Laura por ser un ejemplo a seguir como bióloga.

- A toda mi familia.

- A mi novio Fabrizio por el apoyo y paciencia.

- A mis amigas/os de Villa Carlos Paz.

- A mis compañeras/os de la facultad por todos los años compartidos.

- A Vilma Conci por darme la posibilidad de realizar mi tesina en CIAP-INTA.

- A la Universidad Nacional de Córdoba, y especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales por brindarme el espacio y las herramientas para llevar a cabo mi carrera.

- Al CIAP-INTA por el uso de las instalaciones.

Resumen

El *Soybean mosaic virus* (SMV) está ampliamente difundido en todas las áreas de producción de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) del mundo. En la Argentina se han caracterizado biológicamente cuatro aislamientos geográficos del mismo, cuya caracterización molecular aún no se ha realizado: Marcos Juárez (MJ), Venado Tuerto (VT), Manfredi (M) y Noroeste Argentino (NOA), y un quinto aislamiento denominado Planta Vinosa (PV), que ocasiona en algunos cultivares síntomas severos de necrosis. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente dichos aislamientos, para lo cual se amplificaron por PCR y secuenciaron tres genes: P1, CI y CP. Además se compararon los síntomas macroscópicos y las alteraciones fisiológicas producidas por estos en distintos cultivares susceptibles de soja. Los parámetros medidos fueron peso seco, área foliar, Φ PSII, Fv/Fm, concentración de clorofilas, azúcares solubles, almidón y MDA. Tres de los cuatro aislamientos que pudieron ser analizados presentaron divergencia a nivel genético en los tres fragmentos evaluados, no habiéndose encontrado diferencias entre PV y NOA. Sin embargo todos indujeron sintomatologías fisiológicamente diferentes, incluso PV y NOA. El aislamiento M produjo un mayor aumento en los contenidos de: MDA, azúcares solubles y almidón. Finalmente el aislamiento MJ desarrolló síntomas más severos en el cultivar Davis que en el Don Mario 4800. En conclusión existen diferencias genéticas entre los aislamientos estudiados que sugieren que las mismas estarían implicadas en la expresión del síntoma viral. Resulta interesante que los aislamientos NOA y PV fueron similares genéticamente pero con diferencias fisiológicas, lo que indica que debería hacerse una secuenciación completa de sus genomas para realizar una asociación más específica.

Palabras claves: *Soybean mosaic virus*, *Glycine max*, soja, Potyvirus, sintomatología, caracterización molecular.

INTRODUCCIÓN

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.) comenzó a sembrarse en Argentina a mediados de los años '70, y su producción empezó a crecer más aceleradamente que la de maíz, trigo y girasol a finales de los años '90. Actualmente es la oleaginosa más difundida, con 20,2 millones de hectáreas sembradas. Argentina es el tercer productor de soja, luego de Estados Unidos y Brasil, con un rendimiento para la campaña 2015/2016 de 29,1 qq/ha. El 84% de la producción de soja en Argentina se exporta como grano, harina, aceite y biodisel (CEPA, 2014; FAOSTAT, 2015; BCR, 2016; Calzada y Rossi, 2016).

Existen muchísimas limitantes de distinta naturaleza para el cultivo de esta oleaginosa. Entre los principales factores encontramos enfermedades causadas por hongos, nematodos, bacterias y virus (Laguna, 2008a), produciendo en promedio pérdidas de entre el 8 y 10% (Vallone, 2002). En el caso de los virus, los daños ocasionados dependen de varios factores como: raza del virus, genotipo de la planta, momento de infección, abundancia de vectores, calidad de la semilla y condiciones climáticas predominantes (Laguna, 2008a).

Las virosis más importantes en cultivos de soja de diferentes áreas productoras de Argentina son: *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Soybean blistering mosaic virus* (SbBMV), *Cowpea mild mottle virus* (CMMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Peanut mottle virus* (PMV), *Tobacco streak virus* (TSV), *Soybean stunt virus* (SSV), y *Soybean mosaic virus* (SMV). Este último virus se encontró difundido en todas las áreas sojeras del país (Campos *et al.*, 2013; Laguna *et al.*, 1986; Laguna *et al.*, 2006; Rodríguez Pardina *et al.*, 2011; Truol *et al.*, 1985; Truol *et al.*, 1988).

El SMV es un virus filamentoso flexuoso, miembro del género *Potyvirus*, y perteneciente a la Familia *Potyviridae*. Su genoma está constituido por una cadena simple de (+)ARN de aproximadamente 9,6 Kb (Riechmann *et al.*, 1992), con la proteína VPg unida covalentemente a su extremo 5' (Murphy *et al.*, 1990; Siaw *et al.*, 1985) y una cola de poliadenina en el extremo 3' (Hari *et al.*, 1979). Posee un solo marco abierto de lectura (ORF) que codifica para una gran poliproteína, que luego es clivada para dar origen a, por lo menos, 10 proteínas maduras gracias a 3 proteasas codificadas por el mismo virus (Figura 1): P1, helper component-proteinase (HC-Pro),

P3, 6K1, cylindrical inclusion (CI), 6K2, genome-linked viral protein (VPg), nuclear inclusion a proteinase (NIa-Pro), nuclear inclusion b (NIb), y capsid protein (CP) (Riechmann *et al.*, 1992). En los últimos años se ha descubierto también un pequeño marco abierto de lectura, incluido dentro del cistron P3, denominado PIPO (Pretty interesting Potyviridae ORF) (Chung *et al.*, 2008).

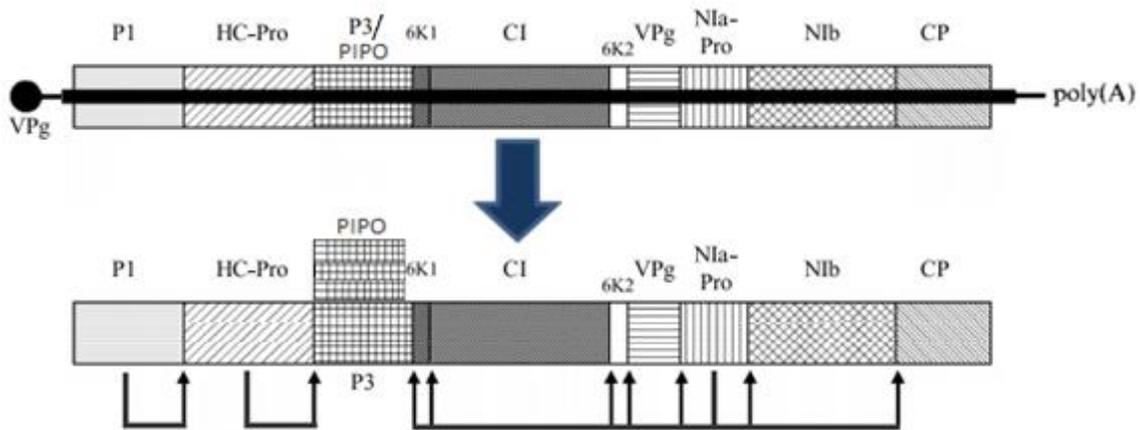


Figura 1: Representación esquemática del genoma y las proteínas codificadas por el SMV. Las flechas indican los sitios de clivaje de cada proteasa (Adams *et al.*, 2005; Bashar, 2015).

A continuación se describen las funciones conocidas hasta el momento de cada una de las proteínas codificadas por el genoma del SMV.

P1: Se ha propuesto que la proteína P1 está involucrada en la dispersión célula a célula durante la infección (Domier *et al.*, 1987; Leonard y Zaitlin, 1982). Por otro lado posee actividad proteolítica (Verchot *et al.*, 1991), cortando su propio extremo carboxilo (García *et al.*, 1993).

HC-Pro: La primera función en la que se vio que estaba implicada es la de transmisión por áfidos (Domier *et al.*, 1987). Posteriormente se ha comprobado que también está implicada en la amplificación del genoma viral (Kasschau *et al.*, 1997), transmisión por semillas (Johansen *et al.*, 1996), inducción de síntomas (Atreya y Pirone, 1993), facilita el desplazamiento del virus entre células (Rojas *et al.*, 1997), y es necesaria para un movimiento eficiente a larga distancia (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997). Al igual que la proteína P1, posee actividad proteolítica (Carrington *et al.*, 1989), cortando se propio extremo carboxilo (Ravelonandro *et al.*, 1993).

P3: Está implicada en la replicación del virus dentro de la célula (Klein *et al.*, 1994). Se ha visto asociada a las inclusiones citoplasmáticas cilíndricas (Rodríguez-Cerezo *et al.*,

1993), pero también se ha detectado junto a las inclusiones nucleares (Langenberg y Zhang, 1997).

6K1: El rol de esta pequeña proteína no está del todo claro. Se sugiere que está implicada en el movimiento del virus entre células, pero a través de un mecanismo diferente a los descritos (Hong *et al.*, 2007). Es necesaria para la replicación viral (Cui y Wang, 2016). Por otro lado, suele encontrarse asociada a la proteína P3, por lo que se ha visto que la eliminación del sitio de corte entre estas dos proteínas no afecta la viabilidad del virus, pero produce infecciones asintomáticas (Riechmann *et al.*, 1995).

CI: Esta proteína forma las inclusiones cilíndricas, presentes en todos los Potyvirus, compuestas por un centro y brazos radiales, que en un corte transversal se observan con la típica forma de rueda de molino (Figura 2). Está involucrada en el transporte del virus entre células, a través de éstas inclusiones que se encuentran asociadas a los plasmodesmos (Carrington *et al.*, 1998; Langenberg, 1986). Por otro lado, también posee actividad ARN helicasa dependiente de ATP (Laín *et al.*, 1989; Laín *et al.*, 1990; Laín *et al.*, 1991).

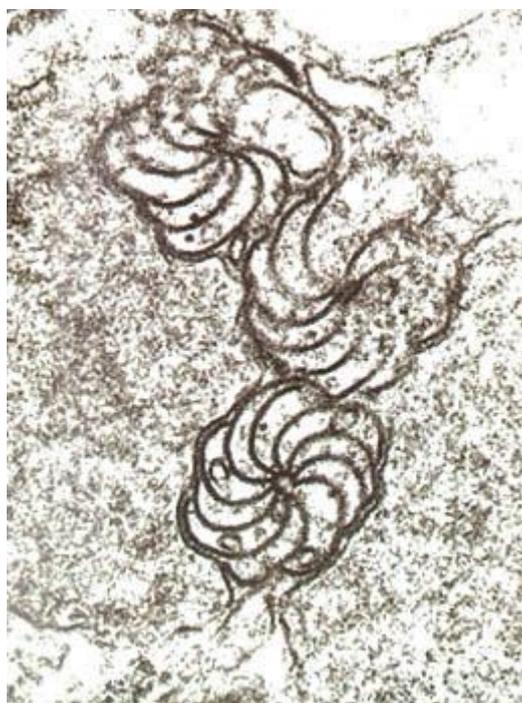


Figura 2: Imagen microscópica de un corte transversal de las inclusiones cilíndricas, características de los Potyvirus, producidas por el SMV en células de la hoja en soja (Gergerich y Dolja, 2006).

6K2: Está implicada en el anclaje de los complejos de replicación virales a las membranas del retículo endoplásmico y de las vesículas formadas a partir del mismo.

Aparentemente induce la formación de estas vesículas y las dirige hacia los cloroplastos (Schaad *et al.*, 1997b; Wei *et al.*, 2010b).

VPg: Esta proteína se encuentra en el extremo amino de la proteína NIa, la cual procesa su propio clivaje (Dougherty y Parks, 1991). Protege el extremo 5' del ARN viral uniéndose a él covalentemente (Siaw *et al.*, 1985). Podría estar implicada en el inicio de la replicación viral (Murphy *et al.*, 1996), en la supresión del silenciamiento génico (Rajamäki y Valkonen, 2009), y en el transporte del virus entre células (Nicolas *et al.*, 1997) y a larga distancia dentro de la planta (Schaad *et al.*, 1997a).

NIa: Es un polipéptido bifuncional que tiene un dominio proteasa en el extremo carboxilo y la proteína VPg en el extremo amino (Dougherty y Parks, 1991). Esta proteína se agrega junto a la proteína NIb y forman los cuerpos de inclusión en el núcleo de la célula infectada (Dougherty y Hiebert, 1980; Knuhtsen *et al.*, 1974). Su dominio con actividad proteolítica es el responsable de clivar la mayor parte de la poliproteína, exceptuando P1 y HC-Pro que procesan su propio clivaje (Carrington y Dougherty, 1987; Dougherty *et al.*, 1988).

NIb: Interviene en la replicación viral como ARN polimerasa dependiente de ARN (Domier *et al.*, 1987; Hong y Hunt, 1996). Como se mencionó anteriormente, forma las inclusiones nucleares junto a la proteína NIa (Baunoch *et al.*, 1988; Dougherty y Hiebert, 1980; Li y Carrington, 1993).

CP: Esta proteína es la encargada de la encapsulación del virus (McDonald y Bancroft, 1977), y también es necesaria para el movimiento entre células y a larga distancia (Dolja *et al.*, 1994), y para la transmisión por áfidos (Atreya *et al.*, 1990).

P3N-PIPO: La proteína PIPO no es independiente, sino que se encuentra asociada a la porción N-terminal de la proteína P3 (Chung *et al.*, 2008). Es necesaria para el movimiento entre células, interactuando con la proteína CI para asociarse a los plasmodesmos (Wei *et al.*, 2010a; Wen y Hajimorad, 2010).

El hospedante del SMV, más importante económicamente, es la soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Pero también puede infectar a otros miembros de las familias Fabaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Passifloraceae, Schrophulariaceae, y Solanaceae (Hill y Whitham, 2014). La transmisión del SMV puede ser a través de las semillas infectadas o por áfidos en forma no persistente (Laguna y Giorda, 1980). Existen al menos 34 especies vectoras, como *Myzus persicae*, *Aphis fabae*, *A. glycines*,

A. craccivora, *Rhopalosiphum maidis*, y *R. padi*, entre otras (Halbert *et al.*, 1981; Hill y Whitham, 2014). En el país solo se comprobó la capacidad vectora de la especie *Myzus persicae* (Laguna, 2008b). Los áfidos pueden adquirir el virus durante el corto tiempo en el que prueban los tejidos epidérmicos de las plantas infectadas o cuando se alimentan de ellos, y luego puede transmitirlo inmediatamente a otras plantas. Debido a la rapidez con que es adquirido y transferido, éste y otros virus transmitidos de la misma forma, son difíciles de manejar (Alemandri, 2008).

El SMV causa síntomas variables en las hojas, desde pequeños y a veces casi imperceptibles puntos cloróticos, hasta grandes áreas cloróticas, mosaico suave o marcado (Figura 3), aclaramiento de nervaduras, deformación, ampollado (Figura 4) y disminución del tamaño de la lámina foliar. En los tallos produce acortamiento de entrenudos y áreas cloróticas. Las vainas suelen ser más pequeñas, deformadas y menos pubescentes que las sanas. También produce deformación de flores, manchado de semillas (Figura 5), disminución del número y tamaño de grano y macho esterilidad (Field Crop Diseases, 2001; Brunt *et al.*, 1996; Hartman y Hill, 2010; Laguna, 2008b). En algunos casos produce reacciones necróticas de hipersensibilidad, causando una sintomatología severa conocida como “planta vinosa” (Herrera *et al.*, 1995; Herrera *et al.*, 1998). En casos de infecciones tempranas se han señalado importantes disminuciones en la producción, calidad de semilla y vigor de las plántulas que éstas generan, e incremento de susceptibilidad a otros patógenos (Tolin y Lacy, 2004).

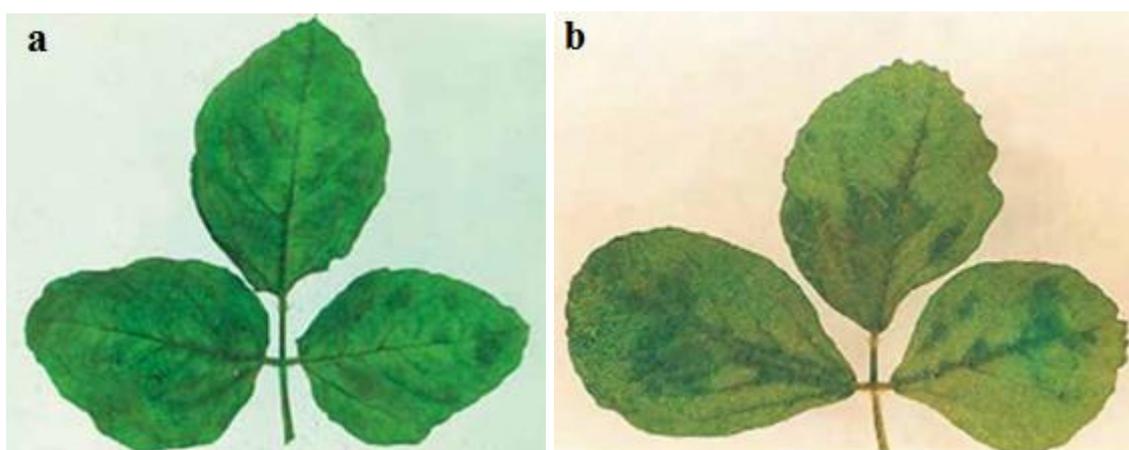


Figura 3: Síntomas de mosaico suave (a) y mosaico marcado (b) producidos por SMV en soja (Laguna, 2008b).



Figura 4: Ampollado y deformación de folíolos de soja producidos por SMV (Laguna, 2008b).

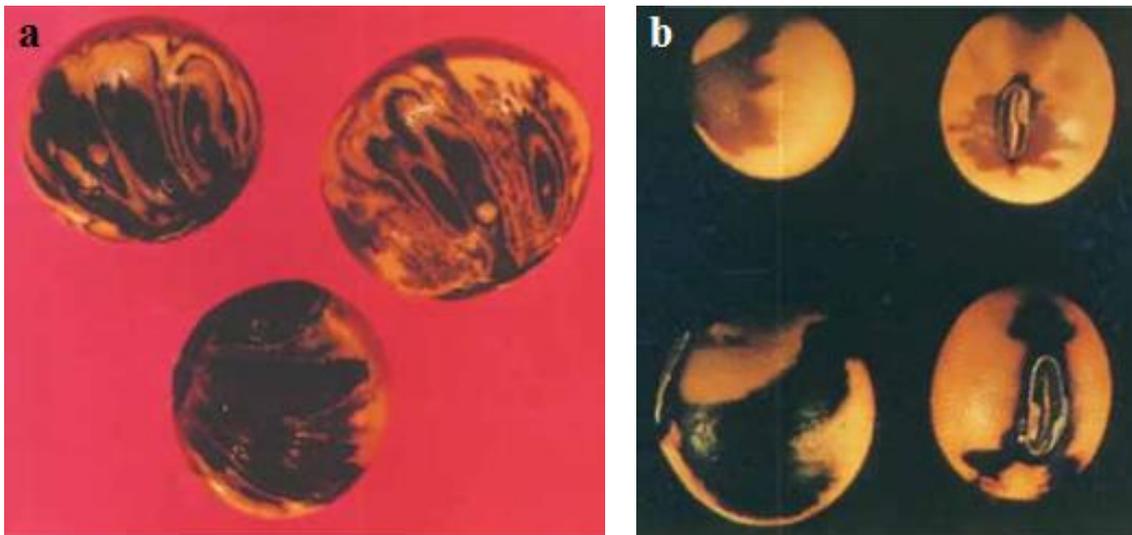


Figura 5: Manchado de semillas de soja ocasionado por SMV. Diseños concéntricos (a) y mancha tipo “montura” (b) (Laguna, 2008b).

Existen muchos aislamientos de este virus, los cuales se han ido agrupando en distintas razas de acuerdo a los efectos fenotípicos en cultivares diferenciales. En Estados Unidos, 98 aislamientos fueron clasificados en siete razas (G1-G7), de la menos a la más virulenta, solo teniendo en cuenta presencia y severidad del mosaico, necrosis e infecciones asintomáticas (resistentes), tanto en hojas inoculadas como en las no inoculadas (Cho y Goodman, 1979). Luego se registraron otras dos razas, en base a los mismos criterios fenotípicos, G7A (Buzzell y Tu, 1984) y C14 (Lim, 1985). Por otro lado, en Japón se agruparon 102 aislamientos en cinco razas (A-E) (Takahashi *et al.*, 1980) y luego Nakano *et al.* (1982) dividieron la raza A del SMV en dos nuevas razas

A1 y A2. En China, Pu *et al.* (1982) clasificaron seis aislamientos en seis razas distintas (Sa-Sf), luego Chen *et al.* (1986) incluyeron dos razas más (Sg y Sh). Desde entonces se han producido diversos reportes de nuevas razas, como G1-G10 (Xu *et al.*, 1983), N1-N3 (Lu *et al.*, 1985), Sd1-Sd6 (Luo *et al.*, 1990), y SC1-SC17 (Guo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Yang, 2002; Zhan *et al.*, 2006), entre otras. Sin embargo, en los últimos años se han utilizado también las secuencias genómicas para diferenciar distintas razas. En este sentido, una de las proteínas más variable e informativa para comparar cepas del SMV es la P1 (Domier *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2001). También se han clasificado aislamientos de acuerdo al vector de transmisión (Lucas y Hill, 1980), propiedades antigénicas (Hill *et al.*, 1989; Hill *et al.*, 1994), y por RT-PCR/RFLP (Kim *et al.*, 2004).

Una gran dificultad que surge para clasificar las distintas razas es la gran velocidad con la que aparecen nuevas. Los principales factores que aportan cambios en el ARN de los virus son, la alta probabilidad de error en la replicación del genoma, la cual se ve aumentada por el gran número de copias formadas en poco tiempo; y la recombinación entre distintas razas del mismo virus y entre especies similares. En los Potyvirus, las recombinaciones se dan principalmente en el gen P1, pero pueden ocurrir también a nivel de otros genes (Gagarinova *et al.*, 2008; Hajimorad *et al.*, 2003; Rodríguez Pardina *et al.*, 1995). Estas modificaciones le permiten a los virus quebrar resistencias, como por ejemplo los aislamientos SMV-N (Cho *et al.*, 1977) y SMV-G7H (Kim *et al.*, 2003) en Corea, que aparecieron en cultivares resistentes a las razas conocidas del SMV hasta ese momento (Choi *et al.*, 2005).

En Argentina, se han encontrado las razas G1, G5, G6 (EE.UU.), MS1 y MS2 (Brazil) (Truol y Laguna, 1992). También se han caracterizado biológicamente cuatro aislamientos geográficos de este virus, cuya caracterización molecular aún no se ha realizado: Marcos Juárez (MJ), Venado Tuerto (VT), Manfredi (M) y Noroeste Argentino (NOA), y un aislamiento denominado Planta Vinosa (PV), que ocasiona en algunos cultivares síntomas severos de necrosis de brotes, hojas, pecíolos, tallos y manchas en vainas. Se determinó que los aislamientos PV y MJ son los más severos, en cuanto a las reacciones que producen en cultivares diferenciales, mientras que el aislamiento M es el que ocasiona mayor porcentaje y severidad de manchado de semillas, además de mayor porcentaje de transmisión por las mismas. Por último, el aislamiento PV tiene una mayor capacidad de transmisión por áfidos, aunque todavía no

se han realizado estudios a nivel genómico de los diferentes aislamientos evaluados (Laguna, 2008a).

Las investigaciones referidas a las enfermedades virales en plantas han estado principalmente dirigidas a la genética viral y a los mecanismos de replicación y movimiento (Nelson y Citovsky, 2005; Zaitlin y Hull, 1987) y se han estudiado cambios a nivel transcripcional y proteómico en tejidos infectados (Babu *et al.*, 2008; Casado-Vela *et al.*, 2006; Geri *et al.*, 1999; Golem y Culver, 2003; Itaya, 2002; Whitham *et al.*, 2003). Sin embargo aún se conoce muy poco acerca del impacto de los virus sobre la fisiología de la planta. En este sentido, varios grupos de investigación han estudiado las alteraciones fisiológicas comunes que producen las interacciones compatibles planta-virus, entre los que se encuentran: disminución de fotosíntesis, alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, incrementos en la respiración, acumulación de compuestos nitrogenados, incrementos de actividades oxidasas, aumento de la generación de especies activas de oxígeno (EAO), aceleración de senescencia; procesos que en conjunto producen severos efectos sobre el crecimiento y productividad de las plantas (Goodman *et al.*, 1986; Hull, 2002; Rahoutei *et al.*, 2000).

Todas las interacciones hospedante-virus compatibles que resultan en síntoma de mosaico, presentan alteraciones en la morfología y metabolismo de los cloroplastos. Esto produce una caída en la fotosíntesis, y como consecuencia una disminución en el crecimiento de las plantas enfermas (Goodman *et al.*, 1986). No está claro aún, como la replicación viral produce la destrucción de los cloroplastos, ni los mecanismos concretos a través de los cuales los virus inhiben la fotosíntesis. Estudios previos desarrollados en el INTA con el virus del moteado clorótico del girasol (SuCMoV), un potyvirus que establece interacciones compatibles con girasol (Arias *et al.*, 2005), han demostrado aumentos de azúcares solubles (principalmente sacarosa) y almidón provocados por la infección de SuCMoV antes de la aparición del síntoma clorótico (Rodríguez *et al.*, 2010). Esta mayor disponibilidad de azúcares produce una reducción del peróxido de hidrógeno y del Φ PSII (Rodríguez *et al.*, 2012). Asimismo, se han demostrado cambios en el estado redox celular y procesos fotoinhibitorios, medidos como caída en la eficiencia cuántica del fotosistema II y degradación de la proteína D1 (Rodríguez *et al.*, 2010).

HIPÓTESIS

Hipótesis:

- Existen diferencias en las secuencias del genoma de los distintos aislamientos de SMV detectados en Argentina y cada uno de ellos induce alteraciones fisiológicas diferentes en el cultivar en estudio.

OBJETIVOS

Objetivos generales:

1. Determinar la secuencia de distintas regiones genómicas de cinco aislamientos de *Soybean mosaic virus* detectados en el país.
2. Evaluar las alteraciones fisiológicas producidas durante la interacción compatible soja-SMV para cada uno de los aislamientos en estudio.

Objetivos específicos:

1. Amplificar mediante RT-PCR diferentes regiones del genoma del SMV y secuenciar los productos obtenidos.
2. Comparar y determinar diferencias entre las secuencias de los genomas obtenidos y otras publicadas en el NCBI (National Center Biotechnology Information).
3. Caracterizar durante la interacción entre soja y los diferentes aislamientos del *Soybean mosaic virus* (SMV) los cambios en:
 - a) superficie foliar
 - b) contenido viral
 - c) eficiencia cuántica del fotosistema II
 - d) contenido de clorofilas
 - e) contenido de azúcares solubles
 - f) contenido de almidón
 - g) daño oxidativo
 - h) peso seco

MATERIALES Y MÉTODOS

1) MATERIAL BIOLÓGICO

Inóculo original de SMV

Se utilizaron cuatro aislamientos de SMV que fueron recolectados en 1999 a partir de cultivares de soja infectados naturalmente, en Marcos Juárez (MJ), Manfredi (M), Noroeste Argentino (NOA) y Venado Tuerto (VT). También se utilizó un quinto aislamiento denominado Planta vinosa (PV) que se caracteriza por producir síntomas severos de necrosis, recolectados durante la misma campaña (Figura 6).

Todas las muestras de hojas con dichos aislamientos se encontraban liofilizadas y mantenidas a -80°C .



Figura 6: Localización de los lugares donde se recolectaron los aislamientos de SMV utilizados (Laguna *et al.*, 2000).

Cultivares de soja

Se trabajó con dos cultivares de soja: Don Mario 4800 (provisto por el IPAVE, INTA), y Davis (provisto por INTA Paraná).

2) RECUPERACIÓN DEL INÓCULO

Los diferentes aislamientos se inocularon a plantas de soja (cultivar Don Mario 4800), utilizando Tampón Fosfato de potasio pH 7,5 (anexo, protocolo 1). Las plantas inoculadas se mantuvieron en un invernáculo con temperatura y luz controlada.

Luego de la aparición de síntomas (aproximadamente 10 días después de la inoculación), se procedió a verificar la infección con SMV, para lo cual se realizó un

PTA-ELISA (anexo, protocolo 2) (Lommel *et al.*, 1982), utilizando un antisuero producido en el IPAVE. La lectura de las placas se realizó a 405 nm (A_{405}) en un lector de ELISA marca Dynatech MR 700. Se consideraron enfermas las muestras que superaron el umbral de absorbancia (punto crítico) obtenido por media de A_{405} de los testigos sanos más tres veces su desvío estándar.

De los cinco aislamientos inoculados, solo se recuperaron cuatro: Marcos Juárez, Manfredi, Noroeste Argentino y Planta vinosa, los que fueron utilizados para los posteriores análisis.

3) ANÁLISIS GENÉTICO

Extracción ARN

Una vez confirmada la infección, se realizó la extracción de ARN, a partir de plantas enfermas con los distintos aislamientos en estudio, utilizando el método de Trizol (anexo, protocolo 3) (Chomczynski y Sacchi, 1987). El ARN obtenido se cuantificó en el *nanodrop*® *Spectrophotometer* ND-1000.

Amplificación de los segmentos correspondientes a CP, CI y P1 del genoma viral mediante RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa)

Para la obtención de las secuencias del ARN viral que codifican para las proteínas P1, CI y CP, se realizó la amplificación del segmento completo de P1 y parcial de los correspondientes a CP y CI. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1.

En primer lugar se obtuvo el ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción (RT) (anexo, protocolo 4), para después realizar una PCR (anexo, protocolo 5).

Los productos de PCR obtenidos se corrieron en gel de agarosa 1% para el fragmento CP, y 1,5% para CI y P1. La corrida se realizó por 30 min utilizando tampón TAE 0,5X (anexo, protocolo 5). Luego los geles fueron revelados en Gel red por 10 min y analizados con el analizador de imágenes BioRad.

Debido a que esta metodología solo tuvo éxito para obtener el ADNc de la CP, para poder amplificar los segmentos CI y P1 se realizó RT-PCR (anexo, protocolo 6)

con el kit “Access RT-PCR System” (Promega). Los segmentos amplificados se revelaron en gel como se describió anteriormente.

Tabla 1: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los segmentos codificantes para las proteínas CP, P1 y CI, junto con el tamaño del fragmento que se espera obtener.

Región	Oligonucleótido	Secuencia primer	Fragmento	Cita
CP	SMV-CPf SMV-CPr	5'-CAAGCAGCAAAGATGTAAATG-3' 5'-GTCCATATCTAGGCATATACG-3'	469 pb	(Sherepitko <i>et al.</i> , 2011)
P1	SMV-P1f SMV-P1r	5'-AGTCAAATGGCAACAATCATG-3' 5'-GGGAGTAGTGCTGAATATCC-3'	934 pb	(Sherepitko <i>et al.</i> , 2011)
CI	SMV CI5' SMV CI3'	5'-GCATTCAACTGTGCGCTTAAAGAAT-3' 5'-TTGAGCTGCAAAAATTTACTCACTT-3'	1385 pb	(Kim <i>et al.</i> , 2004)

Secuenciación de los segmentos CP, CI y P1 del genoma viral

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit “DNA cleaning and concentrator”, siguiendo el protocolo provisto por el fabricante (Zymo research), y enviados a la unidad de Genómica del INTA Castelar para su secuenciación directa, junto con los cebadores correspondientes, en una concentración de 5 µM.

Análisis de las secuencias obtenidas y de relaciones filogenéticas entre aislamientos

Una vez obtenidas las secuencias sentido y antisentido de cada aislamiento, las mismas fueron comparadas entre sí y con las de otros aislamientos del SMV, disponibles en el *National Center of Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para ello, se empleó el programa *Blastn* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

A los fines de analizar la homología de secuencias se utilizó el programa LASERGENE (DNASTAR Inc. Madison, WI, USA). Los alineamientos múltiples de las secuencias de nucleótidos se realizaron con el programa *Clustal W* (<http://www.justbio.com>). Los árboles filogenéticos se generaron con el programa *MEGA* versión 5.2 (www.megasoftware.net) (Kumar *et al.*, 1994), empleando el método de Maximun Likelihood (ML). La significancia estadística del orden de las ramas se estimó realizando 2000 repeticiones del alineamiento múltiple original. Las secuencias utilizadas para la construcción de árboles se eligieron en función de las homologías obtenidas en *Blastp* (tabla 2).

Tabla 2: Aislamientos utilizados para la construcción de los árboles filogenéticos.

Raza/Aislamiento	País	Nro GenBank
TNP	Estados Unidos	HQ845735
Rsv4-RB3	Canadá	JN416770
L	Canadá	EU871724
NP-L	Canadá	HQ166266
WS32	Corea del Sur	FJ640954
WS37	Corea del Sur	FJ640955
WS101	Corea del Sur	FJ640957
WS202	Corea del Sur	FJ640974
WS205	Corea del Sur	FJ640975
G1	Corea del Sur	FJ640977
G3	Corea del Sur	FJ640978
G4	Corea del Sur	FJ640979
G5	Corea del Sur	AY294044
G6	Corea del Sur	AF242845
G5H	Corea del Sur	FJ807701
Go11	Irán	KF135491
Lo3	Irán	KF135490
Ar33	Irán	KF297335
LJZ010	China	KP710866
XFQ010	China	KP710874

Análisis de recombinación

Con el fin de detectar eventos de recombinación entre los distintos aislamientos en estudio, se utilizó el programa RDP4 (Recombination Detection Program v.4.82), utilizando las configuraciones por defecto. Dicho programa utiliza diversos algoritmos incluyendo RDP, GENECONV, MaxChi, BOOTSCAN y SISCAN (<http://web.cbio.uct.ac.za/~darren/rdp.html>) (Martin *et al.*, 2015).

4) ANÁLISIS FISIOLÓGICO

Para los análisis fisiológicos, se utilizaron plantas de soja de los cultivares Don Mario 4800 y Davis.

Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% V/V por 5 min y germinadas en cámara húmeda a 28°C por 48 hs. Una vez germinadas se pasaron a macetas con tierra y se las hizo crecer dentro de una cámara de cultivo con fotoperiodo 16/8 luz/oscuridad, iluminación 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad del 65%. El riego se realizó por sub-irrigación.

Las plantas trasplantadas se inocularon con el SMV (anexo, protocolo 1) a los siete días de ser puestas a germinar.

Todos los parámetros fueron medidos a dos tiempos: antes y después de la aparición de síntomas, 4 y 12 días post-inoculación respectivamente.

Para las mediciones de MDA (malondialdehído), clorofilas, azúcares solubles, almidón y contenido viral, se cortó la primera hoja trifoliada (Figura 7) y se guardó inmediatamente en aire líquido. Las muestras se conservaron a -80°C hasta el día en que se procesaron.

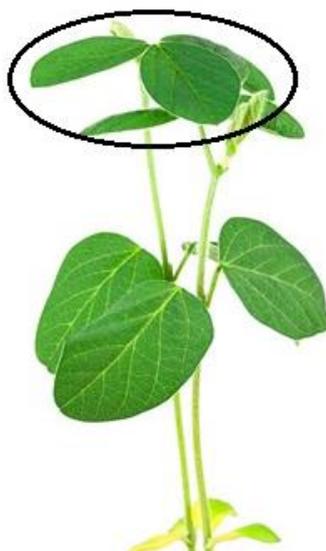


Figura 7: Primer hoja trifoliada de la planta de soja.

Área foliar

Se tomó una foto de la primer hoja trifoliada de cada planta (Figura 7) y luego se determinó su área con el programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics, 2002).

Fluorescencia de clorofilas

Se midió la fluorescencia de las clorofilas para estimar el estado de los fotosistemas, con un sistema de fluorescencia modulada (FMS2, Hansatech U.K.). Las mediciones del ΦPSII y F_v/F_m se realizaron en el foliolo central de la primera hoja trifoliada de cada planta (Figura 7).

Clorofilas

Se estimó el contenido de clorofilas con el medidor CL-01 (Hansatech, U.K.). Las mediciones se tomaron del foliolo central de la primera hoja trifoliada de cada planta (Figura 7).

Por otro lado se midió la concentración de clorofilas, leyendo a 654 nm (anexo, protocolo 7) y utilizando luego la siguiente fórmula (Palta, 1990):

$$\frac{1000 * DO\ 654}{39,8\ (ug/ml)} * \frac{volumen\ etanol\ 80\% (ml)}{peso\ fresco (mg)}$$

Malondialdehído (MDA)

Se midió la concentración de MDA como un indicador de daño oxidativo (anexo, protocolo 7). Las concentraciones se calcularon con la siguiente fórmula (Heath y Packer, 1967):

$$\frac{(DO\ 540 - DO\ 600) * volumen\ etanol\ 80\% (ul)}{155\ (mM^{-1} * cm^{-1}) * peso\ fresco (mg) * volumen\ usado (ul)}$$

Azúcares solubles y almidón

Se molieron 50 mg de hoja congelada con 500 µl de tampón extracción HEPES pH 8,3 (anexo, protocolos 8 y 9). Luego se centrifugó a 9000 xg, 30 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para medir azúcares solubles (anexo, protocolo 8) y el pellet para medir almidón (anexo, protocolo 9) (Guan y Janes, 1991).

Contenido viral

En primer lugar se midió la cantidad de proteína en cada muestra con Coomassie Brilliant Blue G-250 (anexo, protocolo) (Bradford, 1976), y luego se sembró en una placa MicroWell™ Nunc-Immuno™ NUNC® la cantidad del extracto original necesaria para tener 25 µg de proteína. Se completó hasta 100 µl con tampón de revestimiento y se procedió con el método ya descrito para PTA-ELISA (anexo, protocolo 2).

Peso seco (parte aérea)

Al finalizar los muestreos ya descritos se cortaron todas las plantas por la base y se secaron en estufa a 70°C por 48 hs, dentro de bolsas de papel.

5) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron sujetos a un análisis de varianza paramétrico (ANAVA), para lo cual se probaron los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de varianzas para cada variable utilizada. Las diferencias significativas (p<0,05) entre

tratamientos se evaluaron mediante una prueba de rango múltiple DGC. Todos estos análisis se realizaron con el programa InfoStat 2015 (<http://www.infostat.com.ar>) (Di Rienzo *et al.*, 2015).

RESULTADOS

ANÁLISIS GENÉTICO

Las secuencias obtenidas para cada segmento de estudio se muestran en el anexo resultados 1-3, y los porcentajes de similitud y divergencia entre los aislamientos para cada segmento se presentan en la tabla 3. Con estos datos se puede apreciar una gran similitud entre los aislamientos NOA y PV en todas las secuencias analizadas, y una notable diferencia entre estos y los aislamientos M y MJ para el segmento P1.

Tabla 3: Porcentajes de similitud y divergencia entre los aislamientos analizados.

Segmento	Aislamientos	Similitud (%)			Divergencia (%)		
		MJ	NOA	PV	MJ	NOA	PV
P1	M	95,9	53,1	53,6	4,2	31,4	30,6
	MJ	-	51,1	51,4	-	32,3	31,9
	NOA	-	-	99,1	-	-	0,9
CI	M	90,2	97,8	97,7	10,8	2,2	2,3
	MJ	-	91	91	-	9,8	9,8
	NOA	-	-	99,5	-	-	0,6
CP	M	92,9	95,3	94,9	7,6	4,9	5,1
	MJ	-	95,3	95,6	-	4,9	4,6
	NOA	-	-	99,6	-	-	0,2

Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos obtenidos, se muestran en las figuras 8-10. Los aislamientos NOA y PV aparecen muy relacionados entre sí en todos los casos y solo en el análisis filogenético del segmento P1 se asocian a su vez con el aislamiento LJZ010 (China), con un 100% de confianza. En cuanto al aislamiento MJ, se encuentra relacionado con los aislamientos/razas WS101, G6, y WS32, todos originarios de Corea del Sur, para el análisis con CP, y con estos mismos y la raza G5 (Corea del sur) para CI, ambos con un 99% de confianza. Por otro lado, para el análisis realizado con el segmento P1, agrupó solo con la raza G5H (Corea del sur), con un 91% de confianza. Por último, el aislamiento M agrupó con la raza TNP (EE.UU.), con 97% y 69% de confianza en los análisis de los fragmentos correspondientes a P1 y CI respectivamente, mientras que para CP agrupó con las razas G1 (Corea del sur), TNP (EE.UU.) y G3 (Corea del sur), con un 96% de confianza.

Árbol filogenético-P1

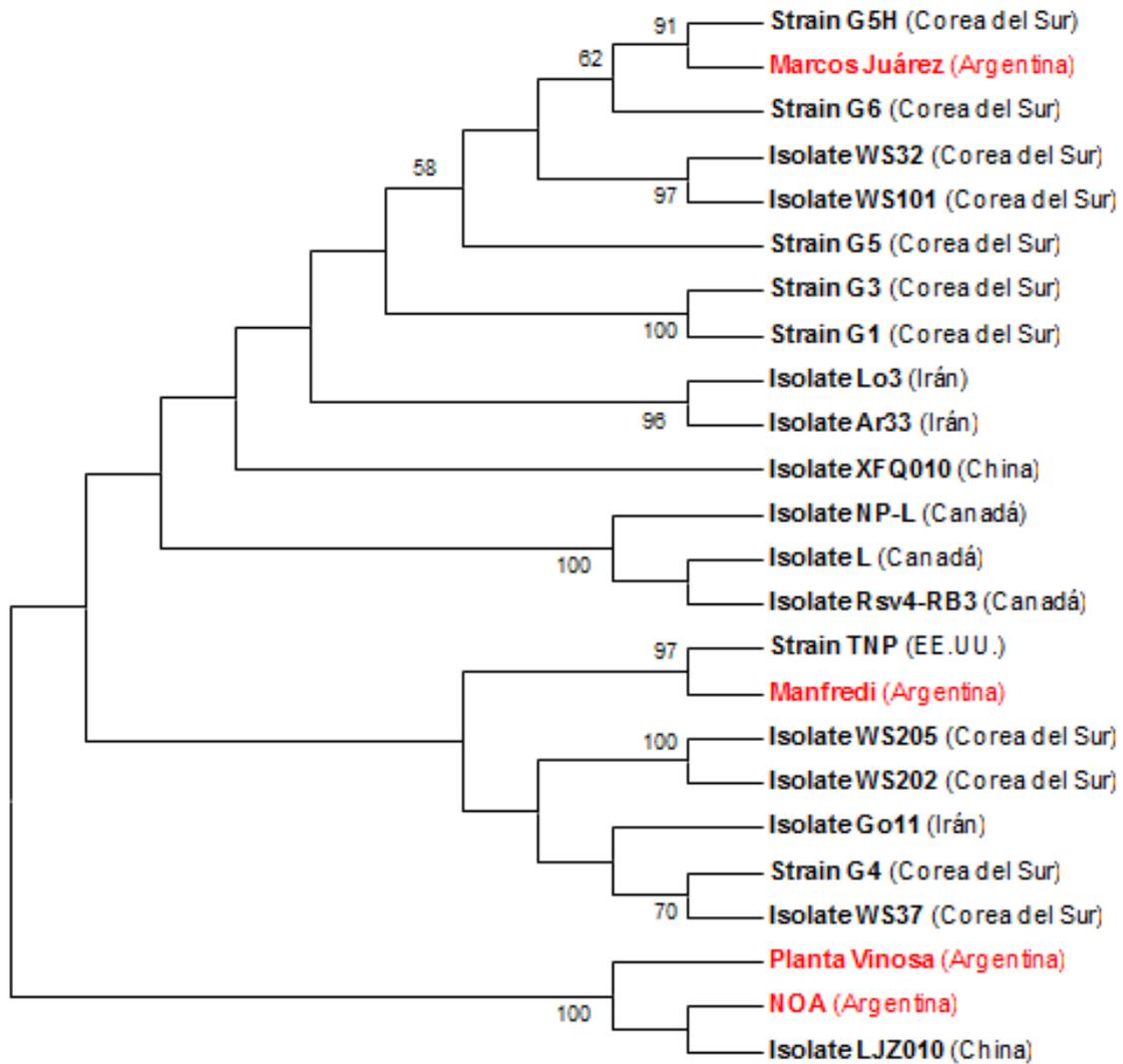


Figura 8: Árbol filogenético de las razas/aislamientos analizados, creado en base a las secuencias del segmento P1 con el programa *MEGA* versión 5.2. Los números colocados en las ramas indican los valores de confianza para 2000 repeticiones.

Árbol filogenético-CI

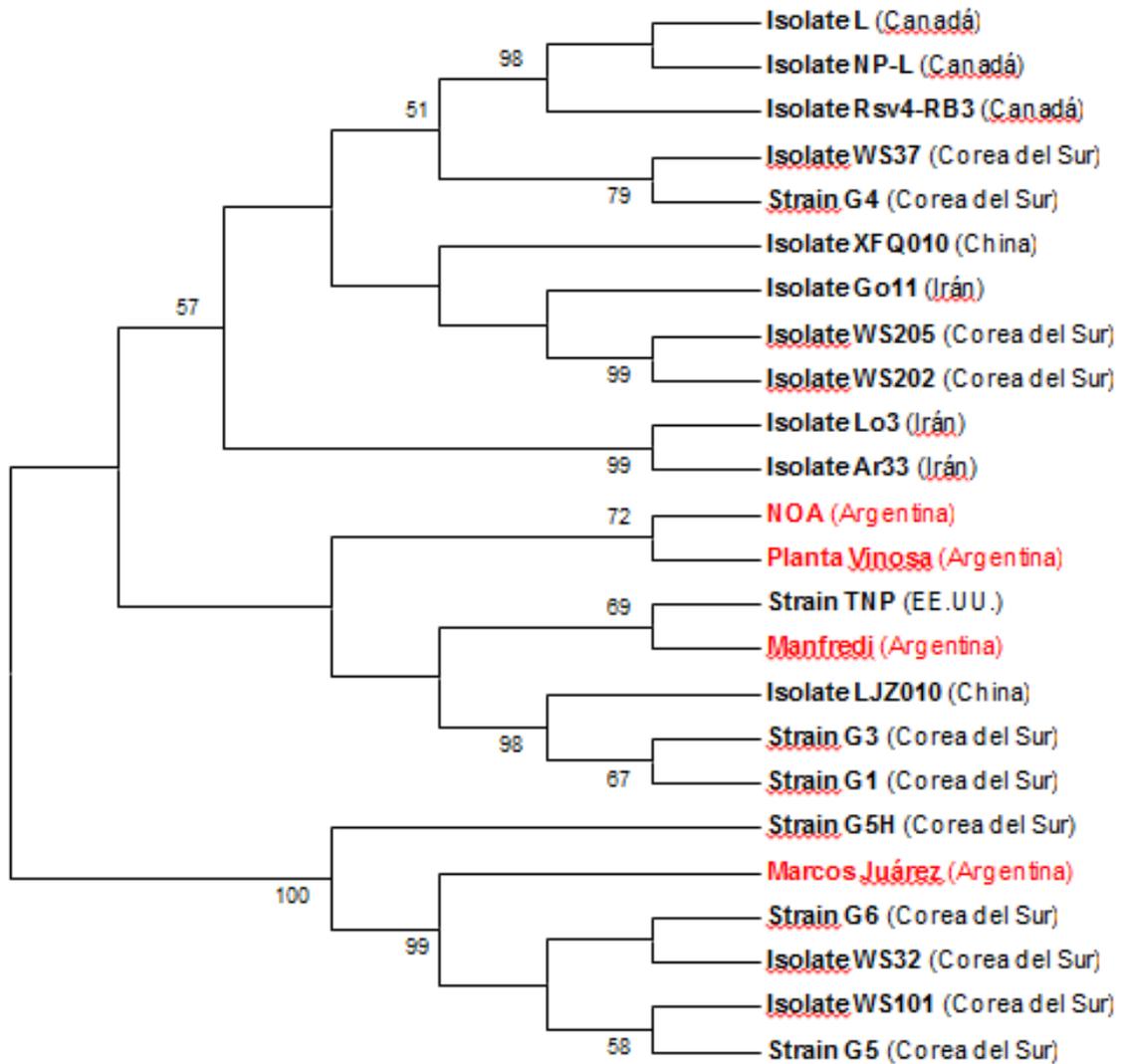


Figura 9: Árbol filogenético de las razas/aislamientos analizados, creado en base a las secuencias del segmento CI con el programa *MEGA* versión 5.2. Los números colocados en las ramas indican los valores de confianza para 2000 repeticiones.

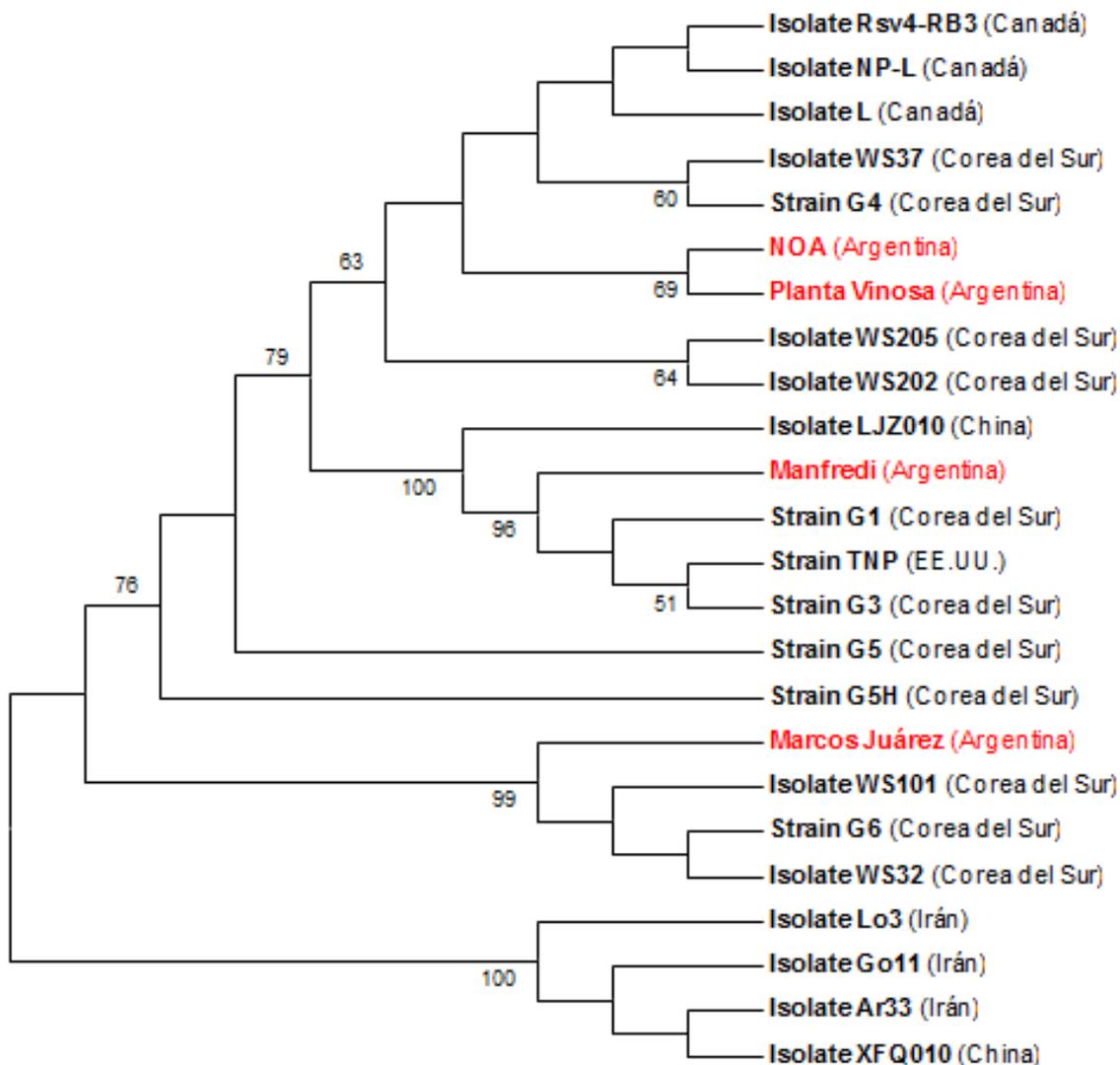
Árbol filogenético-CP

Figura 10: Árbol filogenético de las razas/aislamientos analizados, creado en base a las secuencias del segmento CP con el programa *MEGA* versión 5.2. Los números colocados en las ramas indican los valores de confianza para 2000 repeticiones.

Recombinación

De acuerdo a los análisis realizados, los aislamientos NOA, PV y M podrían haber surgido por recombinación (Figuras 11-13). Los segmentos P1 de los aislamientos NOA y PV presentaron el mismo evento de recombinación entre LJZ010 (parental mayor) y la raza G4 (parental menor), siendo los puntos de intercambio los nucleótidos 690 y 1128 aproximadamente para NOA, y 690 y 1185 para PV. Por otro lado, M sería recombinante entre las razas G4 (parental mayor) y G3 (parental menor), al igual que la raza TNP, en el análisis con el segmento CI. Los puntos de intercambio para M son aproximadamente los nucleótidos 1560 y 1902.

Segmento

P1

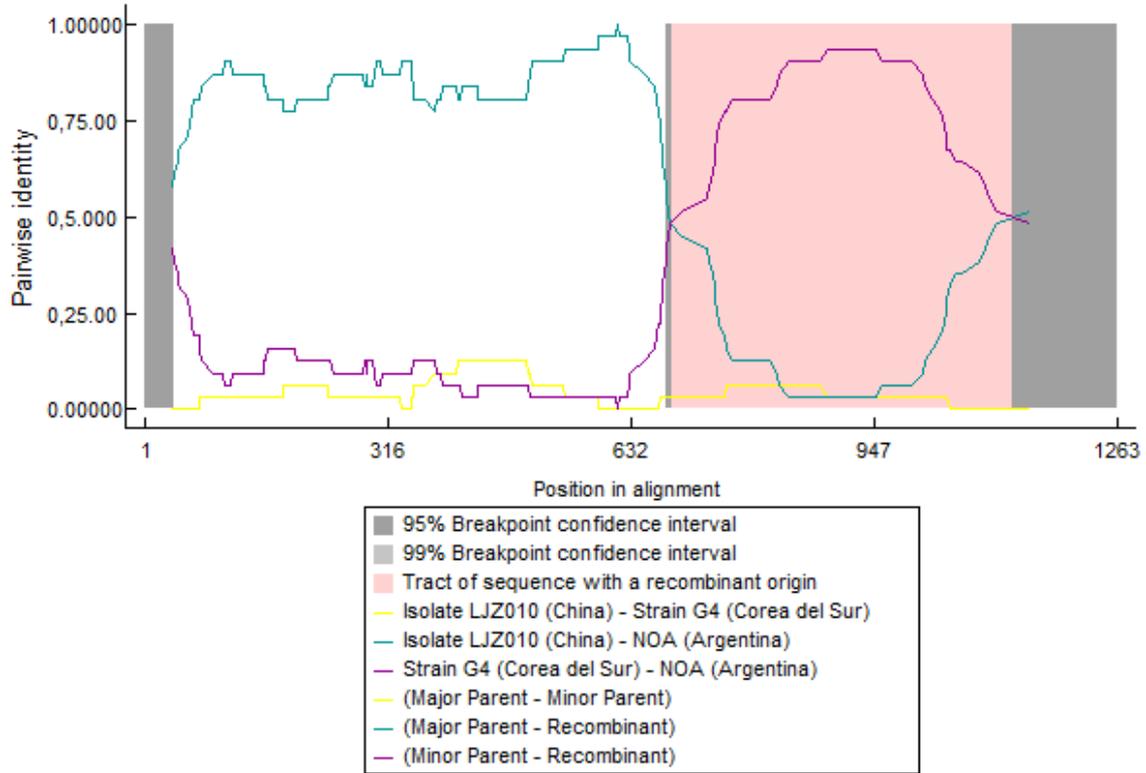


Figura 11: Perfiles de identidad de nucleótidos del ADN del fragmento correspondiente a P1 del aislamiento NOA, con los parentales LJJ2010 (celeste) y G4 (violeta) del evento de recombinación detectado y puntos de quiebre del mismo. Realizado con el programa RDP4.

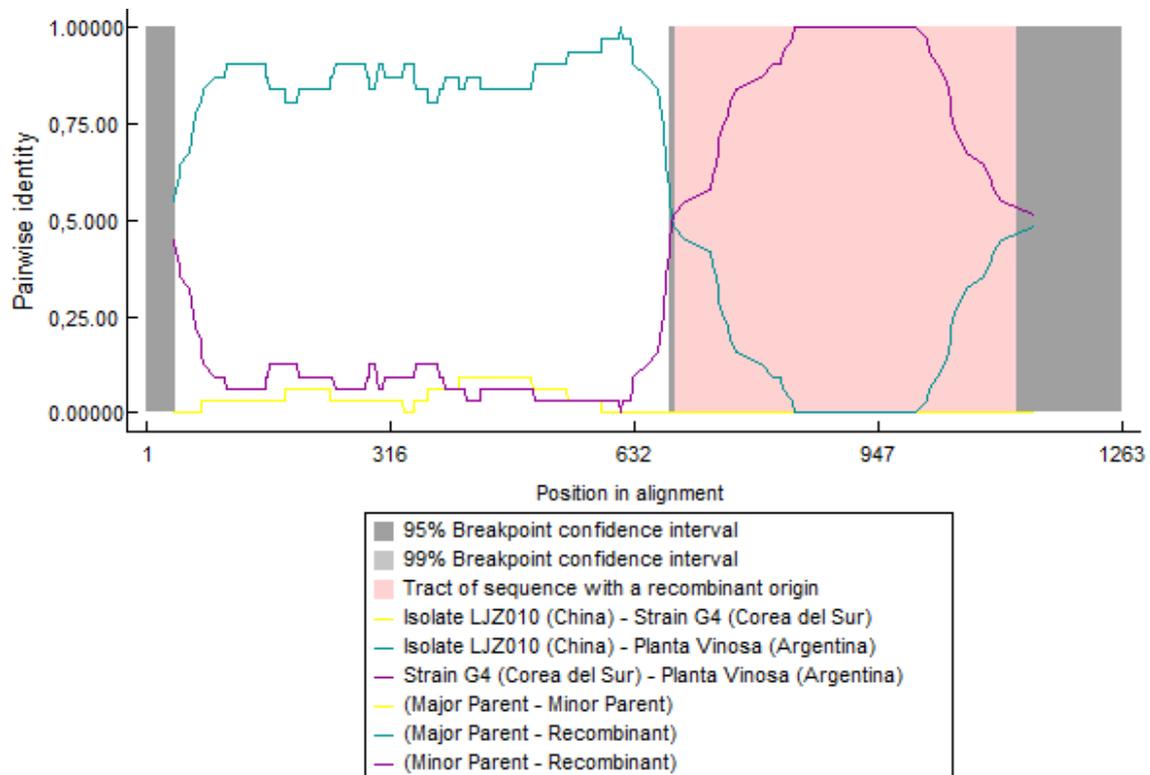


Figura 12: Perfiles de identidad de nucleótidos del ADN del fragmento correspondiente a P1 del aislamiento PV, con los parentales LJZ010 (celeste) y G4 (violeta) del evento de recombinación detectado y puntos de quiebre del mismo. Realizado con el programa RDP4.

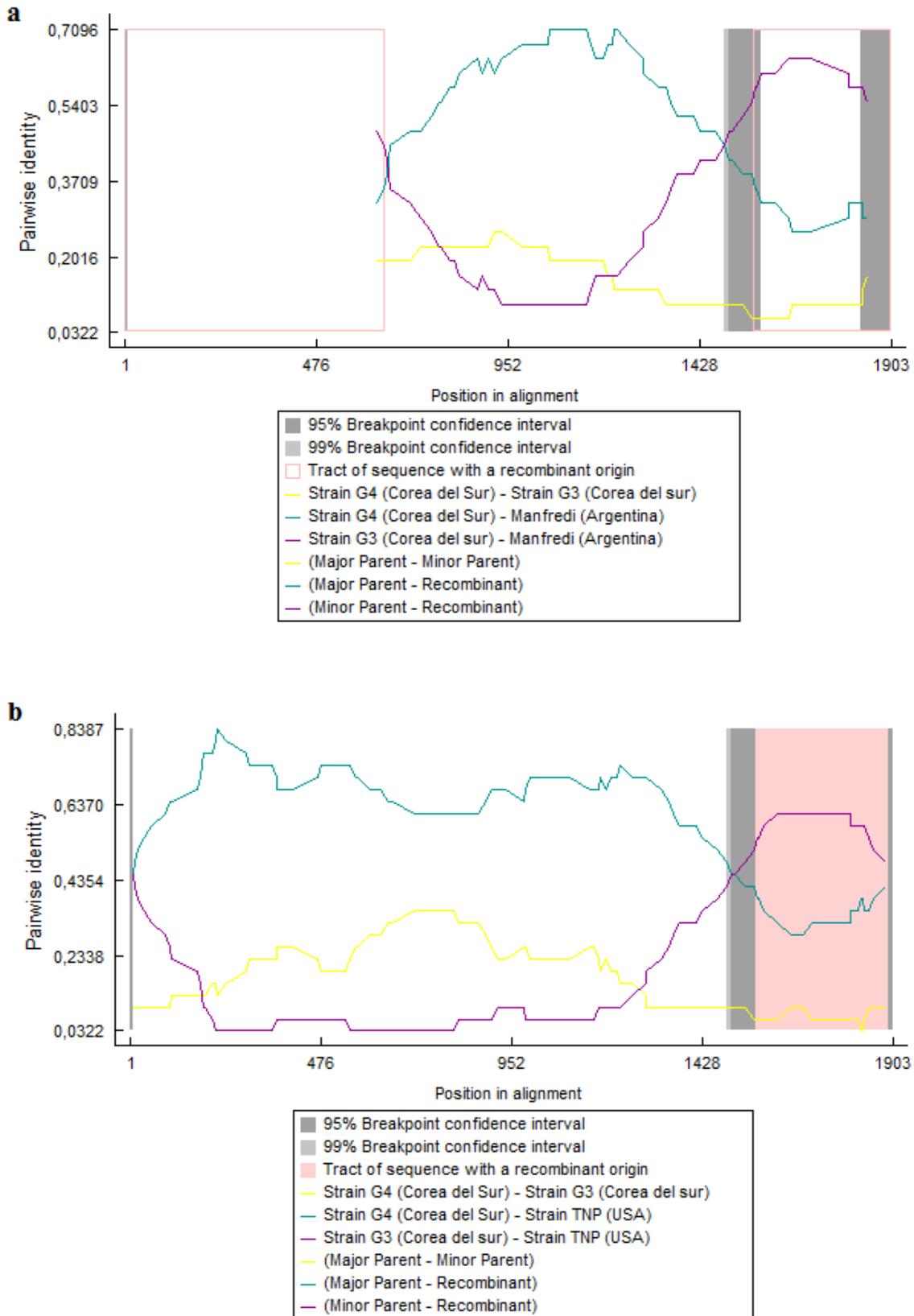


Figura 13: Perfiles de identidad de nucleótidos del ADN del fragmento correspondiente a CI del aislamiento M (a) y la raza TNP (b), con los parentales G4 (celeste) y G3 (violeta) de los eventos de recombinación detectados y puntos de quiebre de los mismos. Realizados con el programa RDP4.

ANÁLISIS FISIOLÓGICO

A continuación se muestran los resultados obtenidos antes y después de síntoma para cada variable medida utilizando el cv. Don Mario 4800. Las comparaciones estadísticas se realizaron únicamente entre los tratamientos, y no con respecto a los controles, ya que todos los valores se encuentran relativizados a su respectivo control a través de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Valor} - \text{Media del control}}{\text{Media del control}}$$

En cuanto a las variables macroscópicas, es decir, peso seco de la parte aérea y área foliar, solo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el análisis del área foliar después de síntoma, en el cual solo los aislamientos MJ y PV provocaron una disminución de la misma respecto de los otros tratamientos (Figuras 14-15). Las plantas infectadas con PV fueron las menos afectadas en peso seco (Figura 14), a pesar de no comprobarse diferencias estadísticamente significativas.

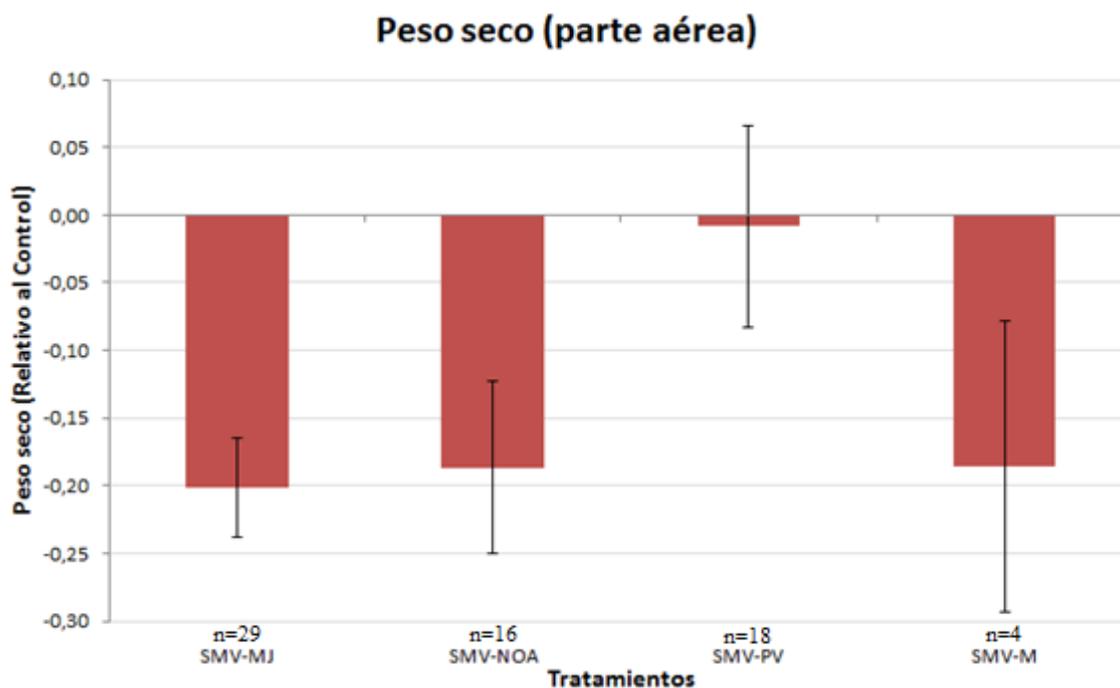


Figura 14: Peso seco de la parte aérea relativizada al control, medida a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico), en gramos. Las barras de error indican el error estándar. Los datos se obtuvieron de dos experimentos independientes.

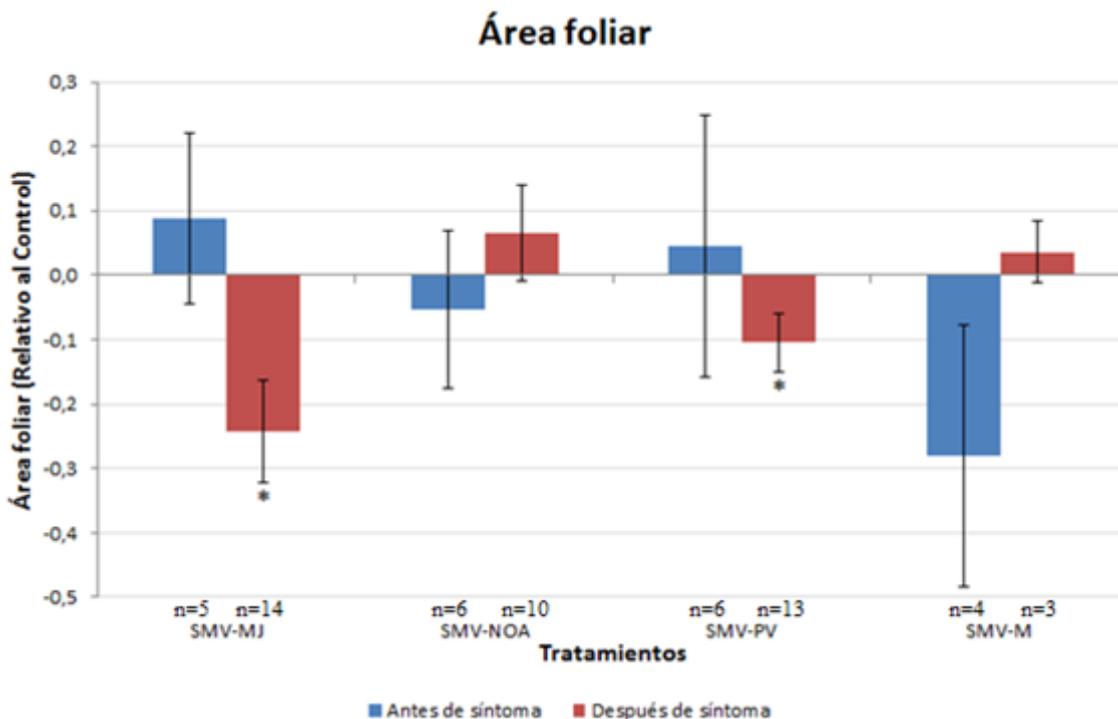


Figura 15: Área foliar relativizada al control, medida antes (4 días post-inoculación) y después (12 días post-inoculación) de síntoma, en cm². Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con *, con un p-valor < 0,05 (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes.

En cuanto al resto de las variables (Figuras 16-22), las únicas que presentaron algún tipo de diferencia, estadísticamente significativa, entre los aislamientos fueron ϕ PSII, azúcares solubles, almidón y MDA.

Todos los aislamientos produjeron una disminución en el ϕ PSII, antes y después de síntoma, excepto el aislamiento NOA que solo lo presentó después de síntoma (Figura 16). Aunque el aislamiento M, después de síntoma, no mostró una diferencia significativa, aparentemente no habría producido una disminución en el ϕ PSII (Figura 16). Por otro lado, todos los aislamientos provocaron un aumento en Fv/Fm medido antes de síntoma, aunque el aislamiento M parecería no producir un aumento de igual magnitud que el resto. Mientras tanto, dicha variable disminuyó después de la aparición de síntoma, en los cuatro tratamientos (Figura 17).

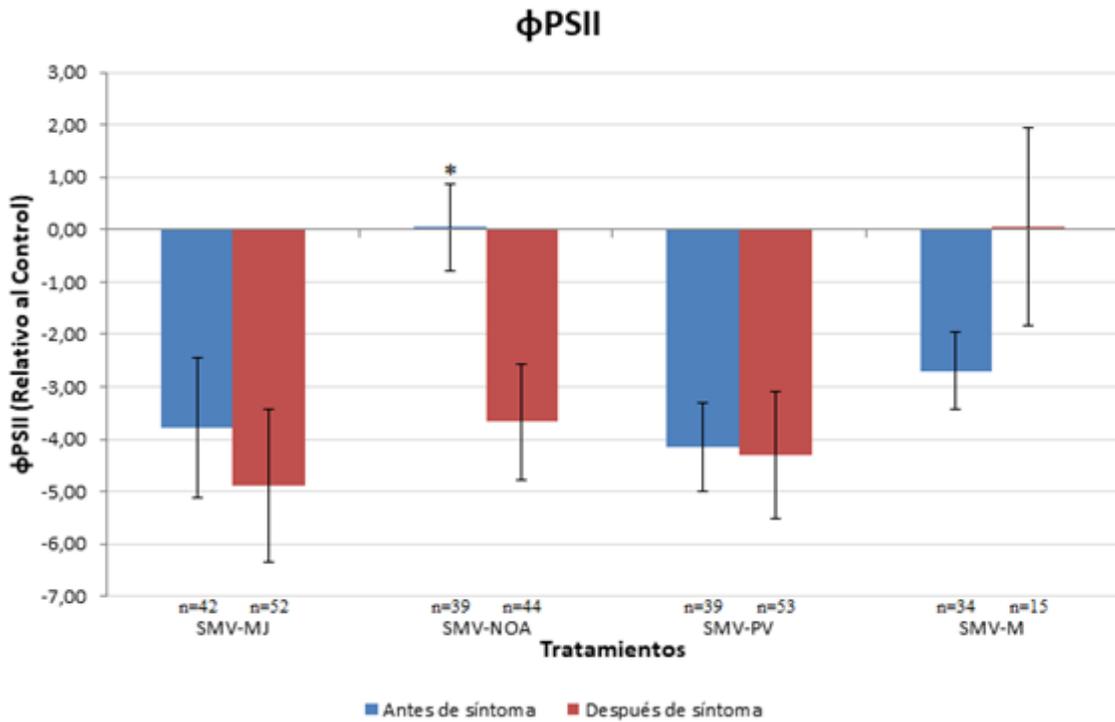


Figura 16: φPSII relativizado al control, medido antes (4 días post-inoculación) y después (12 días post-inoculación) de síntoma. Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con *, con un p-valor < 0,05 (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes.

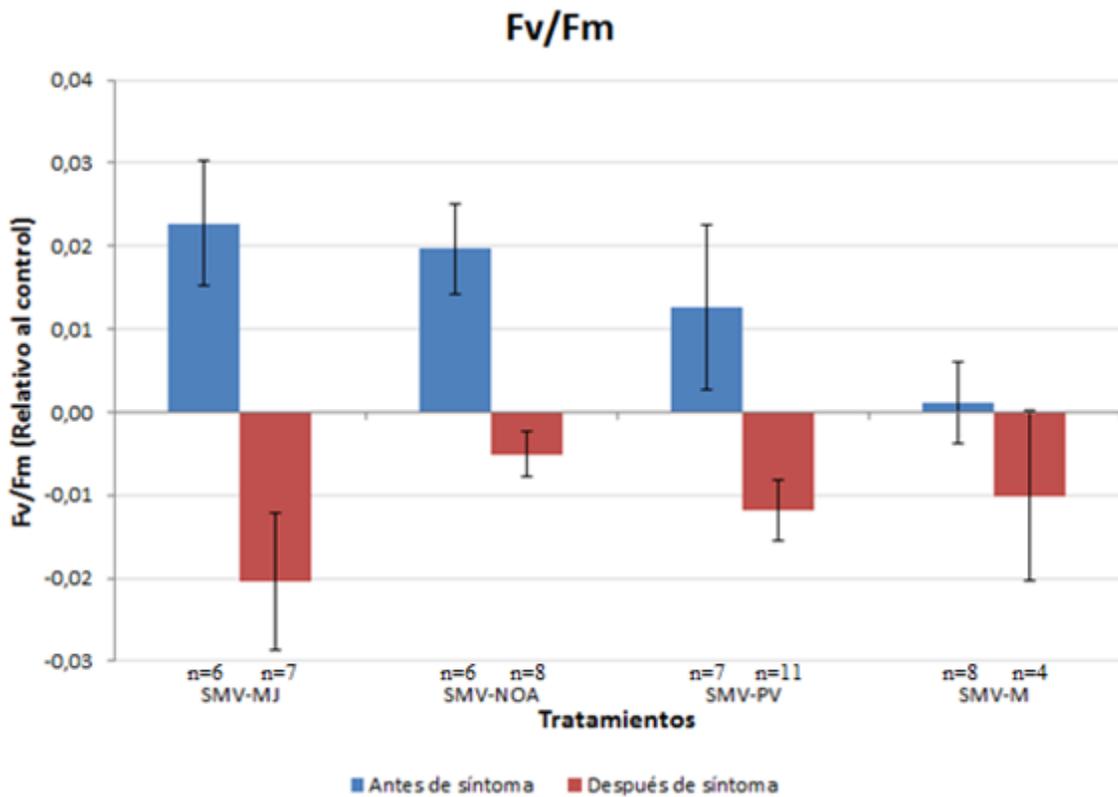


Figura 17: Fv/Fm relativizado al control, medido antes (4 días post-inoculación) y después (12 días post-inoculación) de síntoma. Las barras de error indican el error estándar. Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes.

Para el contenido de clorofilas, los datos obtenidos a partir del SPAD no fueron concluyentes por lo cual no se tuvieron en cuenta a la hora de los análisis. Al analizar la concentración de clorofilas extraídas, se pudo observar que las plantas infectadas con SMV-M disminuyeron su concentración antes de la aparición de los síntomas cloróticos, aunque no se pudo confirmar estadísticamente. Por otro lado, en las muestras tomadas después de la aparición de síntomas, solo se pudo observar una tendencia a disminuir especialmente en la infección con SMV-MJ (Figura 18).

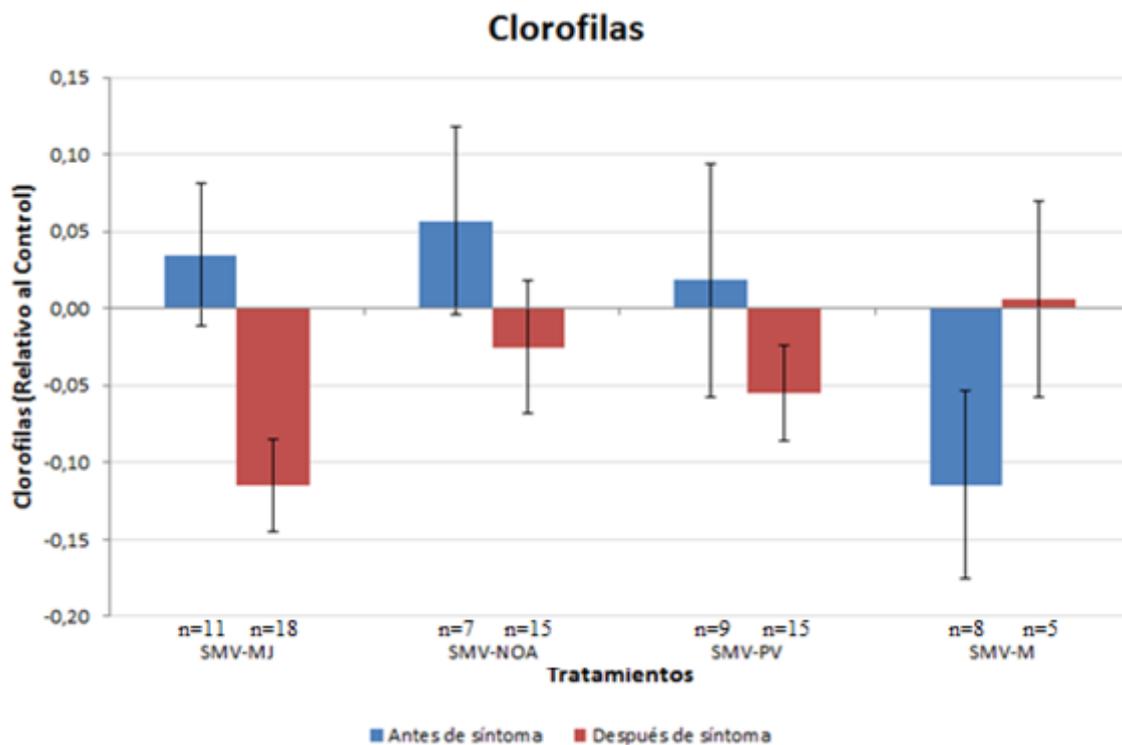


Figura 18: Concentración de clorofilas relativizada al control, medida antes (4 días post-inoculación) y después (12 días post-inoculación) de síntoma, en $\mu\text{g}/\text{mg}$. Las barras de error indican el error estándar. Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes.

A continuación se midieron las concentraciones de azúcares solubles y almidón. Se observó una importante acumulación de azúcares después de síntoma, produciendo un aumento significativamente mayor el aislamiento M (Figura 19). En cuanto al almidón, se detectó un aumento del mismo en ambos tiempos, y el aislamiento M volvió a inducir un mayor aumento después de síntoma. Cabe destacar que las infecciones por SMV-PV y SMV-MJ parecerían no producir un aumento en el estado tardío, aunque no fueron estadísticamente comprobable (Figura 20).

Azúcares solubles

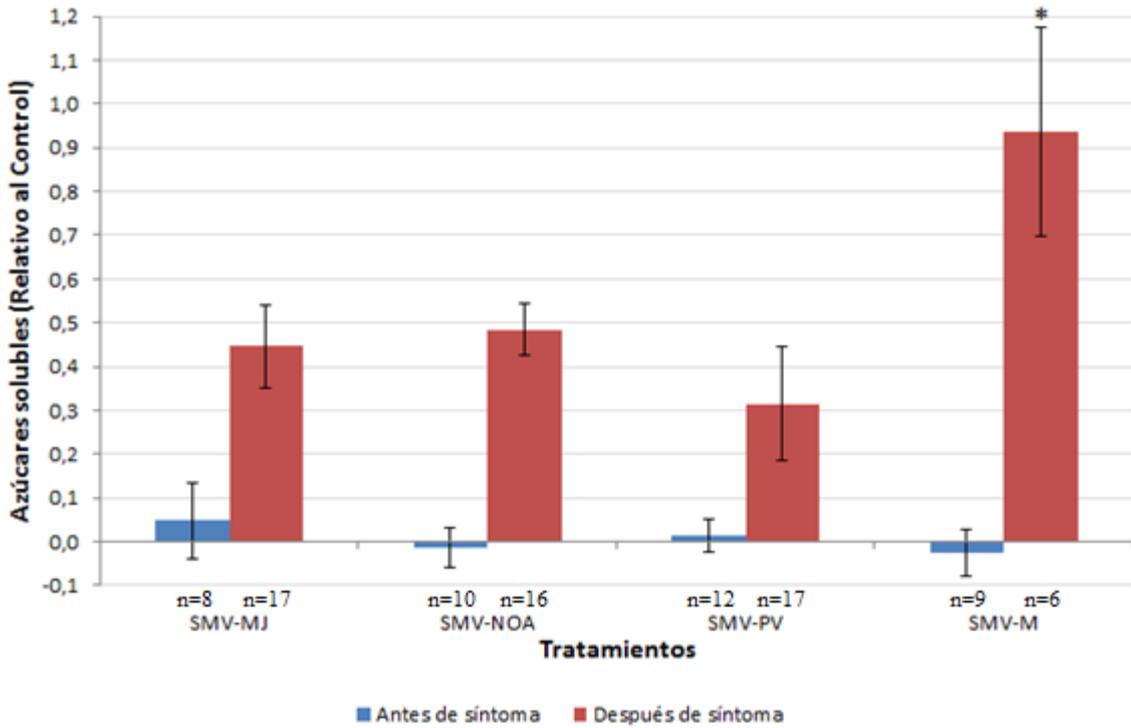


Figura 19: Concentración de azúcares solubles relativizada al control, medida antes (4 días post-inoculación) y después (12 días post-inoculación) de síntoma, en µg/mg. Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con *, con un p-valor<0,05 (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes.

Almidón

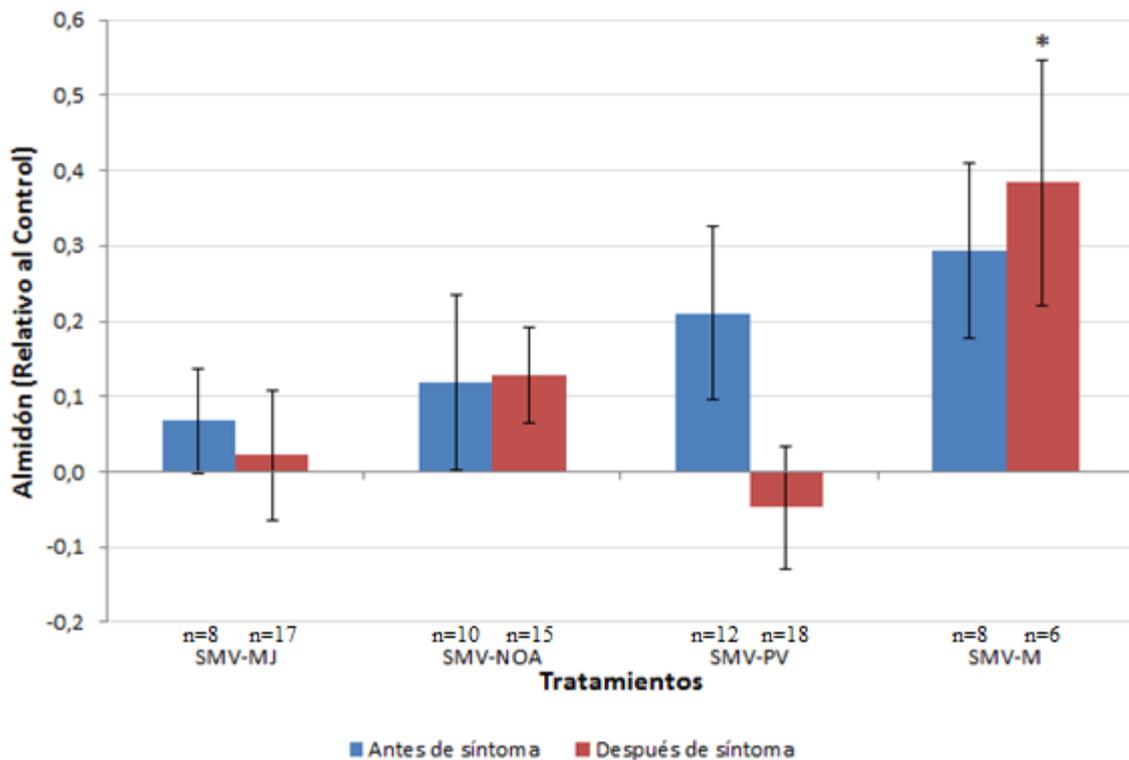


Figura 20: Concentración de almidón relativizada al control, medida antes (4 días post-inoculación) y después (12 días post-inoculación) de síntoma, en $\mu\text{g}/\text{mg}$. Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con *, con un $p\text{-valor} < 0,05$ (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes.

En relación a las concentraciones de MDA, en primer lugar se observó, antes de la aparición de síntomas, un aumento estadísticamente significativo en las plantas infectadas con el aislamiento NOA, mientras que luego de la aparición de síntomas todos los aislamientos produjeron un aumento en su concentración, pero los aislamientos NOA y M lo hicieron un mayor magnitud (Figura 21).

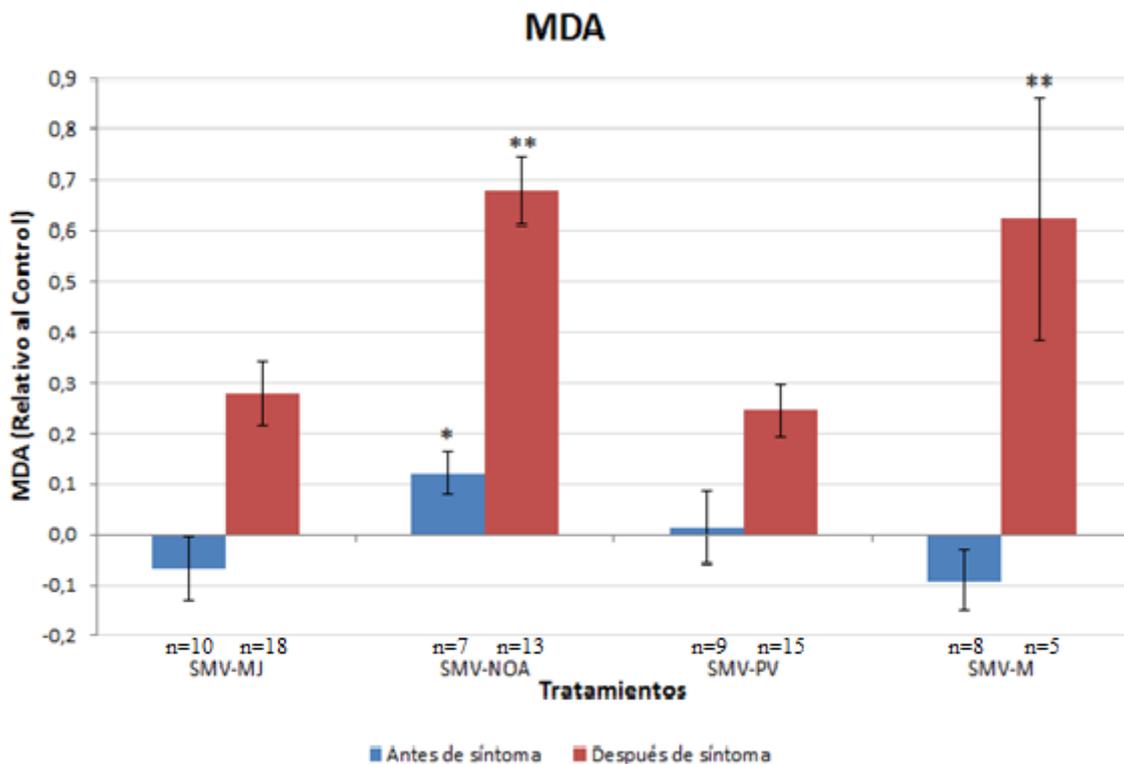


Figura 21: Concentración de MDA relativizada al control, medida antes (4 días post-inoculación) y después (12 días post-inoculación) de síntoma, en nM/mg . Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con * para antes de síntoma y ** para después de síntoma, con un $p\text{-valor} < 0,05$ (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes.

Por último se midió el contenido viral luego de la aparición de síntomas, mostrando todos los aislamientos una carga viral similar (Figura 22).

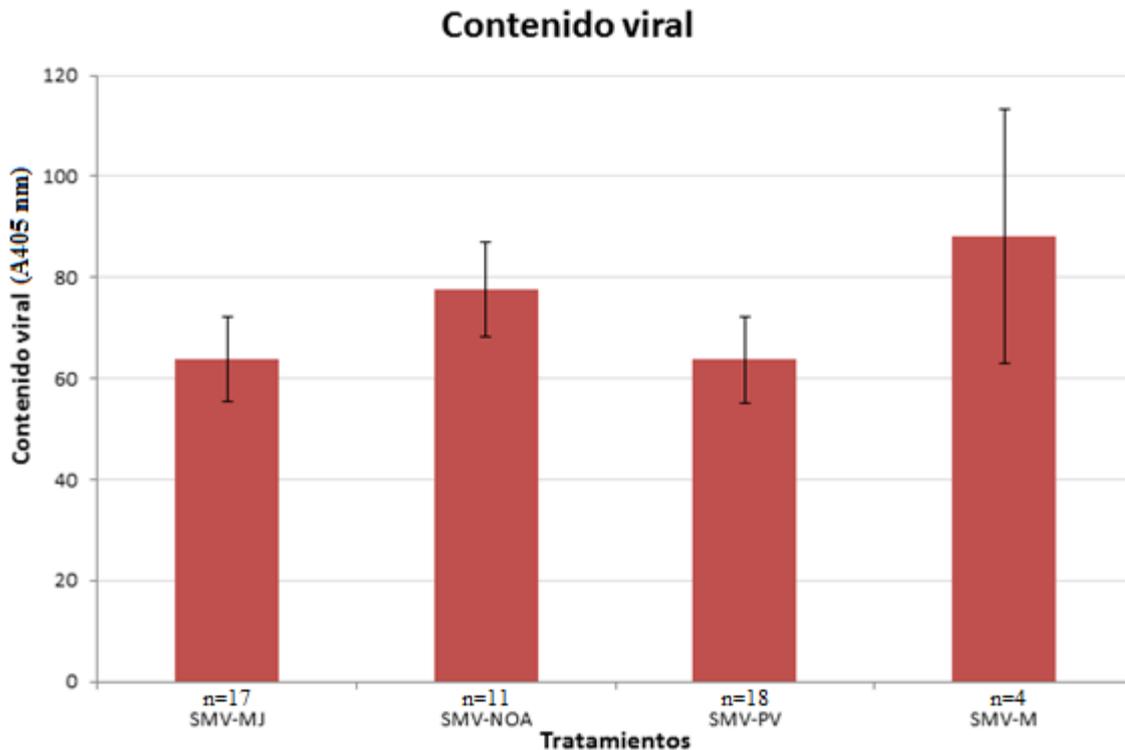


Figura 22: Contenido viral relativizado al control, medida a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico). Lectura a 405 nm de 25 μ g de proteína. Las barras de error indican el error estándar. Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes.

Para comparar el comportamiento de los aislamientos en diferentes cultivares de soja, se buscó medir las mismas variables en plantas del cv Davis. Debido a la baja tasa de infectividad obtenida solo se pudo hacer dicha comparación con el aislamiento MJ y tomando las muestras solo después de la aparición de síntomas.

Los resultados obtenidos mostraron que para el área foliar (Figura 24), Φ PSII (Figura 25), clorofilas (Figura 27), azúcares solubles (Figura 28) y MDA (Figura 30), la infección por SMV-MJ en las plantas del cultivar Davis tuvo un efecto mayor que en las del cultivar Don Mario 4800. Para el peso seco (Figura 23) y almidón (Figura 29) no hubo diferencias entre los cultivares. Por otro lado, en el análisis de Fv/Fm (Figura 26) las plantas del cv. Davis mostraron un comportamiento opuesto a las del cv. Don Mario 4800, ya que el mismo aumentó su valor. Por último, las plantas del cv. Davis contenían una menor carga viral (Figura 31).

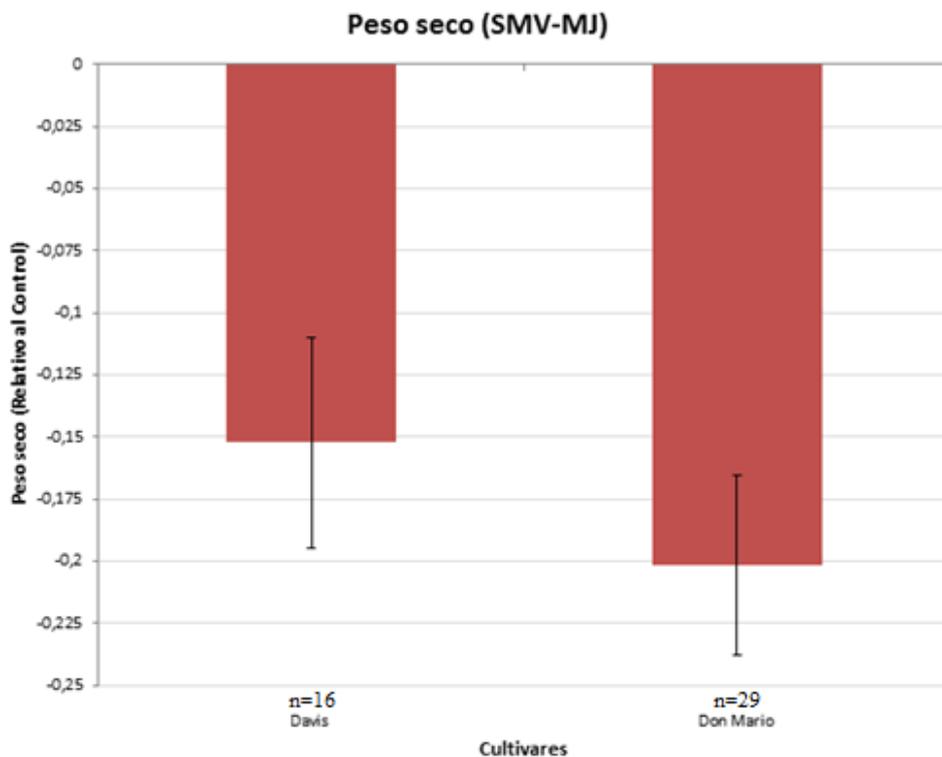


Figura 23: Peso seco de la parte aérea, relativizado al control, medido a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico), en gramos. Las barras de error indican el error estándar. Los datos para el cv. Davis se obtuvieron de dos experimentos independientes.

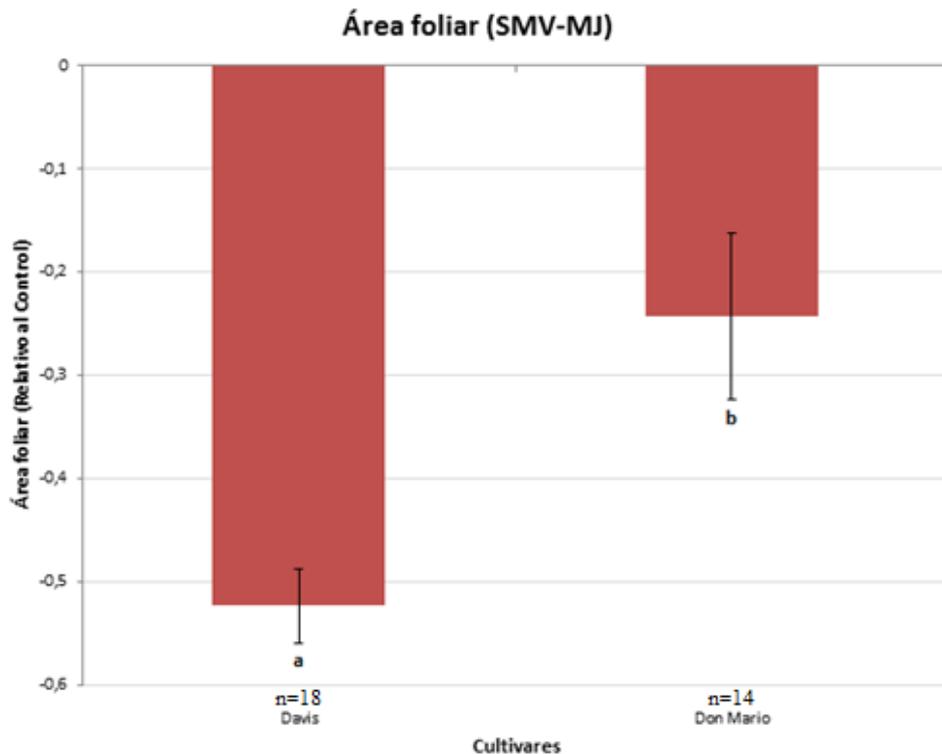


Figura 24: Área foliar relativizada al control, medida a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico), en cm². Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con las letras “a” y “b”, con un p-valor<0,05 (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos para el cv. Davis se obtuvieron de dos experimentos independientes.

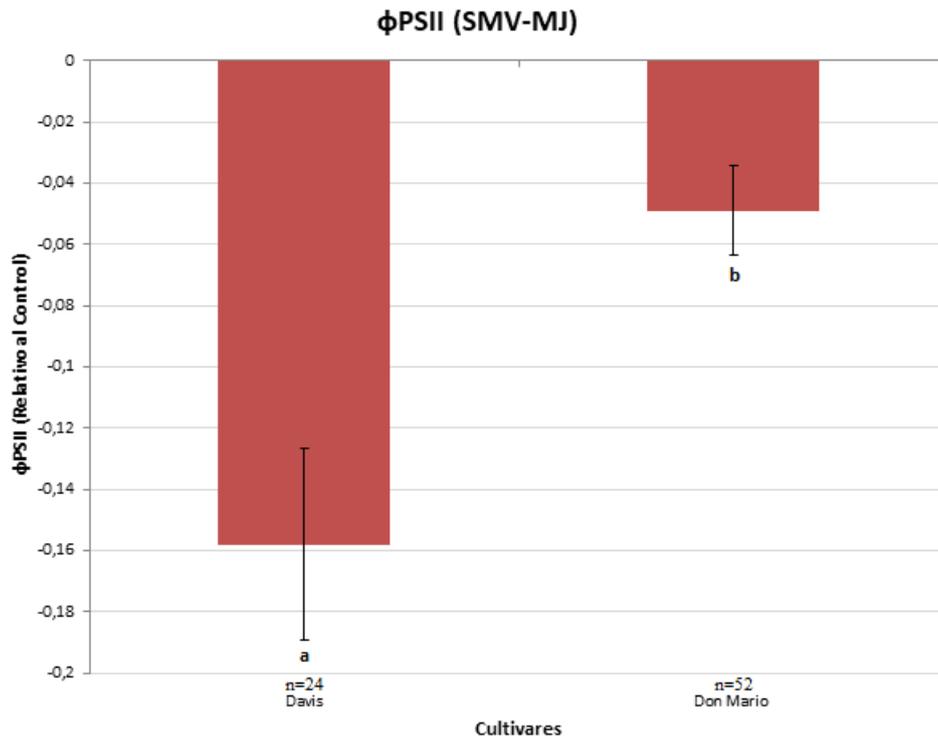


Figura 25: φPSII relativizado al control, medido a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico). Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con las letras “a” y “b”, con un p-valor<0,05 (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos para el cv. Davis se obtuvieron de tres experimentos independientes.

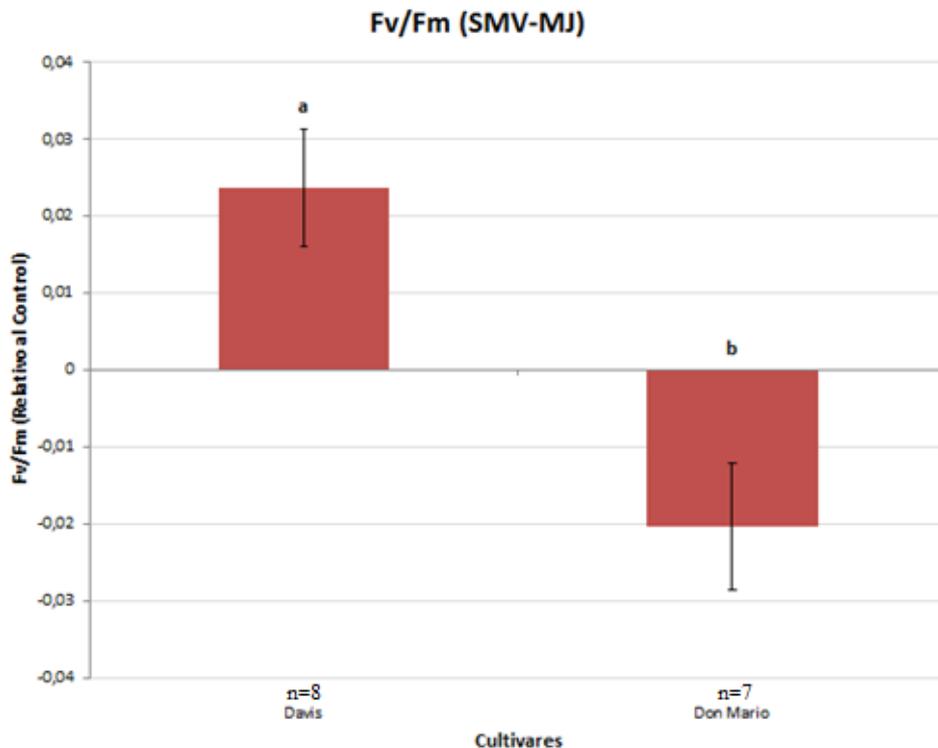


Figura 26: Fv/Fm relativizado al control, medido a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico). Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con las letras “a” y “b”, con un p-valor<0,05 (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos para el cv. Davis se obtuvieron de un experimento.

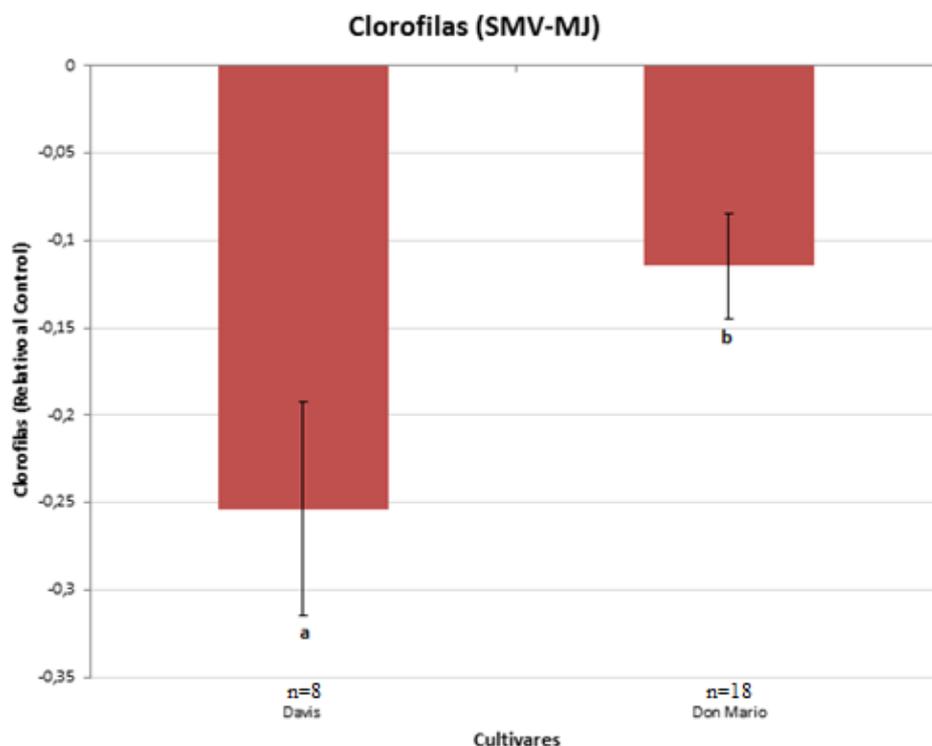


Figura 27: Concentración de clorofilas relativizada al control, medida a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico), en µg/mg. Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con las letras “a” y “b”, con un p-valor<0,05 (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos para el cv. Davis se obtuvieron de tres experimentos independientes.

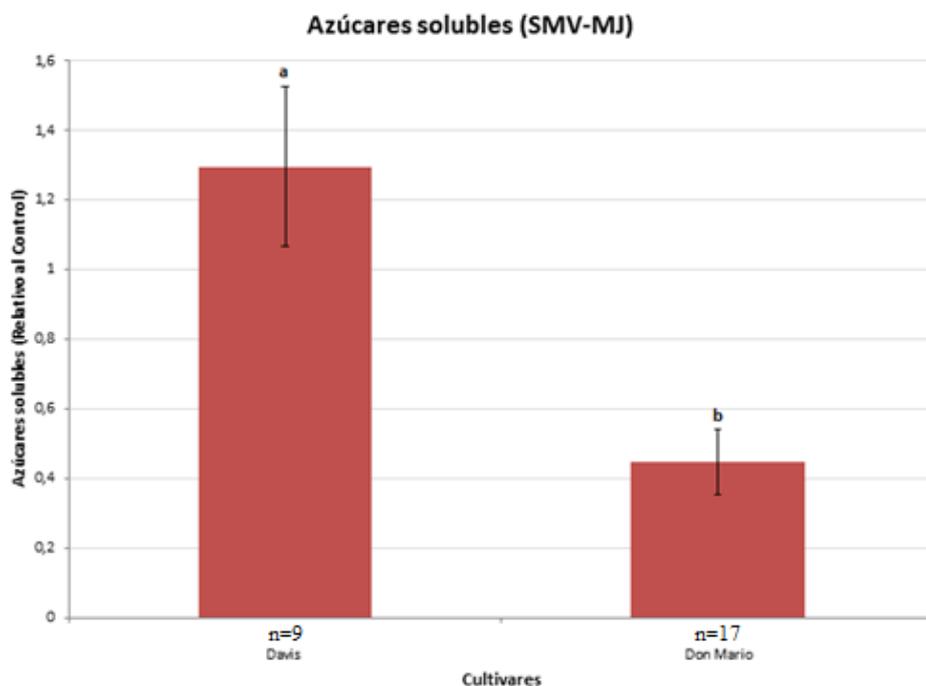


Figura 28: Concentración de azúcares solubles relativizada al control, medida a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico), en µg/mg. Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con las letras “a” y “b”, con un p-valor<0,05 (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos para el cv. Davis se obtuvieron de tres experimentos independientes.

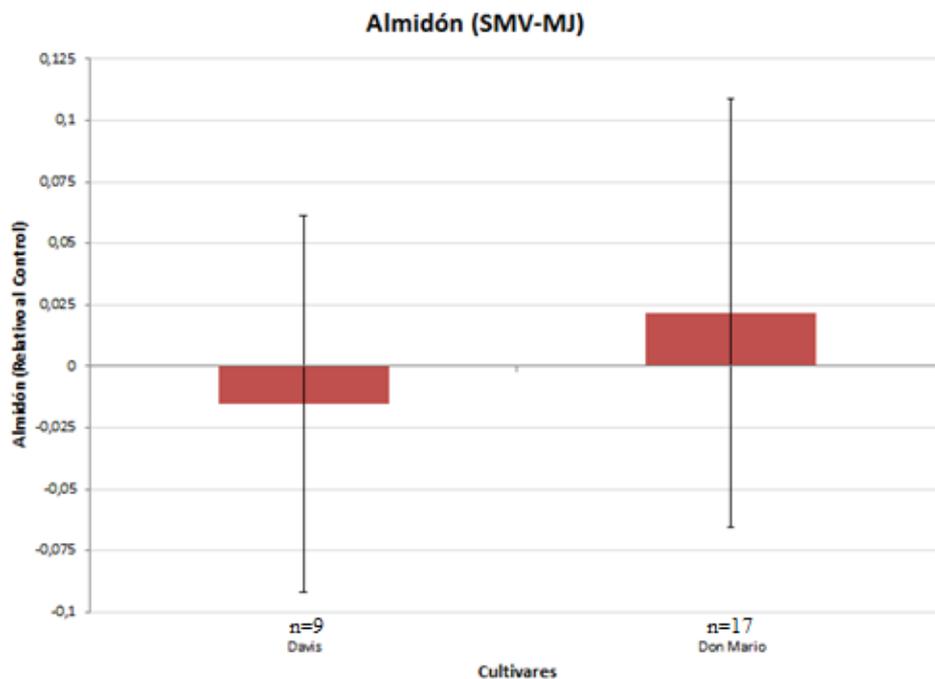


Figura 29: Concentración de almidón relativizada al control, medida a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico), en $\mu\text{g}/\text{mg}$. Las barras de error indican el error estándar. Los datos para el cv. Davis se obtuvieron de tres experimentos independientes.

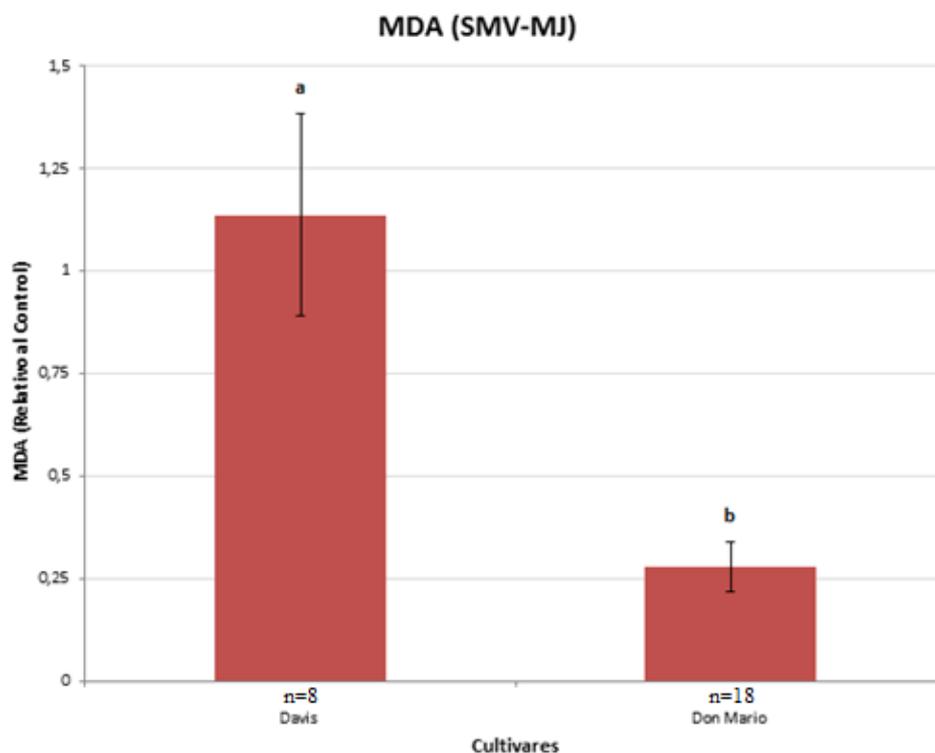


Figura 30: Concentración de MDA relativizada al control, medida a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico), en nM/mg . Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con las letras “a” y “b”, con un $p\text{-valor} < 0,05$ (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos para el cv. Davis se obtuvieron de tres experimentos independientes.

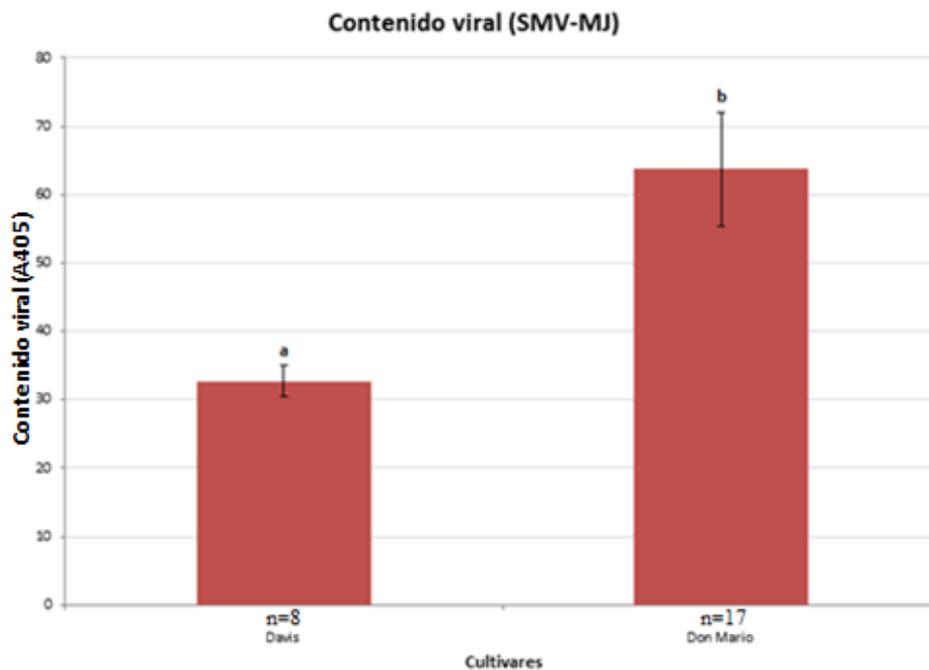


Figura 31: Contenido viral relativizado al control, medido a los 12 días post-inoculación (después de la aparición del síntoma clorótico). Lectura a 405 nm de 25 µg de proteína. Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan con las letras “a” y “b”, con un p-valor<0,05 (DGC). Las barras de error indican el error estándar. Los datos para el cv. Davis se obtuvieron de dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Como ya se describió anteriormente, los virus son uno de los factores que limitan la producción de soja en el mundo (Laguna, 2008a; Vallone, 2002). Debido a que los daños ocasionados dependen de diversos factores, entre ellos la raza del virus (Laguna, 2008a), y a la gran velocidad con la que emergen nuevas variantes, es de gran utilidad mantener una caracterización actualizada de los mismos (Zhou *et al.*, 2015).

En este trabajo, los árboles filogenéticos mostraron el agrupamiento de los distintos aislamientos en diferentes grupos de razas/aislamientos evidenciando diferencias genéticas entre la mayoría de los aislamientos en estudio. Sin embargo, los aislamientos NOA y PV fueron los únicos que no mostraron ningún tipo de diferencia en los tres segmentos genómicos secuenciados. Estos resultados confirman el polimorfismo ya observado para CP, donde se obtuvieron las mismas diferencias (Laguna *et al.*, 2000). Los aislamientos NOA y PV tampoco mostraron relación filogenética con otras razas, solo se agruparon con el aislamiento LJZ010 (China) (Zhou *et al.*, 2015) para el análisis con el segmento P1. En este sentido, se vio que estos aislamientos son recombinantes entre LJZ010 (China)-parental mayor- y la raza G4 (Corea de sur) (Seo *et al.*, 2009)-parental menor- para dicho segmento. La recombinación es un proceso muy frecuente en los Potyvirus y es uno de los factores que más aporta a su evolución. Este proceso ocurre mayormente en el gen P1 pero no es raro en otros segmentos (Gagarinova *et al.*, 2008; Hajimorad *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2015). La presencia del mismo evento de recombinación en ambos aislamientos, sumado a los altos índices de similitud en los tres segmentos secuenciados y al agrupamiento entre ambos en los tres árboles filogenéticos construidos, nos lleva a sugerir que podrían corresponder a una misma raza del SMV. Sin embargo, los síntomas inducidos en las plantas de soja mostraron grandes diferencias (Laguna *et al.*, 2000). En este sentido, NOA mostró diferencias significativas respecto de PV en: área foliar, ϕ PSII y MDA, indicando que estos aislamientos podrían presentar diferencias en otras partes del genoma viral aún no secuenciado. Es importante resaltar que el aislamiento PV surgió como uno nuevo, muy virulento, que logró infectar cultivares de soja que poseían genes de resistencia (Rodríguez Pardina *et al.*, 1995) en los que produjo reacciones necróticas de hipersensibilidad (Herrera *et al.*, 1998). Es posible que tanto NOA como PV provengan de un antecesor común y que este último se diferenció luego de una mutación o un evento de recombinación, no detectado en este estudio, que le permitió superar las barreras de resistencia de soja.

En cuanto al aislamiento MJ, este agrupó con las razas G5 (Lim *et al.*, 2003), G6 (Wang *et al.*, 2001) y los aislamientos WS32 y WS101 (Seo *et al.*, 2009), los cuales se encontraron agrupados en trabajos anteriores tanto en análisis con el genoma completo (Zhou *et al.*, 2015) como del gen CI (Seo *et al.*, 2009). Para el caso de los análisis realizados para el gen CI se observó que estos aislamientos se agrupaban junto con otros con los cuales compartían la característica de no infectar al cultivar L29 de soja (*Rsv3*), por lo cual es probable que el aislamiento MJ posea las misma característica conferida por el gen CI como determinante patogénico (Seo *et al.*, 2009).

En referencia a las posibles alteraciones fisiológicas ante infecciones virales, se han producido registros de disminución de fotosíntesis, alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, aumento de especies activas del oxígeno, entre otros, que en general conllevan a una disminución del crecimiento y productividad (Goodman *et al.*, 1986; Hull, 2002; Rahoutei *et al.*, 2000).

Existen dos modelos generales para explicar los síntomas inducidos por virus y el desarrollo de la enfermedad (Fraser, 1987). El modelo competitivo, sugiere que el virus que se replica dentro de la planta utiliza una importante cantidad de fuentes del hospedante que reducen la síntesis de compuestos vitales para la planta y causa la enfermedad (Fraser, 1987). Este modelo predice que el grado de inhibición del crecimiento debería ser proporcional a la cantidad de virus acumulado (Fraser y Van Loon, 1986) y ha sido demostrado para varias interacciones planta-virus (Hull, 2002; Matthews, 1991; Siegel *et al.*, 1978). Sin embargo, existen muchos ejemplos en los que la reducción en el crecimiento sería causada por otros mecanismos no competitivos, por ejemplo alteraciones hormonales (Whenham y Fraser, 1990) y de pequeños ARN involucrados en el desarrollo. La disminución en el crecimiento de las plantas infectadas por virus podría estar relacionada, entre otras cosas, no solo con la utilización de materias primas producidas por la planta para la replicación del virus, sino también con la presencia de ciertas proteínas virales que podrían interactuar con componentes del hospedante. En el caso específico de los Potyvirus, ha sido demostrada la interacción entre la proteína VPg (proteína ligada al genoma viral) y el factor de iniciación de la transcripción del hospedante, eIF4E, que puede tener un efecto en la inhibición de la expresión génica durante la infección por potyvirus debido a la desestabilización del ARNm (Havelda *et al.*, 2008; Leonard *et al.*, 2000) contribuyendo al desarrollo de la sintomatología viral compatible. En el caso de la infección por SMV se observó

disminución de peso seco de la parte aérea a los 12 días post-inoculación (excepto para el aislamiento PV). Asimismo, los aislamientos PV y MJ mostraron una reducción en el área foliar luego de la aparición de síntomas. Sin embargo, a pesar de las diferencias en el crecimiento de las plantas, la carga viral fue muy similar entre los diferentes aislamientos.

Por otro lado, en el presente estudio, se observó al igual que en trabajos anteriores para diversos virus (Berger *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2010), una disminución en el Φ PSII tanto antes como después de la aparición de síntomas, excepto para los aislamientos M y NOA que solo disminuyeron previo y posterior al desarrollo de síntomas visibles, respectivamente. Este parámetro permite medir la eficiencia con que la energía absorbida por el complejo antena es utilizada para los procesos fotoquímicos, siendo un indicador de la tasa de fijación de CO₂. Sin embargo, la disminución en la eficiencia cuántica en el PSII se vio acompañada por un aumento en la concentración de azúcares solubles luego que el síntoma se hizo evidente, sugiriendo que dicho aumento podría ser producto de una mayor importación de los mismos, menor exportación, o a partir de reciclaje intracelular (Arias *et al.*, 2003; Di Feo *et al.*, 2010). La acumulación de azúcares solubles y de almidón y la desorganización de cloroplastos, sugieren que las hojas enfermas estarían desarrollando un proceso de senescencia acelerado. Esto incluye la síntesis de enzimas requeridas para metabolizar los lípidos y aminoácidos liberados, y convertirlos en formas transportables (Noodén *et al.*, 1997). Se ha visto que la infección con SMV produce clorosis asociada a daño en la morfología de los cloroplastos (Tu *et al.*, 1970). Es posible que el incremento de azúcares solubles en plantas enfermas se encuentre asociado al reciclado de componentes celulares resultantes del daño en los cloroplastos.

Asimismo, el aumento en la concentración de almidón se observó en ambos estadíos, lo cual también se ha observado en otros trabajos con el *Sunflower chlorotic mottle virus* (SuCMoV) (Rodríguez *et al.*, 2010). El aumento de almidón desde etapas tempranas de infección podría deberse a una disminución en la actividad del transportador de triosas-P/Pi (Heineke *et al.*, 1994; Riesmeier *et al.*, 1993), un aumento en la actividad de la enzima ADP-Glu pirofosforilasa (Stark *et al.*, 1992), o a una disminución en la degradación del mismo por alfa amilasas. El aislamiento M presentó un mayor aumento en el contenido de almidón y azúcares solubles respecto de los otros aislamientos, después de la aparición de síntomas. En este sentido, aumentos similares

de azúcares solubles y almidón se confirmaron en muchos otros estudios tanto con virus como con hongos (Di Feo *et al.*, 2010; Shalitin y Wolf, 2000; Sindelá-rová *et al.*, 1999; Sziraki *et al.*, 1984), y se sugiere que dicha acumulación de carbohidratos sería necesaria para sostener la replicación del patógeno (Di Feo *et al.*, 2010; Sindelá-rová *et al.*, 1999).

Los cloroplastos son la principal fuente de generación de especies activas de oxígeno (EAO) intracelular en tejidos verdes, principalmente bajo situaciones de estrés y altas intensidades de luz. Diferentes condiciones de estrés combinadas con altas intensidades de luz que causan una sobre-reducción de la cadena fotosintética transportadora de electrones induciendo la transferencia de electrones al O₂ dando como resultado la formación de EAO. En este sentido, nuestros resultados mostraron aumento en el contenido de MDA después del desarrollo de síntomas visibles en las plantas infectadas con todos los aislamientos, indicando daño oxidativo (Arias *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2005; Di Feo *et al.*, 2010; Radwan *et al.*, 2006), siendo los aislamientos NOA y M los que mostraron un mayor aumento de MDA. Para las mediciones tempranas (antes de la aparición de síntomas macroscópicos, AS), NOA fue el único aislamiento que mostró un aumento de MDA, pero no así una disminución de clorofilas, ni del ϕ PSII. El conjunto de resultados podrían indicar que el daño oxidativo medido a través de este parámetro, en el estadio AS, no es producto del daño en las membranas del cloroplasto y que este incremento podría deberse a daños en otras organelas como mitocondrias, peroxisomas, o actividad de NADPH oxidasa en la membrana plasmática, entre otras.

En cuanto a la concentración del virus, solo fue detectable luego de la aparición de síntomas por el método PTA-ELISA, al igual que el SuCMoV (Arias *et al.*, 2003), no habiendo diferencias entre los aislamientos, sugiriendo que las diferencias observadas en las sintomatologías se deben a los distintos genotipos y no a diferente contenido viral.

Por otro lado se observó que el comportamiento diferencial que tiene un mismo aislamiento del virus no solo se da entre cultivares con diferente resistencia (Cho y Goodman, 1979) o entre cultivares susceptibles y resistentes (Arias *et al.*, 2005), sino también entre cultivares susceptibles. Se identificaron síntomas más severos en el cv Davis que en el cv Don Mario 4800, esto no solo se observa en las variables medidas y expuestas en este trabajo para el aislamiento MJ, sino también para el aislamiento M

para el cual se pudo observar necrosis severa en las plantas infectadas. Sin embargo, dado el bajo número de plantas infectadas obtenido de las mismas, no se pudieron utilizar dichos datos para los análisis. La poca eficiencia en la transmisión mecánica de los aislamientos M, NOA y PV también denota la interacción diferencial de un mismo genoma viral con diferentes genomas de la planta hospedante. Estas observaciones ya fueron destacadas por Pu *et al.* (1982) quienes hicieron notar la poca credibilidad del sistema para clasificar las razas utilizando la sintomatología diferencial en distintos cultivares de soja, debido a que al inocular una misma cepa en distintos cultivares la misma difería, sumado a que cada investigador utiliza un conjunto de cultivares distinto.

En resumen, se pudieron confirmar diferencias tanto en los genomas de los segmentos secuenciados como en los síntomas inducidos por los mismos, así como el comportamiento diferencial de cultivares distintos de soja con respecto a un mismo aislamiento del SMV. Para poder establecer una mejor asociación entre genoma y alteraciones fisiológicas inducidas por los diferentes aislamientos de SMV, será necesaria una secuenciación completa del genoma viral de los aislamientos utilizados. Específicamente, podría ser de mayor interés la secuenciación de las proteínas HC-Pro ya que se encuentra relacionada a la inducción de síntomas (Atreya y Pirone, 1993), 6k2 debido a que se asocia con los cloroplastos (Wei *et al.*, 2010b), y 6k1 que cuando no se separa de la proteína P3 produce infecciones asintomáticas (Riechmann *et al.*, 1995). En este sentido, será de especial interés estudiar los genomas virales completos de los aislamientos NOA y PV para detectar diferencias que puedan explicar la poca similitud en cuanto a los síntomas inducidos, junto con la determinación de las proteínas virales que sean determinantes de la patogenicidad y sintomatología diferencial. Asimismo, los aislamientos NOA y M mostraron sintomatología similar con grandes diferencias genómicas, nuevamente, la secuenciación completa del genoma permitiría determinar la proteína implicada en la determinación del síntoma. También cabe resaltar en base a las repuestas diferenciales del aislamiento M en las plantas del cv Don Mario 4800 y la necrosis observada en las plantas del cv Davis, que dicho aislamiento sería más severo que los otros analizados.

ANEXO

PROTOCOLO 1

Inoculación de plantas de soja con SMV

Se molieron aproximadamente 100 mg de muestra en tampón Fosfato de potasio pH 7,5 y luego se agregó una punta de cucharadita de carbón activado y tierra de diatomeas. En todo momento los morteros donde se procesaron las muestras, se mantuvieron en hielo. Una vez obtenido el inóculo homogéneo, se esparció sobre la cara adaxial de las dos primeras hojas verdaderas de las plantas de soja (Fig. 32).

Tampón Fosfato de potasio
 PO_4HK_20,05 M
 $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$0,05 M
 SO_3Na_20,2%



Figura 32: Primeras hojas verdaderas de la planta de soja.

PROTOCOLO 2

PTA-ELISA

Se molieron aproximadamente 100 mg de muestra (hoja nueva) en 1ml de tampón de revestimiento pH 9,6. Luego se sembraron 100 μl del homogenato por pocillo de la placa para elisa MicroWell™ Nunc-Immuno™ NUNC®. Como testigo sano se utilizaron hojas frescas de plantas de soja sanas mantenidas a -20°C , y como testigo enfermo hojas liofilizadas de plantas enfermas. Se incubó en estufa a 37°C por 2 horas (en cámara húmeda). Una vez pasado el tiempo se lavaron las placas con tampón fosfato salino + tween pH 6,8 (PBS-T), durante 3 minutos y se repitió 3 veces. A continuación en cada pocillo se colocó 100 μl de tampón enzima pH 7,4 con el antisuero específico para SMV en una relación 1:1200 (V/V). Luego se incubaron y lavaron las placas nuevamente, siguiendo los pasos ya descriptos. Se agregó 100 μl en cada pocillo de buffer enzima con el suero anticonejo, conjugado con fosfatasa alcalina (BIO-RAD cat. N° 170-6518) en una relación 1:3000 (V/V), se incubó y lavó, siguiendo los pasos ya descriptos anteriormente. Por último se colocó el sustrato (p-nitrofenilfosfato de sodio) disuelto en tampón sustrato (0,75 mg/ml) y se incubó en oscuridad por 30 minutos aproximadamente.

Tampón de revestimiento
 CO_3Na_21,59 g/l
 CO_3NaH2,93 g/l

Tampón fosfato salino (PBS 10X)

ClNa.....	80 g/l
PO ₄ KH ₂	2 g/l
PO ₄ Na ₂ H 12.H ₂ O.....	29 g/l
ClK.....	2 g/l
NaN ₃	2 g/l

PBS Normal + Tween (PBS-T)

PBS 10X.....	10%
Tween 20.....	0,05%

Tampón enzima

PBS-T.....	1 litro
PVP.....	2%
Leche en polvo.....	2%

Tampón sustrato (para 1 litro)

Dietanolamina.....	10%
NaN ₃	0,02%

PROTOCOLO 3Extracción de ARN por Trizol

Se molieron 200 mg de muestra congelada (hoja nueva) en morteros estériles enfriados con aire líquido, agregando una cucharadita de PVPP (polivinilpolipirrolidona). Una vez obtenido un polvo bien fino, se colocó dentro de micro tubos (estériles y mantenidos en aire líquido) y se reservaron en aire líquido. Después de molidas todas las muestras, se agregó 1 ml de Trizol (Invitrogen) en cada una y se agitó en vortex durante 5 min, a temperatura ambiente. Luego se agregó 200 µl de Cloroformo, se agitó manualmente y se centrifugó a 13000 rpm, 15 min, a 4°C. Se recuperó la fase acuosa, se agregó Isopropanol 1:1, y se incubó 30 min a -80°C. Se centrifugó a 13000 rpm, 15 min, a 4°C, y se descartó el sobrenadante. Luego se lavó con 1 ml de Etanol 75%, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones por 2 min y se descartó el sobrenadante. Los micro tubos se dejaron secar en hielo y luego se resuspendió el pellet en 20 µl de agua DEPC. Por último se mantuvo 5 min a 37°C, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, y se recuperó el sobrenadante.

PROTOCOLO 4Retro Transcriptasa (RT)

Por cada reacción se mezcló agua DEPC (cantidad necesaria para un volumen final de 10 µl), 1,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl del cebador CPf, P1f o CI3' (10 µM) dependiendo el segmento buscado, y por último 1 µg del ARN correspondiente (MJ, VT, M, NOA, y testigo Sano). A continuación se calentó la mezcla en un baño de agua a 95°C durante 3 min. y al retirar se colocó inmediatamente en hielo. Luego se agregó a cada reacción una segunda mezcla formada por 5,5 µl de agua DEPC, 2 µl de buffer 5X, 2 µl de DTT, y 0,5 µl de la enzima retro transcriptasa MMLV (Epicentre). El producto final se llevó a un termociclador y se mantuvo 1 hora a 42°C y luego 15min a 70°C.

PROTOCOLO 5

PCR

Se utilizaron por cada reacción 11,3 µl de agua miliQ, 5 µl de buffer, 2,5 µl de dNTPs (10X), 2,5 µl de los cebadores correspondientes (CPr y CPf, CI3' y CI5', P1r y P1f) (10 µM), 0,2 µl de la enzima Taq polimerasa (Promega), y por último 1 µl de cada ADNc según corresponda. Dicha mezcla se llevó al termociclador y para el caso de los segmentos CP y P1 se realizó un ciclo de 2 min a 94°C, 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, y 1 min a 72°C, por último un ciclo de 10 min a 72°C. Para el segmento CI se realizó un ciclo de 2 min a 94°C, 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C, por último un ciclo de 7 min a 72°C.

Los productos de PCR obtenidos se corrieron en gel de agarosa 1% para el fragmento CP, y 1,5% para CI y P1, utilizando tampón TAE 0,5X.

Tampón TAE 0,5X

Trizma base.....2,42 g/l
 Ácido acético glacial.....571 µl/l
 EDTA 0,5M (pH 8).....0,1 ml/l

PROTOCOLO 6

RT-PCR

Por cada reacción se realizó una mezcla de agua DEPC (cantidad necesaria para un volumen final de 50 µl), 10 µl de buffer AMV/Tfl (5X), 1 µl de dNTPs (10 mM), 2 µl de MgSO₄ (25 mM), 5 µl de los cebadores correspondientes (CI3' y CI5', o P1f y P1r) (10 µM), 1 µl de la enzima retro transcriptasa AMV, 1 µl de la ADN polimerasa Tfl, y por último 1 µg de cada ARN según corresponda. Luego se llevó al termociclador y para el segmento CI se realizó un ciclo de 45 min a 48°C, otro de 2 min a 94°C, 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 68°C, por último un ciclo de 7 min a 68°C. En el caso de P1 fue, un ciclo de 45 min a 48°C, otro de 2 min a 94°C, 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, y 1 min a 68°C, por último un ciclo de 10 min a 68°C.

PROTOCOLO 7

MDA y Clorofilas

Se molieron 100 mg (peso fresco) de cada hoja, siempre manteniendo las muestras congeladas con aire líquido, y se le agregó una cucharadita de PVPP. Una vez molido todo se agregó 1ml de etanol 80%, se pasó a un ependorf y se mantuvo en hielo. Al finalizar de procesar todas las muestras, se las calentó a 80°C por 30 min. Se centrifugó a 12000 xg, 10 min, a temperatura ambiente.

MDA: Del sobrenadante obtenido en el paso anterior se tomaron 500 µl y se agregó 500 µl de una solución 0,5% ácido tiobarbitúrico en 20% ácido tricloroacético (TBA/TCA). Se preparó también un blanco con 500 µl de etanol 80% y 500 µl TBA/TCA. Se calentó a 92°C por 20 min y luego se enfrió en hielo y centrifugó a 12000 xg, 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se sembraron 300 µl en una placa MicroWell™ Nunc-Immuno™ NUNC® y se leyó a 540 nm y 600 nm.

Clorofilas: Se leyeron 100 µl a 654 nm (etanol 80% como blanco).

PROTOCOLO 8

Azúcares solubles

Se utilizó el sobrenadante obtenido de la extracción realizada con HEPES pH 8,3. Se mezclaron 0,5 ml de este sobrenadante con 1 ml de reactivo anthrona 0,2% y se calentó a 100°C por 5 min. Por último se enfriaron los tubos a temperatura ambiente y se midieron los valores de la absorbancia a 620 nm. Los valores obtenidos fueron referidos a una curva realizada con sacarosa en un rango entre 2,4-28,8 µg, con un valor de r^2 superior al 0,95.

Reactivo anthrona

H₂SO₄.....c/n
Anthrona.....0,2% (P/V)

Tampón extracción HEPES

HEPES-KOH.....50 mM
EDTA.....2 mM
EGTA.....2 mM
MgCl₂.....1 mM
MnCl₂.....1 mM
DL-DTT.....2 mM

PROTOCOLO 9

Almidón

Se utilizó el pellet obtenido de la extracción realizada con HEPES pH 8,3. Se resuspendieron estos pellets en 0,5 ml de agua destilada y se hirvió en baño de agua por 30 min. Se le agregó 0,75 ml de solución amiloglucosidasa 5 mg/ml, compuesta por la enzima (EC 3.2.1.3) disuelta en tampón AcNa/AcH pH 4,5. Se dejó toda la noche a 55°C. Al día siguiente se centrifugó a 12000 xg por 10 min a temperatura ambiente. Luego se tomaron 120 µl de cada muestra y se les agregó 500 µl del reactivo sumner a cada una, preparado en el momento y en oscuridad. Se calentaron a 100°C por 5 min y luego se les agregó 600 µl de agua. Finalmente se leyeron a 550 nm. Los valores obtenidos fueron referidos a la curva realizada con glucosa en un rango entre 30-180 µg, con un valor de r^2 superior al 0,95.

Tampón acético-acetato

AcNa.....0,2 M
AcH.....0,2 M

Reactivo Sumner

Agua destilada.....0,88 ml/ml
NaOH 2N.....0,08 ml/ml
KNa Tartrato 4H₂O.....176 mg/ml
diNO₂ salicílico.....4 mg/ml

Tampón extracción HEPES

HEPES-KOH.....50 mM
EDTA.....2 mM
EGTA.....2 mM
MgCl₂.....1 mM

MnCl₂.....1 mM
DL-DTT.....2 mM

PROTOCOLO 10
Cuantificación de proteínas

Se molieron 100 mg aproximadamente de hoja en 1 ml de tampón de revestimiento pH 9,6. En una placa MicroWell™ Nunc-Immuno™ NUNC® se sembró por duplicado 5 µl del extracto con 145 µl de agua destilada, luego se agregó 150 µl de Coomassie Brilliant Blue G-250 y se mantuvo 10 min en oscuridad para finalmente leer a 595 nm. Los valores obtenidos fueron referidos a la curva realizada con Seroalbúmina bovina en un rango entre 0,75-7,5 µg, con un valor de r² superior al 0,95.

RESULTADO 1

Alineamiento de las secuencias de los aislamientos M, MJ, NOA y PV del SMV, correspondientes al segmento P1, realizado mediante Clustal W

```

#Manfredi          -----t--catgattggaagca-tggcgatttctgtgccaacactcacg----t-tcgtgcgcat
#Marcos_Juarez    -----at--catgattggaagca-tggcgatttctgtgccaacactcaca----tcttgtgcgcat
#NOA              accaccgaaatagcgcgaaccagtagtggtgtcacttccatgagcaatgtttgcggaactgctatgcagac
#Planta_Vinosa    accaccgaaatagcgcgaaccagtagtggtgtcacttccatgagcaatgtttgcggaactgctatgcagac

#Manfredi          cgaattctgtgatgccggttcaagca--gttcagatggcaaaacaagtgccttctgctcgaggggtgttat
#Marcos_Juarez    caaattctgtgatgccggttcaagca--gttcagatggcaaaacaagtgccttctgctcgaggggtgttat
#NOA              aaaggtgacgagtgctatcgtcaccaaaagatatgatggcgacatctaagccatcgctgaagcaagtcagcc
#Planta_Vinosa    aaaggtgacgagtactatcgtcaccaaaagatatgatggcgacatctacgccatcgctgaggcaagtcagcc

#Manfredi          acacacttaagagagagggcagcagcgaagtgcataagcatgaggaggcactgcgcaaatttcaagaagca
#Marcos_Juarez    acacacttaaaagagagggcaacacgcgaagtgcataagcatgaggaggcgtgcgcaaatttcaagaagca
#NOA              gttctctgtactgactggttaagaaagaggttggttagctatgatttgactatcaagaagatggatgaggca
#Planta_Vinosa    gttctctgtactgactggttaagaaagaggttggttagctatgatttgactatcaagaagatggatgaggca

#Manfredi          ttcgaccaagatgttggcattcagcgaaggttctagtaaacaagcatagttctatacaatccacaa--ag
#Marcos_Juarez    ttcgaccaagatgttggcattcagcgaaggttctggtaaacaagcatagttccatacaatccacaa--ag
#NOA              atgcagcagaatctgtgctgcaaaaacagcttttcatcacaagcaagcaccattcaacagaaacctaa
#Planta_Vinosa    atgcagcagaatctgtgctgcaaaaacagcttttcatcacaagcaagcaccattcaacagaaacctaa

#Manfredi          aagaatggtttgaccttgcgctgctttaaacttttagagcaggctcgagcaaaagaagcggcaattgcaaggcg
#Marcos_Juarez    aagaatggtttgaccttgcgctgctttaaacttttagagcaggctcgagcaaaagaagcggcaattgcaaggcg
#NOA              aggagctgttcaac--tgaggttatgctcgtacgaacaagcaaaagaaacgtgttgaattggcgcgtaagag
#Planta_Vinosa    aggagctgttcaac--tgaggttatgctcgtacgaacaagcaaaagaaacgtgttgaattggcgcgtaagag

#Manfredi          aaagcaagaagaggaagacttttctcaatgggaagtatgaacagcaatttt-acgctggtgtttccgctaca
#Marcos_Juarez    aaggcaagaagaggaagacttttctcaatggaaaatgatgacagcaatttt-atgctggtgtttccgctaca
#NOA              acaagaagaagaggaagacttttctcaatgggaagtatgaacagcaatttt-acgctggtgtttccgctaca
#Planta_Vinosa    acaagaagaagaggaagacttttctcaatgggaagtatgaacagcaatttttacgctggtgtttccgctaca

#Manfredi          aagtccatgaagtttgaaggaggaagtgttgggttcagaacaaagtactggagaccaactccaaagaagac
#Marcos_Juarez    aagtccatgaagtttgaaggaggaagtgttgggttcagaacaaagtactggagaccaactccaaagaagac
#NOA              aagtccatgaagtttgaaggaggaagtgttgggttcagaacaaagtactggagaccaactccaaagaagac
#Planta_Vinosa    aagtccatgaagtttgaaggaggaagtgttgggttcagaacaaagtactggagaccaactccaaagaagac

#Manfredi          taaagaaaggcgtgcaacatcacagtgtaggaaactaacatatgttttggaggaggttctttctatagctt
#Marcos_Juarez    taaagaaaggcgtgcaacatcacagtgtaggaaactaacatatgttttggaggaggttctttctatagctt
#NOA              taaagaaaggcgtgcaacatcacagtgtaggaaactaacatatgttttggaggaggttctttctatagctt
#Planta_Vinosa    taaagaaaggcgtgcaacatcacagtgtaggaaactaacatatgttttggaggaggttctttctatagctt

#Manfredi          caaagagtggtaagttggtcgaatttatcacagg--caaaggaagagagtcgaagtctggtatgtgctg
#Marcos_Juarez    caagaagtggtaagctggttgaatttatcacaggaggcaaggcaagagagtcgaaggtctggtatgtgctg
#NOA              caaagagtggtaagctggttgaatttatcacagg--taaaggaagaggggtcaagtttgggtatgtgctg
#Planta_Vinosa    caaagagtggtaagctggttgaatttatcacagg--caaaggaagaggggtcaagttctggtatgtgctg

#Manfredi          aagcatggcgcaatattgcccaagtttccctcccgcgatgaagaaggcaaatatataccatcaggagcttca
#Marcos_Juarez    aagcatggcgcaatattgcccaagtttccctcccgcgatgaagaaggcaaatatataccatcaggagcttca
#NOA              aagcatggcgcaatattgcccaagtttccctcccgcgatgaagaaggcaaatatataccatcaggagcttca
#Planta_Vinosa    aagcatggcgcaatattgcccaagtttccctcccgcgatgaagaaggcaaatatataccatcaggagcttca

#Manfredi          gtatgcaagcacatatgaatttcttccctatatttgcattgtatgcaaaatataagagcataaatgcggtatg
#Marcos_Juarez    gtatgcaaacacatatgaatttcttccctatatttgcattgtatgcaaaatataagagcataaatgcggtatg
#NOA              gtatgcaagcacatatgaatttcttccctatatttgcattgtatgcaaaatataagagcataaatgcggtatg
#Planta_Vinosa    gtatgcaagcacatatgaatttcttccctatatttgcattgtatgcaaaatataagagcataaatgcggtatg

#Manfredi          atataacttatggagatagtggttactgtttgatgagcgatcatctttaaccacaaatcacactaagtta
#Marcos_Juarez    atataacttatggagatagtggttactgtttgatgagcgatcatctttaaccacaaatcacactaagtta
#NOA              atataacttatggagatagtggttactgtttgatgagcgatcatctttaaccacaaatcacact-----
#Planta_Vinosa    atataacttatggagatagtggttactgtttgatgagcgatcatctttaaccacaaatcacacta-----

#Manfredi          cpgtactttgttctcggggaaggaggaatgggaagctcgttaacgctcttgaagtggttgaaaacatgga
#Marcos_Juarez    cpgtactttgttctcggggaaggaggaatgggaagctcgttaacgctcttgaagtggttgaaaacatgga
#NOA              -----
#Planta_Vinosa    -----

#Manfredi          -----
#Marcos_Juarez    ggatat
#NOA              -----

```

#Planta_Vinosa -----

RESULTADO 2

Alineamiento de las secuencias de los aislamientos M, MJ, NOA y PV del SMV, correspondientes al segmento CI, realizado mediante Clustal W

```

#Manfredi -----ggagagagtgcgaattcacaacacacacaccccggtgaaattgaaagttgaaga
#NOA --tgtctgcacgcctccagggagagagtgcgaattcacaacacacacacccagtgaaattgaaagttgaaga
#Planta_Vinosa agtgtctgcacgcctccagggagagagtgcgaattcacaacacacacaccccggtgaaattgaaagttgaaga
#Marcos_Juarez --gtctgcacgcctccaggaaggaggtgtgaattcacaacgcacaacaccagtgaaattgaaagttgaaga

#Manfredi ccatttgccttttcagaactttgtgcaagctcaaggtacaggatcaaatgctgatgatccaacatggga
#NOA ccatttgccttttcagaactttgtgcaagctcaaggtacaggatcaaatgctgatgatccaacatggga
#Planta_Vinosa ccatttgccttttcagaactttgtgcaagctcaaggtacaggatcaaatgctgatgatccaacatggga
#Marcos_Juarez ccatttgccttttcagaactttgtgcaagctcaaggtacagggtcaaatgctgatgatccaacatggaa

#Manfredi acaacttacttctgtatattgtgcaagctacaatgaggttgaccaattgtcacgattattaactgagaaacat
#NOA acaacttacttctgtatattgtgcaagctacaatgaggttgaccaattgtcacgattattaactgagaaacat
#Planta_Vinosa acaacttacttctgtatattgtgcaagctacaatgaggttgaccaattgtcacgattattaactgagaaacat
#Marcos_Juarez acaatttgccttctgtatattgtgcaagctacaatgaggttgaccaattgtcacgattattaactgaaagcat

#Manfredi tataaggtgacaaaagttgatgggagaacaatgcaaatgggaaatgtagagattgcaactacaggcacgga
#NOA tataaggtgacaaaagttgatgggagaacaatgcaaatgggaaatgtagagattgcaaccacaggcacgga
#Planta_Vinosa tataaggtgacaaaagttgatgggagaacaatgcaaatgggaaatgtagagattgcaaccacaggcacgga
#Marcos_Juarez tacaaggtgacaaaaggtcgatgggaggacaatgcaaatgggaaatgtagaaattgcaaccacaggtagaca

#Manfredi ggggaaaccacactttatagtcgcaacaacatcattgagaatggagtgactccttgatattgattgctgtaa
#NOA ggggaaaccacactttatagtcgcaacaacatcattgagaatggagtgactccttgatattgattgctgtaa
#Planta_Vinosa ggggaaaccacactttatagtcgcaacaacatcattgagaatggagtgactccttgatattgattgctgtaa
#Marcos_Juarez ggggaaaccacacttcatagttgcaacgaacatcattgagaatggagtaactccttgacattgattgctgta

#Manfredi ttgattttggacttaaagtggtggtacaccttgacacagataaccgggtgtgctgcttacaacaacagtc
#NOA ttgattttggacttaaagtggtggtacaccttgacacagataaccgatgtgctgcttacaacaacagtc
#Planta_Vinosa ttgattttggacttaaagtggtggtacaccttgacacagataaccgggtgtgctgcttacaacaacagtc
#Marcos_Juarez ttgactttggacttaaagtggtggtacaccttgacacagataaccgggtgtgctgcttacaataaacagtc

#Manfredi gtttcctatggagagcgaattcaagacttggcagagttggctgctgcaaacctggatttgcgctcaggat
#NOA gtttcctatggagagcgaattcaagacttggcagagttggctgctgtaaacctggatttgcgctcaggat
#Planta_Vinosa gtttcctatggagagcgaattcaagacttggcagagttggctgctgtaaacctggatttgcgctcaggat
#Marcos_Juarez gtatcctatggagagcgcattcagaggcttggcagagttggctgctgtaaacctggatttgcacttagagt

#Manfredi tggacacacagggaaaaggagttgaggaagtcccgagttcatagctacagaggcagcttttctatcctttg
#NOA tggacacacagggaaaaggagttgaggaagtcccgagttcatagctacagaggcagcttttctatcctttg
#Planta_Vinosa tggacacacagggaaaaggagttgaggaagtcccgagttcatagctacagaggcagcttttctatcctttg
#Marcos_Juarez tggacacacgggaaaaggagttgaggaagtccctgaattcatagccacggaggcagcttttctatcctttg

#Manfredi cttatgggttgccagttacaacacaaagcgtctcgaccaatataattgtcccgttgccagtgaaacaagct
#NOA cttatgggttgccagttacaacacaaagcgtctcgaccaatataattgtcccgttgccagtgaaacaagct
#Planta_Vinosa cttatgggttgccagttacaacacaaagcgtctcgaccaatataactgtcccgttgccagtgaaacaagct
#Marcos_Juarez cttatggccttgccagttacaacacaaagcgtctcaaccaacatataattgtctcgttgccagtgaaagcaagca

#Manfredi cgagtagctctaaattttgagctaaactccatttttcaccactaatttcataaagtagatggttagcatgca
#NOA cgagtagctctaaattttgagctaaactccatttttcaccactaatttcataaagtagatggttagcatgca
#Planta_Vinosa cgagtagctctaaattttgagctaaactccatttttcaccactaatttcataaagtagatggttagcatgca
#Marcos_Juarez cgagtagctctcaattttgagctaaactccatttttcaccactaacttcataaagtagatggttagcatgca

#Manfredi ccagaaaatccacagactgctcaagtcctataaaactcagggagctgagatggtgctgaccaagttagcca
#NOA ccagaaaatccacagactgctcaagtcctataaaactcagggagctgagatggtgctgaccaagttagcca
#Planta_Vinosa ccagaaaatccacagattgctcaagtcctataaaactcagggagctgagatggtgctgaccaagttagcca
#Marcos_Juarez ccagagatccacagattgctcaagtcctataaaactcagggagctgagatggtgtaaccaaattagcaa

#Manfredi taccatatcagtttgttggcagtggtgacagtcgaaggatgaacgtcaaggtatccacctcaattgt
#NOA taccatatcagtttgttggcagtggtgacagtcgaaggatgaacgtcaaggtatccacctcaattgt
#Planta_Vinosa taccatatcagtttgttggcagtggtgacagtcgaaggatgaacgtcaaggtatccacctcaattgt
#Marcos_Juarez taccatatcagtttgttggcagtggtgataacagtcgaaggatgaacgtcagggcgttccacctcaattgt

#Manfredi ccagagaaagtgaaaataccttttctatgtgacggaataaccagacaagttgtatgagatggttggggacac
#NOA ccagagaaagtgaaaataccttttctatgtgacggaataaccagacaagttgtatgagatggttggggacac
#Planta_Vinosa ccagagaaagtgaaaataccttttctatgtgacggaataaccagacaagttgtatgagatggttggggacac
#Marcos_Juarez ccagagaaagtgaaaataccttttctatgtgacggaataaccagacaagctgtatgagatggttggggacac

#Manfredi agtttgaataacaagaatgatgctggg-ttcggctcaattaagagtggaacgcacaacgaagattagttac

```

```

#NOA          agtttgtaaatacaagaatgatgctggg-ttcggctcagtcgaagagtgtgaatgcaacgaagattagttac
#Planta_Vinosa agtttgtaaatacaagaatgatgctggggttcggctcagtcgaagagtgtgaatgcaacgaagattagttac
#Marcos_Juarez agtttgcaaatacaagaatgatgctgga-tttggctcaatcaagagtgtgaatgcaacaaagattagctac

#Manfredi     actctaagcactgacccgacagcaattcctcgacacttgcaatactggaccatttattgagtgaggagat
#NOA          actctaagcactgacccaacagcaattcctcgacacttgcaatactggatcatttggtagtgaggagat
#Planta_Vinosa actctaagcactgacccaacagcaattcctcgacacttgcaatactggatcatttggtagtgaggagat
#Marcos_Juarez actttaagcactgatccaacggcaatccctcgacacttgcaatactggaccatttggtagtgaggagat

#Manfredi     gaccaagaaaagtcattttgacacaattggctcgcgctgctcactgggtattccttttctcttcgagccatag
#NOA          gaccaagaagagtcattttgacacaattggctcgcgctgctcactgggtattccttttctcttcgagccatag
#Planta_Vinosa gaccaagaagagtcattttgacacaattggctcgcgctgctcactgggtattccttttctcttcgagccatag
#Marcos_Juarez gactaagaaaagtcattttgacacaattggctcctctgctcactggatattccttttctcttcgagccatag

#Manfredi     ctgatggatttaggaagaggtatttaaaggactacacacagcataatatagcccgtctacaacaggtctaaa
#NOA          ctgatggatttaggaagaggtatttaaaggactacacacagcataatatagcccgttttacaacaggtctaaa
#Planta_Vinosa ctgatggatttaggaagaggtatttaaaggactacacacagcataatatagcccgttttacaacaggtctaaa
#Marcos_Juarez ctgatggatttaggaagaggtacttgagggattacacacagcacaataatagctattctacaacaggtctaaa

#Manfredi     gcacagctgctagagttcgactgcaacaagttgacatcaacaatctgcacaat-----
#NOA          gcacagttgctggaattcgattgcaacaagttgacatcaacaacctgcaacaatggtgagggatagggca-
#Planta_Vinosa gcacagttgctggaattcgattgcaacaagttgacatcaacaacctgcaacaatggtgagggatagggcat
#Marcos_Juarez gcacagctgctagaatttgattgcaacaagttgacatcaacaacctgcaacaatggtgaggggt-----

#Manfredi     -----
#NOA          -----
#Planta_Vinosa ttaaatgca
#Marcos_Juarez -----

```

RESULTADO 3

Alineamiento de las secuencias de los aislamientos M, MJ, NOA y PV del SMV, correspondientes al segmento CP, realizado mediante Clustal W

```

#Manfredi     aagatgtaaatgttggatcaaaggggaaggtggtgccgcgtttgcagaagattacaagaagatgaatctt
#NOA          aagatgtaaatgttggatcaaagggaaaggtggttccgcgtttgcagaagattacaaggaagatgaatctt
#Planta_Vinosa -agatgtaaatgttggatcaaagggaaaggtggttccgcgtttgcagaagattacaaggaagatgaatctt
#Marcos_Juarez -agatgtaaatgttggatcaaaagggaaaggtggttccgcgtttgcagaagattacaaggaagatgaatctt

#Manfredi     ccaatggttgaagggaaaatcattctcagtttgaccacttgcttgagtataaacctaatacaggttgattt
#NOA          ccaatggttgaagggaaagatcatcctcagtttgaccacttgcttgagtataaacctaatacaggttgattt
#Planta_Vinosa ccaatggttgaagggaaagatcatcctcagtttgaccacttgcttgagtataaacctaatacaggttgattt
#Marcos_Juarez ccaatggttgaagggaaagattattcttagcttagaccacttgcttgagtataaacctaatacaggttgattt

#Manfredi     attcaactactcgagcaacaagaacacaattcgaagcgtggtacaatgcagttaaagatgaatatgagcttg
#NOA          attcaacactcgagcaacaagaacacagttcgaagcgtggtacaacgcagttaaagatgaatatgagcttg
#Planta_Vinosa attcaacactcgagcaacaagaacacagttcgaagcgtggtacaacgcagttaaagatgaatatgagcttg
#Marcos_Juarez attcaacactcgagcaacaagaacacagtttgaagcgtggtacaatgcagttaaagatgaatatgagcttg

#Manfredi     acgatgaacagatgggcgtggttatgaatggtttcatggtatggtgcatcgacaatggcacatctccagat
#NOA          acgatgagcagatgggtggttatgaatggtttcatggtatggtgcatcgacaatgggtacatctccagat
#Planta_Vinosa atgatgagcagatgggtggttatgaatggtttcatggtatggtgcatcgacaatgggtacatctccagat
#Marcos_Juarez atgatgaacaaatgggtggttatgaatggtttcatggtatggtgcatcgacaatggcacatctccagac

#Manfredi     gccaatggcgtgtgggtgatgatggatggagaagaacagattgaatatccgctgaaacccattgtcgagaa
#NOA          gctaattggcgtgtgggtgatgatggatggagaggaacagattgaatatccgctgaaacccattgttgaaaa
#Planta_Vinosa gctaattggcgtgtgggtgatgatggatggagaggaacagattgaatatccgctgaaacccattgttgaaaa
#Marcos_Juarez gccaatggcgtgtgggtgatgatggatggagaggaacagattgaatatccgctgaaacccattgttgaaaa

#Manfredi     tgcaaaaccaactctgagacaaattatgcaccacttctcagatgcagcagaagcttacattgagatgagaa
#NOA          tgcaaaaccaactttgagacaaatcatgcatcatttctcagatgcagcagaagcttacattgagatgagaa
#Planta_Vinosa tgcaaaaccaactttgagacaaatcatgcatcatttctcagatgcagcagaagcttacattgagatgagaa
#Marcos_Juarez tgcaaaaccaactttgagacaaatcatgcatcattttctcagatgcagcagaagcttacattgagatgagaa

#Manfredi     attctgaaagtccgtatatgcctag-----
#NOA          attctgaaagtccgtatatgcctag-----
#Planta_Vinosa attctgaaagtccgtatatgcctagaatatggaca
#Marcos_Juarez attctgaaagtccgtatatgcctag-----

```

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. J., Antoniw, J. F., y Fauquet, C. M. (2005). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology* **150**, 459-79.
- Alemandri, V. (2008). Capítulo XI: Áfidos transmisores de virus en soja en Argentina. En "Enfermedades causadas por virus en cultivos de soja en Argentina", pp. 61-63, INTA, Córdoba.
- Arias, M. C., Lenardon, S., y Taleisnik, E. (2003). Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the *Sunflower chlorotic mottle virus*. *Journal of Phytopathology* **151**, 267-273.
- Arias, M. C., Luna, C., Rodríguez, M., Lenardon, S., y Taleisnik, E. (2005). *Sunflower chlorotic mottle virus* in compatible interactions with sunflower: ROS generation and antioxidant response. *European Journal of Plant Pathology* **113**, 223-232.
- Atreya, C. D., y Pirone, T. P. (1993). Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 11919-23.
- Atreya, C. D., Raccach, B., y Pirone, T. D. (1990). A point mutation in the coat protein abolish aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* **178**, 161-165.
- Babu, M., Gagarinova, A. G., Brandle, J. E., y Wang, A. (2008). Association of the transcriptional response of soybean plants with *Soybean mosaic virus* systemic infection. *Journal of General Virology* **89**, 1069-80.
- Bashar, T. (2015). Characterization of seed transmission of *Soybean mosaic virus* in soybean., The University of Western Ontario.
- Baunoch, D., Das, P., y Hari, V. (1988). Intracellular localization of TEV capsid and inclusion proteins by immunogold labeling. *Journal of Ultrastructure Research and Molecular Structure Research* **99**, 203-212.
- BCR (2016) Bolsa de Comercio de Rosario. <https://www.bcr.com.ar/Pages/gea/estimaProd.aspx> [Noviembre 2016]
- Berger, S., Sinha, A. K., y Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **58**, 4019-26.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., y Zurcher, E. J. (1996) Plant viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE database. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/> [Noviembre 2016]
- Buzzell, R. I., y Tu, J. C. (1984). Inheritance of soybean resistance to *Soybean mosaic virus*. *Journal of Heredity* **75**, 82.
- Calzada, J., y Rossi, G. (2016) 84% de la soja argentina se exporta como grano, harina, aceite y biodiesel. Bolsa de comercio de Rosario. https://www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/informativosemanal_noticias.aspx?pIdNoticia=55 [Noviembre 2016]
- Campos, R. E., Bejerman, N., Nome, C., Laguna, I. G., y Rodríguez Pardina, P. (2013). *Bean yellow mosaic virus* in soybean from Argentina. *Phytopathology* **162**, 322-325.
- Carrington, J. C., y Dougherty, W. G. (1987). Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of Virology* **61**, 2540-2548.
- Carrington, J. C., Jensen, P. E., y Schaad, M. C. (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *The Plant Journal* **14**, 393-400.

- Carrington, J. C., Cary, S. M., Parks, T. D., y Dougherty, W. G. (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *The EMBO journal* **8**, 365-370.
- Casado-Vela, J., Selles, S., y Martínez, R. B. (2006). Proteomic analysis of *Tobacco mosaic virus*-infected tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) fruits and detection of viral coat protein. *Proteomics* **6 Suppl 1**, S196-206.
- CEPA (2014) Centro de Economía Política Argentina. <http://centrocepa.com.ar/la-produccion-de-soja-en-la-argentina/> [Noviembre 2016]
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C., y Carrington, J. C. (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *The Plant Cell* **7**, 549-559.
- Cui, H., y Wang, A. (2016). The *Plum pox virus* 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection. *Journal of Virology* **90**, 5119-31.
- Chen, Y. X., Xue, B. D., Hu, Y. Z., y Fang, Z. D. (1986). Identification of two new strains of *Soybean mosaic virus*. *Acta Phytopylacica Sinica* **13**, 221-226.
- Cho, E. K., y Goodman, R. M. (1979). Strains of *Soybean mosaic virus*: classification based on virulence in resistant soybean cultivars. *Phytopathology* **69**, 467-470.
- Cho, E. K., Chung, B. J., y Lee, S. H. (1977). Studies on identification and classification of soybean virus diseases in Korea. II. Etiology of a necrotic disease of *Glycine max*. *Plant Disease Reporter* **61**, 313-317.
- Choi, B. K., Koo, J. M., Ahn, H. J., Yum, H. J., Choi, C. W., Ryu, K. H., Chen, P., y Tolin, S. A. (2005). Emergence of Rsv-resistance breaking *Soybean mosaic virus* isolates from Korean soybean cultivars. *Virus Research* **112**.
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- Chung, B. Y.-W., Miller, W. A., Atkins, J. F., y Firth, A. E. (2008). An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 5897-902.
- Di Feo, L. V., Laguna, I. G., y Biderbost, E. B. (2010). Alteraciones fisiológicas asociadas a la infección con *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) y a fitotoxicidad provocada por su insecto vector (*Delphacodes kuscheli* Fennah) en trigo. *Tropical Plant Pathology* **35**, 79-87.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. (2015). InfoStat versión 2015. *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*.
- Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G., y Carrington, J. C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of *Tobacco etch potyvirus* in plants. *The EMBO journal* **13**, 1482-91.
- Domier, L. L., Shaw, J. G., y Rhoads, R. E. (1987). Potyviral proteins share amino acid sequence homology with Picorna-, Como-, and Caulimoviral proteins. *Virology* **158**, 20-27.
- Domier, L. L., Latorre, I. J., Steinlage, T. A., McCoppin, N., y Hartman, G. L. (2003). Variability and transmission by *Aphis glycines* of North American and Asian *Soybean mosaic virus* isolates. *Archives of Virology* **148**, 1925-41.
- Dougherty, W. G., y Hiebert, E. (1980). Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: identification of nuclear inclusion proteins as products of *Tobacco etch virus* RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* **104**, 174-182.

- Dougherty, W. G., y Parks, T. D. (1991). Post-translational processing of the *Tobacco etch virus* 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: Identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* **183**, 449-456.
- Dougherty, W. G., Carrington, J. C., Cary, S. M., y Parks, T. D. (1988). Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. *The EMBO journal* **7**, 1281-1287.
- FAOSTAT (2015) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en> [Noviembre 2016]
- Field Crop Diseases (2001) Field Crop Diseases. Information and Management for Illinois. <http://cropdisease.cropsci.illinois.edu/soybeans/soybean-mosaic.html> [Noviembre 2016]
- Fraser, R. S. S. (1987). Genetics of plant resistance to viruses. En "Ciba Foundation Symposium 133 - Plant Resistance to Virus", pp. 6-22. John Wiley y Sons Ltd.
- Fraser, R. S. S., y Van Loon, L. C. (1986). Genes for resistance to plant viruses. *Critical Reviews in Plant Sciences* **3**, 257-294.
- Gagarinova, A. G., Babu, M., Strömvik, M. V., y Wang, A. (2008). Recombination analysis of *Soybean mosaic virus* sequences reveals evidence of RNA recombination between distinct pathotypes. *Virology* **5**, 143.
- García, J. A., Cervera, M. T., Riechmann, J. L., y López-Otín, C. (1993). Inhibitory effects of human cystatin C on *Plum pox potyvirus* proteases. *Plant Molecular Biology* **22**, 697-701.
- Gergerich, R. C., y Dolja, V. V. (2006). Introduction to plant viruses, the invisible foe. *The Plant Health Instructor*.
- Geri, C., Cecchini, E., Giannakou, M. E., Covey, S. N., y Milner, J. J. (1999). Altered patterns of gene expression in *Arabidopsis* elicited by *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) infection and by a CaMV gene VI transgene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 377-384.
- Golem, S., y Culver, J. N. (2003). *Tobacco mosaic virus* induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 681-688.
- Goodman, R. N., Király, Z., y Wood, K. R. (1986). "The biochemistry and physiology of plant disease.", University of Missouri Press, Columbia.
- Guan, H. P., y Janes, H. W. (1991). Light regulation of sink metabolism in tomato fruit. II. Carbohydrate metabolizing enzymes. *Plant Physiology* **96**, 922-927.
- Guo, D. Q., Zhi, H. J., Wang, Y. W., Gai, J. Y., Zhou, X. A., Yang, C. L., Li, K., y Li, H. C. (2005). Identification and distribution of *Soybean mosaic virus* strains in middle and northern Huang Huai region of China. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences* **27**, 64-68.
- Hajimorad, M. R., Eggenberger, A. L., y Hill, J. H. (2003). Evolution of *Soybean mosaic virus*-G7 molecularly cloned genome in Rsv1-genotype soybean results in emergence of a mutant capable of evading Rsv1-mediated recognition. *Virology* **314**, 497-509.
- Halbert, S. E., Irwin, M. E., y Goodman, R. M. (1981). Alate aphid (Homoptera: Aphididae) species and their relative importance as field vectors of *Soybean mosaic virus*. *Association of Applied Biologist* **97**, 1-9.
- Hari, V., Siegel, A., Rozek, C., y Timberlake, W. E. (1979). The RNA of *Tobacco etch virus* contains poly(A). *Virology* **92**, 568-571.

- Hartman, G. L., y Hill, C. B. (2010). Capítulo 13: Diseases of soybean and their management. En "The soybean: botany, production and uses." (G. Singh, ed.), pp. 276-299.
- Havelda, Z., Varallyay, E., Valoczi, A., y Burgyan, J. (2008). Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *The Plant Journal* **55**, 278-288.
- Heath, R. L., y Packer, L. (1967). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 189-198.
- Heineke, D., Kruse, A., Flügge, U. I., Frommer, W. B., Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., y Heldt, H. W. (1994). Effect of antisense repression of the chloroplast triose-phosphate translocator on photosynthetic metabolism in transgenic potato plants. *Planta* **193**, 174-180.
- Herrera, P. S., Ploper, L. D., Rodríguez Pardina, P., y Laguna, I. G. (1998). Presencia de "planta vinosa" en soja en el noroeste argentino. *Avance Agroindustrial* **72**, 23-26.
- Herrera, P. S., Rodríguez Pardina, P., Ferrer, F., Truol, G., y Laguna, I. G. (1995). Caracterización de tres aislamientos del *Soybean Mosaic Potyvirus* (SMV), provenientes de diferentes áreas sojeras argentinas. En "I Congreso nacional de soja y II Reunión nacional de oleaginosas", pp. 72-79, Pergamino.
- Hill, J. H., y Whitham, S. A. (2014). Control of virus diseases in soybeans. En "Advances in virus research. Control of plant virus diseases: Seed-propagated crops" (G. Loebenstein and N. Katis, eds.), 1. Academic Press.
- Hill, J. H., Benner, H. I., y Van Deusen, R. A. (1994). Rapid differentiation of *Soybean mosaic virus* isolates by antigenic signature analysis. *Phytopathology* **142**, 152-162.
- Hill, J. H., Benner, H. I., Permar, T. A., Bailey, T. B., Andrews Jr., R. E., Durand, D. P., y Van Deusen, R. A. (1989). Differentiation of *Soybean mosaic virus* isolates by one-dimensional trypsin peptide maps immunoblotted with monoclonal antibodies. *Phytopathology* **79**, 1261-65.
- Hong, X. Y., Chen, J., Shi, Y. H., y Chen, J. P. (2007). The '6K1' protein of a strain of *Soybean mosaic virus* localizes to the cell periphery. *Archives of Virology* **152**, 1547-51.
- Hong, Y., y Hunt, A. G. (1996). RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **226**, 146-151.
- Hull, R. (2002). Chapter 9 - Induction of disease 1: Virus movement through the plant and effects on plant metabolism. En "Matthews' Plant virology (Fourth edition)", pp. 373-436. Academic Press, London.
- Itaya, A. (2002). Plasmodesma-mediated selective protein traffic between "symplasmically isolated" cells probed by a viral movement protein. *The Plant Cell Online* **14**, 2071-2083.
- Johansen, I. E., Dougherty, W. G., Keller, K. E., Wang, D., y Hampton, R. O. (1996). Multiple viral determinants affect seed transmission of *Pea seed-borne mosaic virus* in *Pisum sativum*. *Journal of General Virology* **77**, 3149-3154.
- Kasschau, K. D., Cronin, S., y Carrington, J. C. (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of *Tobacco etch potyvirus* helper component-proteinase. *Virology* **228**, 251-262.
- Kim, Y. H., Kim, O. S., Lee, B. C., Moon, J. K., Lee, S. C., y Lee, J. Y. (2003). G7H, a new *Soybean mosaic virus* strain: Its virulence and nucleotide sequence of CI gene. *Plant Disease* **87**, 1372-1375.

- Kim, Y. H., Kim, O. S., Rho, J. H., Moon, J. K., Sohn, S. I., Lee, S. C., y Lee, J. Y. (2004). Identification of *Soybean mosaic virus* strains by RT-PCR / RFLP analysis. *Plant Disease* **88**, 641-644.
- Klein, P. G., Klein, R. R., Rodríguez-Cerezo, E., Hunt, A. G., y Shaw, J. G. (1994). Mutational analysis of the *Tobacco vein mottling virus* genome. *Virology* **204**, 759-769.
- Knuhtsen, H., Hiebert, E., y Purcifull, D. E. (1974). Partial purification and some properties of tobacco etch virus induced intranuclear inclusions. *Virology* **61**, 200-209.
- Kumar, S., Tamura, K., y Nei, M. (1994). MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Computer Applications in the Biosciences* **10**, 189-191.
- Laguna, I. G. (2008a). Introducción general. En "Enfermedades causadas por virus en cultivos de soja en Argentina.", pp. 13-14. INTA, Córdoba.
- Laguna, I. G. (2008b). Capítulo VIII: *Soybean mosaic virus* (SMV). En "Enfermedades causadas por virus en cultivos de soja en Argentina", pp. 49-53, INTA, Córdoba.
- Laguna, I. G., y Giorda, L. M. (1980). El Virus del mosaico de la soja (*Glycine max* (L) Merr) en Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* **15**, 513-525.
- Laguna, I. G., Truol, G., y Giorda, L. M. (1986). Presencia del Virus del mosaico de la soja, *Soybean mosaic virus*, (SMV) en diferentes cultivares de áreas sojeras de la Argentina. *Revista Agronómica Manfredi* **II**, 49-53.
- Laguna, I. G., Arneodo, J. D., Rodríguez Pardina, P., y Fiorona, M. (2006). *Cowpea mild mottle virus* infecting soybean crops in Northwestern Argentina. *Fitopatología Brasileira* **31**, 283.
- Laguna, I. G., Truol, G. A. M., Ducasse, D. A., Rodríguez Pardina, P., Hanada, K., Kanematsu, S., Usugi, T., Nkagaki, S., Sakai, J., Onuki, M., y Ploper, L. D. (2000). Módulo soja. Enfermedades causadas por virus. En "Avances en métodos y tecnologías aplicadas en fitovirología", pp. 141-163, JICA-INTA, Córdoba, Argentina.
- Laín, S., Riechmann, J. L., y García, J. A. (1989). The complete nucleotide sequence of *Plum pox potyvirus* RNA. *Virus Research* **13**, 157-172.
- Laín, S., Riechmann, J. L., y García, J. A. (1990). RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Research* **18**, 7003-7006.
- Laín, S., Martín, M. T., Riechmann, J. L., y García, J. A. (1991). Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the *Plum pox potyvirus* helicase-like protein. *Journal of Virology* **65**, 1-6.
- Langenberg, W. G. (1986). Virus protein association with cylindrical inclusions of two viruses that infect wheat. *Journal of General Virology* **67**, 1161-1168.
- Langenberg, W. G., y Zhang, L. (1997). Immunocytology shows the presence of *Tobacco etch virus* P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology* **118**, 243-247.
- Leonard, D. A., y Zaitlin, M. (1982). A temperature-sensitive strain of *Tobacco mosaic virus* defective in cell-to-cell movement generates an altered viral-coded protein. *Virology* **117**, 416-424.
- Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., y Laliberte, J. F. (2000). Complex formation between Potyvirus VPg and translation eukaryotic

- initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology* **74**, 7730-37.
- Li, X. H., y Carrington, J. C. (1993). Nuclear transport of Tobacco etch potyviral RNA-dependent RNA polymerase is highly sensitive to sequence alterations. *Virology* **193**, 951-958.
- Lim, S. M. (1985). Resistance to *Soybean mosaic virus* in soybeans. *Phytopathology* **75**, 199-201.
- Lim, W. S., Kim, Y. H., y Kim, K. H. (2003). Complete genome sequences of the genomic RNA of *Soybean mosaic virus* strains G7H and G5. *Plant Pathology* **19**.
- Lin, S. S., Hou, R. F., y Yeh, S. D. (2001). Complete genome sequence and genetic organization of a Taiwan isolate of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **42**, 243-250.
- Lommel, S. A., McCain, A. H., y Morris, T. J. (1982). Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* **72**, 1018-22.
- Lu, W. Q., Zhang, M. H., Wei, P. W., Xie, S. Y., Guo, J. Q., Jiang, Y. Y., y Geng, Y. C. (1985). Classification and distribution of strains of *Soybean mosaic virus* in Northeast China. *Acta Phytophylacica Sinica* **15**, 225-229.
- Lucas, B. S., y Hill, J. H. (1980). Characteristics of the transmission of three *Soybean mosaic virus* isolates by *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum maidis*. *Phytopathology* **99**, 47-53.
- Luo, R. W., Yang, C. L., Shang, Y. F., Zhao, J. H., y Li, C. S. (1990). Identification of strains of *Soybean mosaic virus* in Shandong province. *Journal of Shandong Agricultural Sciences* **5**, 16-19.
- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., y Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* **1**, 1-5.
- Matthews, R. E. F. (1991). "Plant virology (Third Edition)", Academic Press, San Diego.
- McDonald, J. G., y Bancroft, J. B. (1977). Assembly studies on *Potato virus Y* and its coat protein. *Journal of General Virology* **35**, 251-263.
- Media Cybernetics. Image-Pro Plus. Silver Spring: Media Cybernetics (2002) Maryland, EE.UU. <http://www.mediacy.com/action.htm>
- Murphy, J. F., Rhoads, R. E., Hunt, A. G., y Shaw, J. G. (1990). The VPg of *Tobacco etch virus* RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. *Virology* **178**, 285-8.
- Murphy, J. F., Klein, P. G., Hunt, A. G., y Shaw, J. G. (1996). Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* **220**, 535-538.
- Nakano, M., Iwasaki, M., y Shinkai, A. (1982). Further study on strains of *Soybean mosaic virus* in Kyushu. *Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu* **28**, 24-25.
- Nelson, R. S., y Citovsky, V. (2005). Plant viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways. *Plant Physiology* **138**, 1809-14.
- Nicolas, O., Dunnington, S. W., Gotow, L. F., Pirone, T. P., y Hellmann, G. M. (1997). Variations in the VPg protein allow a Potyvirus to overcome Gene resistance in tobacco. *Virology* **237**, 452-459.

- Noodén, L. D., Guiamét, J. J., y John, I. (1997). Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* **101**, 746-753.
- Palta, J. P. (1990). Leaf chlorophyll content. *Remote Sensing Reviews* **5**, 207-213.
- Pu, Z. Q., Cao, Q., Fang, D. C., Xue, B. D., y Fang, Z. D. (1982). Identification of strains of *Soybean mosaic virus*. *Acta Phytopythologica Sinica* **9**, 15-20.
- Radwan, D. E. M., Fayez, K. A., Mahmoud, S. M., Hamad, A., y Lu, G. (2006). Salicylic acid alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by *Zucchini yellow mosaic virus* infection in *Cucurbita pepo* leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **69**, 172-181.
- Rahoutei, J., García-Luque, I., y Barón, M. (2000). Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiologia Plantarum* **110**, 286-292.
- Rajamäki, M.-L., y Valkonen, J. P. T. (2009). Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like *Potato virus A* in *Nicotiana* species. *The Plant Cell* **21**, 2485-2502.
- Ravelonandro, M., Peyruchaud, O., Garrigue, L., de Marcillac, G., y Dunez, J. (1993). Immunodetection of the *Plum pox virus* helper component in infected plants and expression of its gene in transgenic plants. *Archives of Virology* **130**, 251-268.
- Riechmann, J. L., Lain, S., y Garcia, J. A. (1992). Highlights and prospects of Potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* **73**, 1-16.
- Riechmann, J. L., Cervera, M. T., y Garcia, J. A. (1995). Processing of the *Plum pox virus* polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *Journal of General Virology* **76**, 951-956.
- Riesmeier, J. W., Flügge, U.-I., Schulz, B., Heineke, D., Heldt, H. W., Willmitzer, L., y Frommer, W. B. (1993). Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 6160-6164.
- Rodríguez, M., Taleisnik, E., Lenardon, S., y Lascano, R. (2010). Are *Sunflower chlorotic mottle virus* infection symptoms modulated by early increases in leaf sugar concentration? *Plant Physiology* **167**, 1137-44.
- Rodríguez, M., Muñoz, N., Lenardon, S., y Lascano, R. (2012). The chlorotic symptom induced by *Sunflower chlorotic mottle virus* is associated with changes in redox-related gene expression and metabolites. *Plant science* **196**, 107-16.
- Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E. D., Pirone, T. P., y Shaw, J. G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology* **74**, 1945-1949.
- Rodríguez Pardina, P., Herrera, P. S., Laguna, I. G., y Truol, G. (1995). Etiología del síntoma de "planta vinosa" en soja. *En "1er Congreso Nacional de Soja y 2a Reunión Nacional de Oleaginosos."*, Vol. II, pp. 80-88, Pergamino, Buenos Aires.
- Rodríguez Pardina, P., Hanada, K., Laguna, I. G., Zerbini, F. M., y Ducasse, D. A. (2011). Molecular characterization and relative incidence of bean- and soybean-infecting Begomoviruses in northwestern Argentina. *Annals of Applied Biology* **158**, 69-78.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L., y Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283-295.

- Schaad, M. C., Lellis, A. D., y Carrington, J. C. (1997a). VPg of *Tobacco etch potyvirus* is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology* **71**, 8624-31.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E., y Carrington, J. C. (1997b). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: Role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *The EMBO journal* **16**, 4049-4059.
- Seo, J. K., Ohshima, K., Lee, H. G., Son, M., Choi, H. S., Lee, S. H., Sohn, S. H., y 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.
- Shalitin, D., y Wolf, S. (2000). *Cucumber mosaic virus* infection affects sugar transport in melon plants. *Plant Physiology* **123**, 597-604.
- Sherepitko, D. V., Budzaniwska, I. G., Polischuk, V. P., y Boyko, A. L. (2011). Partial sequencing and phylogenetic analysis of *Soybean mosaic virus* isolated in Ukraine. *Biopolymers and Cell* **27**, 472-479.
- Siaw, M. F. E., Shahabuddin, M., Ballard, S., Shaw, J. G., y Rhoads, R. E. (1985). Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of *Tobacco vein mottling virus* RNA. *Virology* **142**, 134-143.
- Siegel, A., Hari, V., y Kolacz, K. (1978). The effect of *Tobacco mosaic virus* infection on host and virus-specific protein synthesis in protoplasts. *Virology* **85**, 494-503.
- Sindelá-rová, M., Sindelar, L., y Burketova, L. (1999). Changes in glucose, fructose and saccharose metabolism in tobacco plant infected with *Potato virus Y*. *Biologia Plantarum* **42**, 431-439.
- Stark, D. M., Timmerman, K. P., Barry, G. F., Preiss, J., y Kishore, G. M. (1992). Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Science* **258**, 287-292.
- Sziraki, I., Mustardy, L., Faludi-Daniel, A., y Király, Z. (1984). Alteration in chloroplast ultrastructure and chlorophyll content in rust-infected pinto beans at different stages of disease development. *Phytopathology* **74**, 77-83.
- Takahashi, K., Tanaka, T., Iida, W., y Tsuda, Y. (1980). Studies on virus diseases and causal viruses of soybean in Japan. *Bulletin of the Tohoku National Agricultural Experiment Station* **62**, 103-130.
- Tolin, S. A., y Lacy, G. H. (2004). Viral, bacterial, and phytoplasmal diseases of soybean. En "Soybean: Improvement, production, and uses", 3, pp. 765-819.
- Truol, G. A., y Laguna, I. G. (1992). Identificación de razas del Virus del mosaico de la soja (*Soybean mosaic virus*) presentes en Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* **XXIII**, 41-51.
- Truol, G. A., Laguna, I. G., y Rodríguez Pardina, P. E. (1988). Presencia del *Peanut mottle virus* en soja en la Argentina. *Revista de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología* **23**, 75-80.
- Truol, G. A., Laguna, I. G., Nome, S. F., y Rodríguez Pardina, P. E. (1985). *Alfalfa mosaic virus* en cultivos de soja (*Glycine max* (L) Merr). *Idia XXI* **64**, 441-444.
- Tu, J. C., Ford, R. E., y Grau, C. R. (1970). Some factors affecting the nodulation and nodule efficiency in soybeans infected by *Soybean mosaic virus*. *Phytopathology* **60**, 1653-56.
- Vallone, S. D. (2002). Enfermedades de la soja. *Idia XXI* **2**, 68-74.
- Verchot, J., Koonin, E. V., y Carrington, J. C. (1991). The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* **185**, 527-535.

- Wang, X., Eggenberger, A. L., Nutter Jr., F. W., y Hill, J. H. (2001). Pathogen-derived transgenic resistance to *Soybean mosaic virus* in soybean. *Molecular Breeding* **8**, 119-127.
- Wang, X. Q., Gai, J. Y., y Pu, Z. Q. (2003). Classification and distribution of strains of *Soybean mosaic virus* middle and lower Huang-Huai and Changjiang Valleys. *Soybean Science* **22**, 102-107.
- Wang, Y. W., Zhi, H. J., Guo, D. Q., Gai, J. Y., Chen, Q. S., Li, K., y Li, H. C. (2005). Classification and distribution of strains of *Soybean mosaic virus* in northern China spring planting soybean region. *Soybean Science* **24**, 263-268.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K. D., y Zhou, X. (2010a). Formation of complexes at plasmodesmata for Potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLOS Pathogens* **6**, 1-12.
- Wei, T., Huang, T. S., McNeil, J., Laliberte, J. F., Hong, J., Nelson, R. S., y Wang, A. (2010b). Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *Journal of Virology* **84**, 799-809.
- Wen, R. H., y Hajimorad, M. R. (2010). Mutational analysis of the putative pipo of *Soybean mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* **400**, 1-7.
- Whenham, R. J., y Fraser, R. S. S. (1990). Plant growth regulators, viruses and plant growth. En "Recognition and Response in Plant-Virus Interactions" (R. S. S. Fraser, ed.), pp. 287-310. NATO ASI Series.
- Whitham, S. A., Quan, S., Chang, H. S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X., y Hou, Y. M. (2003). Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal* **33**.
- Xu, Z. G., Goodman, R. M., y Polston, J. E. (1983). Identification of strains of *Soybean mosaic virus*. *Journal of Nanjing Agricultural College* **3**, 36-40.
- Yang, Y. L. (2002). Classification and distribution of strains of *Soybean mosaic virus* in the middle and lower Changjiang River Valleys and the resistance to *Soybean mosaic virus* in soybeans. Master's thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing, China.
- Zaitlin, M., y Hull, R. (1987). Plant virus-host interactions. *Annual Review of Plant Physiology* **38**, 291-315.
- Zhan, Y., Zhi, H. J., Yu, D. Y., y Gai, J. Y. (2006). Identification and distribution of SMV strains in Huang-Huai Valleys. *Scientia Agricultura Sinica* **39**, 2009-15.
- Zhou, G. C., Shao, Z. Q., Ma, F. F., Wu, P., Wu, X. Y., Xie, Z. Y., Yu, D. Y., Cheng, H., Liu, Z. H., Jiang, Z. F., Chen, Q. S., Wang, B., y Chen, J. Q. (2015). The evolution of *Soybean mosaic virus*: An updated analysis by obtaining 18 new genomic sequences of Chinese strains/isolates. *Virus Research* **208**, 189-98.