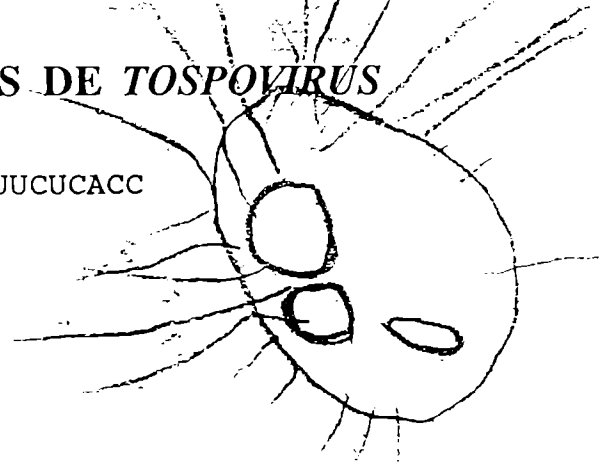


Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Universidad Nacional de La Plata

CARACTERIZACION MOLECULAR E INFERENCIAS EVOLUTIVAS DE AISLAMIENTOS ARGENTINOS DE *TOSPOVIRUS*



AAAGAGGCCAAGAUUGCUGGUGUUGCAUAAAGCUUUGCACUUUCUCACC

U
C
A
G
A
A
G
A
U
A
C
C
A
A
A
U
C
A
G
A
A

GAUAUGACUUUCAGAAGGCUUG

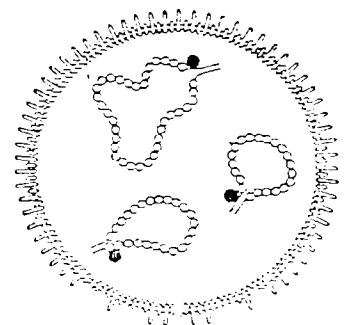
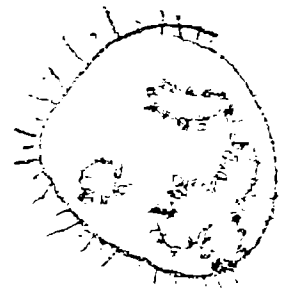
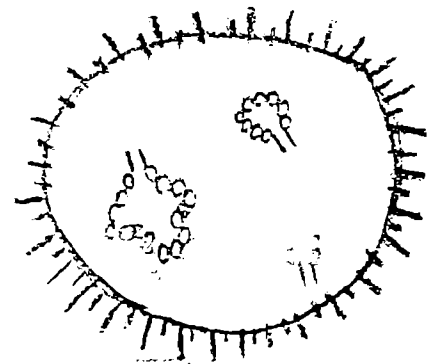
GUUGCAUAAAGCUUUGCACUUUCUCACC

G
U
C
U
U
G
A
G
G
U
C
A
G
G
C

CUAAGUAUAACA

U
G
U
U
A
U
G
A

UGAAGCUCAUAG



Ricardo Alfredo Dewey

Tesis

La Plata, 1995

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, y en el Laboratorio de Sistemática y Biología Evolutiva (LASBE) de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, bajo la dirección del Prof. Oscar Grau y la co-dirección del Prof. Dr. Jorge V. Crisci.

Dibujo de la portada

De arriba hacia abajo: Virus 1 o *outgroup* (Santiago Bruno, 4 años)
Virus 2 (Martina Bruno, 10 años)
Virus 3 (Manuela Bruno, 6 años)
Virus 4: tomado de Resende *et al.*, 1993.

INDICE

	Pág.
Indice	i
Abreviaturas	iv
INTRODUCCION	1
1. ANTECEDENTES	4
1.1. Estructura y composición de la partícula viral	4
1.2. Importancia económica	8
1.3. Sintomatología	8
1.4. Vector y modo de transmisión	9
1.5. Citopatología	11
1.6. Movimiento célula a célula	12
1.7. Morfogénesis de la partícula viral	12
1.8. Clasificación de los <i>Bunyaviridae</i>	13
1.9. Clasificación de los <i>Tospovirus</i>	15
1.10. Métodos de detección y diagnóstico	16
1.11. Aislamientos defectivos	19
1.12. Estrategias de control de <i>Tospovirus</i>	20
1.13. Inferencias evolutivas	24
1.13.1. Sistemática filogenética	25
1.13.2. Reconstrucción filogenética utilizando macromoléculas	31
1.13.3. Métodos de simplicidad (<i>parsimony</i>)	32
1.13.4. Morfología versus moléculas en la reconstrucción filogenética	34
1.13.5. Congruencia de caracteres. Medidas de adecuación entre los árboles y los datos	36
1.13.6. Árboles y confianza	38
2. MATERIALES Y METODOS	40
2.1. Obtención de aislamientos	40
2.2. Producción y mantenimiento de virus	40
2.3. Purificación de viriones	40
2.4. Obtención de ARN	43
2.5. Preparación de bacterias competentes	46
2.5.1. Competentes químicas (Método de cloruro de calcio)	46
2.5.2. Electrocompetentes	47
2.6. Biblioteca de ADN complementario	47
2.6.1. Generación de primera y segunda cadena de ADNc	47

	Pág.
2.6.2. Fraccionamiento por tamaño	48
2.6.3. Ligación del ADNc al vector plasmídico	48
2.6.4. Electrotransformación	49
2.6.5. Transferencia de colonias a soporte sólido (<i>colony blot</i>)	49
2.6.6. Métodos de incorporación de nucleótidos radiactivos al ADN (marcación de sondas de ADN)	49
2.6.7. Detección de colonias conteniendo el gen N	51
2.6.8. Purificación de ADN plasmídico	51
2.6.9. Subclonado de fragmentos de ADN provenientes de la biblioteca de ADNc	52
2.7. Transcripción reversa y PCR (RT-PCR)	53
2.7.1. Oligonucleótidos utilizados como <i>primers</i>	53
2.7.2. Generación de ADNc con primers específicos	53
2.7.3. Reacción de PCR	53
2.8. Recuperación de los fragmentos de amplificación a partir del gel de agarosa	54
2.9. Digestión de fragmentos de PCR con enzimas de restricción	54
2.10. Clonado de fragmentos amplificados por PCR	54
2.11. Secuenciación de fragmentos de ADN complementario	55
2.12. Análisis de proteínas	56
2.12.1. Purificación parcial de nucleocápside	56
2.12.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS (PAGE-SDS)	56
2.12.3. Antisueros	57
2.12.4. Transferencia de proteínas a soporte sólido (<i>Western blot</i>)	57
2.12.5. Inmunodetección	58
2.12.6. ELISA	59
2.13. Microscopía Electrónica	59
2.14. Análisis de secuencias	60
2.15. Análisis filogenético	60
Medios para cultivo de bacterias	64
Soluciones usadas	65
3. RESULTADOS	66
3.1. Caracterización del aislamiento M316	66
3.1.1. Biblioteca de ADNc	66
3.1.2. Secuenciación de extremos del clon pM316-74	68
3.1.3. Subclonado del clon pM316-74	71
3.1.4. Identificación de clones del gen N mediante digestión con enzimas de restricción	73

	Pág.
3.1.5. Secuenciación	73
3.1.6. Análisis de secuencias	73
3.1.7. Análisis proteico (SDS-PAGE y <i>Western blot</i>)	78
3.1.8. Análisis proteico (DAS-ELISA)	78
3.1.9. Microscopía electrónica	82
3.2. Caracterización de aislamientos de distintas regiones del país	82
3.2.1. Diseño de oligonucleótidos	82
3.2.2. RT-PCR	85
3.2.3. Clonado y secuenciación de fragmentos de PCR	85
3.2.4. Análisis de secuencias	88
3.2.5. Detección de especies de <i>Tospovirus</i> mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) de fragmentos de amplificación	88
3.2.6. Análisis proteico (DAS-ELISA)	101
3.2.7. Microscopía electrónica	101
3.3. Análisis filogenético	101
4. DISCUSION	118
4.1 Diversidad de <i>Tospovirus</i> en Argentina	118
4.2 Identificación y diagnóstico de especies de <i>Tospovirus</i>	124
4.3 Análisis filogenético del género <i>Tospovirus</i>	125
CONCLUSIONES	128
BIBLIOGRAFIA	129

Abreviaturas

ADNc:	ADN copia
AMV:	virus de myeloblastoma de ave (<i>Avian myeloblastoma virus</i>)
ARNt:	ácido ribonucleico de transferencia
ATP:	adenosina 5'-trifosfato
BSA:	seroalbúmina bovina
pb:	pares de bases
Ci/ μ Ci:	curi / microcuri
cpm:	cuentas por minuto
dATP:	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP:	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP:	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
dNTP:	desoxiribonucleósidos trifosfato
dTTP:	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA:	ácido etilén-diamino-tetracético
IPTG:	isopropil-tio- β -D-galactósido
kDa:	kilodaltons
Kb:	kilopares de bases
Kv:	kilovolts
MOPS:	ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfónico
nm:	nanometros
nt:	nucleótidos
PIPES:	ácido piperazin-N,N'-bis(2-etano-sulfónico)
p/v:	peso en volumen
rpm:	revoluciones por minuto
SDS:	dodecil sulfato de sodio
TEMED:	N,N,N,N'-tetrametil etilén diamino
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
v/v:	volumen en volumen
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

INTRODUCCION

La enfermedad del marchitamiento moteado, peste negra del tomate o *spotted wilt* fue descrita por primera vez en Australia por Brittlebank (1919). Dicha enfermedad, responsable en un principio de cuantiosas pérdidas económicas en cultivos de tomates en el sur de Australia (Samuel *et al.*, 1930), es considerada actualmente como una enfermedad de distribución mundial. El agente etiológico de dicha enfermedad es el virus *tomato spotted wilt* (TSWV), descrito por primera vez en 1930 por Samuel, Bald y Pittman.

Hasta principios de la década del 90, se creyó que TSWV constituía un grupo viral monotípico (Ie, 1970; Matthews, 1982; Francki *et al.*, 1991). Actualmente se sabe que, junto con otras tres especies virales [*tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Impatiens necrotic spot virus* (INSV)] (De Avila *et al.*, 1993) constituyen el género *Tospovirus* (Francki *et al.*, 1991).

Los *Tospovirus* junto con los géneros, *Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* y *Uukuvirus* forman parte de la familia *Bunyaviridae* (para una revisión ver Bishop, 1990; Elliot, 1990; Gonzales-Scarano y Nathanson, 1990; Schmaljohn y Patterson, 1990) y son los únicos de dicha familia que infectan plantas.

Los *Tospovirus* son unos de los virus de plantas con mayor rango de huéspedes. Infecta más de 550 especies de plantas superiores, incluyendo mono y dicotiledóneas, que representan más de 60 familias botánicas (Sether y De Angelis, 1992). Más de 100 especies dentro de familias de importancia económica, tales como Solanaceae, Compositae y Leguminosae, son huéspedes registrados (Peters *et al.*, 1991).

Entre los virus de plantas, los *Tospovirus*, parecen tener una organización genómica única. El genoma está compuesto por tres ARNs de cadena simple llamados grande, mediano y pequeño [*large* (L), *medium* (M) y *small* (S)], respectivamente. Dichos ARNs forman nucleocápsides pseudocirculares junto con proteínas de la nucleocápside (N) (Van Der Hurk *et al.*, 1977; Mohamed, 1981; De Haan *et al.*, 1989b; Peters *et al.*, 1991). En el laboratorio los *Tospovirus* pueden transmitirse mecánicamente, pero en la naturaleza sólo son transmitidos de planta a planta por medio de varias especies de trips (Thysanoptera, Terebrantia, Tripidae) (Paliwal, 1974 y 1976; Sakimura 1962a y b). Con respecto al pasaje del virus entre células contiguas, se ha detectado que existe una proteína no estructural (NS_M), codificada por el fragmento de ARN M, que podría cumplir esa función en la dispersión del virus en la planta (Kormelink *et al.*, 1994).

El control de la enfermedad producida por *Tospovirus* es muy difícil. Existen varias estrategias para intentar disminuir las infecciones de plantas, ya sea mediante control de los vectores, empleo de cultivares con resistencia o tolerancia genética natural u obtención de plantas transgénicas resistentes.

Desde el punto de vista de la detección e identificación viral y de la epidemiología de la enfermedad, se hace necesario conocer en profundidad tanto la diversidad genómica como la historia evolutiva del género *Tospovirus* con el fin de diseñar estrategias universales de identificación de especies y la elaboración de planes de resistencia a la enfermedad en cultivos de importancia económica.

En los últimos años, biólogos de diferentes disciplinas han comenzado a utilizar métodos de análisis filogenéticos para interpretar históricamente la variación existente en los sistemas biológicos (Brooks y McLennan, 1991). El método de reconstrucción filogenética más difundido actualmente, es el cladismo o sistemática filogenética (Hennig, 1966; Nelson y Platnick, 1981; Wiley, 1981). Se trata de una escuela sistemática que estudia los patrones de relaciones genealógicas entre poblaciones, especies o taxa mayores y las refleja en sus clasificaciones.

Hasta el momento, la diversidad del género *Tospovirus* sólo ha sido analizada (De Avila *et al.*, 1993) mediante el alineamiento de las secuencias del gen N. En dichos estudios, la agrupación de taxa estuvo dada por el análisis de similitudes globales de datos de identidad de ARN y similitud e identidad de aminoácidos entre los miembros del género. Las clasificaciones basadas en estudios de similitud global no suelen corresponderse con la historia evolutiva del grupo analizado, por ello, resulta justificado aplicar el método de la sistemática filogenética al análisis de la variación genómica de los *Tospovirus* y grupos afines.

Los objetivos de este trabajo son:

- a) Establecer desde el punto de vista molecular, la diversidad de *Tospovirus* existente en el país, con especial énfasis en las zonas de importancia en la producción de hortalizas.
- b) Generar un método de detección y diagnóstico de especies de *Tospovirus* rápido, sensible, preciso y reproducible.

- c) Plantear hipótesis clasificatorias que reflejen la historia evolutiva del género *Tospovirus*, utilizando los métodos de la sistemática filogenética.

ANTECEDENTES

1.1. Estructura y composición de la partícula viral

El virus *tomato spotted wilt* (TSWV) fue descrito por primera vez en 1930 por Samuel, Bald y Pittman a pesar de que la enfermedad del marchitamiento moteado, peste negra del tomate o *spotted wilt* había sido descrita por primera vez en Australia en 1915 por Brittlebank (1919). Dicha enfermedad, responsable en un principio de cuantiosas pérdidas económicas en cultivos de tomates en el sur de Australia (Samuel *et al.*, 1930), se encontró posteriormente en muchas otras regiones y actualmente se considera una enfermedad de distribución mundial.

Desde mediados de la década del 60 hasta mediados de los '70 varios grupos trabajaron en la purificación del virus (Black *et al.*, 1963; Best y Palk, 1964; Martin, 1964; Van Kammen *et al.*, 1966; Best, 1968; Gumpf y Weathers, 1972; Tsakiridis y Gooding, 1972; Joubert *et al.*, 1974; Paliwal, 1974), hallando como principal obstáculo su inestabilidad en extractos de planta (Black *et al.*, 1963).

Analizadas bajo el microscopio electrónico, las partículas virales mostraron ser esféricas, de 70-110nm y poseer una envoltura con proyecciones superficiales (Ie, 1964; Best y Palk, 1964; Van Kammen *et al.*, 1966; Milne, 1970; Kitajima *et al.*, 1992). Se observan como racimos en vacuolas citoplasmáticas, probablemente en cisternas del retículo endoplásmico (Ie, 1964; Milne, 1970; Milne y De Zoeten, 1967) y en la luz de la membrana nuclear (Kitajima, 1965).

En cuanto a los componentes estructurales del virus, Best y Katekar (1964) describieron la presencia de un 20% de lípidos mediante extracción directa con solventes orgánicos. En estudios de microscopía electrónica se demostró que esos lípidos formaban parte de la envoltura viral y posteriormente, Tas *et al.* (1977b), hallaron que estaban glicosilados.

Respecto de las proteínas virales, (Mohamed *et al.*, 1973) demostraron, por electroforesis en geles de poliacrilamida la presencia de cuatro proteínas estructurales, tres mayoritarias, de pesos moleculares de 84, 50 y 29kDa y una minoritaria, de 220kDa entre otras, estando glicosiladas las proteínas mayoritarias. Después del tratamiento de las partículas con Nonidet P-40, se demostró que la proteína de 220kDa y la de 29kDa, contrariamente a lo que ocurría con las restantes, permanecían presentes en cantidades comparables a las de la partícula intacta. Este hecho sugirió la existencia de una partícula subviral 30% menor que la partícula viral. Posteriormente, Tas *et al.* (1977b) describieron un perfil proteico similar compuesto por cuatro proteínas mayoritarias de pesos moleculares 78, 58,

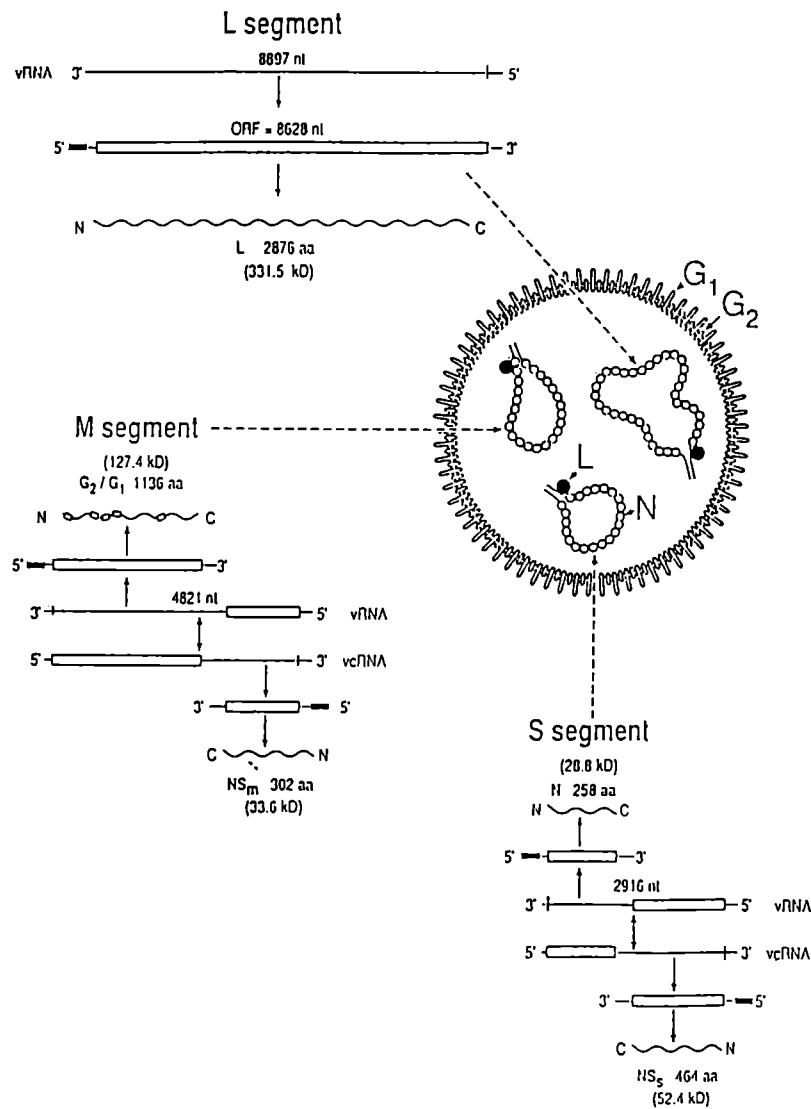
52 y 27kDa y una minoritaria de alrededor de 90kDa entre otras. Por medio de reactivos de Schiff se detectó que, excepto la proteína de 27kD, todas las demás estaban glicosiladas a diferencia de lo observado por Mohamed *et al.* (1973). Tas *et al.* (1977b) atribuyeron esta diferencia fundamentalmente al empleo de diferentes aislamientos de TSWV o al uso de huéspedes distintos. Por otra parte, mediante experimentos de iodación de proteínas (Tas *et al.*, 1977b), se llegó a la conclusión que la proteína de 78kDa probablemente se localizara en la envoltura viral, hecho sugerido también por el elevado nivel de glicosilación de esa proteína y su remoción mediante actividad proteolítica. Por experimentos de iodación, la posición de las proteínas de 58 y 52kDa demostró ser menos precisa, pese a que el nivel de glicosilación y la susceptibilidad a la digestión proteolítica indicaban una localización externa. Los experimentos antes mencionados sugirieron también, y de acuerdo a los resultados de Mohamed *et al.* (1973), que la proteína de 27kDa sería de localización interna y formase parte de la nucleocápside viral.

Con respecto al genoma viral, Van Kammen, *et al.* (1966), concluyeron que era ARN, en base a las reacciones de orcinol (positiva) y de difenilamina (negativa). Best (1968) arribó a la misma conclusión mediante cromatografía en papel y estimación de la composición de bases (38% de guanina, 35% de adenina, 9% de citosina y 18% de uracilo). En 1977, Van der Hurk *et al.*, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, detectaron la presencia de tres bandas mayoritarias y dos minoritarias de ARN sugiriendo que el genoma estaba segmentado. Experimentos de incubación con ARNasa y ADNasa, de precipitación diferencial con cloruro de litio, de calentamiento a 100°C y de comportamiento electroforético del ARN en geles con distintos porcentajes de acrilamida, permitió demostrar a dichos autores que las moléculas de ARN presentes en el virus eran de cadena simple.

Las diferencias con otros virus conocidos tanto en la estructura del virión como en los componentes de la misma llevaron a clasificar a TSWV en un grupo monotípico (Harrison *et al.*, 1971). Actualmente, luego del desarrollo de métodos de purificación más reproducibles y efectivos (Tas *et al.*, 1977a) y gracias a la utilización de técnicas de biología molecular, se conoce con precisión la composición de la partícula viral del aislamiento de Brasil BR-01 (Figura 1).

Entre los virus de plantas, TSWV parece tener una organización genómica única. El genoma está compuesto por tres ARNs de cadena simple llamados grande, mediano y pequeño [*large* (L), *medium* (M) y *small* (S)], respectivamente. Dichos ARNs forman nucleocápsides pseudocirculares junto con proteínas de la

Figura 1: Estructura de la partícula viral y estrategia de expresión génica de *tomato spotted wilt virus* (Tomado de Resende, 1993).



nucleocápside (N) (Van Der Hurk *et al.*, 1977; Mohamed, 1981; De Haan *et al.*, 1989b; Peters *et al.*, 1991). El ARN L (8.9kb) es de polaridad negativa y posee un solo marco abierto de lectura (ORF) que codifica para la supuesta ARN polimerasa viral de 331.5kDa (De Haan *et al.*, 1991). Los otros dos ARNs utilizan estrategias de codificación bipolar o "ambisense" y cada uno contiene dos ORFs. El ARN M (4.8kb) codifica una proteína no estructural (NS_M) de un tamaño de 33.6kDa en sentido viral (Kormelink *et al.*, 1992c), que es la supuesta proteína de movimiento (Kormelink *et al.*, 1994) y un precursor común de las glicoproteínas G1 (78kDa) y G2 (58kDa) que forman parte de las espículas proteicas de la envoltura, en sentido viral complementario. El precursor de las glicoproteínas contiene una secuencia (RGD) característica de dominios proteicos de unión celular (Kormelink *et al.*, 1992c). El ARN S (2.9kb) codifica la proteína de la nucleocápside (N), de 28.8kDa, en sentido viral complementario y otra proteína no estructural (NS_S) de 52.4kDa, en sentido viral (De Haan *et al.*, 1990; Kormelink *et al.*, 1991). Las proteínas codificadas por los ARNs M y S se expresan por ARNs mensajeros (ARNm) subgenómicos. Dichos ARNm se transcriben a partir de cadenas complementarias y se inician por procesos de *cap-snatching* (Kormelink *et al.*, 1992a y b). Las moléculas de ARNm probablemente terminan en la región intercistronica central en una horquilla larga, rica en A-U (De Haan *et al.*, 1990; Kormelink *et al.*, 1992c). Los tres ARNs genómicos tienen, en sus extremos 3' y 5', secuencias de 8 nt complementarios entre sí y muy conservadas, los cuales se aparean formando estructuras estables en mango de sartén (*panhandle*), que podrían estar involucradas en la formación de nucleocápsides pseudocirculares (Peters *et al.*, 1991; De Haan, 1991; Kormelink *et al.*, 1992b).

En 1984, en base a la comparación de datos publicados sobre las propiedades de TSWV y los virus de la familia *Bunyaviridae*, que sólo infectaban vertebrados, (Milne y Francki, 1984 y De Haan *et al.*, 1989a), se sugirió que TSWV debería ser considerado un posible miembro de esa familia. Posteriormente, estudios más detallados revelaron que TSWV comparte muchas características con los miembros de esa familia tales como modo de transmisión, morfología y estructura genómica. Como resultado de esas similitudes, TSWV se clasificó como único miembro de un nuevo género (*Tospovirus*) de la familia *Bunyaviridae* (Francki *et al.*, 1991).

1.2. Importancia económica

TSWV es uno de los virus con mayor rango de huéspedes. Infecta más de 550 especies de plantas, incluyendo mono y dicotiledóneas, que representan más de 60 familias botánicas (Sether y De Angelis, 1992). Más de 100 especies dentro de las familias Solanaceae, Compositae y Leguminosae son huéspedes registrados (Peters *et al.*, 1991). Las descripciones de nuevos huéspedes se ha incrementado enormemente. En 1992, se han listado 62 nuevas especies de plantas huéspedes en una sola publicación (Stoobs *et al.*, 1992). Muchas de esas plantas son huéspedes tanto para el virus como para el vector y sirven como reservorios de infección que contribuyen a la epidemia en cultivos de plantas económicamente importantes (Cho *et al.*, 1986; Stoobs *et al.*, 1992). El daño producido en los cultivos comerciales es muy elevado. Durante 1986, la infección de plantaciones de maní por TSWV causó la pérdida de 5 millones de dólares sólo en Texas (USA). Cho *et al.* (1987) comunicaron que, en las plantaciones de lechuga de Hawaii, TSWV causa un 50 y 90% de pérdidas en cualquier época del año. En 1989 y 1990, en invernaderos comerciales de Estados Unidos y Canadá, se produjeron grandes pérdidas en la producción de plantas forrajeras a causa de este virus. También ha habido grandes pérdidas económicas debidas a TSWV en plantaciones de ajo, tabaco, ananá, sandía, tomate, papa, pimiento y plantas ornamentales como crisantemo, begonia, ageratum e *impatiens* (Sether y De Angelis, 1992). En Argentina, la enfermedad se encuentra muy difundida en zonas productoras tanto de hortalizas como de flores ornamentales. Se estima que la enfermedad causa, en plantas infectadas experimentalmente, una reducción en rendimiento de 64-70% y 54-65% para número y peso de fruto de tomate, respectivamente (Biderbost *et al.*, 1989). Recientemente, la enfermedad causó pérdidas de alrededor del 80% en plantaciones de crisantemo en la zona del gran La Plata.

1.3. Sintomatología

El virus puede inducir una amplia variedad de síntomas que varía con el tipo de cepa viral, época del año, ambiente y con la especie huésped (Best y Gallus, 1953; Francki y Hatta, 1981; Ie, 1970; Jones y Baker, 1991). La sintomatología puede incluso variar sobre la misma especie huésped, dependiendo de la edad y el estado

nutricional de las plantas (Francki y Hatta, 1981). TSWV se ha aislado de plantas enfermas que también estaban infectadas con otro virus, y ambos virus replican en la misma célula. Se encontró que estas plantas así infectadas presentaban síntomas correspondientes a la infección de TSWV, aunque puede suceder que en otras plantas la coinfección pueda ampliar la variabilidad de síntomas asociados con TSWV (Francki y Hatta, 1981).

La infección por TSWV es muy importante en plantaciones de tomate y tabaco en muchas regiones. En tomate, los síntomas característicos son el amarronamiento repentino (*sudden browning*) de hojas jóvenes seguido de la detención del crecimiento de la planta. Posteriormente, las hojas se distorsionan y aparecen zonas necróticas. Los frutos formados después de la infección suelen desarrollar manchas irregulares oscuras ó transparentes (Samuel *et al.*, 1930). En tabaco, generalmente causa clorosis y distorsión de las hojas jóvenes, hay necrosis y puede llegar a detenerse el crecimiento. Si la infección ocurre en plantas jóvenes, los síntomas son extremadamente severos pudiendo causar la muerte de las mismas. La infección con TSWV en distintas especies de plantas, incluido tomate y tabaco, tiende a desarrollar síntomas más severos sobre un solo lado de la planta, produciendo un crecimiento asimétrico de la misma (Francki y Hatta, 1981).

1.4. Vector y modo de transmisión

A pesar que en el laboratorio los *Tospovirus* pueden transmitirse mecánicamente, en la naturaleza sólo son transmitidos de planta a planta por medio de varias especies de trips (Thysanoptera, Terebrantia, Tripidae). La relación entre los trips y los *Tospovirus* es muy específica. De la gran cantidad de especies de trips conocidas, sólo siete transmiten a los *Tospovirus*, *Thrips tabaci* (Lind.) (Pittman, 1927), *Frankliniella schultzei* (Trybom) (Samuel *et al.*, 1930), *Frankliniella fusca* (Hinds) (Sakimura, 1963), *Scirtothrips dorsalis* (Hood) (Amin *et al.*, 1981), *Thrips setosus* (Moulton) (Sakimura, 1962b), *Thrips palmi* (Karny) (Mau *et al.*, 1991) y *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Cho *et al.*, 1988). Este último es uno de los vectores más importantes dada su alta fecundidad, capacidad de dispersión y hábitos alimenticios polifágicos. La dispersión de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) desde el oeste de los Estados Unidos al resto del país y a

Canadá y Europa ha causado la aparición de TSWV en diferentes cultivos a campo y en invernáculos (Peters *et al.*, 1991).

En algunas localidades hay incompatibilidad entre la especie de vector y el virus; por ejemplo en Canadá se vio que *Thrips tabaci* es incapaz de transmitir TSWV (Paliwal, 1976).

Sólo las larvas de los trips pueden adquirir los *Tospovirus*, mientras que tanto las larvas como los adultos los pueden transmitir de un modo persistente (Amin *et al.*, 1981; Paliwal, 1974 y 1976; Pittman, 1927; Reddy *et al.*, 1988; Sakimura, 1940; 1962a y b; 1963; 1969). El ciclo de infección comienza cuando el trip adulto hembra coloca los huevos sobre las hojas de plantas infectadas por *Tospovirus*. En el estadio de larva, éstas se alimentan de la planta infectada, y así comienza el ciclo propiamente dicho. Se ha comprobado que en un período de alimentación de 15 a 30 minutos, la larva puede adquirir el virus y la eficiencia de transmisión se incrementa conforme aumenta el tiempo de alimentación (Razvyazkina, 1953; Sakimura, 1962b; 1963). Una vez que las larvas adquieren los virus, los mismos persisten a través de los pasajes transestadiales hasta el adulto (Sakimura, 1962b).

Se ha comprobado que los *Tospovirus* replican dentro de las glándulas salivales y de la musculatura del intestino medio del vector (Wijkamp *et al.*, 1993). A estos resultados se arribó por estudios de microscopía electrónica y por determinación serológica de proteínas virales, en particular detección de NS₅ e incremento de niveles de proteína N. El hecho de replicar dentro del vector constituye otra similitud con el resto de los *Bunyaviridae* (Beaty y Calisher, 1991).

Los trips son insectos con aparato bucal raspador-chupador que se alimentan del citoplasma de las células de la planta (Childers y Achor, 1991) adquiriendo, de este modo, los virus que están en él. En la larva se han observado virus en las células epiteliales del intestino medio, membrana de cuerpos grasos, cerebro, células nerviosas y hemocele (Ullman *et al.*, 1991; 1992b). Esto sugiere que la internalización del virus ocurre a través de las células epiteliales del intestino medio del vector (Ullman *et al.*, 1992a y b). Aparentemente, la adquisición del virus por medio de las células epiteliales del intestino medio ocurre por medio de endocitosis mediada por receptores, dada la similitud mostrada por las vesículas de transporte con las del Virus 40 de simios (Ullman *et al.*, 1992a), pero faltan datos concluyentes. Es importante mencionar que la presencia de la envoltura lipoproteica parece ser esencial para la transmisión exitosa por parte de trips ya que se ha encontrado que un aislamiento defectivo morfológico (sin envoltura) no puede transmitirse por el

vector (Wijkamp, comunicación personal). Este hecho sugiere un rol importante de las proteínas G1 y/o G2 en la interacción virus-vector. Por otra parte y como se mencionó en la sección 1.1, la estructura primaria de esas proteínas contiene una secuencia de unión celular (RGD) en el extremo N-terminal de la G2 (Kormelink *et al.*, 1992c) que podría estar involucrada en el reconocimiento de un receptor del intestino medio del vector (Resende, 1993). En el adulto, se han observado partículas virales sólo en las células epiteliales del intestino medio y la cantidad de las mismas disminuye a medida que pasa el tiempo, sugiriendo que esas células actúan como barrera para la adquisición del virus (Cho *et al.*, 1991). Se ha visto (Wijkamp *et al.*, 1993), que desde las glándulas salivales se liberan los virus a los ductos, junto con la saliva, por medio de vesículas secretorias. Esto sugiere un papel fundamental del aparato de Golgi en la multiplicación del virus.

1.5. Citopatología

Se ha demostrado que las partículas virales se acumulan en las cisternas del retículo endoplásmico de las células de plantas infectadas (Kitajima, 1965; Francki y Grivell, 1970; Milne, 1970; Ie, 1971). Por otra parte, en el citoplasma de las células infectadas, se han encontrado acumulaciones de material amorfo (viroplasma) en las cuales están embebidos agregados de material más denso con una periodicidad de 5nm (Ie, 1982; Verkleij y Peters, 1983; De Avila *et al.*, 1991). Este material está constituido por nucleocápside no envuelta y, en algunos casos, el agregado de proteína NS_M (Kormelink *et al.*, 1994). El hecho de hallar virus no envuelto puede deberse a un desbalance entre la producción de glicoproteínas y de proteína N, a la síntesis de glicoproteínas defectuosas o a la ausencia de glicoproteínas debido a mutaciones o deleciones en el ARN M (Verkleij y Peters, 1983; Resende *et al.*, 1991). Se han encontrado, además, agregados de apariencia fibrosa (Francki *et al.*, 1985; Law y Moyer, 1990) que corresponden a acumulaciones de proteína NS_G (Kitajima *et al.*, 1992). Se desconoce la función de esa proteína y el significado de esa acumulación. En algunos aislamientos, sólo se han encontrado masas densas y ninguna partícula viral intacta en el tejido infectado (Ie, 1982). A esos aislamientos se los conoce como defectivos morfológicos (Resende *et al.*, 1991).

Los *Tospovirus* parecen ser capaces de invadir todos los órganos vegetativos y tejidos de las plantas a los cuales infecta sistémicamente, incluyendo células

mitóticas (Francki y Grivell, 1970). Con respecto a la transmisión a través de la semilla, no existen reportes confirmados de que ésta ocurra.

1.6. Movimiento célula a célula

Con respecto al pasaje del virus entre células contiguas, se ha detectado que existe una proteína no estructural (NS_M) que podría cumplir esa función en la dispersión del virus en la planta (Kormelink *et al.*, 1994). El hecho de haber encontrado a esa proteína relacionada con los agregados densos de material de nucleocápside y en asociación con los plasmodesmos, sugiere que éstos son atravesados por nucleocápside y no por partículas virales maduras. Dicha especulación se ha visto reforzada por el hecho de que los aislamientos defectivos morfológicos (nucleocápside sin envoltura) pueden expandirse a través de la planta (Ie, 1982; Verkleij y Peters, 1983; Resende *et al.*, 1991). Asimismo, el hecho de no hallar partículas virales maduras en los plasmodesmos, pese a que los desmotúbulos están conectados por medio de cisternas del retículo endoplásmico de células contiguas (Kitajima *et al.*, 1992) habla en favor de esta hipótesis. Dadas estas evidencias, es importante mencionar que el hecho de hallar ocasionalmente partículas maduras en los tubos cribosos, y más comúnmente en el xilema, no sería relevante para la dispersión del virus a través de la planta ya que no habría manera de dejar el sistema vascular de la misma (Kitajima *et al.*, 1992).

1.7. Morfogénesis de la partícula viral

El modo preciso de cómo los *Tospovirus* adquieren la membrana permanece aún desconocido. Uno de los principales problemas es la dificultad para hallar estructuras que puedan interpretarse como partículas en maduración. Se supone que este hecho se debe a que el proceso de envoltura es muy breve (Francki *et al.*, 1985). A pesar de esto, en algunos estudios (Kitajima *et al.*, 1992) se han visto estructuras que podrían cumplir alguna función en el proceso de maduración.

Actualmente se proponen tres rutas de maduración que ocurren, básicamente, en el retículo endoplásmico y en vesículas del aparato de Golgi de la célula vegetal y se excluye la formación *de novo* de las envolturas virales como había sido

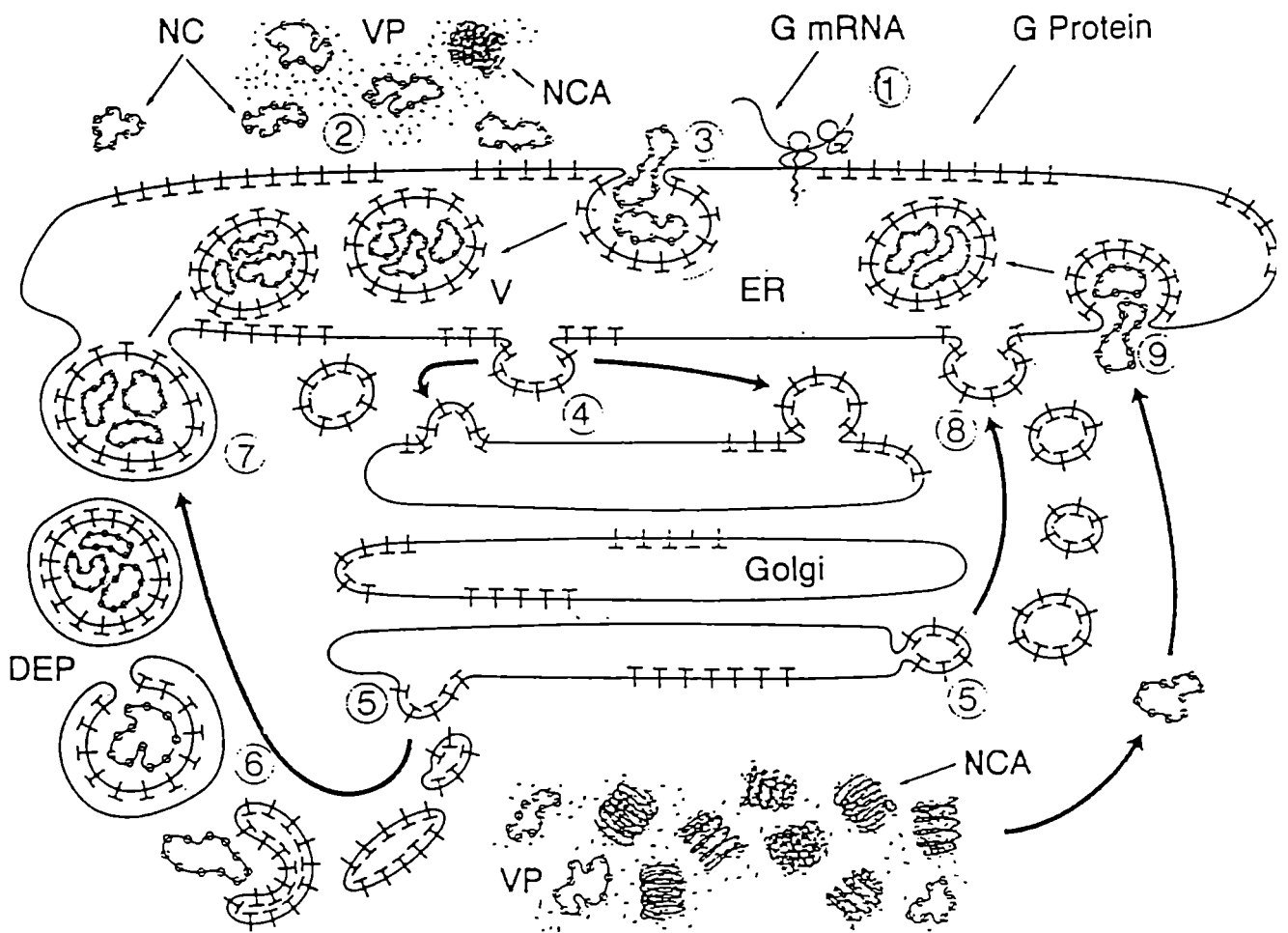
propuesto por Ie (1971). En la primera ruta propuesta (Figura 2, paso 1-4), las nucleocápsides, formadas por la condensación en el citosol de los ARNs virales y la proteína N, brotan a través de la membrana del retículo endoplásmico. Dicha membrana, tachonada de glicoproteínas, envuelve las nucleocápsides. Alternativamente, las glicoproteínas pueden migrar hacia el complejo de Golgi obteniendo de este modo cambios adicionales en los polisacáridos antes de envolver a las nucleocápsides. En la segunda ruta propuesta (Figura 2, pasos 5-7), la envoltura se logra a partir de vesículas derivadas del aparato de Golgi que envuelven a las nucleocápsides, dando un aspecto de partícula con doble envoltura. Eventualmente, esas vesículas pueden fusionarse entre ellas o con la membrana del retículo endoplásmico produciendo grandes cavidades con muchas partículas. Finalmente, en la tercera ruta (Figura 2, pasos 8-9), las glicoproteínas pueden ser reinsertadas en la membrana del retículo endoplásmico, luego de la maduración de las glicoproteínas en el complejo de Golgi. La formación de la partícula en esta ruta ocurriría en las membranas del retículo endoplásmico.

Existen algunas evidencias, a partir de estudios de microscopía electrónica, que indicarían que la segunda ruta es una de las más probables (Kitajima *et al.*, 1992).

1.8. Clasificación de los *Bunyaviridae*

La familia *Bunyaviridae* incluye seis géneros, *Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Uukuvirus* y *Tospovirus* (para una revisión ver Bishop, 1990; Elliot, 1990; Gonzales-Scarano y Nathanson, 1990; Schmaljohn y Patterson, 1990). La mayoría de los miembros de la familia son transmitidos por artrópodos de un modo persistente y no letal y se replican en el vector. Estos virus se ubican en una sola familia en base a sus similitudes morfológicas, genómicas y a las estrategias de replicación. Como los *Tospovirus*, los otros miembros de la familia poseen partículas virales esféricas de alrededor de 80 a 120nm de diámetro, con una envoltura lipídica tachonada por espículas de glicoproteínas que rodea a la nucleocápside. La nucleocápside, a su vez, está formada por ARN y proteína N. Todos los miembros de la familia presentan un genoma tripartito, con el fragmento grande (L) que codifica para la polimerasa, el mediano (M) que contiene la información para las dos proteínas de la envoltura (G1 y G2) y el fragmento pequeño (S) que codifica la proteína N. Poseen, además, un número variable de

Figura 2: Posibles rutas de morfogénesis de TSWV. NC: nucleocápside; NCA: agregado de nucleocápside; V: partículas virales; VP: viroplasma; ER: retículo endoplásmico; DEP: partículas con envoltura doble. (Tomado de Kitajima *et al.*, 1992).



proteínas no estructurales. Los miembros de cada género comparten una secuencia consenso de 8 nucleótidos que se encuentra en los extremos de cada fragmento de ARN genómico. Esas secuencias, en la mayoría de los casos, son género-específicas y ayudan a diferenciarlos. Una excepción la constituyen los *Phlebovirus* y los *Uukavirus* que tienen la misma secuencia terminal. Actualmente, este último ha sido fusionado con el primero y clasificado como *Phlebovirus* (Calisher, 1991).

Los *Tospovirus*, son más parecidos a los *Phlebovirus* en cuanto a que tienen una estrategia de replicación del ARN S *ambisense*. En contraste a lo que ocurre con el resto de los *Bunyaviridae*, el ARN M de los *Tospovirus* es también *ambisense*. Excepto los *Tospovirus*, que infectan células vegetales, el resto de los *Bunyaviridae* infectan células animales.

1.9. Clasificación de los *Tospovirus*

Los primeros intentos para clasificar los aislamientos de TSWV se basaron en estudios de sintomatología sobre hospedantes diferenciales (Norris, 1946). Mediante estos estudios, cinco cepas distintas se ubicaron en tres grupos. Posteriormente, Best y Gallus (1953) distinguieron seis cepas por expresión de síntomas sobre tres hospedantes indicadores. Estos estudios no se continuaron debido a la falta de descripciones de cepas apropiadas y a la carencia de un propósito claro para clasificar a TSWV en términos de cepas y/o especies. Por lo tanto y como se mencionó en la sección 1.1, hasta principios de la década del 90 en que se creó el género *Tospovirus*, se creyó que el grupo estaba formado sólo por la especie TSWV (Ie, 1970; Matthews, 1982; Francki *et al.*, 1991). En 1990, Law y Moyer describieron por primera vez un aislamiento (TSWV-I) serológicamente distinto de los TSWV descriptos. Ese aislamiento prevalecía en cultivos florales pero no infectaba cucurbitáceas. Posteriormente, De Avila *et al.* (1992) confirmaron esos resultados mediante el estudio de un aislamiento holandés similar (NL-07) y propusieron el nombre de *Impatiens necrotic spot virus* con el que se lo conoce ahora. La ocurrencia de INSV está restringida hasta ahora a Norteamérica, Europa oriental y países del Mediterráneo (De Haan *et al.*, 1992a). Actualmente se conoce la secuencia de nucleótidos de los ARN S y M de esa especie (De Haan *et al.*, 1992a; Law *et al.*, 1991; 1992). Por otra parte, De Avila *et al.* (1990) mediante estudios con anticuerpos poli y monoclonales contra las

proteínas N, G1 y G2, y utilizando diferentes ensayos de ELISA en 20 aislamientos de *Tospovirus*, lograron separarlos en dos serogrupos (anticuerpos policlonales) y tres serotipos (anticuerpos monoclonales). También se pudo detectar que la proteína N es más variable que las proteínas G1 y G2. Pese a que, en estudios anteriores (Wang y Gonsalves, 1990) y por aplicación de técnicas similares sobre otros 20 aislamientos se habían detectado diferencias, los mismos no habían sido agrupados en serogrupos o serotipos. Posteriormente se confirmó la existencia de los grupos propuestos por De Avila *et al.* (1990) con el agregado de INSV (serogrupo III) y se analizó el nivel de relación existente entre ellos por serología y mediante hibridación de ácidos nucleicos (De Avila, 1992). Estos estudios dieron sustento suficiente para considerar a los serogrupos I (TSWV) y III (INSV) como especies distintas. Por otra parte, el serogrupo II mostró estar compuesto por dos serotipos y ser distinto de los otros dos, pero se desconocía si se trataba de una o dos especies. Mediante secuenciación del gen N de aislamientos correspondientes a los serogrupos I y II (De Avila *et al.*, 1993) y alineamiento de estas secuencias entre ellas y con la secuencia de INSV (De Haan *et al.*, 1992a) se pudo demostrar las diferencias existentes entre los distintos aislamientos. Dichos estudios sugirieron la existencia de, al menos, cuatro especies virales como constituyentes del género *Tospovirus*: *tomato spotted wilt virus* (TSWV) (serogrupo I, serotipo I), *tomato chlorotic spot virus* (TCSV) (serogrupo II, serotipo II), *groundnut ringspot virus* (GRSV) (Serogrupo II, serotipo III) e *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (serogrupo III).

Se han encontrado otros aislamientos similares a TSWV, pero con algunas diferencias, (Chanekar *et al.*, 1979; Reddy *et al.*, 1991; 1992; Kameya-Iwaki *et al.*, 1988) pero aún no se ha establecido la relación con las especies antes mencionadas.

La elección de la proteína N como criterio taxonómico se basa en el rol preponderante que cumple dicha proteína en el ciclo viral. Es la encargada de regular la transición de la maquinaria replicativa de transcripción a replicación, cumple funciones en el complejo de replicación y encapsida los ARNs genómicos y antigenómicos (Beaton y Krug, 1984; 1986).

1.10. Métodos de detección y diagnóstico

Pese a que la expresión de síntomas a campo es variable, los *Tospovirus* tienen algunas características biológicas que son útiles para el diagnóstico.

Los *Tospovirus* son transmisibles mecánicamente o mediante savia (*sap-transmissible*) frotando suavemente las hojas de las plantas con inóculos preparados por maceración de material de planta infectada en buffer de inoculación. Con el empleo de varias plantas indicadoras es posible obtener síntomas típicos (Brown *et al.*, 1991; Ie, 1970). Plantas tales como *Nicotiana glutinosa* L., *Chenopodium quinoa* Wild. y *Petunia hybrida* Vilm. dan lesiones características que se expanden para formar manchas o zonas concéntricas que, en muchos casos, se convierten en necrosis letal (German, *et al.*, 1992). *Petunia hybrida* Vilm. es una de las más útiles debido a la rapidez de desarrollo de los síntomas ya que, en condiciones favorables, aparecen entre los 2 y 4 días (Francki y Hatta, 1981). En algunos casos, distintos aislamientos de *Tospovirus* se pueden discriminar mediante diferencias en la expresión de síntomas sobre la misma serie de plantas indicadoras (ensayo de huéspedes diferenciales). De cualquier manera, cada laboratorio tiene sus preferencias en cuanto a las especies a usar en ensayos de esa naturaleza.

Los *Tospovirus* son los únicos virus de plantas de forma esférica y con envoltura conocidos hasta ahora. Esta característica hace que se los identifique fácilmente mediante microscopio electrónico, ya sea en preparaciones de *leaf-dip* como en secciones ultrafinas de plantas infectadas (Black *et al.*, 1963; Brown *et al.*, 1991; Ie, 1971; Kitajima *et al.*, 1965; Milne, 1970; Peters *et al.*, 1991, Kitajima *et al.*, 1992). Es importante destacar que, estudios de microscopía electrónica practicados en más de 30 aislamientos de *Tospovirus* resultaron insuficientes para identificar un aislamiento dado, ya sea por la forma de acumulación de las partículas o por la forma y cantidad de inclusiones intracelulares inducidas (Kitajima *et al.*, 1992). Todo esto señala la falta de poder resolutivo de las técnicas antes mencionadas, ya que si bien son útiles para distinguir a estos virus de otros virus de plantas no alcanzan para diferenciar aislamientos. Sólo aquellos aislamientos que son defectivos morfológicos pueden ser identificados sin duda por la ausencia de partículas virales enteras (Kitajima *et al.*, 1992).

La propiedad de los *Tospovirus* de ser transmitidos por trips no se ha utilizado rutinariamente para la identificación debido a las dificultades en el manejo de esos insectos y a los complicados métodos de cría (De Avila, 1992).

Otro parámetro utilizado para el diagnóstico es el de la estabilidad viral en extractos de savia mediante registros de tiempo de inactivación térmica (TIP), longevidad in vitro (LIV) y punto final de dilución (DEP). Debido a la variabilidad encontrada en la bibliografía estos estudios carecen de validez. Sin embargo, dada

la inusual inestabilidad de los *Tospovirus*, los parámetros antes mencionados pueden resultar de utilidad para distinguirlos de otros virus de plantas (Francki y Hatta, 1981). La capacidad del sulfito de sodio a concentración de 10mM de prolongar significativamente la vida de los *Tospovirus* en la savia (Best, 1968; Ie, 1970), puede emplearse como un criterio adicional para diferenciarlos de otros virus de plantas.

El primer punto de inflexión en el diagnóstico y detección de *Tospovirus* aparece con la producción de antisueros policlonales de alta calidad y con la aplicación de la técnica de ELISA por Gonsalves y Trujillo (1986). Este método es generalmente el de elección para el diagnóstico y detección en plantas y trips (Cho *et al.*, 1988 y 1989; Gonsalves y Trujillo, 1986). La detección de *Tospovirus* utilizando ELISA con anticuerpos mono y policlonales (Sherwood *et al.*, 1989; De Avila *et al.*, 1990; Huguenot *et al.*, 1990; Law y Moyer, 1990; Wang y Gonsalves, 1990); Resende *et al.*, 1991) sugirió la presencia de al menos tres serogrupos (utilizando un panel de anticuerpos monoclonales específicos para la proteína N) y cuatro serotipos (utilizando un panel de anticuerpos monoclonales para las glicoproteínas) (De Avila *et al.*, 1990; Wang y Gonsalves, 1990). Si bien estas técnicas son las más difundidas suele haber resultados ambiguos debido a la aparición de aislamientos defectivos a causa de subsecuentes transferencias mecánicas del virus.

Además de las técnicas mencionadas, la detección de los ácidos nucleicos virales resulta de utilidad. Estas técnicas son más sensibles y permiten hacer un diagnóstico más preciso. Una de ellas utiliza transcritos de ARN sintéticos como sondas (*riboprobes*) y otra, sondas de ADN complementarios (ADNc) sintetizadas a partir de los ARN virales (Ronco *et al.*, 1989; Huguenot *et al.*, 1990; Rice *et al.*, 1990). A pesar de las virtudes de esta metodología, el alto costo, el requerimiento de equipamiento especializado y el uso de radioisótopos restringen demasiado su utilización.

Otro punto de inflexión en la detección y diagnóstico de *Tospovirus* surgió recientemente con el desarrollo y aplicación de la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988; Mumford *et al.*, 1994). Cuando esta técnica se aplica a la amplificación de fragmentos de ARN se denomina RT-PCR e involucra la síntesis enzimática de ADNc a partir del ARN viral con transcriptasa reversa, seguida de la amplificación del producto resultante utilizando *Taq* polimerasa, en presencia de oligonucleótidos específicos como *primers*. Esta

técnica permitió recientemente la identificación de 8 aislamientos británicos como correspondientes al género *Tospovirus* (Mumford *et al.*, 1994). Para ello se utilizaron *primers* que permitían amplificar una región conservada correspondiente al ORF del ARN L. La amplificación de regiones muy conservadas del ARN L es muy útil para una identificación genérica de los aislamientos, pero hace difícil el diagnóstico de especies. Por otra parte es importante resaltar que existe un alto grado de similitud en la región codificante de las ARN polimerasas tanto de los virus con ARN negativo como con ARN positivo (Poch *et al.*, 1989; De Haan *et al.*, 1991). Esto podría significar un problema ya que podrían obtenerse falsos positivos. Desde el punto de vista de la detección e identificación de especies de *Tospovirus* se hace necesario conocer en profundidad la diversidad genómica del grupo con el fin de diseñar estrategias universales.

1.11. Aislamientos defectivos

En los *Tospovirus* pueden encontrarse dos tipos de aislamientos defectivos que surgen luego de sucesivas inoculaciones mecánicas. Los defectivos morfológicos que se observan al microscopio electrónico como masas amorfas acumuladas en el citoplasma de las células infectadas y ausencia simultánea de partículas virales, como se mencionó en la sección 1.5.. Verkleij y Peters (1983) estudiaron esos aislamientos defectivos morfológicos y detectaron, en células infectadas, proteína N pero no glicoproteínas de membrana. Las masas densas mencionadas representan agregados de nucleocápside viral que no están envueltas en partículas virales maduras. Se concluyó que las envolturas virales no pueden formarse debido a la incapacidad del virus para producir las glicoproteínas de membrana. Esos resultados sugirieron que la pérdida de síntesis de glicoproteínas por los aislamientos defectivos está causada por grandes deleciones (Verkleij y Peters, 1983), mutaciones puntuales o pequeñas deleciones del ARN M (Resende, 1993).

Esos aislamientos defectivos morfológicos de *Tospovirus*, no deben confundirse con el otro tipo de aislamientos defectivos, que son los defectivos interferentes [*defective interfering* (DI)]. Las partículas DI típicas, se originan principalmente a partir de segmentos defectuosos de ARN que codifican para la polimerasa viral y surgen a partir del genoma viral normal. Poseen un genoma anormal (defectivo) y por lo tanto necesitan funciones de ayuda (*helper*), aportadas por las partículas

virales intactas, para poder propagarse. De este modo interfieren en la replicación del virus normal, atenuando los síntomas (Huang y Baltimore, 1970). Los defectivos morfológicos, a diferencia de éstos, son capaces de replicar autónomamente en los tejidos de vegetales sin la ayuda de un virus *helper*, pese a no contener todas las proteínas virales estructurales. Sin embargo poseen una de las propiedades características de las partículas DI como es la capacidad de incrementar en número a expensas de las partículas virales intactas.

Resende (1993), utilizando como material de partida aislamientos de *Tospovirus* normales, obtuvo mutantes defectivos que, luego de sucesivas inoculaciones mecánicas, habían acumulado formas delecionadas del ARN L que podrían representar partículas DI. Esa interpretación surge debido a que esas formas más cortas replican más rápidamente que los ARNs de longitud completa, y su aparición estuvo siempre asociada a la atenuación de los síntomas en las plantas hospedantes. Este fenómeno es bien conocido para los virus de animales (Cave *et al.*, 1985) pero se ha descrito para unos pocos virus de vegetales (Morris y Knorr, 1990). Mediante caracterización de DIs de cuatro aislamientos se ha observado que las deleciones del ARN L abarcan aproximadamente entre el 60 y el 80% del tamaño normal, reteniendo los extremos del mismo. La presencia de ambos extremos de la molécula sugiere que esas regiones contienen las señales necesarias para la replicación del genoma. Por otra parte, esas moléculas defectivas pueden ser encapsidadas e incorporadas dentro de partículas envueltas (Resende, 1993).

Debido a que los ARNs DI de *Tospovirus* pueden generarse en cualquier sistema de hospedantes que permita el crecimiento del virus normal, es probable que también surjan en infecciones naturales. La presencia de tales moléculas en partículas envueltas, indicaría que pueden ser potencialmente transmitidas por trips y de ese modo sobrevivir en la naturaleza (Resende, 1993).

1.12. Estrategias de control de *Tospovirus*

El control de la enfermedad producida por *Tospovirus* es muy difícil. Existen varias estrategias para intentar disminuir las infecciones de plantas ya sea mediante control del vector, empleo de cultivares con resistencia o tolerancia genética natural u obtención de plantas transgénicas resistentes.

Los intentos para controlar los vectores de los *Tospovirus* con insecticidas han

tenido poco éxito pese a que en algunos casos produjeron una disminución de la incidencia de la enfermedad (Best, 1968; Cho *et al.*, 1989). Eso no es sorprendente ya que, fundamentalmente, la infección parece deberse a la migración de los trips virulentos desde reservorios ubicados fuera de los cultivos de interés (Francki y Hatta, 1981). La destrucción de tales reservorios si bien permitiría disminuir la cantidad de inóculo que penetra al cultivo, resulta difícil debido al amplio rango de huéspedes de los *Tospovirus* (sección 1.2) que incluye numerosas malezas. Además, entre los huéspedes figuran plantas perennes que probablemente cumplan una función importante en la supervivencia del virus de año a año. Sin embargo, es útil para el control de la enfermedad, controlar eficientemente a las malezas y evitar cultivar otras plantas huéspedes del virus en la proximidad de los cultivos susceptibles (Francki y Hatta, 1981). Por otra parte es necesario tener en cuenta que los trips adquieren rápidamente resistencia a los insecticidas. Por todo lo mencionado, el control de los vectores con insecticidas dista mucho de ser el método de elección.

La resistencia genética natural en tomate, se describió por primera vez en *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. por Samuel *et al.* (1930). Posteriormente, se halló resistencia en otras especies incluyendo *L. hirsutum* Humb. & Bonpl. y *L. peruvianum* (L.) Mill.. Smith (1944) demostró la resistencia en tomate a partir de un cruzamiento entre *L. esculentum* y *L. pimpinellifolium*. A partir de esta fuente, Kikuta y Frazier (1946) desarrollaron el cultivar Pearl Harbor. Desafortunadamente, esa resistencia resultó ser específica de cepas. En 1953, Finlay demostró la existencia de cinco genes, cada uno de los cuales controla la resistencia a cepas de TSWV diferentes. *L. peruvianum* fue sumamente resistente a las cinco cepas. En *L. esculentum*, cultivar "Stevens" (Van Zijl *et al.*, 1986) se observó resistencia a un amplio espectro de cepas de *Tospovirus* (Stevens *et al.*, 1992; Boiteux y Giordano, 1992). Boiteux y Giordano (1993), trabajando con un cultivar derivado del "Stevens" (CNPH Tx 405) encontraron que era resistente a aislamientos correspondientes a las especies TSWV y TCSV y que dicha resistencia se debía al gen dominante Sw-5. Luego, Boiteux *et al.* (1993a) hallaron también resistencia de esos cultivares a aislamientos de la especie GRSV. Por otra parte, en experiencias a campo con el linaje "TSW10", derivado del cultivar "Stevens", se encontró resistencia a aislamientos de las especies TSWV, TCSV y GRSV (Boiteux *et al.*, 1993b).

El uso de cepas débiles de *Tospovirus* para proteger a las plantas de tomate y de lechuga de la infección por cepas severas (protección cruzada) (Wang y Gonsalves, no publicado) no ha tenido éxito.

Otra estrategia para el control de los *Tospovirus* es la adquisición de resistencia mediante la introducción del gen que codifica para la proteína N viral. Los primeros trabajos al respecto, datan de 1991 (Gielen *et al.*, 1991). Se transformaron plantas de tabaco con el gen N del aislamiento BR-01 (especie TSWV) siendo éste el primer ejemplo de resistencia por ingeniería genética a un virus con genoma a ARN negativo. Se analizaron varias líneas transgénicas que expresaban dicho gen y se observó, inoculando mecánicamente el aislamiento homólogo, que en seis de las quince líneas existía una significativa resistencia (Gielen *et al.*, 1991). En esos momentos poco se sabía del posible mecanismo involucrado en esa protección. Posteriormente, De Haan *et al.* (1992b), trabajando también en plantas de tabaco transgénicas con el gen N del aislamiento BR-01 (TSWV), observaron que la expresión del gen N no era condición *sine qua non* para conferir protección a la planta ya que la acumulación de ARN no traducido de dicho gen produjo resultados homologables. Por otra parte, se observó que la cantidad de producto génico (ARNm y/o proteína) que se acumula en la planta transgénica determina el nivel de resistencia (efecto de dosis génica). Estas conclusiones se lograron luego de desafiar a las plantas transgénicas con el aislamiento homólogo [BR-01 (TSWV)], por inoculación mecánica y por medio de *Frankliniella occidentalis* (Perg.). Por otra parte encontraron que las plantas transgénicas que expresaban el gen no eran resistentes a la infección por los aislamientos SA-05 (GRSV) y BR-03 (TCSV). Estos experimentos sugirieron que el probable mecanismo de resistencia estaba dado por un bloqueo de la replicación viral debido a una interacción del ARN viral y el ARNm del gen N de la planta transgénica. Pese a que el aislamiento BR-01 comparte un 80% de identidad de secuencia de nucleótidos en dicho gen con los aislamientos BR-03 y SA-05, la protección es sumamente específica.

Casi simultáneamente, Pang *et al.* (1992), llegaron a conclusiones similares haciendo expresar el gen N en plantas de tabaco transgénicas con el gen N del aislamiento TSWV-BL (supuestamente correspondiente a la especie TSWV dado el elevado porcentaje de identidad de nucleótidos con el aislamiento BR-01). En dichos ensayos se encontró un alto grado de resistencia a aislamientos homólogos y aparentemente también resistencia a un aislamiento heterólogo (aislamiento TSWV-I, que corresponde a la especie INSV). Pang *et al.* (1993), ampliaron este

estudio construyendo además plantas transgénicas que sintetizaban ARN (que no puede traducirse) sentido (*sense*) y antisentido (*antisense*) del gen N del mismo aislamiento (TSWV-BL). Se observó que las plantas que sintetizaban tanto el ARN sentido como antisentido mostraban resistencia a los aislamientos homólogos (TSWV) pero no a los heterólogos (INSV y GRSV) como se había detectado con anterioridad (De Haan *et al.*, 1992b). Por otra parte, también se observó protección en plantas que producían bajos niveles de transcritos del gen N. Además, se encontró que las plantas transgénicas que sintetizan ARN de sentido viral poseen una mayor resistencia que las que sintetizan ARN antisentido. El ARN de sentido viral (polaridad positiva) de la planta transgénica se hibrida con el ARN genómico (polaridad negativa) del virus antes de la iniciación de la replicación y de esta manera la inhibe. El ARN antisentido (polaridad negativa) sólo puede hibridar con el ARN de cadena positiva que se replicó a partir del ARN genómico viral y por lo tanto la replicación ya se ha iniciado. Pang *et al.* (1993) sugieren la presencia de un doble mecanismo de protección. En el caso de protección contra aislamientos homólogos, el ARN no traducido sería el que produce la protección debido a una inhibición de la replicación por hibridación ARN-ARN. Por lo tanto es necesaria una elevada identidad de nucleótidos del gen N (más del 90%) para que esta hibridación ocurra. En el caso de protección contra aislamientos heterólogos la identidad de nucleótidos es mucho menor y la resistencia estaría conferida por la proteína N y no por el ARN transcrito. En este caso se produciría una heteroencapsidación que resultaría en partículas virales que pierden alguna propiedad biológica importante. Aparentemente, la diferencia de similitud de aminoácidos, debe ser bastante elevada para que eso ocurra. Recientemente, se han obtenido plantas de tomate transgénicas resistentes a *Tospovirus* (Kim *et al.*, 1994).

Alternativamente, se ha logrado protección en plantas de tabaco transgénicas transformadas con partículas DI correspondientes al ARN L (Resende, 1993). Debido a que el tipo de protección obtenida es de inmunidad más que de tolerancia, dicho autor ha propuesto que la protección está basada en inhibición antisentido del ARN y no en la capacidad de los transcritos DI de co-replicar con el virus infectante.

1.13. Inferencias evolutivas

En las últimas dos décadas, biólogos de diferentes disciplinas se han volcado hacia los análisis filogenéticos para interpretar la variación existente en los sistemas biológicos (Brooks y McLennan, 1991). Actualmente, esos análisis se aplican ampliamente en investigaciones biomédicas, en investigaciones moleculares de organización genómica y de estructura génica, en el estudio sobre el origen de nuevos alelos y de cepas de laboratorio, en estudios comparativos de ecología y etología, en investigaciones sobre procesos fisiológicos y en todos los campos en los cuales se realizan comparaciones biológicas entre organismos (ver Hillis *et al.*, 1994).

Tres cuestiones han sido de vital importancia en el éxito y la difusión de los análisis filogenéticos: A) el desarrollo de criterios objetivos y algoritmos para discriminar entre las probables filogenias, B) el incremento del poder de la computación para implementar algoritmos filogenéticos y C) un rápido aumento de los datos disponibles para inferir filogenias, especialmente moleculares (Hillis y Moritz, 1990). Por otra parte, y a partir fundamentalmente de la utilización de datos moleculares, se comenzó a obtener información filogenética de un grupo creciente de organismos que permite a su vez, perfeccionar los métodos de reconstrucción filogenética incrementando de ese modo el poder predictivo de tales métodos.

La virología no es ajena a esta especie de revolución. Aproximadamente desde principios de la década del 90 existe en la bibliografía un número cada vez más importante de trabajos que mediante la utilización de datos moleculares intentan reconstruir la historia evolutiva de grupos virales que infectan plantas o animales (Griffin y Bournsnel, 1990; Kooning, 1991; Gorman *et al.*, 1991; Nerome *et al.*, 1991; Saksena *et al.*, 1993). La familia *Bunyaviridae* no es una excepción. Recientemente (Xiao *et al.*, 1994) se realizó el análisis filogenético de aislamientos virales en el género *Hantavirus* utilizando una metodología similar a la empleada en esta tesis.

En lo referente al género *Tospovirus*, pese a que cuatro especies fueron propuestas, dicho análisis se realizó sólo mediante el alineamiento de las secuencias del gen N y la reconstrucción del árbol filogenético se basó en la agrupación de taxa basadas en similitudes globales de datos de identidad de ARN y similitud e identidad de aminoácidos (De Avila *et al.*, 1993). Como se discutirá más adelante, los métodos que utilizan similitudes globales para la agrupación de taxa, ignoran que

no siempre esas similitudes representan las relaciones evolutivas existentes en un grupo determinado. Por lo tanto, el agrupamiento de especies basado en relaciones evolutivas propuesto por De Avila *et al.* (1993) debe ser analizado mediante otro tipo de metodología que demuestre que el agrupamiento de taxa se corresponde con las relaciones filogenéticas o cladísticas.

Uno de los objetivos de esta tesis es el análisis filogenético de los *Tospovirus* utilizando la metodología propuesta por la sistemática filogenética o cladismo cuyos conceptos teóricos, se discutirán más adelante. Mediante dicha metodología se plantearán hipótesis clasificatorias que pueden ser contrastadas objetivamente y comparadas con las propuestas por De Avila *et al.* (1993).

1.13.1. Sistemática filogenética

El método de reconstrucción filogenética más difundido es el **cladismo o sistemática filogenética** (Hennig, 1966; Nelson y Platnick, 1981; Wiley, 1981). Se trata de una escuela sistemática que estudia los patrones de relaciones genealógicas entre poblaciones, especies o taxa mayores y las refleja en sus clasificaciones. La detección de patrones genealógicos no depende de suposiciones específicas acerca de los procesos evolutivos. Esta escuela sistemática fue formulada por primera vez como una metodología comprensible por Hennig (1950) y es el paradigma actual de la sistemática. El cladismo se basa en tres axiomas: 1) la naturaleza se ordena jerárquicamente de acuerdo con un patrón específico, que puede ser descubierto y representado mediante un diagrama jerárquico ramificado (cladograma); 2) este patrón se estima tomando muestras de caracteres y hallando conjuntos replicados de novedades evolutivas compartidas (sinapomorfías) expresadas de la manera más económica; 3) todo conocimiento acerca de la historia evolutiva y de la clasificación debe derivarse de este patrón.

El cladismo centra su atención en el conocimiento acerca de los grupos monofiléticos. Estos grupos están sustentados por caracteres derivados en común (sinapomorfías) y comprenden una especie ancestral y todas sus especies descendientes. La importancia de las sinapomorfías es que es la única evidencia de un ancestro común.

Para los cladistas, la naturaleza tiene una estructura jerárquica que consiste de grupos monofiléticos ordenados de mayor o menor grado de inclusión. El cladismo

sostiene que los grupos monofiléticos son los únicos que pueden reconocerse en la clasificación y que la clasificación linneana debe ser formulada de acuerdo a lo que propone el cladismo. Esta escuela, muestra gráficamente los linajes monofiléticos (clados) y sus relaciones, mediante diagramas ramificados llamados cladogramas o árboles filogenéticos (Wheeler y Blackwell, 1984). Los componentes de un árbol filogenético tienen una variedad de nombres. Los taxa en estudio corresponden a nodos terminales, también llamados puntas, hojas o nodos externos. Los puntos de ramificación dentro de un árbol se llaman nodos internos. Las ramas que conectan pares de nodos se llaman segmentos o puentes.

Los algoritmos matemáticos propuestos por el cladismo para elegir entre hipótesis rivales, se basan en el principio de simplicidad de caracteres o "*parsimony*" (Farris, 1970; Crisci, 1982). Ese principio es una prescripción metodológica que supone que los cambios evolutivos se realizan de la manera más económica posible, desde el punto de vista de los sucesos genéticos requeridos.

Dentro del lenguaje cladista existen términos que es preciso definir.

- apomorfía:** carácter derivado.
- autapomorfía:** carácter derivado poseído por un solo taxón.
- plesiomorfía:** carácter primitivo.
- simplesiomorfía:** carácter primitivo compartido.
- grupo parafilético:** incluye una especie ancestral y alguno pero no todos sus descendientes. Grupo basado en simplesiomorfías.
- grupo polifilético:** grupos basados en caracteres convergentes; incluye taxa que no comparten entre ellos el ancestro común más reciente.
- carácter:** es el atributo en estudio.
- estado de un carácter:** son las formas alternativas de un atributo.

Para distinguir entre caracteres apomorfos o plesiomorfos (determinación de la polaridad de los caracteres) existen varios criterios siendo dos los más difundidos. Uno es el ontogenético (Løvtrup, 1974, 1978; Nelson, 1978; Patterson, 1982) que toma como caracteres plesiomorfos a aquéllos que se encuentran en estadios ontogenéticos tempranos. Es importante mencionar que este criterio a veces puede resultar impreciso ya que, en casos de organismos neoténicos, las características del adulto adquiridas en estadios tempranos del desarrollo no pueden tomarse como plesiomorfías. Este criterio no es el más difundido debido a que en el caso de algunos taxa poco se sabe del desarrollo ontogenético. Probablemente sea el mejor criterio, pero para ello sería necesario profundizar y

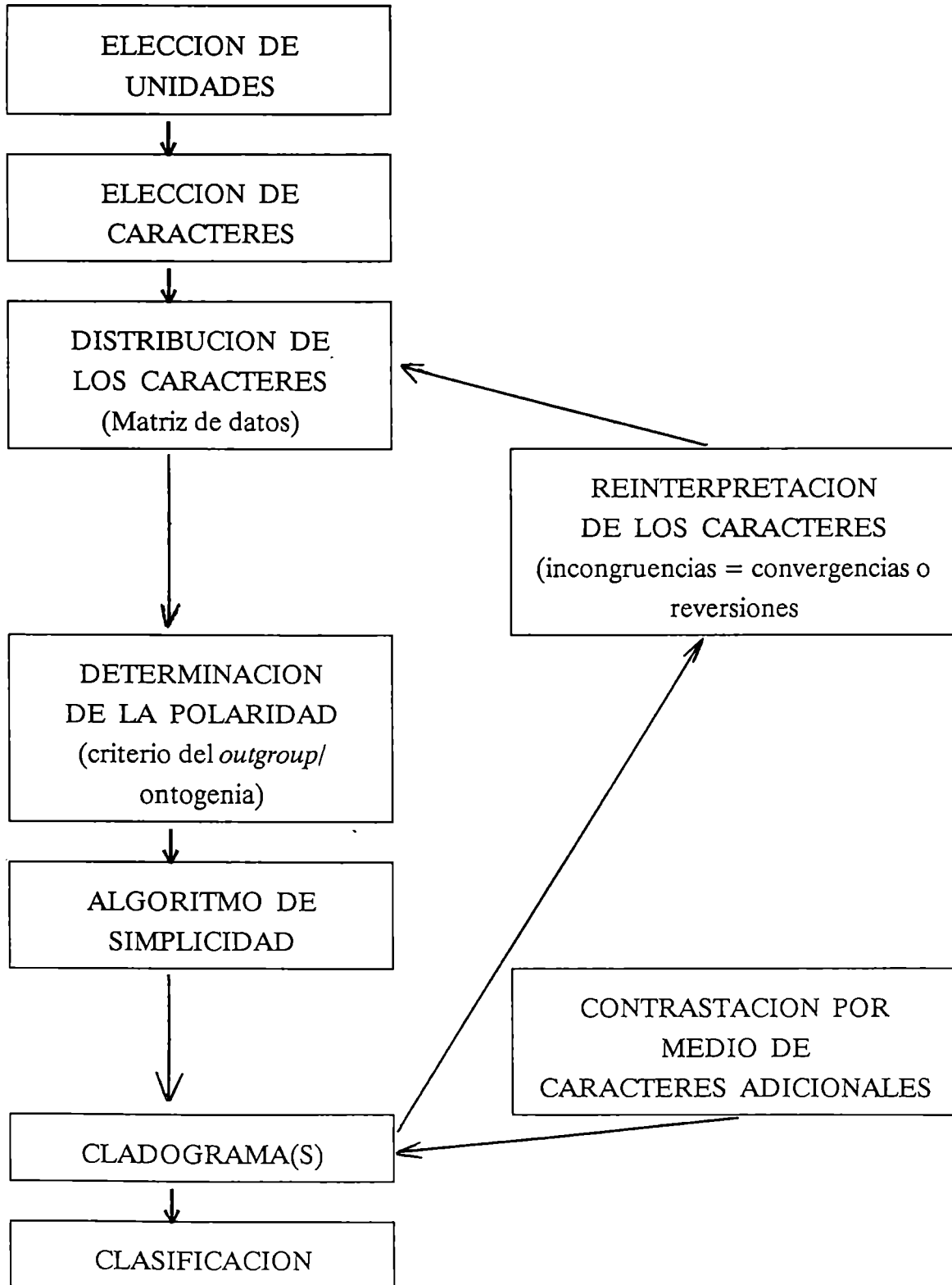
ampliar los estudios a nivel embriológico. El otro criterio es el del grupo externo o *outgroup* (Hennig, 1966; Wiley, 1975; Watrous y Wheeler, 1981) en el cual se toman taxa (*outgroup*) cercanos al grupo en estudio (*ingroup*) y constituyen la base de comparación para determinar la polaridad de los caracteres. Así, los caracteres presentes en el *outgroup* y en el *ingroup* son los plesiomorfos y los presentes sólo en el *ingroup* los apomorfos. Los *outgroups* son seleccionados en base a supuestas relaciones con el *ingroup*. Es el criterio más difundido.

Casi todos los estudios cladísticos tienen en algún grado caracteres conflictivos. Esos caracteres son similitudes que parecen ser homólogas (falsas sinapomorfías). Simpson (1961) llamó a esas similitudes homoplasias y distinguió cinco clases: paralelismo, convergencia, analogía, mimetismo y chance de similitud. Patterson (1982) puso a los cuatro últimos bajo el nombre de convergencia y citó otro término (homeología) que se refiere a analogías sobre una base homóloga. Como señaló Patterson (1982) existen tres criterios para detectar una homología: a) similitud (isología); b) congruencia (con otras posibles estructuras homólogas) y c) conjunción (si dos estructuras están presentes en el mismo organismo al mismo tiempo, no son homólogos). Los caracteres homólogos cumplen con los tres requisitos. Las convergencias cumplen con el requisito de conjunción pero no con los otros dos y los paralelismos con el de conjunción y similitud pero no con el de congruencia. El requisito de congruencia es el más importante debido a que las únicas que cumplen con él son las homologías. La única manera de implementar la congruencia es a través del análisis cladístico. En este punto se redefinirá simplicidad (*parsimony*) del modo que lo hizo Farris (1983); la hipótesis genealógica más simple es aquella que minimiza los requerimientos de hipótesis *ad hoc* de homoplasias.

El enfoque epistemológico del cladismo es el método hipotético deductivo. De acuerdo con Popper (1968), las hipótesis científicas para poder ser desafiadas de modo crítico, deben ser potencialmente falsables. Una hipótesis se construye basándose en observaciones empíricas y los desafíos críticos se realizan en búsqueda de la falsación de la hipótesis. Ninguna prueba corroborativa demuestra que una hipótesis es correcta pero, una sola prueba en su contra sirve para descartarla. Las hipótesis que soportan cantidades crecientes de pruebas críticas son cada vez más confiables y se dicen estar altamente corroboradas pero no probadas.

Los componentes de un análisis cladístico se muestran esquemáticamente en forma de diagrama de flujo en la figura 3.

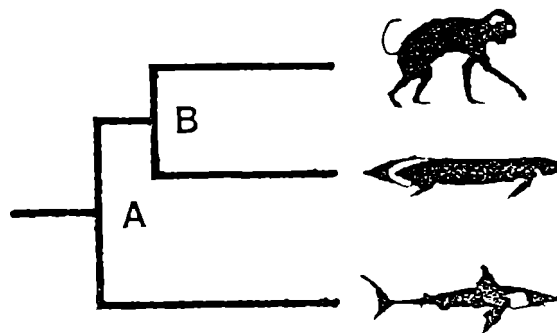
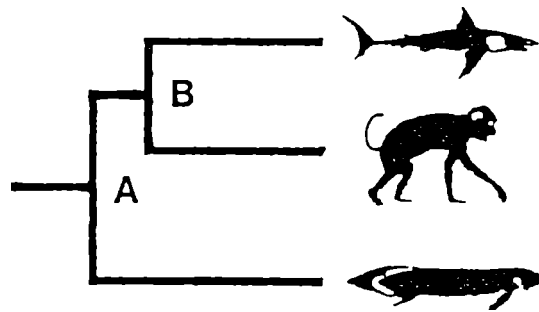
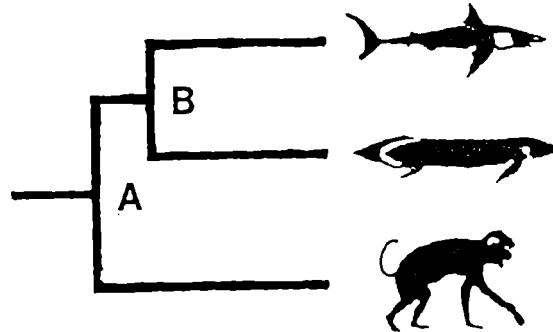
Figura 3: Componentes de un análisis cladístico en formato de diagrama de flujo.



Es importante mencionar en esta sección que dentro de la sistemática existen enfoques alternativos al cladismo como lo son la taxonomía intuitiva, el feneticismo y la sistemática evolutiva. La taxonomía intuitiva, es el clásico enfoque taxonómico de muchas ramas de la biología y está basada en la intuición del taxónomo sobre similitudes que generalmente no están separadas en primitivas o derivadas. Debido a que es intuitivo, las conclusiones generalmente tienen orígenes inexplicados y por lo tanto son difíciles de evaluar. Los estudios de taxonomía intuitiva no tienen efecto para estudios de patrones evolutivos. Otro enfoque es el del feneticismo (ver Sneath y Sokal, 1973; Crisci y López Armengol, 1983) que propone que las clasificaciones se realicen sobre la mayor cantidad posible de caracteres (de diferentes fuentes y de todo el ciclo vital del organismo). Las relaciones entre taxa se basan en las similitudes globales encontradas entre ellos, de manera que no tienen en cuenta grados de parentesco. Las herramientas metodológicas del feneticismo son las técnicas numéricas (Crisci y López Armengol, 1983). Las técnicas numéricas muchas veces han producido clasificaciones artificiales sobre la base de que los organismos más relacionados son los que comparten el mayor número de caracteres en común. Esos análisis no son los apropiados para construir clasificaciones naturales o para el estudio de relaciones evolutivas ya que no se basan sobre grupos monofiléticos (= grupos naturales). Otro enfoque clasificatorio es el de la sistemática evolutiva o evolucionismo (Mayr, 1969; 1982). Dicho enfoque supone que la mejor clasificación es la que expresa la genealogía de los taxa y otros factores como el grado de divergencia con respecto al antecesor. Resumidamente, combina la información cladística (ramificación) con el grado de divergencia. Los grupos formados serán tanto mono como parafiléticos.

Como se mencionó anteriormente, los métodos que tienen en cuenta las similitudes globales, ignoran que las relaciones evolutivas no siempre se corresponden con el agrupamiento obtenido basado sobre esas similitudes. Dos taxa pueden ser muy parecidos y no estar relacionados. Contrariamente, dos taxa relacionados pueden ser muy distintos entre ellos. Esta diferencia puede ser ilustrada por la relación genealógica entre los tetrapodos y los peces pulmonados (Figura 4).

Figura 4: Tres posibles árboles que relacionan los tiburones, los peces pulmonados y los tetrapodos. En el árbol 1, se ubican los tiburones y los peces pulmonados como más estrechamente relacionados; es decir que comparten un antecesor más reciente. En el árbol 2 son los tiburones y los tetrapodos los que están más relacionados y en el árbol 3, los tetrapodos y los peces pulmonados están más estrechamente relacionados. Se cree que el árbol 3 es el correcto.



1.13.2. Reconstrucción filogenética utilizando macromoléculas

En los análisis de reconstrucción filogenética utilizando macromoléculas los tipo de datos utilizados pueden ser **caracteres discretos y valores de similitud o distancia** entre taxa. Un carácter discreto provee datos acerca de una especie individual o secuencia. Los valores de similitud o distancia son una comparación cuantitativa entre dos especies o secuencias; describe una relación entre pares.

Los caracteres discretos son variables independientes cuyos posibles valores son colecciones de estados de carácter mutuamente excluyentes.

Los caracteres pueden estar expresados a través de datos **cualitativos**, en los cuales los posibles estados son dos o más valores **discretos o cuantitativos**, en los cuales los caracteres varían continuamente y son medidos en una escala de intervalos. Los caracteres cualitativos pueden ser subdivididos en **binarios** (dos estados posibles) y **multiestado** (tres o más estados posibles). Los caracteres binarios representan típicamente la presencia o ausencia de algún ítem tal como la secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción o un alelo particular en el locus de una isozima. Los caracteres multiestado, pueden ser **ordenados (= aditivos)** o **desordenados (= no aditivos)**, dependiendo de si se impone una relación ordenada de posibles estados. Por ejemplo, los datos de secuencias de nucleótidos se tratan generalmente como caracteres multiestado desordenados debido a que, *a priori*, no hay razón para asumir que el estado C es intermediario entre A y G. Los caracteres multiestado ordenados son raramente utilizados pero a veces se usan en análisis de datos de alozimas.

Los análisis filogenéticos utilizando macromoléculas pueden realizarse con tres tipos de datos de carácter: datos de secuencias tanto de ácidos nucleicos (ADN o ARN) como de proteínas, datos obtenidos mediante digestión con endonucleasas de restricción y datos de isozimas. En esta tesis sólo comentaremos los datos de secuencias y los de enzimas de restricción.

Datos de secuencias: dado un conjunto de secuencias, los caracteres están representados por sus posiciones correspondientes en la secuencia y los estados del carácter son los nucleótidos o aminoácidos observados en esas posiciones. Además de requerirse el uso de moléculas homólogas es necesario que los datos de secuencia tengan **homología posicional**.

Para el manejo de los datos de esta naturaleza es necesario primero realizar un **alineamiento** de secuencias mediante la inserción de espacios o *gaps*, que

corresponden a inserciones o deleciones dentro de una o más secuencias para poner aquellas posiciones que son homólogas en la misma columna de la matriz de datos. Este tipo de tareas se realizan mediante la aplicación de algoritmos de alineamiento computarizados.

Datos de endonucleasas de restricción: pueden obtenerse dos tipos de datos de esta naturaleza. En ambos casos se trabaja con un conjunto de datos binarios para cada taxon. Los caracteres son localizaciones de sitios de corte de enzimas de restricción sobre un mapa y los estados del carácter son la presencia y ausencia de esos sitios de corte de enzimas particulares en esas localizaciones (datos de sitios de restricción). Debido a que la realización de mapas de restricción es laboriosa, algunos investigadores simplemente utilizan como datos presencia o ausencia de fragmentos de restricción de un tamaño dado como estado de carácter (datos de fragmentos de restricción). No se recomienda el uso de esta última aproximación debido a que viola un aspecto crucial que es el de la independencia de caracteres. Si aparece un nuevo sitio entre dos preexistentes, desaparece un fragmento grande y aparecen dos fragmentos más pequeños. Pese a que dos especies pueden compartir dos de los tres sitios, no tienen fragmentos en común y sería una fuente de error. Aún cuando se usen sitios de restricción y no fragmentos de restricción los datos suelen ser problemáticos para el análisis filogenético debido a la asimetría en las probabilidades de ganancias y pérdidas de sitios que, generalmente, los algoritmos existentes no tienen en cuenta. Esa asimetría está dada por el hecho de es mucho más probable que ocurra la pérdida de un sitio de restricción existente que la ganancia del mismo en una localización particular (Templeton, 1983a y b; DeBry y Slade, 1985).

1.13.3 Métodos de simplicidad (*parsimony*)

De los algoritmos para inferir filogenias a partir de datos de carácter los más utilizados son los basados en el principio de máxima simplicidad o *parsimony*. Este principio se basa en que son preferibles aquellas hipótesis que plantean filogenias más simples a otras más complicadas y que las hipótesis *ad hoc* deben ser reducidas al máximo. Cuando aparecen caracteres conflictivos, como se mencionó anteriormente, no pueden evitarse las hipótesis *ad hoc* para explicar la distribución de caracteres y debe suponerse la existencia de homoplasias (convergencia, paralelismo o reversiones).

En general, los métodos basados en la simplicidad o *parsimony* para inferir filogenias funciona seleccionando cladogramas que minimizan la longitud total del árbol. Es decir, minimizan el número de pasos evolutivos (transformaciones de un estado de carácter a otro) requeridos para explicar un conjunto dado de datos.

Actualmente, los análisis basados en el principio de simplicidad, comprenden un grupo relacionado de algoritmos. A continuación se presentan algunos de esos métodos.

Simplicidad de Fitch y Wagner: son los algoritmos más simples. Los cambios en los estados de carácter permitidos no están limitados (Fitch) o las limitaciones son mínimas (Wagner). El método de Wagner formalizado por Kluge y Farris (1969) y Farris (1970), asume que los caracteres se miden sobre una escala de intervalos. Este método es apropiado para caracteres binarios, multiestado ordenados y continuos. Fitch (1971) generalizó el método permitiendo caracteres multiestado desordenados (secuencias de nucleótidos y aminoácidos). Ambos métodos permiten la libre reversibilidad, es decir, se asume como igualmente probable el cambio de un estado de carácter en cualquier dirección.

Simplicidad de Dollo: Para datos de caracteres de sitios de restricción no es razonable utilizar los algoritmos de Fitch y Wagner debido a que, como se explica anteriormente, es mucho más probable perder un sitio preexistente que ganarlo en una localización precisa. Debido a esa asimetría, DeBry y Slade (1985) y otros han sugerido que el modelo de simplicidad de Dollo es el más apropiado para ese tipo de caracteres. Este modelo puede aplicarse a caracteres binarios o multiestado ordenados lineales. Como los métodos de simplicidad antes mencionados, en éste, el árbol preferido es el que requiere el mínimo número de pasos pero la reconstrucción de estados de carácter debe ser consistente con la limitación de que cada carácter derivado sea únicamente derivado. En otras palabras, se permite que cada estado de un carácter se origine una sola vez en el árbol y que cualquier homoplasia requerida tenga la forma de reversión a una condición más ancestral. En resumen, la limitación es que un estado de carácter derivado no puede perderse y volver a ganarse.

Simplicidad de Transversión: varios autores (por ejemplo Brown *et al.*, 1982) observaron que las sustituciones transicionales (cambios de purina a purina o de pirimidina a pirimidina) ocurren más frecuentemente que las transversiones (purina a pirimidina o vice versa). Un método simple para ignorar las transiciones es reunir a los cuatro nucleótidos como R (A o G) e Y (C o T). Posteriormente, se

puede utilizar el algoritmo de simplicidad de Wagner utilizando datos binarios. Otra manera de tratar este problema es asignar a las transversiones mayor peso que a las transiciones sin ir tan lejos como la simplicidad de transversión que le otorga peso cero a las transiciones.

Simplicidad de secuencias de proteínas: para el manejo de este tipo de datos se describirán dos procedimientos generales. El más simple minimiza el número de reemplazos de aminoácidos usando la simplicidad de Fitch (cada posición en las secuencias alineadas es un carácter multiestado desordenado en el cual los posibles estados son los 20 residuos aminoacídicos). Esa aproximación utilizada por primera vez por Eck y Dayhoff (1966), ignora el código genético. La otra aproximación fue implementada por Felsenstein (1991) en el programa PROTPARS del paquete PHYLIP. Contrariamente al algoritmo anterior, éste considera el código genético y además ignora las sustituciones silenciosas (aquéllas que ocurren en la tercera posición del codon y que no cambian al aminoácido). El programa PROTPARS asigna un paso al cambio de lisina a arginina (AAA - AGA) y dos cambios de lisina a prolina [AAA - CAA (glutamina) - CCA]. Los cambios tales como de fenilalanina a glutamina necesitan una sustitución de tres nucleótidos [AAA - GAA (leucina) - GAT (leucina) - GTT] pero se cuentan como dos pasos debido a que la sustitución del medio es silenciosa.

1.13.4. Morfología versus moléculas en la reconstrucción filogenética

Desde la aparición de la sistemática bioquímica, han comenzado a generarse debates entre los enfoques morfológicos y moleculares de reconstrucción filogenética (Frelin y Vuilleumier, 1979; Maxson y Wilson, 1974; Nei, 1975). Como se mencionó anteriormente, el objetivo principal de los estudios filogenéticos es reconstruir la historia evolutiva de un grupo de organismos. Debido a que los organismos en estudio tienen una sola historia, los estudios sistemáticos de cualquier conjunto de caracteres determinados genéticamente deben ser congruentes con otros estudios basados en conjuntos diferentes de caracteres del mismo organismo. La congruencia entre diferentes estudios es una fuerte evidencia en favor del patrón histórico descubierto. En caso de conflicto, podría estar indicando problemas ya sea teóricos como de procedimiento en cualquiera de los dos tipos de análisis o podría indicar la necesidad de incorporar datos adicionales para resolver las relaciones filogenéticas.

Pese a que existen argumentos a favor de una u otra postura (Frelin y Vuilleumier, 1979; Maxson y Wilson, 1974; Nei, 1975) muchos sistemáticos reconocen que las aproximaciones morfológicas y moleculares tienen cada una sus ventajas y desventajas (Hillis, 1987). Algunas de las mismas se describirán en los párrafos siguientes.

Probablemente, la principal ventaja de los datos moleculares es la gran cantidad de datos que pueden obtenerse. Debido a que toda la información heredable de un organismo está codificada en el ADN o el ARN, como se mencionó anteriormente, el conjunto de caracteres morfológicos con una base genética es un pequeño conjunto de la información molecular. El máximo número de caracteres independientes de un organismo está limitado por el número de nucleótidos en su ADN o ARN. Ese número abarca desde 4×10^3 para los virus más pequeños hasta alrededor de 4×10^{11} para algunos eucariotas (Cavalier-Smith, 1985; Hedman, 1985; Rees, 1972). En los últimos años, la información de secuencias de nucleótidos de cualquier organismo vivo están disponibles en bancos de datos actualizados (por ejemplo *GENBANK*) a los cuales se puede acceder fácilmente mediante correo electrónico. Otra de las ventajas es que los datos moleculares están casi completamente libres de la influencia de factores no heredables como lo son los factores ambientales, contrariamente a lo que ocurre con los caracteres morfológicos. Por otra parte, los análisis moleculares pueden verse afectados por la degradación de las macromoléculas a través del tiempo debido al almacenamiento incorrecto. De este modo, por el momento, las muestras de colección almacenadas en museos no siempre pueden estudiarse desde el punto de vista molecular. Esta desventaja para los caracteres moleculares constituye una de las principales ventajas de la morfología.

Un punto importante en esta controversia es el tema del muestreo. Un sistemático que utiliza caracteres morfológicos revisa cientos y hasta miles de ejemplares, mientras que un estudio molecular se restringe a unos pocos ejemplares por taxon. Asociado a este tema, está el hecho que el estudio molecular de un grupo siempre está basado en identificaciones de los taxónomos empleando caracteres morfológicos (salvo en virus y, a veces, bacterias).

Es importante mencionar, a favor de los caracteres moleculares, que ellos además reflejan un amplio espectro de niveles filogenéticos que van, de acuerdo a la molécula analizada, desde relaciones interpoblacionales (e.g. ADN mitocondrial) hasta relaciones entre grupos (e.g. ADN ribosómico). Este espectro no siempre se

obtiene con los caracteres morfológicos.

Un tema final a favor de la morfología, es el del costo económico de los estudios moleculares, el cual es siempre mayor que el de los estudios morfológicos.

Los conflictos reales de los resultados obtenidos mediante ambos tipos de estudios requieren de métodos que puedan usarse para reconciliar las diferencias. Se han desarrollado dos aproximaciones para reconciliarlos: las técnicas de consenso y las de combinación. Las primeras, ponen énfasis en la estabilidad y en la información común. Las últimas lo ponen en el poder descriptivo y en la simplicidad (*parsimony*) global (Miyamoto, 1985).

Las técnicas de consenso se basan en la obtención de un árbol de consenso entre los obtenidos mediante el análisis con datos morfológicos y moleculares. La técnica de combinación, combina ambos tipos de caracteres en una sola matriz y los procesa conjuntamente.

Una de las técnicas de consenso conceptualmente más simple es la del consenso estricto. El árbol de consenso estricto, fue definido por Sokal y Rohlf (1981) como el único árbol que contiene sólo aquellos grupos que aparecen en todos los árboles rivales. La mayor ventaja del consenso estricto es la simplicidad de interpretación. Si un grupo aparece en el árbol de consenso estricto, se puede tener la inmediata certeza que aparece en todos los árboles rivales. Cuando se deben comparar varios árboles, como ocurre cuando se obtiene más de un árbol igualmente simples (*parsimonious*), es preferible utilizar consensos que se basan en la regla de la mayoría (*majority rule consensus*) (Margush y McMorris, 1981). En este tipo de técnica de consenso, en vez de incluir todos aquellos grupos representados en todos los árboles rivales, se mantienen aquéllos que aparecen en la mayoría (por encima de una proporción especificada) de los árboles rivales. Típicamente, se usa una proporción de 0,5 y de este modo se mantienen todos los grupos representados en más de la mitad de los árboles rivales. Si sólo se están comparando dos árboles, los métodos de consenso estricto y de la regla de la mayoría son equivalentes.

1.13.5 Congruencia de caracteres. Medidas de adecuación entre los árboles y los datos

La congruencia de caracteres (*character congruence*) (Kluge, 1989) se refiere hasta qué punto todos los caracteres disponibles, producen una hipótesis unificada

e internamente consistente acerca de las relaciones de los taxa en estudio.

El **índice de consistencia** (Kluge y Farris, 1969) se ha usado tradicionalmente para evaluar la correspondencia de los datos de carácter en las hipótesis filogenéticas. Siguiendo la notación y terminología de Farris (1989), el índice de consistencia para un sólo carácter, c , es igual a m/s , donde m es la mínima cantidad de cambio que un carácter puede mostrar en cualquier árbol y s es la cantidad de cambio requerido por el carácter en el árbol que se está evaluando, es decir es el cociente entre la cantidad de cambio esperado sobre el observado. La cantidad $(1-c)$, por lo tanto representa la proporción de cambio que puede ser sólo explicado por homoplasias. El índice de consistencia para todos los caracteres en estudio, C , puede calcularse como M/S , donde M y S son la suma de los valores s y m de todos los caracteres, respectivamente. El índice de consistencia puede usarse como una medida directa de la congruencia de caracteres, pero han surgido algunas complicaciones. Una de dichas complicaciones es que cuantos más taxa y caracteres se incluyan, el índice disminuye bastante dado que aumenta la probabilidad de cambios homoplásicos. El otro problema encontrado es que los caracteres no informativos (e.g. autapomorfías) lo aumentan fuera de lo normal. Para evitar este último problema es trabajar sólo con caracteres informativos desde el punto de vista filogenético. Farris (1989) propuso un nuevo índice, el índice de retención. Este índice para un solo carácter, r , se define como $(g-s)/(g-m)$, donde s y m son como se definieron anteriormente y g es la cantidad posible de cambio que un carácter puede requerir en cualquier árbol. Por lo tanto, cuando un carácter se corresponde con un árbol tan pobremente como es posible, su índice de retención será 0 y puede ser significativamente interpretado como una congruencia estadística. En otras palabras cuando la cantidad de cambio observada es igual a la cantidad de cambio posible, r es igual a 0 y por lo tanto la cantidad de cambios homoplásicos encontrados es elevada y no es un buen carácter. Es importante mencionar que para caracteres no informativos (por ej. autapomorfías), m es igual a g por lo tanto r es indefinido. El índice de retención para todos los caracteres R se define como $(G - S) / (G - M)$ donde G , S y M son la sumatoria de los g , s y m individuales, respectivamente.

1.13.6 Árboles y confianza

Error de muestreo

Está ampliamente aceptado que las secuencias utilizadas en estudios particulares pueden ser demasiado cortas para realizar una predicción filogenética apropiada. Si el único problema fuera que las secuencias son demasiado cortas es probable que, estudiando secuencias más largas, se mejore la estimación de los árboles filogenéticos óptimos, pero es muy difícil medir esa diferencia directamente. Sin embargo, lo que se puede medir es si los árboles óptimos obtenidos a partir de diferentes conjuntos de datos se asemejan más cuando se aumenta la longitud de las secuencias.

Probablemente, el mejor método para seleccionar subconjuntos de datos es el de remuestreo al azar de columnas. Dicha selección puede realizarse mediante *bootstrapping* o *jackknifing*. En *bootstrapping* (Felsenstein, 1985; Penny y Hendy, 1985), los subconjuntos de columnas de la matriz de datos se seleccionan al azar con reemplazos. Ese subconjunto puede tener el mismo número de columnas que la matriz original. Una columna puede ser omitida de un subconjunto particular o seleccionada más de una vez. Con *jackknifing* (Penny y Hendy, 1985, 1986), los subconjuntos son seleccionados al azar sin reemplazos. Consecuentemente, el subconjunto debe ser más corto que la secuencia original.

Los árboles pueden construirse con los subconjuntos obtenidos mediante métodos estándar y los resultados analizados sistemas métricos de comparación de árboles. Existen dos modos de comparación de resultados. Felsenstein (1985) determinó que la medida estaría dada por los puentes internos que ocurren en al menos el 95% de los árboles. Penny y Hendy (1985; 1986) estudiaron la velocidad de convergencia a medida que se adicionaban secuencias más largas (subconjuntos).

Para establecer la confianza de los resultados suele utilizarse como criterio, la estabilidad de una rama o puente del cladograma. En tales casos, el *bootstrapping* puede ser el elegido ya que no acepta una rama si existen dudas.

Determinación de señal filogenética

Mientras que el número de caracteres que se utilizan empleando datos moleculares de secuencia suele ser grande, hay solamente cinco estados de carácter

posible en cualquier posición (A, C, G, T y brechas o *gaps*). El limitado número de estados de carácter, aumenta la posibilidad que algunos nucleótidos filogenéticamente informativos puedan covariar por azar (Faith y Cranston, 1991). Recientemente, se han desarrollado métodos para establecer la señal filogenética que pueden ser aplicados tanto a conjuntos de datos moleculares como morfológicos. Tales métodos estadísticos son la aleatorización (*randomization o permutation*) (Archie, 1989; Faith y Cranston, 1991; Källersjö *et al.*, 1993) y el de distribución asimétrica (*skewness*) (Hillis, 1991; Hillis y Huelsenbeck, 1992).

Los métodos de aleatorización comparan la longitud de los árboles más simples obtenidos a partir de los datos originales con los obtenidos con datos al azar. Las matrices al azar se generan mediante la permutación de estados de carácter (manteniendo el número y la frecuencia de caracteres) dentro de cada columna de la matriz de datos. Hillis (1991; Hillis y Huelsenbeck, 1992) describieron otro método para detectar la señal filogenética denominado *skewness*. En este método, se obtiene la distribución de la longitud de los árboles encontrando la longitud de cada árbol bifurcado obtenido a partir de los datos (no se incluyen los árboles multifurcados). Cuando existen demasiadas terminales para evaluar cada árbol, éstos se muestrean al azar. En dicho método se examina la forma de la distribución de los distintos árboles obtenidos. La presencia de señal filogenética se mide mediante el estadístico *gI* (Sokal y Rohlf, 1981). Cuando la distribución de los árboles de distinta longitud está significativamente desplazada hacia la izquierda (es decir que la mediana es mayor que la media), el estadístico *gI* es negativo y se dice que los datos tienen señal filogenética. Si la distribución de los árboles es simétrica o casi simétrica, *gI* no es significativo y los datos son considerados aleatorios con respecto a la historia evolutiva (Hillis *et al.*, 1993).

MATERIALES
Y
METODOS

2.1. Obtención de aislamientos

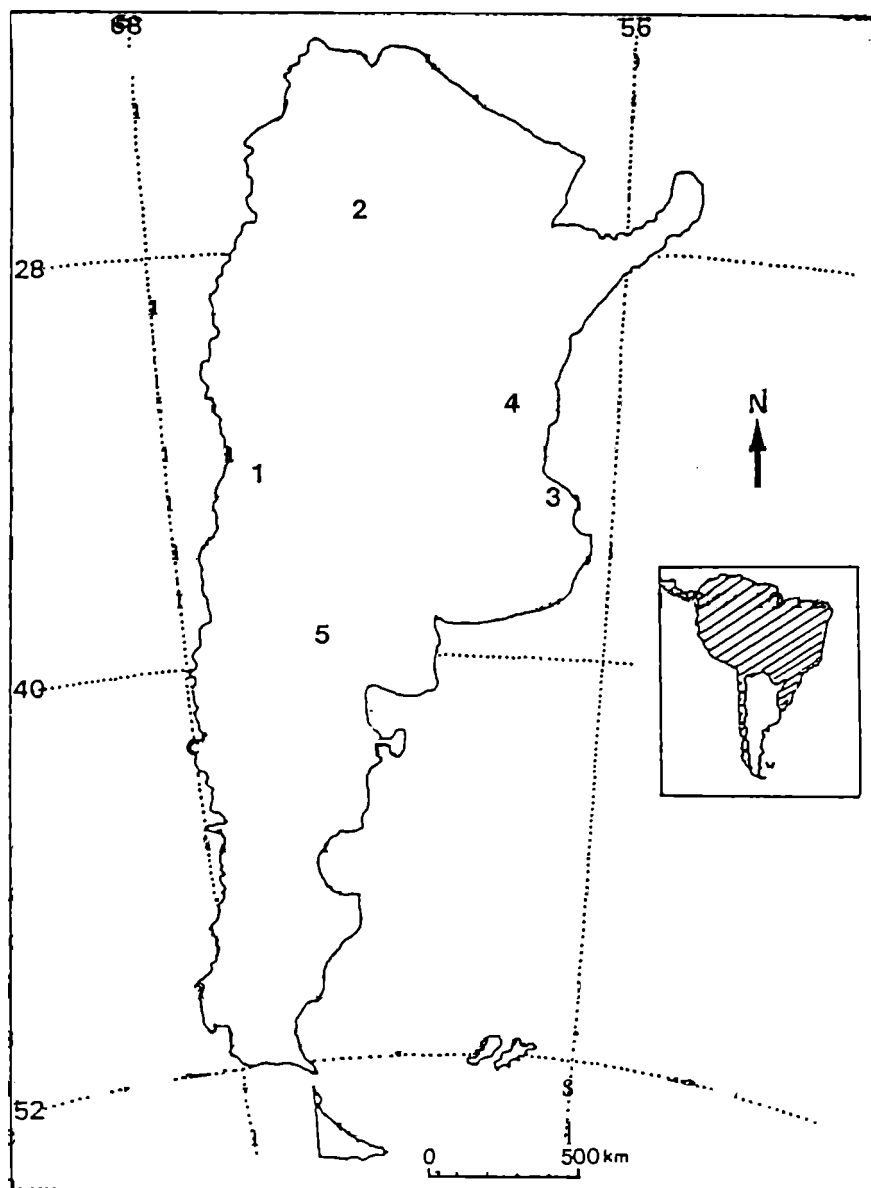
Figura 5: Zonas hortícolas muestreadas; denominación de los aislamientos utilizados y cultivo originario. Se obtuvieron plantas infectadas, o aparentemente infectas, por *Tospovirus* provenientes de distintas zonas argentinas productoras de hortalizas y de distintos cultivos (Figura 5). La recolección de las mismas estuvo a cargo de personal especializado de cada zona, mediante reconocimiento de sintomatología. Posteriormente, el material infectado se envió a nuestro laboratorio para su análisis.

2.2. Producción y mantenimiento de virus

A partir de los aislamientos antes mencionados se multiplicó el virus mediante la inoculación mecánica de plantas de *Nicotiana rustica* var. America. Las plantas crecieron en invernáculo, a 21-24°C y se inocularon cuando tuvieron tres hojas totalmente expandidas. Al cabo de 10-12 días se cosecharon las hojas con lesiones sistémicas (Figura 6) (Tas *et al.*, 1977), las que se almacenaron a -135°C.

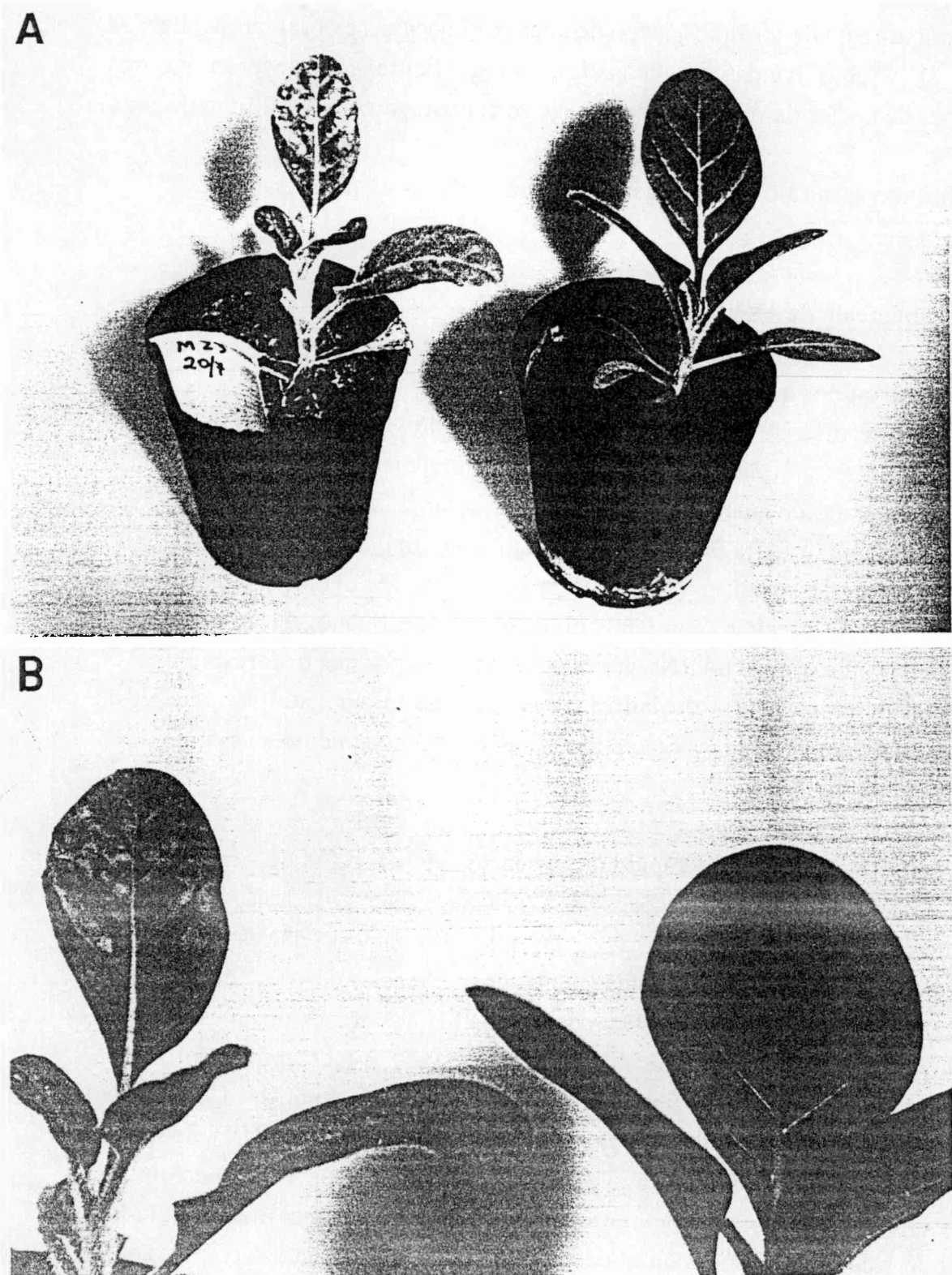
2.3. Purificación de viriones

Se realizó mediante el procedimiento de Tas *et al.* (1977) modificado por De Avila *et al.* (1990). Para tal fin, se homogeneizaron 100gr de hojas de *N. rustica* infectadas sistémicamente, utilizando una licuadora Waring (Waring Product Division. New Hartford, Conn. USA). Dicha homogeneización se realizó durante 90 segundos a baja velocidad y en presencia de 100ml de buffer de extracción compuesto por Tris-HCl 0,01M (pH 8.0), sulfito de sodio 0,01M, clorhidrato de cisteína 0,1% y fluoro de fenil-metil sulfonilo (PMSF) 1mM. El material así homogeneizado se filtró a través de gasa y se centrifugó a 10.000g. El precipitado obtenido se reextrajo con 200ml de buffer de resuspensión (Tris-HCl, 0,01M pH 7.9, sulfito de sodio 0,01M, clorhidrato de cisteína 0,1% y glicina 0,01M) durante una hora, con agitación y posterior centrifugación a 10.000g. Los virus se concentraron a partir de los sobrenadantes por centrifugación a 25.000rpm. El precipitado se resuspendió en buffer de resuspensión y se incubó con antisuero contra hojas sanas (título 1:32) durante 1 hora. Luego de centrifugar a 9.500rpm, el



- | | | | |
|---------|-----------------|---------------|---------------------------------------|
| Zona 1: | M23 (tomate) | M28 (tomate) | M316 (tomate) |
| Zona 2: | T101 (pimiento) | T102 (tabaco) | |
| Zona 3: | LP2 (tomate) | LP87 (tomate) | LP940 (crisantemo) LP941 (crisantemo) |
| Zona 4: | ER25 (pimiento) | ER30 (tomate) | ER36 (pimiento) |
| Zona 5: | RN5 (tomate) | RN7 (tomate) | |

Figura 6: Plantas de *Nicotiana rustica* infectadas con el aislamiento M23 (mostrando típicas lesiones sistémicas) (izquierda) y sin infectar (derecha).
A: plantas enteras. B: detalle de las hojas.



sobrenadante se sometió a centrifugación en ultracentrífuga a 27.000rpm durante 1 hora 20 minutos a 4°C en gradiente de sacarosa 3-30% (p/v) en un rotor Beckman SW-25-2 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California, USA). Mediante la iluminación directa de los tubos, luego de la centrifugación, se observaron 3 bandas (Figura 7). Dichas bandas se recogieron del gradiente y disolvieron en tres volúmenes de buffer de resuspensión. Luego se centrifugaron a 30.000rpm durante 1 hora.

Utilizando el mismo procedimiento se trataron hojas de planta sana.

2.4. Obtención de ARN

Se siguieron dos métodos.

A) En este método se partió del concentrado de viriones obtenido como se describió en la sección 2.3. Los viriones se resuspendieron en 1ml de solución de TCG (isotiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25mM pH 7, sarcosil 0,5% y β -mercaptoetanol 0,1M). El ARN se extrajo con una mezcla de fenol ácido; cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y acetato de sodio 2M pH 4.3 (Chomczynski y Sacchi, 1987) y se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol. La presencia y el tamaño aproximado de los ARNs virales se verificaron por electroforesis en gel de agarosa 0,8% en presencia de buffer TAE 1X más el agregado de 150 μ g/l de bromuro de etidio (Figura 8). Siguiendo el mismo procedimiento se extrajo ARN de planta sana.

B) Se trata de un método rápido que no incluye purificación de viriones (Jones *et al.*, 1991). Como material de partida se utilizaron 200mg de hoja de *Nicotiana rustica*, frescas o congeladas a -135°C, tanto con lesiones sistémicas como sanas. Dicho material se disgregó mecánicamente en presencia de 400 μ l de buffer de homogeneización (Tris-HCl 0,2M, sacarosa 0,2M, acetato de magnesio 30mM, cloruro de potasio 60mM, polivinil-pirrolidona 1% y β -mercaptoetanol 0,31%, pH 8.5). Posteriormente, se agregó SDS a concentración final de 0,75%, 400 μ l fenol saturado con agua y 400 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló durante 10 minutos y se centrifugó 5 minutos a 14.000rpm. Se recuperó la fase acuosa, que se trató con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló y centrifugó como en el paso anterior y a la fase acuosa recuperada se

Figura 7: Centrifugación en gradiente de sacarosa 3-30% (p/v) correspondiente a la purificación del aislamiento M316. Las flechas indican las bandas colectadas.

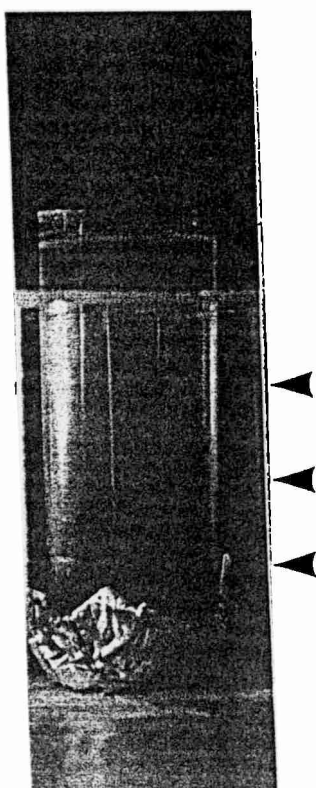
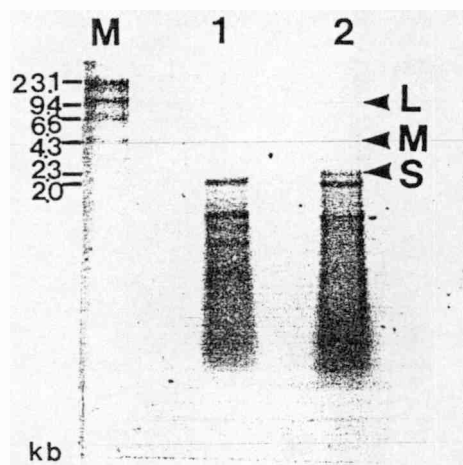


Figura 8: Electroforesis de ARN en gel de agarosa 0.8 % en TAE 1X. calle 1: ARN de planta sana; calle 2: ARN de planta infectada con el aislamiento M316. M: marcador de peso molecular (*lambda*/HindIII).



agregaron 30 μ l de acetato de sodio 3M y 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar el ARN. La mezcla se incubó durante 15 minutos a -70°C y luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos. Después de esta primera precipitación, el precipitado obtenido se resuspendió en 100 μ l de acetato de sodio 3M, se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 14.000rpm durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en 200 μ l de TE pH 7.5 en presencia de 20 μ l de acetato de sodio 3M. Posteriormente, se agregaron 200 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló durante 5 minutos y se centrifugó 15 minutos a 14.000 rpm. A la fase acuosa obtenida se le agregaron 2 volúmenes de etanol 96% para precipitar el ARN por segunda vez. Luego de incubar la mezcla durante 15 minutos a -70°C, se centrifugó 15 minutos a 14.000rpm. El pellet obtenido se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 50 μ l de agua bidestilada estéril. La concentración de ARN total se midió por absorbencia a 260nm y resultó ser de alrededor de 0,5-1 μ g/ μ l.

2.5. Preparación de bacterias competentes

2.5.1. Competentes químicas (Método de cloruro de calcio)

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α o INV α F'. La noche anterior a la preparación de competentes se sembraron las bacterias en 1ml de medio Psi-B y se incubaron a 37°C. Al día siguiente el cultivo se diluyó en 100ml de Psi-B a 37°C y se dejó crecer con agitación orbital a 200rpm hasta que la densidad óptica, medida a 600nm, alcanzó un valor de 0,6 a 0,9 (fase logarítmica). El cultivo se mantuvo en hielo 5 min. y se centrifugó durante 5 min. a 10.000rpm. Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en 40ml de solución TfbI (30mM acetato de potasio, 100mM cloruro de potasio, 10mM cloruro de calcio, 50mM cloruro de manganeso y 15% glicerol, pH 5.8) mantenida en agua hielo. Se dejaron 5 min. en hielo, se centrifugaron 5 min. a 10.000rpm, se resuspendieron en 4ml de solución TfbII (10mM PIPES o MOPS, 75mM cloruro de calcio, 10mM cloruro de potasio y 15% de glicerol, pH 6.5) y se dejaron en hielo 15 min. Se fraccionaron en alícuotas de 200 μ l y se almacenaron a -80°C (Sambrook *et al.*, 1989).

2.5.2. Electrocompetentes

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli* LE392 y DH5 α . La noche anterior se inocularon 50ml de medio LB con bacterias que se incubaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente, 10ml de este cultivo se diluyeron en 1 litro de LB-glucosa que se incubó con agitación. Cuando la densidad óptica, medida a 600nm, alcanzó un valor entre 0,6 y 0,9 se puso el cultivo en agua-hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó durante 15 min. a 5.000 rpm, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 litro de agua bidestilada estéril, preenfriada en agua hielo. La suspensión se centrifugó nuevamente a 5.000rpm durante 15 min., se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 500ml de agua bidestilada estéril. Se centrifugó como en los pasos anteriores y las bacterias se resuspendieron en 20ml de glicerol 10% y se volvieron a centrifugar durante 15 min. a 5.700rpm; se resuspendieron en 700 μ l de glicerol 10% y se almacenaron a -80°C en alícuotas de 200 μ l y (Dower *et al.*, 1988).

2.6. Biblioteca de ADN complementario

2.6.1. Generación de primera y segunda cadena de ADNc

Se utilizó el kit *Librarian II*TM (Invitrogen, San Diego, California, USA). La primera cadena de ADNc se generó mediante la utilización de 2-3 μ g de ARN obtenido como se describe en la sección 2.4A, iniciadores con secuencias nucleotídicas al azar (Gubler y Hoffman, 1983) y transcriptasa reversa de AMV (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA). La mezcla se incubó durante 1 hora a 42°C. Posteriormente se generó la segunda cadena de ADNc mediante la utilización de ADN polimerasa I de *E. coli*, ARNasa H y ADN ligasa de *E. coli*. Dicha mezcla se incubó 90 minutos a 15°C y 30 minutos adicionales a temperatura ambiente. La reacción se detuvo calentando la mezcla 10 minutos a 70°C. Posteriormente se agregó ADN polimerasa del bacteriofago T4 para generar extremos romos en las dobles cadenas de ADNc. Los fragmentos obtenidos se ligaron a adaptadores *Bst*XI mediante la acción de la ADN ligasa del bacteriofago T4 a 15°C durante toda la noche.

2.6.2. Fraccionamiento por tamaño

El ADNc de doble cadena se sometió a electroforesis en gel de agarosa 0,8%, en buffer TA 1X y las bandas fluorescentes correspondientes a los tamaños de ADNc de 23-4kb; 4-2kb y 2-0,5kb se cortaron del gel. El ADN se purificó de la agarosa mediante la utilización del kit *GeneClean*TM (BIO 101 Inc., La Jolla, California, USA). Para tal fin, el fragmento de agarosa conteniendo el ADN de interés se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5ml y se pesó. Teniendo en cuenta que 1mg es equivalente a 1ml, se agregaron 3 volúmenes de yoduro de sodio 6M con respecto al volumen inicial y se incubó a 45°C-55°C hasta disolución de la agarosa. Posteriormente, se agregaron 5 μ l de una matriz sólida (*Glassmilk*TM) y se incubó en hielo durante 15 minutos, mezclando cada 2 minutos, y se centrifugó a 14.000rpm durante 5 segundos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10-50 volúmenes de una solución conteniendo cloruro de sodio, Tris, EDTA (la empresa no consigna las concentraciones) y 50% de etanol. Se centrifugó 5 segundos a 14.000rpm y se descartó el sobrenadante. El procedimiento se realizó dos veces más. Una vez descartado el último sobrenadante, se centrifugó una vez más en las condiciones descritas para eliminar, mediante micropipeta, cualquier traza de sobrenadante. El ADN correspondiente a cada fracción se eluyó de la matriz sólida mediante el agregado de 20 μ l de agua bidestilada estéril, 2 minutos de incubación a 45°C-55°C y centrifugación a 14.000rpm durante 30 segundos. Se recuperó el sobrenadante que se almacenó a -20°C.

2.6.3. Ligación del ADNc al vector plasmídico

La ligación del ADNc al vector de clonado plasmídico se realizó utilizando el siguiente procedimiento: a) 1 μ l del ADNc correspondiente a las fracciones entre 4-2kb y 2-0.5Kb y b) 1 μ l de la dilución 1/5 de las mismas fracciones, se agregaron a una mezcla de ligación conteniendo 5ng del plásmido pcDNAII cortado con *Bst*XI en presencia de ADN ligasa del bacteriofago T4 e incubados 16-18 horas a 15°C en un volumen total de 10 μ l cada una.

2.6.4. Electrotransformación

Para electrotransformar 40 μ l de bacterias *E. coli* LE392 electrocompetentes (Sección 2.5.2) se utilizaron 2 μ l de cada fracción obtenida como se describió en la sección anterior. Para tal fin se utilizó un equipo *Gene pulser* (Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA) a 25 μ F; 200ohms y 1,8kV en cubetas de 0,1cm (Dower *et al.*, 1988). Luego de un pulso en dichas condiciones, se agregaron 400 μ l de medio de cultivo SOC y las bacterias se incubaron 1 hora a 37°C. Posteriormente se sembraron en medio LB sólido con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron durante la noche a 37°C. Se alcanzó una eficiencia de transformación del orden de 10⁸ colonias por μ g de ADN del plásmido pcDNAII superenrollado. Todas las colonias se repicaron por duplicado a cajas de Petri conteniendo LB y ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron durante 16 horas a 37°C.

2.6.5. Transferencia de colonias a soporte solido (*colony blot*)

Las colonias se transfirieron a papel Whatman 541 (Whatman International Ltd., Maidstone, England), se desnaturalizaron con NaOH 0,5N; se neutralizaron con Tris-HCl 0,5M (pH 7-8) y se lavaron con 2X SSC y etanol 96%. Luego se dejaron secar al aire.

2.6.6. Métodos de incorporación de nucleótidos radiactivos al ADN (marcación de sondas de ADN)

A) Incorporación de α [³²P]dATP en ADN de doble cadena

Se utilizó la técnica de cebado al azar (*random priming*) (Feinberg y Vogelstein, 1983). Para tal fin, se usaron como molde 100ng de ADN del inserto de interés, escindido de un plásmido recombinante mediante enzimas de restricción y purificado mediante el kit *GeneClean*TM (sección 2.6.2). La mezcla de reacción contuvo también 75ng de iniciadores al azar (*random primers*) de 6 nucleótidos de longitud; 0,4mM de dCTP, dGTP y dTTP; 10 μ Ci de α [³²P]dATP (3000Ci/mmol) y 5 unidades del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Promega Corp. Madison Wisconsin, USA), en buffer de reacción (50mM cloruro de sodio,

10mM Tris-ClH, 10mM cloruro de magnesio, 1mM ditiotreitól, pH 7.9), y en un volumen final de 50 μ l. Dicha mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y posteriormente el ADN radiactivo se purificó en columnas de Sephadex G-50 (*Nick columns*TM, Pharmacia P-L Biochemicals Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA). La purificación se realizó haciendo pasar por la columna y por gravedad los 50 μ l de mezcla de reacción. Posteriormente, se agregaron 350 μ l de buffer TE pH 8.0 y se realizaron 5 lavados de 400 μ l cada uno con el mismo buffer. Las 6 fracciones se colectaron en tubos de polipropileno de 1,5ml, de las cuales se tomaron 2 μ l de cada una y se agregaron a otros tubos de polipropileno conteniendo 500 μ l de agua destilada cada uno. Dichos tubos se pusieron en viales para su lectura en contador de centelleo y por el método de Cerenkov. De las 6 fracciones se tomaron la segunda, tercera y cuarta. La incorporación total estuvo en el orden de 10⁷cpm.

B) Incorporación de *gamma*[³²P]ATP en oligonucleótidos

Se realizó mediante la técnica de marcación de extremos 5' de oligonucleótidos por fosforilación con polinucleótido kinasa (Sambrook *et al.*, 1989). Para tal fin, se utilizaron 200ng del oligonucleótido apropiado, de 20 nucleótidos de longitud. A la mezcla de reacción se agregaron 100 μ Ci de *gamma*[³²P]ATP (8500Ci/mmol) y 8 unidades de polinucleótido kinasa (PNK) del bacteriofago T4 (Promega Corp. Madison, Wisconsin, USA) en presencia de buffer (40mM Tris-ClH, pH 7.5, 10mM cloruro de magnesio y 5mM ditiotreitól) y en un volumen final de 20 μ l. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, y con el objeto de purificar el oligonucleótido marcado, se agregó un volumen igual (20 μ l) de formamida y 2 μ l de colorante de carga (0,05% azul de bromofenol y 0,05% xilen-cianol). La mezcla se calentó 5 min. a 95°C y se sembró en un gel de poli(acrilamida) 20% (40% acrilamida/bisacrilamida 38:2, 50% urea, TBE 1X, 87,5 μ l de persulfato de amonio y 8,7 μ l de TEMED). La electroforesis se realizó a 100 volts durante 2 horas y luego de esto se envolvió el gel con una película de polietileno y se lo expuso durante 15 min., sin pantalla amplificadora y a temperatura ambiente. En los extremos del gel se colocaron fragmentos de cinta adhesiva conteniendo puntos marcados con tinta radiactiva para el alineamiento del gel con la película radiográfica luego de la exposición. Realizado dicho procedimiento, se cortó el gel a la altura correspondiente a la banda mayoritaria del oligonucleótido marcado, para su posterior elución del gel. Seguidamente, el fragmento de poli(acrilamida) escindido

se colocó en 500 μ l de agua bidestilada y se leyó por Cerenkov en contador de centelleo (Lectura 0). Se dejó el fragmento en agua durante la noche a 55-60°C luego de lo cual se centrifugó a 12.000rpm durante 15 min.. Se tomó el sobrenadante, se pasó a otro tubo y se determinó la radiactividad (Lectura 1). En el paso siguiente se agregaron 500 μ l de agua bidestilada al trocito de poliacrilamida, se incubó 2 ó 3 horas a 55-60°C y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se determinó la radiactividad en contador de centelleo (Lectura 2). Comparando los valores de la suma de las lecturas 1 y 2 con respecto a la lectura 0 se estimó el porcentaje de recuperación del oligonucleótido marcado a partir de la poliacrilamida. El porcentaje de recuperación estuvo entre el 90 y el 100%. La incorporación total de radiactividad fue del orden de 10⁶cpm.

2.6.7 Detección de colonias conteniendo el gen N

Los papeles de filtro conteniendo las colonias transferidas (sección 2.6.5.) se prehibridaron durante 2 horas a 65°C en 10ml de solución de prehibridación (6X SSC; 5X Denhardt's; 1% SDS y 3mg/ml ARNt de levadura) (Sambrook *et al.*, 1989). La hibridación se realizó a 65°C, durante 18 horas, en una solución de la misma composición que la utilizada en la prehibridación más el agregado de la sonda de ADN radiactiva (Sección 2.6.6). Para su reutilización, los filtros se lavaron como en la Sección 2.6.5 y prehibridaron e hibridaron a 45°C en la solución mencionada anteriormente más el agregado de un oligonucleótido marcado en su extremo con *gamma*[³²P]ATP (2.6.6).

2.6.8 Purificación de ADN plasmídico

Cada una de las colonias de interés se inoculó en 5ml de LB líquido con ampicilina (100 μ g/ml) y se crecieron a 37°C, con agitación, durante 16 horas. El ADN plasmídico se extrajo siguiendo la técnica estándar de purificación de ADN plasmídico (miniprep) descrita por Sambrook *et al.* (1989). Para tal fin, se centrifugaron 1,5ml del cultivo durante 1 min. a 14.000rpm y se descartó el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 100 μ l de solución I (glucosa 50mM, Tris-ClH 25mM y EDTA 10mM, pH 8.0), se mezclaron con vortex y se

centrifugaron durante 1 min. a 14.000rpm. Seguidamente, se agregaron 100 μ l de solución I, se mezcló vigorosamente, y luego de agregar 200 μ l de solución II (hidróxido de sodio 0.2N y SDS 1%) se invirtió el tubo varias veces. A continuación se incorporaron 150 μ l de solución III (acetato de potasio 5M y ácido acético glacial) y se volvió a mezclar por inversión del tubo. La mezcla se centrifugó durante 15 min. a 14.000rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo, se agregaron 2 volúmenes de etanol 96% y se incubó a temperatura ambiente 15 min. La mezcla se centrifugó durante 10 min., se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 μ l de etanol 70%. Luego de este paso se volvió a centrifugar como en el paso anterior y el precipitado se secó en una centrífuga con vacío durante 2 min. El pellet se disolvió en 20-30 μ l de agua bidestilada estéril.

2.6.9. Subclonado de fragmentos de ADN provenientes de la biblioteca de ADNc

Los subclonados se realizaron por tratamiento, de 2-4 μ g del fragmento de interés, con 2U/ μ g de la o las enzimas de restricción correspondientes. Unos 20ng del fragmento a subclonar se ligaron al plásmido elegido (linealizado con las enzimas apropiadas y eluido del gel de agarosa como se describe en la sección 2.6.2) en proporción molar 1:1 para extremos cohesivos y 3:1 para extremos romos, de inserto y vector, respectivamente. La ligación se realizó en presencia de 3,5 unidades Weiss de ADN ligasa de T4 (Promega Corp. Madison, Wisconsin, USA) y de ATP 0,5 mM para ligaciones de extremos romos, en un volumen final de 10 μ l. Las reacciones se incubaron a 15°C, durante toda la noche. Posteriormente, con 2 μ l de la mezcla de ligación se transformaron 50 μ l de bacterias INV α F' competentes (sección 2.5.1). La mezcla bacterias-ADN se incubó 20 minutos en hielo, 2 minutos a 42°C y 2 minutos nuevamente en hielo (Sambrook *et al.*, 1989). Posteriormente, se agregaron 350 μ l de LB sin ampicilina, se incubó durante 1 hora a 37°C y la mezcla se distribuyó en una caja de Petri sobre medio LB sólido conteniendo ampicilina 100 μ g/ml, X-Gal 40 μ g/ml e IPTG 80 μ M. Las cajas se incubaron a 37°C durante la noche. Se seleccionaron las colonias blancas y el ADN plasmídico se purificó como se describe en la sección 2.6.7.

2.7. Transcripción reversa y PCR (RT-PCR)

2.7.1. Oligonucleótidos utilizados como *primers*

Se seleccionaron dos oligonucleótidos correspondientes al gen N. El *primer 1* es complementario a los primeros 15 nucleótidos del extremo 3' del ARN S en sentido viral (*primer 1*: 5' AGAGCAATTGTGTCA 3') (de Avila *et al.*, 1993). El otro, *primer 2*, diseñado en nuestro laboratorio, está situado a 450bp de distancia del primero y es complementario a 20nt. de la cadena viral complementaria (*primer 2*: 5' TCAAGc/tCTTCg/tGAAa/gGTCAT 3') sobre el marco abierto de lectura (ORF) del gen N.

2.7.2. Generación de ADNc con *primers* específicos

La generación de ADNc se realizó por medio de transcriptasa reversa termo-resistente (Retrotherm™ RT, Epicentre Technologies Inc., Madison, Wisconsin, USA), en un volumen final de 50µl, y en presencia de buffer de reacción (Tris-ClH 10mM, pH 8.3, cloruro de potasio 50mM, cloruro de magnesio 1,5mM y sulfato de manganeso 0,75mM). La mezcla de reacción estuvo compuesta por 1µM de *primer 1*, 0,2µM de dNTPs, 4U de transcriptasa reversa y 1µl (0,5-1µg/µl) de ARN total como molde. La mezcla se incubó a 52°C and 70°C durante 5 y 10 min., respectivamente.

2.7.3. Reacción de PCR

Se realizó en un volumen de 10µl, en presencia de cloruro de magnesio 1,5mM; Tris 50mM, pH 8.3; de ambos *primers* 0,5µM; dNTPs 0,2µM; BSA 500µg/ml; ADNc 1µl como molde y 0,5U de Taq ADN polimerasa. (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA). Se utilizó un ciclador térmico cuyo sistema de calentamiento es por medio de aire forzado y en el que las muestras se colocan en tubos capilares (Idaho Technologies, Idaho Falls, Idaho, USA). El tiempo total de reacción fue de 30 min. con 1 ciclo a 92°C, 15 seg.; 35 ciclos at 92°C 0 seg.; 52°C 0 seg. 72°C 15 seg. y un paso final de 15 seg. at 72°C. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 0,8%, en buffer TAE 1X más el agregado de 150µg/l de bromuro de etidio.

2.8. Recuperación de los fragmentos de amplificación a partir del gel de agarosa

Los fragmentos amplificados por PCR se eluyeron de la agarosa por medio del Kit *GeneClean* II (BIO 101 Inc., La Jolla, California, USA)(Sección 2.6.2). El ADN se disolvió en 10-20 μ l de agua bidestilada estéril y se estimó el porcentaje de recuperación mediante el análisis del 10% de la muestra. Para esto se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8%, en presencia de buffer TAE 1X más el agregado de 150 μ g/l de bromuro de etidio.

2.9. Digestión de fragmentos de PCR con enzimas de restricción

Se utilizó como molde el ADN amplificado por PCR. A la mezcla de reacción (10 μ l) se agregaron 4U de las enzimas *Bst*NI o *Hinc*II (New England Biolabs, Inc. Beverly, Massachusetts, USA) y se realizó la digestión en un volumen final de 20 μ l y en presencia de los correspondientes buffers [(50mM cloruro de sodio, 10mM Tris-ClH, pH 7.9, 10mM cloruro de magnesio, 1mM ditiotritol, 100 μ g/ml BSA) y (100mM cloruro de sodio, 50mM Tris-ClH, 10mM cloruro de magnesio, 1mM ditiotritol, pH 7.9, 100 μ g/ml BSA)], respectivamente. Se incubó durante 16 horas a 60°C o 37°C, respectivamente. Los resultados se observaron mediante electroforesis de los productos de reacción en geles de agarosa 2%, en presencia de buffer TAE 1X más el agregado de 150 μ g/l de bromuro de etidio.

2.10. Clonado de fragmentos amplificados por PCR

Se utilizaron 7ng de ADN de los fragmentos recuperados del gel de agarosa (sección 2.6.2) que se ligaron a 50ng del plásmido pGEM T (Promega Corp. Madison, Wisconsin, USA) mediante la acción de 1U Weiss de ADN ligasa de T4 (Promega Corp. Madison, Wisconsin, USA), a 15°C en presencia de buffer de ligación (30mM Tris-HCl, 10mM cloruro de magnesio, 10mM ditiotritol y 1mM ATP) durante 16 horas, en un volumen final de 10 μ l. Posteriormente, se inactivó la enzima mediante calentamiento a 72°C durante 10 minutos. Se tomaron 2 μ l de la mezcla de ligación y se agregaron 50 μ l de bacterias *E. coli* DH5 α competentes

(Sección 2.5.1). La transformación se realizó como se describe en la sección 2.6.8. Con las colonias blancas o celeste claro obtenidas, se hicieron estrías sobre LB sólido en presencia de ampicilina, X-Gal e IPTG en las concentraciones ya descritas y se incubó a 37°C. La búsqueda de las colonias que contenían el plásmido recombinante se realizó mediante PCR (Robles y Doers., 1994) utilizando los oligonucleótidos específicos descritos en la sección 2.7.1. Para tal fin, se tomaron bacterias de las estrías mediante un ansa y se resuspendieron en 50µl de agua bidestilada estéril. La suspensión se hirvió durante 10 min., se centrifugó 3 min. a 14.000rpm y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Con 5µl del sobrenadante de cada una se realizó la reacción de PCR en las mismas condiciones descritas en la sección 2.7.3. La purificación de ADN de los plásmidos recombinantes, conteniendo el fragmento de interés, se realizó como en la sección 2.6.7.

2.11. Secuenciación de fragmentos de ADN complementario

La secuenciación de ADN se realizó mediante el método de terminación de cadenas mediadas por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). Como *primers* se usaron los oligonucleótidos universal y directo, complementarios al sitio múltiple de clonado (MCS) del bacteriofago M13 y como molde 1-2µg de ADN plasmídico. Dichos ADNs se desnaturalizaron durante 10 minutos en presencia de NaOH 2N y posteriormente se purificaron en columna de Sephacryl S-400 (*Spun columns*, Pharmacia P-L Biochemicals Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA). La reacción de secuenciación se realizó utilizando el kit *Sequenase*TM versión 2.0 (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio, USA). Para la asociación de los *primers* (*annealing*) se preparó una mezcla con el ADN de doble cadena disuelto en 7µl de agua, 2µl de buffer de reacción 5X (Tris-ClH 200mM, cloruro de magnesio 100mM y cloruro de sodio 250mM, pH 7.5) y 1µl de *primer* universal o directo (20ng/µl). La mezcla se calentó durante 2 min. a 70°C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se incubó durante 1 hora a la misma temperatura. Para la reacción de incorporación de α[³²P]dATP se utilizaron 5µl de la mezcla de *annealing* a la que se agregaron 2.75µl de mezcla de marcación [0,5µl (ditiotreitolo 0,1M), 0,2µl (dGTP 7,5µM, dCTP 7,5µM, dTTP 7,5µM), 4µCi α[³²P]dATP y 0,125µl (1,6U/µl de ADN polimerasa del bacteriofago T7)]. La marcación se realizó durante 2 min. a

temperatura ambiente y se agregaron 1,75 μ l de la mezcla a cuatro tubos conteniendo, separadamente, 1,25 μ l de los cuatro dideoxynucleótidos. Se incubó durante 5 min. a 37°C luego de lo cual se detuvo la reacción por el agregado de 4 μ l solución detenedora (formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% y xilen-cianol 0,05%). Se sembraron 2 μ l de reacción con cada dideoxynucleótido en calles separadas y se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida 6% (acrilamida/bisacrilamida 38:2 12% , urea 50%, TBE1X, 600 μ l de 10% persulfato de amonio y 60 μ l de TEMED) (Sambrook *et al.*, 1989) a 80 watts y a tiempos que dependieron del número de nucleótidos a leer. Finalmente, los geles fueron envueltos con una película de polietileno y puestos en contacto con película radiográfica a -80°C durante la noche.

2.12. Análisis de proteínas

2.12.1. Purificación parcial de nucleocápside

Para tal fin se siguió el protocolo descrito por De Avila *et al.*(1990). Se trabajó con 10gr de hojas de *N. rustica* infectadas sistémicamente, las que se homogeneizaron en 40ml de buffer de extracción (0,1M Tris-ClH, 0,01M sulfito de sodio y 0,01M EDTA, pH 8.0) durante 30 segundos, en licuadora *Waring*. El homogenado se filtró a través de gasa, se centrifugó a 3.000rpm durante 10 min y se colectó el sobrenadante. Este se centrifugó por 30 min a 25.000rpm. El precipitado obtenido se resuspendió en 20ml de buffer de resuspensión (Tris-ClH 0,01M, sulfito de sodio 0,01M, EDTA 0,01M y Nonidet P-40 1%, pH 7.9) mezclando suavemente durante 30 min.. La suspensión se centrifugó a 10.000rpm por 10 min. y posteriormente, el sobrenadante se sometió a centrifugación en un colchón de sacarosa 30% (p/v), en buffer de resuspensión, durante 1 hora a 40.000rpm en un rotor Beckman SW-25 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California, USA). El sedimento obtenido se disolvió en 1ml de buffer de resuspensión.

2.12.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS (PAGE-SDS)

Se realizó en una cuba *Mini-protean II*TM (Bio Rad Laboratories, Inc.,

Hercules, California, USA). Los análisis proteicos se llevaron a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida discontinuos. Los geles de separación de poliacrilamida 12% estuvieron compuestos por Tris-ClH 0,375M, pH 8.8; acrilamida/bisacrilamida 30:0,8; 50 μ l de persulfato de amonio 10% y 10 μ l de TEMED en presencia de SDS 0,1% (p/v), en un volumen final de 10ml. La composición de los geles de apilamiento (*stacking*) fue de Tris-ClH 0,125M, pH 6.8; acrilamida/bisacrilamida 4% (30:0,8) e idénticas cantidades de persulfato de amonio 10% y TEMED, en presencia de igual concentración de SDS (Laemmli, 1970).

A una alícuota de las muestras obtenidas en la sección anterior se agregó buffer de muestra 4X (Tris-ClH 40mM, pH 8.0; EDTA 4mM; SDS 8%; glicerol 40% y azul de bromofenol 0,04%) en concentración final 1X, más el agregado de 1/10 del volumen de la muestra de β -mercaptoetanol. Antes de sembrar, las muestras se hirvieron durante 5 min. La electroforesis se realizó a 200 volts, durante 1 hora, en buffer de corrida (Tris 50mM; glicina 400mM y SDS 0,05%). Concluída la misma, los geles se fijaron y tiñeron durante 30min. o más en una solución conteniendo 0,25g de azul brillante coomassie R250 (*coomassie brilliant blue*), disuelto en 90ml de metanol:agua (1:1 v/v) y 10ml de ácido acético glacial. Los geles se destiñeron con varios cambios de solución para tal fin (ácido acético glacial 5% y de metanol en agua 7,5%) (Laemmli, 1970).

2.12.3. Antisueros

Los antisueros policlonales contra la fracción de nucleocápside purificada de los aislamientos BR-01 (TSWV), BR-03 (TCSV), SA-05 (GRSV) y NL-07 (INSV) se prepararon de acuerdo a Huguenot *et al.* (1990) y fueron cedidos gentilmente por el Dr. Antonio C. de Avila (Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, EMBRAPA, Brasília, Brasil).

2.12.4. Transferencia de proteínas a soporte sólido (*Western blot*).

Se realizó de acuerdo al procedimiento convencional de transferencia húmeda (*wet-blotting*) descrito por Towbin *et al.* (1979) en un dispositivo

*Mini Trans-Blot*TM (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA).

Luego de la electroforesis de proteínas (2.12.2) se descartó el gel discontinuo y el gel de separación se equilibró en buffer de transferencia (20mM Tris, 150mM glicina, pH 8.3) durante 15 a 30 minutos. Posteriormente, se cortaron papeles de filtro (3MM Whatman) y un trozo de membrana de nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA), de las dimensiones del gel, los cuales se humedecieron durante 15 minutos en buffer de transferencia. Seguidamente, se ensambló el dispositivo de transferencia que consta de un sandwich de almohadillas de fibra previamente humedecido en buffer de transferencia. Sobre cada almohadilla del sandwich se pusieron 2 ó 3 hojas de papel de filtro. Sobre el lado de polaridad positiva del sandwich se ubicó la membrana de nylon. Finalmente, el gel de poliacrilamida se ubicó cuidadosamente sobre los papeles de filtro ubicados en la polaridad negativa. Se cerró el sandwich y se lo colocó dentro de una cuba de transferencia. La transferencia se realizó durante 1 hora a 150 volts.

2.12.5. Inmunodetección

Luego de la transferencia se retiró el filtro de nylon y se dejó secar al aire. La calle correspondiente al marcador de peso molecular se cortó y se tiñó con colorante *amido black* (0,1% amido black, 40% metanol y 10% ácido acético) durante 2 a 10 minutos.

La membrana se lavó primero durante 2 minutos con PBS, 0,3% BSA y luego se bloqueó la misma durante 3 horas en PBS, 3% de BSA con agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, el filtro se lavó tres veces con una solución de PBS conteniendo BSA 0,3% durante 10 minutos cada lavado y se incubó durante 1 hora con una dilución 1:1000 de una solución de inmunoglobulina 1mg/ml en PBS con BSA 0,3% de los antiseros antes mencionados (2.12.3). El filtro se lavó tres veces más como en el paso anterior y se incubó durante 1 hora con una dilución 1:1000 de anticuerpo cabra anti-ratón (*goat anti-mouse*), conjugado con fosfatasa alcalina, en PBS más BSA 0,3%. Finalmente, el filtro se lavó con PBS más BSA 0,3%.

La detección se realizó utilizando NBT (*nitroblue tetrazolium*) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) (Sigma, Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) como describe Leary *et al.* (1983). La reacción de coloración se detuvo utilizando una solución compuesta por Tris 20mM pH 7.5 y EDTA 5mM.

2.12.6 ELISA

Los aislamientos se analizaron utilizando la técnica de ELISA, en doble sandwich de anticuerpos [*double antibody sandwich* ELISA (DAS-ELISA)], descrita por Clark y Adams (1977). Como antígeno se utilizaron diluciones seriadas crecientes de extracto de hojas de planta sana e infectadas sistémicamente (desde log 1,5 hasta log 4,5). Este procedimiento se realizó en placas de microtitulación y constó en una primera etapa de recubrimiento (*coating*) de las fosas de la placa con 200 μ l de anticuerpos en buffer carbonato (pH 9.6) mediante incubación durante la noche. Posteriormente, las placas se incubaron 30 min. con 200 μ l de PBS-T (PBS pH 7.4 conteniendo Tween 20 0,05%) y BSA 1% para bloquear los sitios de unión inespecíficos. En el paso siguiente, se agregó a cada fosa 100 μ l de antígeno diluido en PBS-T y las placas se incubaron a 37°C durante 2 horas. Después de esto se lavaron 3 veces con PBS-T y se agregaron 100 μ l de anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina diluido en PBS-T. Se incubó y lavó como en el paso anterior. El antígeno unido se detectó mediante la incubación durante 30 min. en 100 μ l de *p*-nitrofenil fosfato (1mg/ml) disuelto en buffer dietanolamina 0,01M, pH 9.6. La absorbencia se midió a 405nm en un lector de ELISA.

2.13. Microscopía Electrónica

El estudio de microscopía electrónica de varios aislamientos se realizó mediante el análisis de secciones ultrafinas. Para proceder a la fijación del material, se cortaron fragmentos foliares de 1 x 3mm de *N. rustica* infectadas. Dichos fragmentos se incubaron 2 ó 3 horas en una solución conteniendo aldehído glutárico 2%, paraformaldehído 2% y cloruro de calcio 5mM, en presencia de buffer cacodilato 50mM, pH 7.2. Posteriormente, los fragmentos se lavaron en el mismo buffer, tres veces, 15 min. cada vez. Los tejidos se postfijaron en tetróxido de osmio 1% durante 1 hora, en presencia de buffer cacodilato. Se lavaron con agua destilada y trataron con acetato de uranilo 0,5% en solución acuosa durante la noche. Las muestras fijadas se deshidrataron en series crecientes de concentración de acetona (30, 50, 70, 90, 100%), en incubaciones de 10 min. cada una. En acetona 100% los tejidos se trataron 3 veces de 10 min., cada vez y posteriormente, se

incubaron durante 3 horas, con agitación, en acetona 100% más medio de Spurr (resina epóxica de baja viscosidad), en proporción 1:1. El tejido se infiltró con resina pura durante la noche, con agitación y luego de esto se colocó en moldes planos de silicona, con resina nueva. La polimerización se llevó a cabo en estufa a 70°C durante 48 horas.

Para obtener las secciones ultrafinas, el tejido en bloques se cortó en porciones ultradelgadas, en un ultramicrotomo Super Nova (LKB/ Reichert), equipado con navajas de diamante Diatome. Las secciones se colectaron en gradillas de cobre (malla 300), contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM 100C, a 80kV y las micrografías se registraron en film Kodak Electron Image 3 1/4 x 4".

2.14. Análisis de secuencias

Se utilizaron subrutinas del paquete GCG de la Universidad de Wisconsin (Devereaux *et al.*, 1984). Mediante la subrutina GAP se realizó el alineamiento de secuencias de a pares y la subrutina PILEUP se utilizó para alineamientos múltiples. En ambos casos los valores utilizados para los alineamientos fueron los preestablecidos como estándar para cada subrutina. Para la obtención de sitios de restricción se utilizó la subrutina MAP y para la obtención de los productos proteicos predichos la subrutina TRANSLATE.

2.15. Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó en dos niveles: a) Nivel familia *Bunyaviridae* o contexto y B) nivel género *Tospovirus*. Dentro de cada nivel se realizó el análisis de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos.

Para el estudio en el contexto se utilizó como *outgroup* el gen N del virus Junín (género *Arenavirus*, Fam. *Arenaviridae*) y como grupo de estudio o *ingroup* al gen N de los representantes de los géneros que componen la familia *Bunyaviridae*, incluidos los de las cuatro especies de *Tospovirus* descritas (De Avila *et al.*, 1993)(Tabla 1). Las secuencias de los virus antes mencionados se obtuvieron mediante el programa FETCH del paquete GCG de la Universidad de Wisconsin

Tabla 1: Secuencias de gen N utilizadas en los análisis filogenéticos. GB: número para acceder a la secuencia en el banco de datos GENBANK. EM: número para acceder a la secuencia en el banco de datos EMBL. ND: no disponible.

Nro de acceso	Nombre del virus	Género	Referencias
D00353 (GB)	Bunyamwera	<i>Bunyavirus</i>	Elliot (1989)
K00610 (GB)	La Crosse	<i>Bunyavirus</i>	Patterson <i>et al.</i> (1983)
K02736 (GB)	Punta Toro	<i>Phlebovirus</i>	Ihara <i>et al.</i> (1984)
X53794 (EM)	Toscana	<i>Phlebovirus</i>	Giorgi <i>et al.</i> (1991)
X53771 (GB)	Rift Valley fever	<i>Phlebovirus</i>	Giorgi <i>et al.</i> (1991)
J04418 (GB)	Sandfly fever Sicilian	<i>Phlebovirus</i>	Marriot <i>et al.</i> (1989)
M22011 (GB)	Aino	<i>Phlebovirus</i>	Akashi <i>et al.</i> (1984)
M33551 (GB)	Uukuniemi	<i>Phlebovirus</i>	Simons <i>et al.</i> (1990)
M34011 (GB)	Prospect Hill	<i>Hantavirus</i>	Parrington y Kang (1990)
ND	tomato spotted wilt	<i>Tospovirus</i>	De Haan <i>et al.</i> (1990)
ND	tomato chlorotic spot	<i>Tospovirus</i>	De Avila <i>et al.</i> (1993)
ND	groundnut ring spot	<i>Tospovirus</i>	De Avila <i>et al.</i> (1993)
ND	<i>Impatiens</i> necrotic spot	<i>Tospovirus</i>	De Haan <i>et al.</i> (1992a)
X15827 (EM)	Junín	<i>Arenavirus</i>	Ghiringhelli <i>et al.</i> (1989)
M25150 (GB)	Dugbe	<i>Nairovirus</i>	Ward <i>et al.</i> (1990)
U04958 (GB)	Crimean Congo Hemorrhagic	<i>Nairovirus</i>	Marriott <i>et al.</i> (1994)

(Devereaux *et al.*, 1984) y por correo electrónico a partir de los bancos de genes GENBANK (GB) o EMBL (EM). Los productos proteicos predichos a partir de esas secuencias fueron generados por medio del programa TRANSLATE del paquete GCG de la Universidad de Wisconsin. Para el análisis en el nivel género *Tospovirus*, se utilizó como *outgroup* en un primer análisis el gen N del virus *Rift Valley fever* (género *Phlebovirus*) y en un segundo análisis el mismo gen del virus *Bunyamwera* (género *Bunyavirus*). El *ingroup* estuvo formado por las secuencias de ARN del fragmento de 450nt del gen N y del producto proteico predicho a partir de esos fragmentos de los catorce aislamientos argentinos de *Tospovirus* más las de las cuatro especies descriptas (De Avila *et al.*, 1993).

En todos los análisis las secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos fueron alineadas utilizando el programa de computación CLUSTAL V (*Multiple sequence alignments*) (Higgins y Sharp, 1988, 1989) basado en el algoritmo descripto por Needleman y Wunsch (1970). Dicho programa realiza alineamientos globales e introduce espacios o *gaps* para realizar el alineamiento de secuencias correctamente.

Con dichos alineamientos se confeccionaron las matrices de datos cuyos caracteres fueron las posiciones homólogas en las secuencias y los estados de carácter fueron los cuatro nucleótidos (A, C, G y U) en el caso de los análisis de secuencias de ARN y los 20 aminoácidos en los análisis de las secuencias de proteínas.

Los sitios informativos, desde el punto de vista filogenético, de las matrices de ADN se identificaron usando la opción *Show Character Status* en el programa de computación PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) versión 3.1 (Swofford, 1991). Los sitios informativos son aquellas posiciones en las cuales al menos dos taxa comparten un carácter apomórfico. Los sitios no informativos fueron ignorados mediante la opción *ignore characters*. Los datos fueron analizados utilizando el algoritmo de simplicidad (*parsimony*) de Fitch (1971) con la opción *heuristic* del mismo programa para encontrar los árboles más simples. En los casos que existieron más de un árbol igualmente simple se construyeron árboles de consenso estricto mediante la opción *compute consensus* del programa PAUP. Todos los caracteres de nucleótidos se trataron en PAUP como multiestado desordenados. Para establecer la señal filogenética de los caracteres se utilizó el método de *skewness*, con 10.000 repeticiones, mediante la opción *random trees* del programa PAUP. Los valores de *skewness* para reflejar señal filogenética deben ser

negativos. Por otra parte, se obtuvo a partir de los datos, el índice de consistencia (*C*) y el de retención (*R*) mediante la opción *lengths and fit measures*. Además se realizó el análisis de *bootstrap* (Felsenstein, 1985; 1988) mediante el comando que lleva el mismo nombre del programa PAUP sobre la matriz de caracteres informativos. Este análisis se realizó con 100 réplicas, para hacer una estimación de la confianza de los grupos formados en el/los árboles más simples encontrados. A partir de los 100 árboles (como mínimo) producto de las réplicas, se construyó un árbol de consenso de mayoría (sólo estarían representados aquellos grupos que estén presentes en más del 50% de los árboles).

Para el análisis de las matrices de secuencias de proteínas se utilizó el programa PROTPARS (*Protein parsimony algorithm*, versión 3.41) del paquete PHYLIP (copyright 1986-1991 Washington University, Felsenstein, J.). El algoritmo de simplicidad que utiliza se describió en la sección introductoria. Por otra parte, para el análisis de *bootstrapping* y la obtención de árboles de consenso se utilizaron los programas del paquete PHYLIP, *seqboot* y *consense*, respectivamente. La graficación de los árboles obtenidos a partir de datos de secuencias de proteínas se realizó mediante la utilización del programa MAC CLADE versión 3.01 (Maddison y Maddison, 1992).

Medios para cultivo de bacterias*Medio LB (Medio Luria-Bertani)*

bacto-triptona	10g/l
bacto-extracto de levadura	5g/l
cloruro de sodio	10g/l
	pH 7.0

Para preparar medio LB sólido se agregó antes de esterilizar 15g/l de bacto-agar. Esterilizado durante 20 minutos en autoclave a 1Kg por centímetro al cuadrado.

Medio SOC

bacto-triptona	20g/l
bacto-extracto de levadura	5g/l
cloruro de sodio	0,5g/l
cloruro de potasio 250mM	10ml/l
glucosa 1M	20ml/l
	pH 7.0

Esterilizado durante 20 minutos en autoclave a 1Kg por centímetro al cuadrado.

Antes de usarse se agregó 5ml de cloruro de magnesio 2M estéril.

Medio PsiB

bacto-triptona	20g/l
bacto-extracto de levadura	5g/l
sulfato de magnesio	5g/l
	pH 7.6

Soluciones usadas

TE

Tris HCl (pH 8.0)	10mM
EDTA	1mM
	pH 8.0

TA 1x

Tris-acetato	40mM
(Tris base 4,84g/l y 1,14ml/l de ácido acético glacial)	

TAE 1x

Tris-acetato	40mM
EDTA	1mM

SSC 20x (solución salina standard)

cloruro de sodio	175,3g/l
citrato de sodio	88,2g/l
	pH 7.0

RESULTADOS

Los resultados han sido agrupados en tres ítems:

a) Caracterización del aislamiento M316 (sección 3.1), donde se describe la caracterización molecular, serológica y morfológica del aislamiento M316 que, hasta el momento de comenzar este trabajo era considerado como correspondiente a la especie TSWV.

b) Caracterización de aislamientos de distintas regiones del país (sección 3.2), en el que se desarrolla la caracterización molecular, a partir de un fragmento del gen N; la caracterización serológica y la estructura morfológica de aislamientos provenientes de distintas regiones geográficas del país.

c) Análisis filogenético (sección 3.3), donde se muestra los estudios realizados con el fin de plantear hipótesis filogenéticas que reflejen la historia evolutiva del género en estudio.

3.1. Caracterización del aislamiento M316

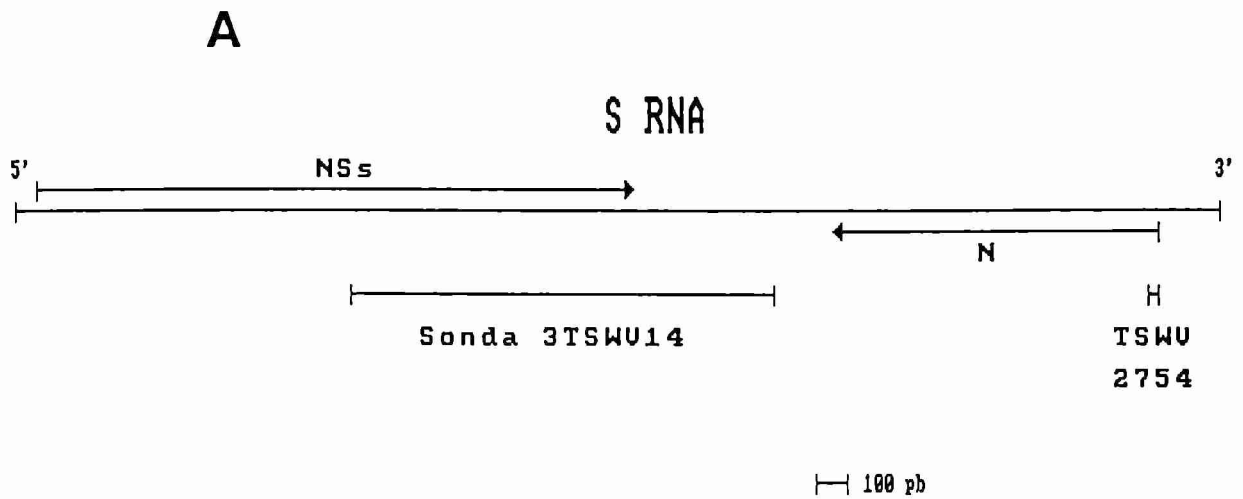
3.1.1. Biblioteca de ADNc

Luego de la transformación de bacterias *E. coli* LE392 con los plásmidos recombinantes (sección 2.6.3) en un primer ensayo se obtuvieron un total de 326 colonias, correspondiendo 63 de ellas a la fracción de ADNc de 4 a 2kb. De las mismas, 37 provenían a la dilución 1/5 de la mezcla de ligación y las restantes a la misma mezcla sin diluir. Con la fracción de ADNc de 2 a 0,5kb, se obtuvieron 263 colonias, correspondiendo 149 a la dilución 1/5 de la mezcla de ligación y 114 a la mezcla sin diluir. Todas las colonias se transfirieron a un soporte sólido para ser prehibridadas e hibridadas (secciones 2.6.5. y 2.6.7.).

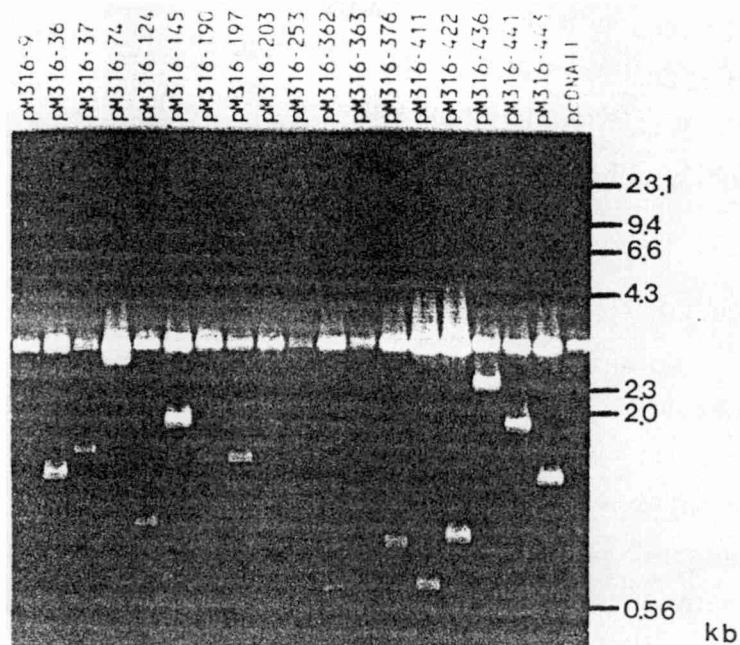
Luego de la hibridación con la sonda $_3$ TSWV14 marcada radiactivamente, se pudo identificar 8 colonias correspondientes al ARN S (clones pM316-9, 36, 37, 74, 145, 190, 197 y 203). Dicha sonda, de 1kb de longitud, proviene de un clon de ADNc obtenido anteriormente en nuestro laboratorio (Ronco *et al.*, 1989) y abarca al ARN S desde el nucleótido 838 hasta el 1868, es decir, una gran parte del ORF que codifica para la proteína NSs (Figura 9A). Debido a que dicha sonda no abarca al gen N, para la detección de los clones que contengan dicho gen, fue necesario lavar las membranas y rehibridarlas con un oligonucleótido específico, complementario al gen N, marcado radiactivamente. Ese oligonucleótido (TSWV 2754) es

Figura 9: A: Estrategia de hibridación utilizada para detectar clones correspondientes al ARN S del aislamiento M316.

B: Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de digestiones *Bam*HI/*Xho*I de clones correspondientes al ARN S del aislamiento M316. Marcador de peso molecular: *lambda*/*Hind*III.



B



complementario a los primeros 20 nucleótidos en sentido viral del ORF que codifica para la proteína N (Figura 9A). Este ensayo evidenció una única señal positiva con el clon 74, indicando que el ORF para la proteína N estaba incluido en ese clon. Posteriormente, se volvieron a transformar bacterias competentes de la cepa LE392, con 2 μ l de la mezcla de ligación diluída 1/5 y sin diluir, correspondiente a la fracción de 2 a 0,5kb. Se obtuvieron así 295 colonias adicionales. En este caso, para la hibridación de las mismas se utilizó como sonda el inserto del clon 74, marcado radiactivamente. Este ensayo permitió detectar aquellos clones con insertos de menor longitud correspondientes al gen N, que no pudieron identificarse hibridando con las otras 2 sondas. De esta manera se obtuvo señal positiva en 10 clones más: pM316-124, 253, 362, 363, 376, 411, 422, 436, 441 y 443, además de los ocho clones anteriores que habían dado positivos con la sonda $_3$ TSWV14. En resumen, se obtuvieron un total de 622 colonias, de las cuales 18 correspondieron al ARN S. Once de ellas contenían al menos una parte del gen N y uno de ellas el gen N completo (clon pM316-74).

Para estimar el tamaño de cada inserto, se purificó ADN plasmídico de cada uno de los clones, se lo digirió con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I en forma combinada para liberar el inserto y se determinó el tamaño de los mismos por electroforesis en gel de agarosa (Figura 9B). La tabla 2 muestra, para cada uno de los 18 clones, el tamaño del inserto correspondiente. Puede notarse que el clon 74 contiene un inserto cuya longitud es de alrededor de 2,6kb. Teniendo en cuenta que la longitud del ARN S es de 3100nt, es evidente que el clon pM316-74 no sólo contenía el gen N completo sino también una fracción importante del NSs.

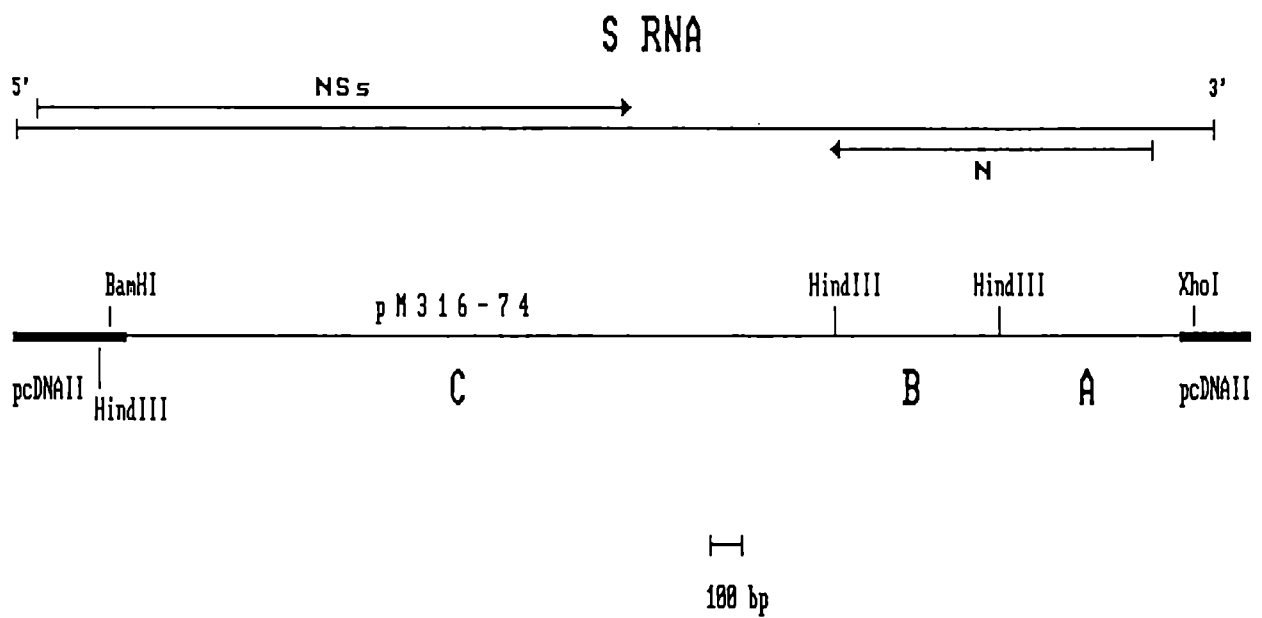
3.1.2. Secuenciación de extremos del clon pM316-74

Con la finalidad de conocer tanto el tamaño como la fracción del ARN S clonado, se secuenciaron alrededor de 150pb de cada extremo del clon pM316-74. Las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia correspondiente al ARN S completo del aislamiento CPNH1 (BR-01) de TSWV (De Haan *et al.*, 1990). De este modo se determinó que el inserto tiene un tamaño de 2570pb, quedando excluidos del mismo 430pb del extremo 5' del ARN S en el ORF de la proteína NSs, y 100pb del extremo 3' de la cadena viral (Figura 10). Simultáneamente, De Avila *et al.* (1993), publicaban la secuencia del gen N de otras dos especies de

Tabla 2: Tamaño de inserto de clones correspondientes al ARN S del aislamiento M316, estimados por electroforesis en gel de agarosa 0,8%.

Clones	Tamaño (kb)
pM316-9	0,48
pM316-36	1,15
pM316-37	1,4
pM316-74	2,6
pM316-124	0,9
pM316-145	1,65
pM316-190	0,5
pM316-197	1,35
pM316-203	0,5
pM316-253	0,65
pM316-362	0,55
pM316-363	0,7
pM316-376	0,7
pM316-411	0,5
pM316-422	0,7
pM316-436	2,0
pM316-441	1,45
pM316-443	1,05

Figura 10: Diagrama del clon pM316-74 referido al fragmento del ARN S, con los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para la liberación del inserto (*Bam*HI/*Xho*I) y para el subclonado de los fragmentos a y b (*Hind*III).



Tospovirus (GRSV y TCSV que se sumaban a las ya publicadas, TSWV e INSV) (De Haan *et al.*, 1990; 1992a). En el alineamiento de la secuencia del clon pM316-74 contra cada una de esas secuencias dicho clon correspondería a la especie GRSV, dado el mayor porcentaje de identidad con dicha secuencia. Para la secuenciación del gen N completo fue necesario subclonar el inserto de pM316-74.

3.1.3. Subclonado del clon pM316-74

Para subclonar el inserto se buscaron enzimas de restricción cuyos cortes produjeran fragmentos de menor tamaño. Utilizando la secuencia del gen N de la especie GRSV (De Avila *et al.*, 1993), y analizándola con la subrutina MAP del paquete GCG de la Universidad de Wisconsin (Devereaux *et al.*, 1984), se encontró que dentro del ARN S había sólo dos secuencias de reconocimiento para la enzima *Hind*III. Esas dos secuencias estaban ubicadas en las posiciones 488 y 976 a partir del extremo 3' de la cadena viral, correspondiendo ambos sitios a la secuencia del gen N. La digestión del inserto con *Hind*III, sumada a *Bam*HI/*Xho*I para escindirlo del plásmido rendiría, por lo tanto, tres fragmentos: 408pb (*Xho*I/*Hind*III) (A), 488pb (*Hind*III/*Hind*III) (B) y 1722pb (*Hind*III/*Bam*HI) (C) (Figura 10). Es importante mencionar que el único sitio *Hind*III del vector se encuentra a 18bp del sitio *Bam*HI. En base a estos resultados se diseñó la estrategia de subclonado. Se digirió ADN del clon pM316-74 con *Hind*III y luego de una electroforesis en gel de agarosa 0,8%. se visualizaron tres bandas: banda 1, de alrededor de 3500bp (vector más fragmento A), banda 2, de alrededor de 1900bp (fragmento C) y banda 3, de alrededor de 500bp (fragmento B) (Figura 11). Los fragmentos de interés quedaban incluidos en las bandas 1 y 3, se extrajo las mismas del gel y se las purificó como en la sección 2.6.2. El ADN obtenido de la banda 1 se puso a religar, se transformaron bacterias competentes y se obtuvo el clon pM316-74a. El ADN de la banda 3 se ligó al plásmido pUC9, se transformaron bacterias competentes y se obtuvo el clon pM316-74b.

Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de la digestión de ADN del plásmido recombinante pM316-74 con *Hind*III. Banda 1: vector más fragmento A; Banda 2: fragmento C y Banda 3: fragmento B. Marcador de peso molecular: λ /*Hind*III.



3.1.4. Identificación de clones del gen N mediante digestión con enzimas de restricción

Dado el análisis de sitios de restricción descrito en la sección anterior, una digestión triple *Bam*HI/*Xho*I/*Hind*III del ADN de todos los clones correspondientes al ARN S permitiría identificar, como correspondientes al gen N, aquéllos que mostrasen un patrón diferente del de la digestión *Bam*HI/*Xho*I. Dicha diferencia significaría que la enzima *Hind*III corta el inserto y por lo tanto incluye, al menos una parte, de ese gen. Para tal fin, se digirieron todos los clones, incluido el pM316-74 con dicha combinación de enzimas y en una electroforesis en gel de agarosa se pudo identificar que además del clon pM316-74, los clones pM316-362, 422 y 436 contenían fragmentos del gen N (Figura 12).

3.1.5. Secuenciación

Los clones pM316-74A y B se secuenciaron en su totalidad, así como los extremos de los clones pM316-362, 422 y 436. La estrategia de secuenciación seguida se muestra en la figura 13, en tanto que en la figura 14 se observa la secuencia de ARN de todo el gen N (secuencias de los subclones pM316-74a más b). El alineamiento de las regiones de superposición de la secuencia de nucleótidos entre los cuatro clones (pM316-74, 362, 422 y 436), mostró que dichas porciones son idénticas entre ellas (Figura 15).

3.1.6. Análisis de secuencias

Mediante la subrutina TRANSLATE se obtuvo el producto proteico predicho, a partir de la secuencia del gen N. Ambas secuencias (ARN y proteína) se alinearon de a pares con sus contrapartes de los aislamientos BR-01 (TSWV), BR-03 (TCSV), SA-05 (GRSV) y NL-07 (INSV)(De Avila *et al.*, 1993) utilizando la subrutina GAP. A través de los valores de similitud e identidad de dichos alineamientos tanto para las secuencias de ARN como para las de proteína, se puede comparar, visualmente, el grado de diferencias existente entre las secuencia del gen N del aislamiento M316 y la mismas secuencias de cada uno de los

Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de digestiones *Bam*HI/*Xho*I/*Hind*III de todos los clones correspondientes al ARN S. Marcador de peso molecular: *lambda*/*Hind*III.

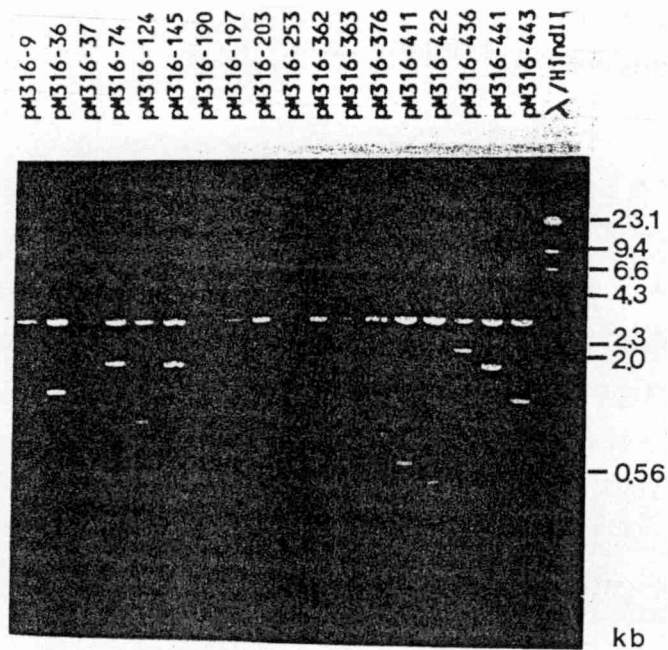


Figura 13: Estrategia de secuenciación de los clones correspondientes al gen N del aislamiento M316. Las flechas indican el fragmento secuenciado de cada inserto.

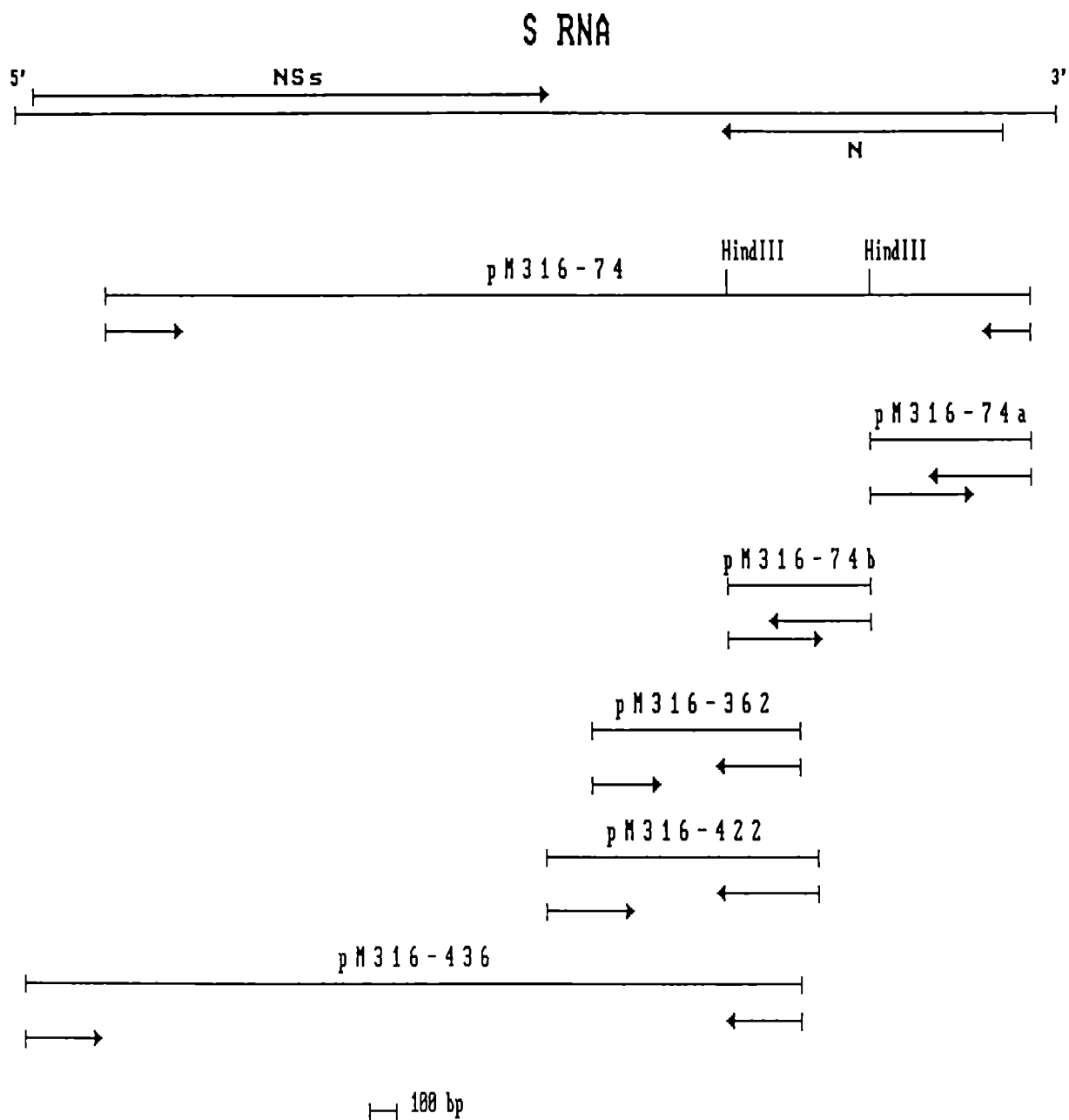


Figura 14: Secuencia de ARN del gen N del clon pM316-74 y producto proteico predicho expresado en código de una letra. Los codones de iniciación y terminación en el ARN y el sitio potencial de glicosilación en el péptido están resaltados con negrita.

```

1 CAUCACAUUAACAGGAUAAGUAACGACCGCGGUCUACAGUGUUGCACUUUCACCUUGA 60
61 AUCUUAUCUCUCGGGAAAGGUCUAGAUCUAAACUACCACCAUGUCUAAGGUCAAGCUCAC 120
      M S K V K L T
121 AAAAGAAAACAUUGUCUCUCUUUUAACUCAUUCUGCAGAUGUUGAGUUUGAAGAAGACCA 180
      K E N I V S L L T Q S A D V E F E E D Q
181 GAACCAGGUCGCAUUCAACUUUAAGACUUUCUGUCAGGAAAACUUGACCUGAUUAAGAA 240
      N Q V A F N F K T F C Q E N L D L I K K
241 AAUGAGUAUCACUUCAUGUUUGACUUUCUUGAAGAAUCGCCAAAGCAUCAUGAAAGUUGU 300
      M S I T S C L T F L K N R Q S I M K V V
301 GAACCAAAGUGAUUUUACUUUUGGCAAGGUCACGAUAAAGAAAAAUUCUGAGAGAGUUGG 360
      N Q S D F T F G K V T I K K N S E R V G
361 AGCUAAAGAUUAGACUUUCAGAAGGCUUGAUAGCAUGAUUAGAGUGAAGCUCAUAGAAGA 420
      A K D M T F R R L D S M I R V K L I E E
421 GACUGCAAACAAUGAGAAUCUAGCUAUCAUCAAGGCAAAAUUGCCUCCCACCCUUUGGU 480
      T A N N E N L A I I K A K I A S H P L V
481 CCAAGCUUACGGGCUGCCUUUGGCAGAUGCAAAAUCUGUGAGACUUGCUAUAAUGCUUGG 540
      Q A Y G L P L A D A K S V R L A I M L G
541 AGGUAGUAUCCUCUCAUUGCUUCUGUUGACAGCUUCGAAAUGAUCAGUGUUGUUCUUGC 600
      G S I P L I A S V D S F E M I S V V L A
601 CAUAUAUCAGGAUGCAAAGUACAAGGAGUUAGGGAUUGAACCGACUAAGUAUAACACUAA 660
      I Y Q D A K Y K E L G I E P T K Y N T K
661 GGAAGCUCUGGGGAAGGUUUGCACAGUGCUUAAAAGUAAAGGAUUUACAAUGGAUGAUGC 720
      E A L G K V C T V L K S K G F T M D D A
721 ACAGAUAAACAAAGGGAAAGAAUAUGCUAAGAUACUCAGUUCUUGCAAUCCCAAUGCUAA 780
      Q I N K G K E Y A K I L S S C N P N A K
781 GGAAGCAUUGCUAUGGACUAUUACAGUGACAAUCUUGACAAGUUCUAUGAAAUGUUUGG 840
      G S I A M D Y Y S D N L D K F Y E M F G
841 AGUCAAGAAAGAGGCCAAGAUUGCUGGUGUUGCAUAAAGCUU 882
      V K K E A K I A G V A *

```

Figura 15: Alineamiento de las regiones de superposición entre los clones pM316-362, 422 y 436, y el clon pM316-74.

```

601                                     650
pM316-422 ..... agtt agggattgaa ccgactaagt
pM316-74  catatatcag gatgcaaagt acaaggagtt agggattgaa ccgactaagt
pM316-362
pM316-436

651                                     700
pM316-422 ataacactaa ggaagctctg ggaaggttt gcacagtgct taaaagtaaa
pM316-74  ataacactaa ggaagctctg ggaaggttt gcacagtgct taaaagtaaa
pM316-362
pM316-436                .ggaaggttt gcacagtgct taaaagtaaa

701                                     750
pM316-422 ggatttaciaa tGGATGATGC ACAGATAAAC AAAGGGAAAG AATATGCTAA
pM316-74  ggatttaciaa tGGATGATGC ACAGATAAAC AAAGGGAAAG AATATGCTAA
pM316-362 ggatttaciaa tGGATGATGC ACAGATAAAC AAAGGGAAAG AATATGCTAA
pM316-436                .GGATGATGC ACAGATAAAC AAAGGGAAAG AATATGCTAA

751                                     800
pM316-422 GATACTCAGT TCTTGCAATC CCAATGCTAA GGAAGCATT GCTATGGACT
pM316-74  GATACTCAGT TCTTGCAATC CCAATGCTAA GGAAGCATT GCTATGGACT
pM316-362 GATACTCAGT TCTTGCAATC CCAATGCTAA GGAAGCATT GCTATGGACT
pM316-436 GATACTCAGT TCTTGCAATC CCAATGCTAA GGAAGCATT GCTATGGACT

801                                     850
pM316-422 ATTACAGTGA CAATCCTGAC AAGTTCTATG AAAT.....
pM316-74  ATTACAGTGA CAATCCTGAC AAGTTCTATG AAATgtttgg agtcaagaaa
pM316-362 ATTACAGTGA CAATCCTGAC AAGTTCTATG AAATgtttgg agtcaagaaa
pM316-436 ATTACAGTGA CAATCCTGAC AAGTTCTATG AAATgtttgg agtcaagaaa

851                                     882
pM316-422 ..... ..
pM316-74  gaggccaaga ttgctggtgt tgcataaagc tt
pM316-362 gaggccaaga ttgctggtgt tgcataaagc tt
pM316-436 gaggccaaga ttgctggtgt tgcataaagc tt

```

aislamientos de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 3, pudiendo observarse el mayor porcentaje de similitud de secuencias corresponde a los aislamientos M316 y el SA-05 (GRSV).

3.1.7. Análisis proteico (SDS-PAGE y Western blot)

La movilidad electroforética de la proteína N del aislamiento M316 correspondió, estimativamente, a la misma proteína en los aislamientos de referencia. Si bien la proteína N de los aislamientos BR-03 y NL-07 (28,677 y 28kDa) es más pequeña que la de los aislamientos BR-01 y SA-05 (28,8 y 28,836kDa), no fue posible detectar diferencias entre ellos y con el aislamiento M316 en las condiciones ensayadas. Restaba confirmar la especificidad de la proteína mediante western blot. Dicho ensayo mostró la máxima reactividad de la proteína N de M316 con el antisuero correspondiente a la especie GRSV (Figura 16). Es importante resaltar que la misma proteína, analizada con los antisueros correspondientes a las especies TSWV y TCSV, mostró reactividad con ambos, siendo mayor con la primera que con la segunda.

3.1.8. Análisis proteico (DAS-ELISA)

Se analizaron diluciones seriadas de extracto de hojas infectadas sistémicamente con el aislamiento M316 por pruebas de DAS-ELISA y se detectó la máxima reactividad de dicho aislamiento con el antisuero correspondiente a la especie GRSV (Figura 17). En este ensayo se volvió a encontrar reactividad del antígeno con los antisueros contra las especies TSWV y TCSV, siendo mayor la primera que la segunda. Es importante mencionar que pese a que los resultados concuerdan cualitativamente con los obtenidos mediante secuenciación, existe, desde el punto de vista cuantitativo, una fuente potencial de error dada por la diferencia de título viral en los extractos de hoja y por la falta de una titulación precisa de los antisueros.

Tabla 3: Porcentajes de similitud e identidad entre las secuencias de ARN y proteína del aislamiento M316 y los aislamientos BR-01 (TSWV), BR-03 (TCSV), SA-05 (GRSV) y NL-07 (INSV).

Clon pM316 - 74			
	ARN		PROTEINA
	%	%	%
	IDENTIDAD	IDENTIDAD	SIMILITUD
TSWV	75,5	79,5	91,0
GRSV	<u>95,4</u>	<u>95,4</u>	<u>96,0</u>
TCSV	82,0	84,5	91,0
INSV	57,7	55,5	69,4

Figura 16: Análisis por *western blot* del aislamiento M316 usando antisueros contra las cuatro especies descritas de *Tospovirus*. Calle 1: M316/antiTSWV; calle 2: BR-01/antiTSWV; calle 3: M316/antiTCSV; calle 4: BR-03/antiTCSV; calle 5: M316/antiGRSV; calle 6: SA-05/antiGRSV; calle 7: M316/antiINSV y calle 8: NL-07/antiINSV. M: marcador de peso molecular.

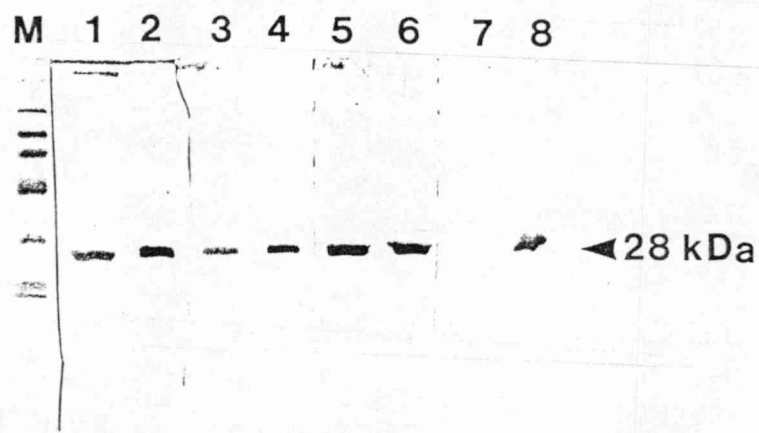
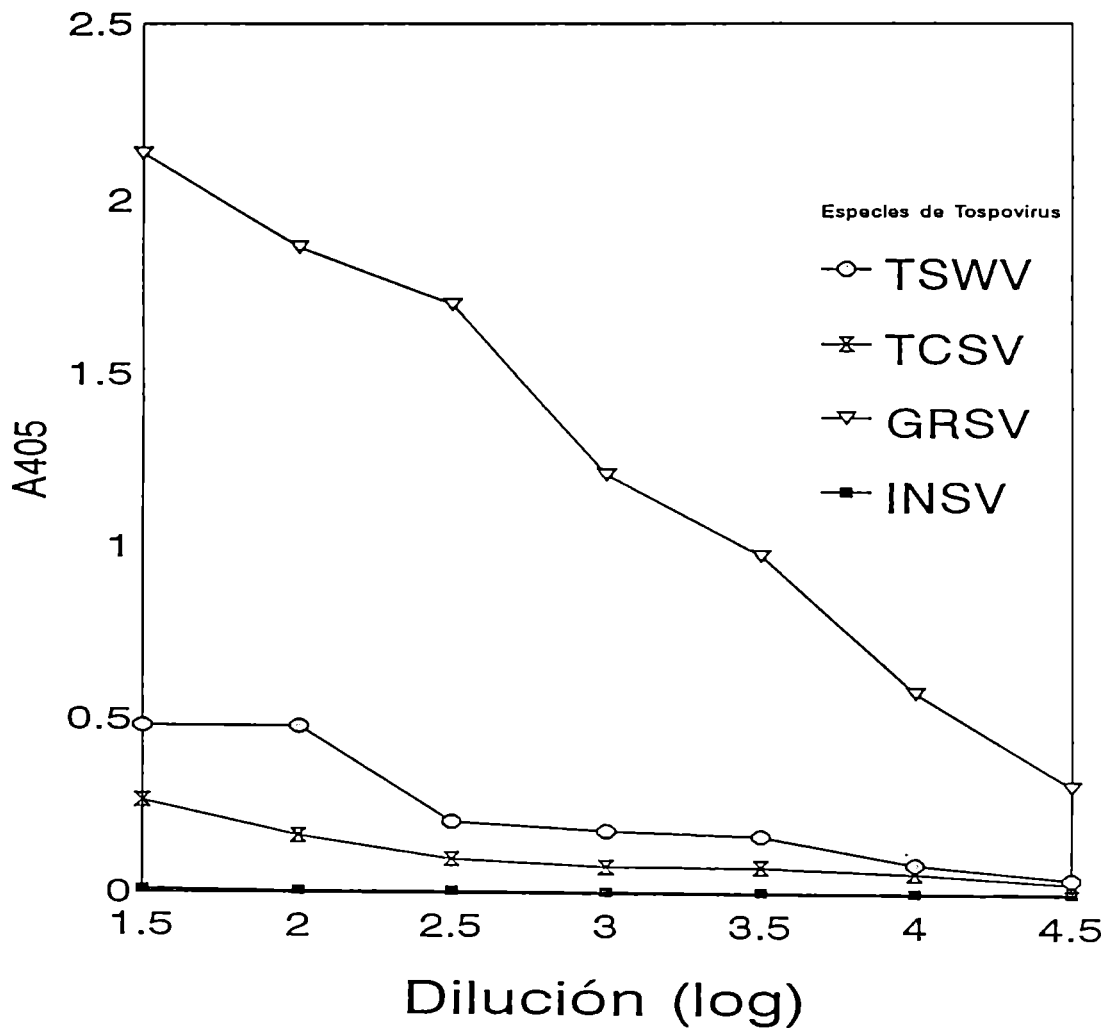


Figura 17: Análisis serológico, por DAS-ELISA, de diluciones crecientes de extracto de planta infectada con el aislamiento M316, con los antisueros de las cuatro especies descritas.

M316



3.1.9. Microscopía electrónica

El análisis del aislamiento M316 al microscopio electrónico mostró partículas virales esféricas, típicas de *Tospovirus*. Dichas partículas se encontraron dentro de la luz del retículo endoplásmico (Figura 18A). Además, se observó acúmulos densos de material fibrilar, correspondiente a la proteína NSs (Figura 18B).

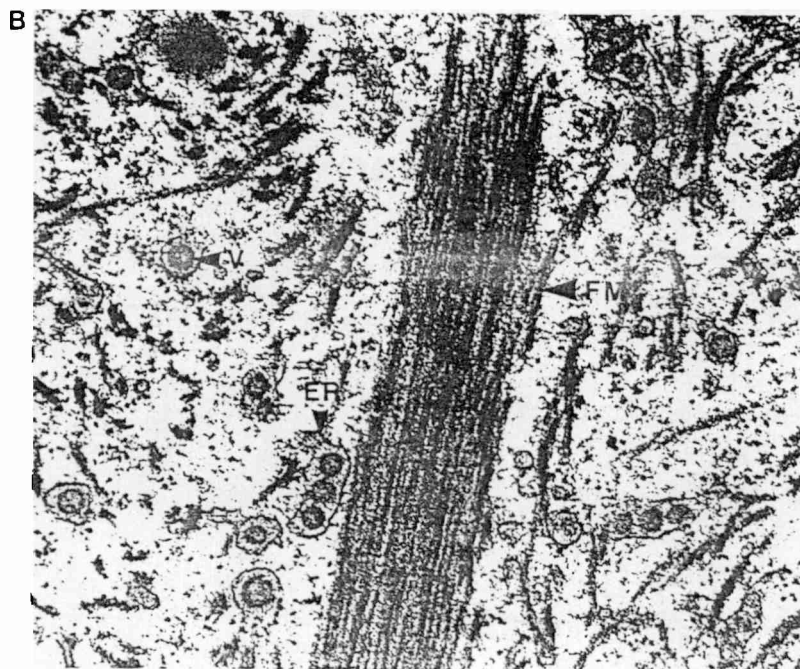
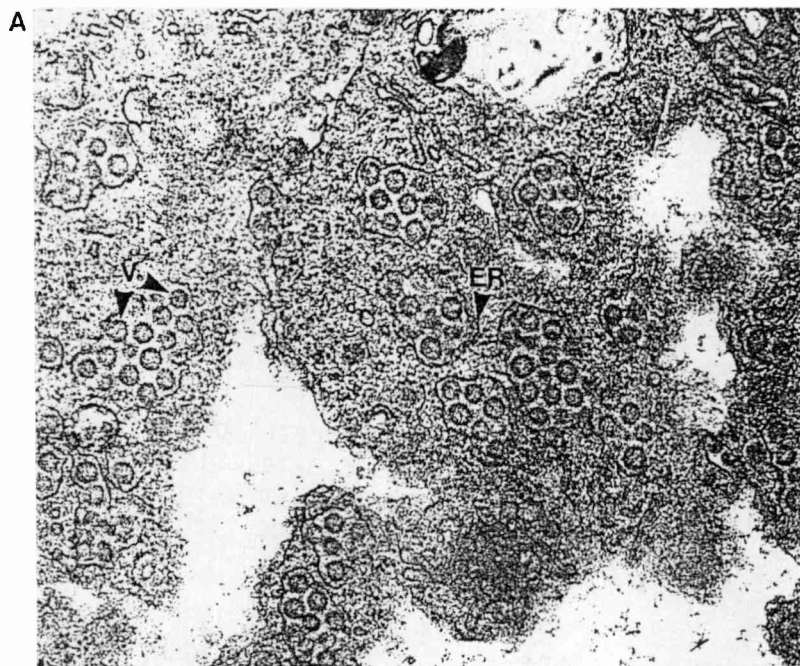
3.2. Caracterización de aislamientos de distintas regiones del país

Dada la poca información existente referida a la diversidad de los *Tospovirus* no sólo en Argentina sino también en el resto del mundo, se hizo necesario investigar dicha diversidad sobre todo desde el punto de vista molecular. Para realizar esa tarea, fue necesario aplicar un método rápido que permitiera analizar un gran número de muestras y así poder determinar a corto plazo la existencia en el país de una o varias especies de *Tospovirus*. En este caso, el método de elección fue el de amplificación por medio de RT-PCR; clonado de los fragmentos de amplificación y secuenciación del inserto de los clones obtenidos. Los resultados mediante caracterización molecular sobre la correspondencia de los diferentes aislamientos a las distintas especies, fueron corroborados mediante análisis serológicos y de microscopía electrónica. Por otra parte, en base a los resultados obtenidos se pudo generar un método más rápido y preciso de identificación y diagnóstico de especies de *Tospovirus*.

3.2.1. Diseño de oligonucleótidos

El oligonucleótido designado como *primer* 1 corresponde a una región muy conservada entre todas las especies de *Tospovirus* y fue descrito por De Avila *et al.* (1993). Era necesario, por lo tanto, diseñar otro oligonucleótido que permitiera amplificar, al menos una parte, del gen N. Para tal fin, se alinearon las secuencias correspondientes a dicho gen de las cuatro especies descritas (TSWV, GRSV, TCSV e INSV) (De Avila *et al.*, 1993) y así buscar una región conservada entre las mismas. Se encontró que una secuencia de alrededor de 20nt de longitud, situada a 450nt del *primer* 1, cumplía con ese requisito (Figura 19). Dicha secuencia era igual

Figura 18: Análisis de secciones ultrafinas del aislamiento M316. (A) partículas de *Tospovirus* típicas. (B) acumulación de material fibrilar. V: partículas virales; ER: retículo endoplásmico; FM: material fibrilar.



para las cuatro especies salvo en las posiciones 6 que podía ser C o T, 10 (G o T) y 15 (A o G). Si bien esas diferencias no estaban ubicadas en regiones críticas para la función del *primer* en la reacción de PCR, se decidió poner en esas posiciones las dos alternativas posibles. Así se disminuirían los posibles problemas por mala asociación (*annealing*) de los *primers*. El oligonucleótido a elegir debía amplificar una zona en la que los porcentajes de identidad de nucleótidos, en posteriores análisis de secuencias, fuesen predictivos de la identidad de la secuencia completa del gen N. Para tal fin, se tomó la secuencia de ARN del gen N correspondiente a los primeros 450nt del aislamiento M316 (sección 3.1.5), se alineó con el mismo gen de las cuatro especies descritas y se obtuvieron los valores porcentuales de identidad y similitud (Tabla 4). Si comparamos los porcentajes de similitud e identidad mostrados en esa tabla con los de la tabla 3 (comparación del gen N entero del aislamiento M316), observamos que los valores son similares. Por lo tanto, el hecho de trabajar sólo con la mitad del gen N es indicativo de lo que ocurrirá comparando la secuencia entera del mismo gen. Por otra parte, se analizaron las posibilidades tanto de formación de estructura secundaria del oligonucleótido como de asociación con el *primer* 1 y se comprobó que no podían ocurrir. De este modo se estimó que la secuencia indicada en la sección 2.7.1 para utilizar como *primer* 2, era un oligonucleótido útil para lograr los objetivos propuestos.

3.2.2. RT-PCR

Mediante la generación de ADNc y posterior amplificación por PCR de los mismos, se detectó para todos los aislamientos analizados la banda predicha de alrededor de 450bp (Figura 20).

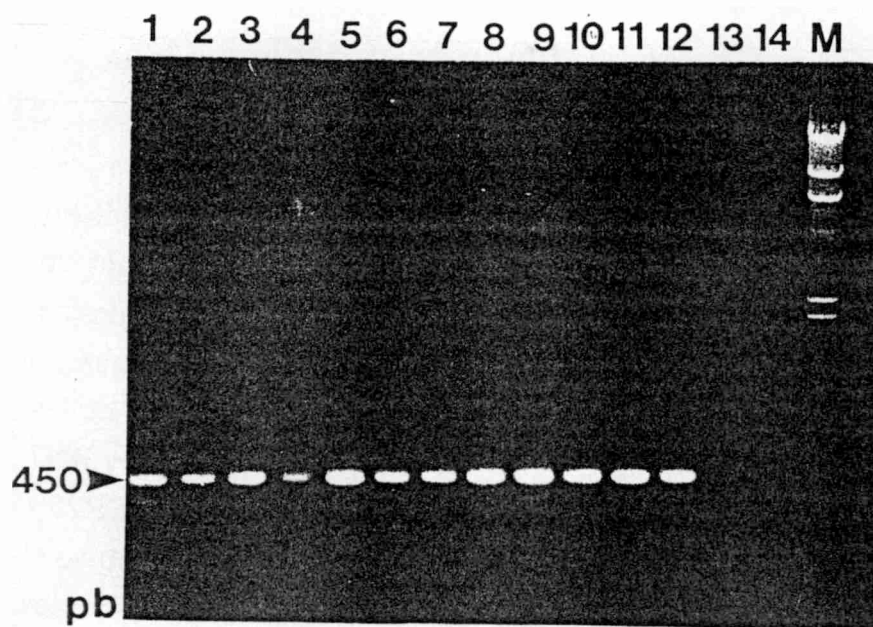
3.2.3 Clonado y secuenciación de fragmentos de PCR

En los ensayos de ligación de fragmentos de PCR (sección 3.2.2) a plásmidos pGEM-T y posterior transformación de bacterias DH5 α se obtuvieron para cada aislamiento entre 10 y 100 colonias totales. Se corroboró la presencia del inserto, por PCR, en las colonias blancas y celeste claro. De cada aislamiento se obtuvieron

Tabla 4: Porcentajes de similitud e identidad entre las secuencias de ARN y proteína de un fragmento de 450bp del gen N del aislamiento M316 y las de los aislamientos BR-01 (TSWV), BR-03 (TCSV), SA-05 (GRSV) y NL-07 (INSV).

pM316 - 74 -450bp-			
	%	%	%
	IDENTIDAD	IDENTIDAD	SIMILITUD
	ARN	PROTEINA	
TSWV	75,1	80,2	89,6
GRSV	<u>97,2</u>	<u>96,9</u>	<u>97,9</u>
TCSV	81,8	80,2	88,5
INSV	57,7	65,6	72,9

Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los productos de amplificación por RT-PCR de los aislamientos argentinos de *Tospovirus*. calle 1: M23; calle 2: M28; calle 3: M316; calle 4: LP2; calle 5: LP87; calle 6: LP940; calle 7: LP941; calle 8: T101; calle 9: T102; calle 10: ER25; calle 11: ER30; calle 12: ER36; calle 13: planta sana; calle 14: mezcla de reacción sin molde. M: Marcador de peso molecular (*lambda/HindIII*).



de 1 a 5 clones que contenían el inserto de interés. Los clones positivos seleccionados para secuenciar a partir de cada aislamiento fueron los siguientes: pM23-11; pM28-1; pM316-1; pLP2-13; pLP87-1; pLP940-8; pLP941-6; pT101-1; pT102-2; pER25-6; pER30-7; pER36-93; pRN5-1 y pRN7-35. A dichos clones se les extrajo ADN plasmídico y se los secuenció. Todos los clones positivos se almacenaron en 20% glicerol a -135°C.

De los insertos de los clones citados anteriormente, se secuenciaron alrededor de 230 a 250nt de cada extremo. Es decir que, para cada uno de los insertos, sólo se superpuso la lectura en la parte central de la secuencia. Las secuencias correspondientes a cada aislamiento y su producto proteico predicho se muestran en las figuras 21 a 27.

3.2.4. Análisis de secuencias

De todas las secuencias obtenidas se obtuvo el producto proteico predicho utilizando la subrutina TRANSLATE (Figuras 21 a 27). Tanto las secuencias de ARN como las de proteínas predichas se alinearon de a pares con las publicadas de las cuatro especies descritas. Dichos alineamientos arrojaron los valores que se muestran en la tabla 5A y B, y sugieren la presencia en Argentina de tres de las cuatro especies descritas [aislamientos M23, M28, M316, T101, T102, RN5 y RN7 (GRSV) (Tabla 5A); LP2, LP87, LP940, LP941 y ER30 (TSWV) (Tabla 5B); ER25 y ER36 (TCSV) (Tabla 5B)]. Por otra parte, utilizando la subrutina MAP se obtuvo el mapa de restricción de todas las secuencias analizadas incluidas las de los aislamientos BR-01, BR-03, SA-05 y NL-07.

3.2.5. Detección de especies de *Tospovirus* mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) de fragmentos de amplificación.

El análisis de los mapas de restricción de los fragmentos de ADNc amplificados en todos los aislamientos, incluidos los de referencia, permitió seleccionar aquellas enzimas de restricción cuyos sitios de corte permitieran obtener patrones de bandas diferenciales y específicos. Este ensayo permitiría identificar las especies de *Tospovirus* sin necesidad de secuenciación. Se hallaron dos enzimas cuyos cortes en

Figura 21: Secuencia de ARN del fragmento de 450bp amplificado por PCR y el producto proteico predicho de los aislamientos M23 (A) y M28 (B). En negrita se muestra el codon de iniciación y la secuencia potencial de N-glicosilación.

A

1 AGAGCAAUUAUGUCAAUUUUAUUCGAAAACCUAUACUCAGCAAUACAAA
 51 UCAUCACAUUAACAGGAUAAGUAACGACCGCGGUCUACAGUGUUGCACUU
 101 UCUCACCUUGAAUCUUAUCUCUCGAGAAAGGUCUAGAUCUAAACUACCAC
 M S K V K L T K E N I V S L L T Q
 151 CAUGUCUAAGGUCAAGCUCACAAAAGAAAACAUGUCUCUCUUUUAACUC
 S A D V E F E E D Q N Q V A S N
 201 AAUCUGCAGAUGUUGAGUUUGAAGAAGACCAAACCAGGUUGCAUCCAAC
 F K T F C Q E N L D L I K K M S I
 251 UUUAAAACUUUCUGUCAGGAAAUCUUGACCUGAUUAAGAAAUGAGUAU
 T S C L T F L K N R Q S I M K V V
 301 CACUUCAUGUUUGACUUUCCUGAAGAAUCGCCAAAGCAUCAUGAAAGUUG
 S Q S D F T F G K V T I K K N S
 351 UGAGCCAAAGUGAUUUUACUUUUGGCAAGGUCACGAUAAAGAAAAAUUCU
 E R V G A K D M T F R R L
 401 GAGAGAGUUGGAGCUAAAGACAUGACCUUCCGAAGACUUGA

B

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAAAACCUAUACUCAGCAAUACAAA
 51 UCAUCACAUUAACAGGAUAAGUAACGACCGCGGUCUACAGUGUUGCACUU
 101 UCUCACCUUGAAUCUUAUCUCUCGAGAAAGGUCUAGAUCUAAACUACCAC
 M S K V K L T K E N I V S L L T Q
 151 CAUGUCUAAGGUCAAGCUCACAAAAGAAAACAUGUCUCUCUUUUAACUC
 S A D V E F E E D Q N Q V A F N
 201 AAUCUGCAGAUGUUGAGUUUGAAGAAGACCAAACCAGGUUGCAUCCAAC
 F K T F S Q E N L D L I K K M S I
 251 UUUAAAGACUUUCAGUCAGGAAAUCUUGACCUGAUUAAGAAAUGAGUAU
 T S C L T F L K N R Q S I M K V V
 301 CACUUCAUGUUUGACUUUCUUGAAGAAUCGCCAAAGCAUCAUGAAAGUUG
 N Q S D F T F G K V T I K K N S
 351 UGAACCAAAGUGAUUUUACUUUUGGUAAGGUCACGAUAAAGAAAAAUUCU
 E R V G A K D M T F R R L
 401 GAGAGAGUUGGAGCUAAAGACAUGACCUUCCGAAGGCUUGA

Figura 22: Secuencia de ARN del fragmento de 450bp amplificado por PCR y el producto proteico predicho de los aislamientos M316 (A) y T101 (B). En negrita se muestra el codon de iniciación y la secuencia potencial de N-glicosilación.

A

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAAAACCUAAUACUCAGCAAUACAAA
 51 UCAUCACAUUAACAGGAUAAGUAACGACCGCGGUCUACAGUGUUGCACUU
 101 UCUCACCUUGAAUCUUAUCUCUCGGGAAAGGUCUAGAUCUAAACUACCAC
 M S K V K L T K E N I V S L L T Q
 151 CAUGUCUAAGGUCAAGCUCACAAAAGAAAACAUGUCUCUCUUUUAACUC
 S A D V E F E E D Q N Q V A F N
 201 AAUCUGCAGAUGUUGAGUUUGAGAAGACCAGAACCAGGUCGCAAUUCAAC
 F K T F C Q E N L D L I K K M S I
 251 UUUAAAGACUUUCUGUCAGGAAAUCUUGACCUGAUUAAGAAAUGAGUUA
 T S C L T F L K N R Q S I M K V V
 301 CACUUCAUGUUUGACUUUCUUGAAGAAUCGCCAAAGCAUCAUGAAAGUUG
 N Q S D F T F G K V T I K K N S
 351 UGAACCAAAGUGAUUUUACUUUUGGCAAGGUCACGAUAAAGAAAAAUUCU
 E R V G A K D M T F R R L
 401 GAGAGAGUUGGAGCUAAAGAUUGACCUUCCGAAGACUUGA

B

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAAAACCUAAUACUCAGCAAUACAAA
 51 UCAUCACAUUAACAGGAUAAGUAACGACCGCGGUCUACAGUGUUGCACUU
 101 UCUCACCUUGAAUCUUAUCUCUCGAGAAAGGUCUAGAUCUAAACUACCAC
 M S K V K L T K E N I V S L L T Q
 151 CAUGUCUAAGGUCAAGCUCACAAAAGAAAACAUGUCUCUCUUUUAACUC
 S A D V E F E E D Q N Q V A F N
 201 AAUCUGCAGAUGUUGAGUUUGAAGAAGACCAAAACCAGGUCGCAUUCAAC
 F K T F C Q E N L D L I K K M S I
 251 UUUAAAGACUUUCUGUCAGGAAAUCUUGACCUGAUUAAGAAAUGAGUUA
 T S C L T F L K N H Q S I M K V V
 301 CACUUCAUGCUUGACUUUCUUGAAGAAUCACCAAAGCAUCAUGAAAGUUG
 N Q S D F T F G E V T I K K N S
 351 UGAACCAAAGUGAUUUUACUUUUGGUGAGGUCACGAUAAAGAAAAAUUCU
 E R V G A K D V T F R R L
 401 GAGAGAGUUGGAGCUAAAGACGUGACCUUCCGAAGACUUGA

Figura 23: Secuencia de ARN del fragmento de 450bp amplificado por PCR y el producto proteico predicho de los aislamientos T102 (A) y LP2 (B). En negrita se muestra el codon de iniciación y la secuencia potencial de N-glicosilación.

A

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAAAGCCUAAUACUCAGCAAUACAAA
 51 UCAUCACAUUAAACAGGAUAAGUAACGACCGCGGUCUACAGUGUUGCACUU
 101 UCUCACCUUGAAUCUUAUCUCUCGAGAAAGGUCUAGAUCUAAACUACCAC
 M S K V K L T K E N I V S L L T Q
 151 **CAUGUCUAAGGUC**AAGCUCACAAAGGAAAACAUUGUCUCUCUUUUAACUC
 S A D V E F E E D Q N Q V A F N
 201 AAUCUGCAGAUGUUGAGUUGAAGAAGACCAAACCAGGUCGCAAUUCAAC
 F K T F C Q E N L D L I K K M S I
 251 UUUAAAGACUUUCUGUCAGGAAAUCUUGACCUGAUUAAGAAAUGAGUAU
 T S C L T F L K N R Q S I M K V V
 301 CACUUCAUGCUUGACUUUCUUGAAGAAUCGCCAAAGCAUCAUGAAAGUUG
 N Q S D F T F G K V T I K K N S
 351 UGAACCAAAGUGAUUUUACUUUUGGUAAGGUCACGAUAAAGAAAAAUUCU
 E R V G A K D M T F R R L
 401 GAGAGAGUUGGAGCUAAAGACAUGACUUUCCGAAGACUUGA

B

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAACCUUAAACACUCAGUCUUACAAAU
 51 CAUCACAUUAAAACCCUAAGAAACGACUGUGGAAUACAGAGUUGUACUUG
 101 CGCACCUUGAAUACAUCGGUCAAGCAUUAACAACUUCUACGAUCAU
 M S K V K L T K E N I V A L L T Q
 151 **CAUGUCUAAGGUU**AAGCUCACUAAGGAAAACAUUGUUGCUUUGUUGACAC
 S K D L E F E E D Q N L V A F N
 201 AAAGCAAAGAUCUUGAAUUUGAGGAAGACCAGAAUCUGGUAGCAUUUAAAC
 F K T F C L E N L D Q T K K M S I
 251 UUCAAGACUUUUGUCUGGAAAACCUUGACCAGACCAAGAAGAUGAGCAU
 I S C L T F L K N R Q S I M K V I
 301 UAUUUCAUGUCUGACAUUCCUGAAGAAUCGCCAGAGUAUAAUGAAGGUUA
 K Q S D F T F G K I T I K K T S
 351 UUAAGCAAAGUGAUUUUACUUUUGGUAUAAUUAACCAUAAAGAAAACUUCA
 D K I G A T D M T F R R L
 401 GACAAGAUUGGAGCCACUGACAUGACUUUCCGAAGACUUGA

Figura 24: Secuencia de ARN del fragmento de 450bp amplificado por PCR y el producto proteico predicho de los aislamientos LP87 (A) y LP940 (B). En n grita se muestra el codon de iniciación.

A

```

1  AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAACCUAACACUCAGUCUUACAAAU
51  CAUCACAUUAAAACCCUAAGAAACGACUGCGGAAUACAGAGUUGUACUUG
101 CGCAUCUUGAAUUACAUACGGUCAAAAGCAUAUAACAACUUCUACGAUCAU
    M S K V K L T K E N I V A L L T Q
151 CAUGUCUAAGGUUAAGCUCACUAAGGAAAACAUUGUUGCUUUGUUGACGC
    S K D L E F E E D Q N L V A F N
201 AAAGCAAAGAUCUUGAAUUUGAGGAAGAUCAAGAAUCUGGUAGCAUUC AAC
    F K T F C L E N L D Q I K K M S I
251 UUCAAGACUUUUUGUCUGGAAAACCUUGACCAGAUC AAGAAGAUGAGCAU
    I S C L T F L K N R Q S I M K V I
301 UAUUUCAUGUCUGACAUUCCUGAAGAAUCGUCAGAGUAUAAUGAAGGUUA
    K Q S D F T F G K I T I K R T S
351 UUAAGCAAAGUGAUUUUACUUUUGGUA AAAAUUACCAUAAAGAGAACUUCG
    D R I G A T D M T F R R L
401 GACAGGAUUGGAGCCACUGACAUGACCUUCCGAAGACUUGA

```

B

```

1  AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAACCUAACACUCAGUCUUACAAAU
51  CAUCACAUUGAAACCCUAAGAAACGACUGCGGAAUACAGAGUUGUACUUU
101 CGCACCUUGAAUUACAUACGGUCAAAAGCAUAUAACAACUUCUACGAUCAU
    M S K V K L T K E N I V A L L T Q
151 CAUGUCUAAGGUUAAGCUCACUAAGGAAAACAUUGUUGCUUUGUUGACAC
    G K D L E F E E D Q N L A F N
201 AAGGCAAAGAUCUUGAAUUUGAGGAAGAUCAAGAAUCUGGUAGCAUUC AAC
    F K T F C L E N L D Q I K K M S I
251 UUCAAGACUUUUUGUCUGGAAAACCUUGACCAGAUC AAGAAGAUGAGCAU
    I S C L T F L K N R Q S I M K V I
301 UAUUUCAUGUCUGACAUUCCUGAAGAAUCGUCAGAGCAUAAUGAAGGUUA
    K Q S D F T F G K I T I K K T S
351 UUAAGCAAAGUGAUUUUACUUUUGGUA AAAAUUACCAUAAAGAAAACUUCA
    D R I G A T D M T F R R L
01  GACAGGAUCGGAGCUACUGACAUGACUUUCCGAAGACUUGA

```

Figura 25: Secuencia de ARN del fragmento de 450bp amplificado por PCR y el producto proteico predicho de los aislamientos LP941 (A) y ER25 (B). En negrita se muestra el codon de iniciación y la secuencia potencial de N-glicosilación.

A

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAACCUUAACACUCAGUCUUACAAU
 51 CAUCACAUAAAACCCUAAGAAACGACUGCGGAAUACAGAGUUGUACUUU
 101 CGCACCUUGAAUACAUAACGGUGAAAGCAUAUAACAACUUCUACGAUCAU
 M S K V K L T K E N I V A L L T Q
 151 CAUGUCUAAGGUAAAGCUCACUAAGGAAAACAUUGUUGCUUUGUUGACAC
 S K D L E F E E D Q N L V A F N
 201 AAAGCAAAGAUCUUGAAUUUGAGGAAGAUCAGAAUCUGGUAGCAUUC AAC
 F K T F C L E N L D Q I K K M S I
 251 UUCAAGACUUUUUGUCUGGAAAACCUUGACCAGAUCAAGAAGAUGAGCAU
 I S C L T F L K N R Q S I M K V I
 301 UAUUCAUGUCUGACAUCCUGAAGAAUCGCCAGAGUAUAUAUGAAGGUUA
 K R S D F T F G K I T I K K T S
 351 UUAAGCGAAGUGAUUUUACUUUUGGUA AAAAUACCAUAAAAGAAAACUUCA
 D R I G A T D M T F R R L
 401 GACAGGAUUGGAGCCACUGACAUGACUUUCCGAAGACUUGA

B

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAAAACAUACUACUCAGAAACACUAA
 51 UCAUCACAUUGCCAGGAUAAGUAACGACUUCGGUCUACAGAGCCGUACUU
 101 UCUUAUCUCGAAUCACAUCUCUCGAGAGCGGUCUAGAUCUACACUACUAA
 M S K V K L T R E N I I S L L T Q
 151 AAUGUCUAAGGUCAAGCUCACCAGAGAGAAACAUCAUCUCUCUUCU AACUC
 A G E I E F E E D Q N Q A A F N
 201 AGGCUGGAGAAAUUGAGUUUGAAGAAGAUCAAAACCAAGCUGCAUUC AAC
 F K T L C G E N L D S I K K M S I
 251 UUCAAAACUCUUUGUGGAGAAAACUUGAUUCAAUCAAGAAAUGAGCAU
 T S C L T F L K N R Q S I M K V V
 301 UACCUCAUGCUUGACUUUCCUGAAAAAUCGCCAGAGCAUCAUGAAAGUUG
 N Q S D F T F G K I T I K K T S
 351 UGAACCAGAGUGACUUUACUUUUGGAAAACACAAUCAAAAAGACUUCU
 G R V G A D D M T F R R L
 401 GGAAGGUUGGAGCUGAUGAUUGACCUUCCGAAGACUUGA

Figura 26: Secuencia de ARN del fragmento de 450bp amplificado por PCR y el producto proteico predicho de los aislamientos ER30 (A) y ER36 (B). En **negrita** se muestra el codon de iniciación y la secuencia potencial de N-glicosilación. .

A

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAACCUAACACUCAGUCUUACAAU
 51 CAUCACAUA AAAACCCUAAGAAACGACUGCGGAAUACAGAGUUGUACUUU
 101 CGCACCUUGAAUUA CAUACGGUCAAGCAUAUAACAACUUCUACGAUCAU
 M S K V K L T K E N I V A L L T Q
 151 **CAUGUCUAAGGUUAAGCUCACUAAGGAAAACA**UUGUUGCCUUGUUGACAC
 S K D L E F E E D Q N L V A F N
 201 AAAGCAAAGAUCUUGAAUUUGAGGAAGAU CAGAAUCUGGUAGCAUUUAAC
 F K T F C L E N L D Q I K K M S I
 251 UUCAAGACUUUUUGUCUGGAAAACCUUGACCAGAUCAAGAAGAUGAGCAU
 I S C L T F L K N R Q S I M K V I
 301 UAUUCAUGUCUGACA UCCUGAAGAAUCGUCAGAGUAUAUGAAGGUUA
 K Q S D F T F G K I T I K K T S
 351 UUAAGCAAAGUGAUUUUACUUUUGGUAAA AUACCAUAAAGAAAACCUCA
 D R I G A T D M T F R R L
 401 GACAGGAUUGGAGCUACUGACAUGACCUUCCGAAGACUUGA

B

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAAAACAUA CUACUCAGAAACACUAA
 51 UCAUCACA UUGCCAGGAUAAGUAACGACUUCGGUCUACAGAGCCGUACUU
 101 UCUUAUCUUGAAUCACAUCUCUCGAGAGCGGUCUAGAUCUACACUACUAA
 M S K V K L T R E N I I S L L T Q
 151 **AAUGUCUAAGGUCAAGCUCACCAGAGAGAACA**UCAUCUCUCUUCUUAACUC
 A G E I E F E E D Q N Q A A F N
 201 AGGCUGGAGAAA UUGAGUUUGAAGAAGAUCAA AACCAAGCUGCAUUCAAC
 F K T F C G E N L D S I K K M S I
 251 UUCAAGACUUUUUGUGGAGAAAUCUUGAUUCAAUCAAGAAAUGAGCAU
 T S C L T F L K N R Q S I M K V V
 301 UACCUCAUGCUUGACUUUCCUGAAAAAU CGCCAGAGCAUCAUGAAAGUUG
 N Q S D S T F G K I T I K K T S
 351 UGAACCAAAGUGACUCUACUUUUGGAAA AUCAAAUCAAAAAGACUUCU
 G R V G A D D M T F R R L
 401 GGAAGGUUGGAGCUGAUGAU AUGACCUUCCGAAGACUUGA

Figura 27: Secuencia de ARN del fragmento de 450bp amplificado por PCR y el producto proteico predicho de los aislamientos RN5 (A) y RN7 (B). En negrita se muestra el codon de iniciación y la secuencia potencial de N-glicosilación.

A

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAAACCUAAUACUCAGCAAUACAAAU
 51 CAUCACAUUAACAGGAUAAGUAACGACCGCGGUCUACAGUGUUGCACUUU
 101 CUCACCUUGAAUCUUAUCUCUCGAGAAAGGUCUAGAUCUAAACUACCACC
 M S K V K L T K E N I V S L L T Q
 151 **AUG**UCUAAGGUCAAGCUCACAAAAGAAAACAUUGUCUCUCUUUUAACUCA
 S A D V E F E E D Q N Q V A F N F
 201 AUCUGCAGAUGUUGAGUUUGAAGAAGACCAAACAGGUCGCAUUCAACU
 K T F C Q D N L D L I K K M S L
 251 UUAAGACUUUCUGUCAGGACAAUCUUGACCUGAUC AAGAAAUGAGUCUC
 T S C L T F L K N R Q S I M K V V
 301 ACUUCAUGUUUGACUUUCUUGAAGAAUCGCCAAAGCAUCAUGAAAGUUGU
 N Q S D F T F G K V T I K K N S E
 351 GAACCAAAGUGAUUUUACUUUUGGUAAGGUCACGAUAAAGAAAAUUCUG
 R V G A K D M T F R R L
 401 AGAGAGUUGGAGCUAAAGACAUGACUUUCCGAAGACUUGA

B

1 AGAGCAAUUGUGUCAAUUUUAUUCAAAACCUAAUACUCAGCAAUACAAA
 51 UCAUCACAUUAACAGGAUAAGUAACGACCGCGGUCUACAGUGUUGCACUU
 101 UCUCACCUUGAAUCUUAUCUCUCGAGAAAGGUCUAGAUCUAAACUACCAC
 M S K V K L T K E N I V S L L T Q
 151 **CAU**GUCUAAGGUCAAGCUCACAAAAGAAAACAUUGUCUCUCUUUUAACUC
 S A D V E F E E D Q N Q V A F N
 201 AAUCUGCAGAUGUUGAGUUUGAAGAAGACCAAACAGGUUGCAUUCAAC
 F K T F C Q E N L D L I K K M S I
 251 UUAAGACUUUCUGUCAGGAAAUCUUGACCUGAUUAAAGAAAUGAGUUAU
 T S C L T F L K N R Q S I M K V V
 301 CACUUCAUGUUUGACUUUCUUGAAGAAUCGCCAAAGCAUCAUGAAAGUUG
 N Q S D F T F G K V T I K K N S
 351 UGAACCAAAGUGAUUUUACUUUUGGUAAGGUCACGAUAAAGAAAAUUCU
 E R V G A K D M T F Q D L
 401 GAGAGAGUUGGAGCUAAAGACAUGACCUUCAAGACUUGA

Tabla 5A: Porcentajes de similitud e identidad de secuencias de RNA y aminácidos entre aislamientos argentinos de *Tospovirus* y aislamientos correspondientes las cuatro especies descritas: SA-05 (GRSV), BR-03 (TCSV), BR-01 (TSWV) y NL-07 (INSV). s: porcentaje de similitud. i: porcentaje de identidad.

	GRSV		TCSV		TSWV		INSV	
	ARN	aa	ARN	aa	ARN	aa	ARN	aa
	I	S	I	S	I	S	I	S
M23	<u>96</u>	<u>97</u>	83	86	75	89	59	72
M28	<u>97</u>	<u>98</u>	83	89	76	90	59	73
M316	<u>97</u>	<u>98</u>	82	88	75	89	59	73
T101	<u>96</u>	<u>97</u>	82	87	75	88	59	73
T102	<u>96</u>	<u>98</u>	82	88	75	90	59	73
RN5	<u>96</u>	<u>98</u>	83	88	76	89	58	73
RN7	<u>96</u>	<u>96</u>	83	86	76	87	59	71

Tabla 5B: Porcentajes de similitud e identidad de secuencias de RNA y aminoácidos entre aislamientos argentinos de *Tospovirus* y aislamientos correspondientes las cuatro especies descriptas: SA-05 (GRSV), BR-03 (TCSV), BR-01 (TSWV) y NL-07 (INSV). s: porcentaje de similitud. i: porcentaje de identidad.

	GRSV		TCSV		TSWV		INSV					
	ARN	aa	ARN	aa	ARN	aa	ARN	aa				
	I	S	I	S	I	S	I	S				
LP2	78	83	90	70	72	82	<u>93</u>	<u>92</u>	<u>98</u>	59	62	71
LP87	78	84	92	71	74	83	<u>94</u>	<u>94</u>	<u>99</u>	60	65	73
LP940	78	83	92	72	74	85	<u>94</u>	<u>95</u>	<u>99</u>	60	64	73
LP941	78	84	90	72	74	83	<u>94</u>	<u>93</u>	<u>98</u>	60	64	72
ER25	82	83	83	<u>93</u>	<u>90</u>	<u>93</u>	71	77	90	57	59	75
ER30	78	85	92	71	74	83	<u>94</u>	<u>94</u>	<u>99</u>	60	65	73
ER36	83	83	91	<u>93</u>	<u>89</u>	<u>91</u>	71	76	88	56	58	79

sitios diferentes permitía una diferenciación específica. De acuerdo al análisis, la enzima *Bst*NI cortaba los fragmentos amplificados a partir de aislamientos correspondientes a la especie GRSV en dos bandas, una de 210pb y otra de 240pb. En el caso de los fragmentos amplificados a partir de aislamientos de la especie TCSV, también daba dos bandas, pero de distinto tamaño, una de 390pb y otra de 60pb. En aislamientos de las otras dos especies (TSWV e INSV), la enzima carecía de sitios de corte, por lo tanto, en ambos casos deberían obtenerse sólo bandas de 450pb. Es importante mencionar que la obtención de fragmentos de 450pb no es condición suficiente para atribuirla a una determinada especie ya que podría tratarse de una falta de digestión debida a problemas técnicos. Por lo tanto, fue necesario buscar, en los mapas de restricción de los aislamientos de TSWV e INSV, sitios de restricción exclusivos de cada uno de ellos. En el caso de la especie INSV, sólo se disponía de la secuencia del aislamiento NL-07, ya que ninguno de los aislamientos argentinos analizados correspondió a dicha especie. De este modo, no pudo encontrarse, de modo preciso, una enzima que permitiera identificar a los miembros de esa especie. Con respecto a los aislamientos de la especie TSWV se encontró que la enzima *Hinc*II cortaba el fragmento en dos bandas, una de 255pb y otra de 195pb. Dicha enzima carece de secuencias de reconocimiento en las especies restantes por lo que permitía reconocer de modo preciso a los integrantes de esa especie. Con respecto a la posibilidad de detección de aislamientos correspondientes a la especie INSV será necesario secuenciar el gen N de un mayor número de aislamientos.

Los resultados predichos por el análisis de los mapas de restricción se confirmaron mediante digestiones simples de ADN de los fragmentos amplificados en todos los aislamientos analizados con las enzimas mencionadas (Figuras 28 A y B).

Posteriormente, para verificar si la técnica permitía predecir la especie, sin necesidad de secuenciar el gen N, se tomaron dos muestras provenientes de Río Negro (RN5 y RN7) que no habían sido aún secuenciadas ni analizadas mediante estudios serológicos. Estas dos muestras incógnita mostraron, por esta técnica, ser miembros de la especie GRSV (Figuras 29A y B). Dichos resultados fueron posteriormente verificados mediante secuenciación del fragmento de 450pb de ambos aislamientos.

Figura 28: Electroforesis en gel de agarosa 2% de digestiones de los fragmentos de PCR de aislamientos argentinos de *Tospovirus* con *Bst*NI (A) y *Hinc*II (B). Calle 1: M23; calle 2: M28; calle 3: M316; calle 4: LP2; calle 5: LP87; calle 6: LP940; calle 7: LP941; calle 8: T101; calle 9: T102; calle 10: ER25; calle 11: ER30; calle 12: ER36; calle 13: planta sana; calle 14: mezcla de reacción sin molde. M: Marcador de peso molecular (pUC 9/*Hae*III).

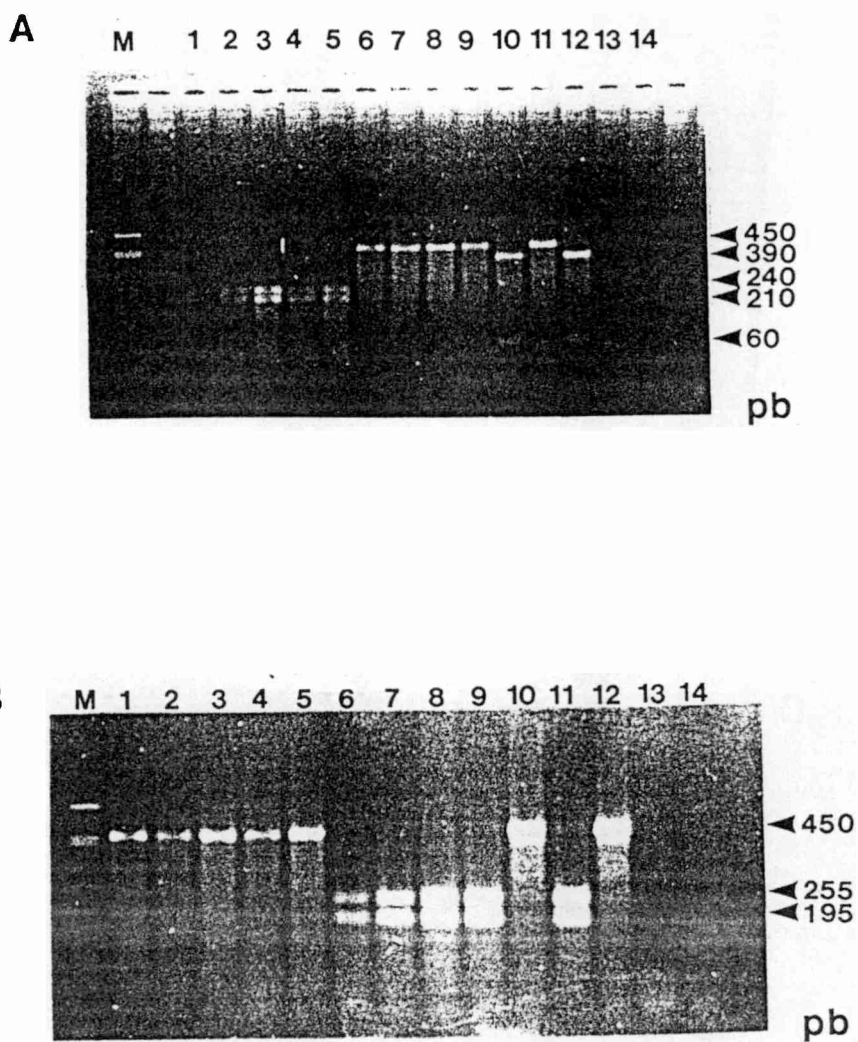
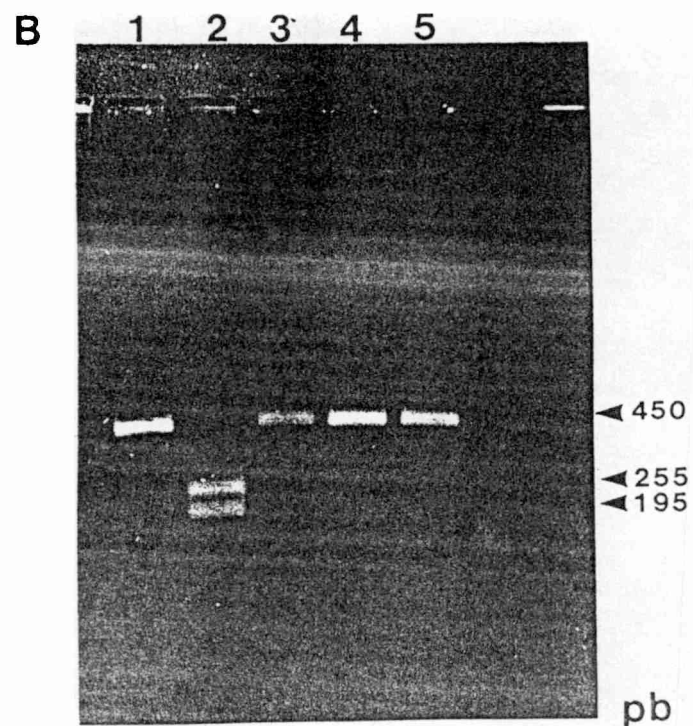
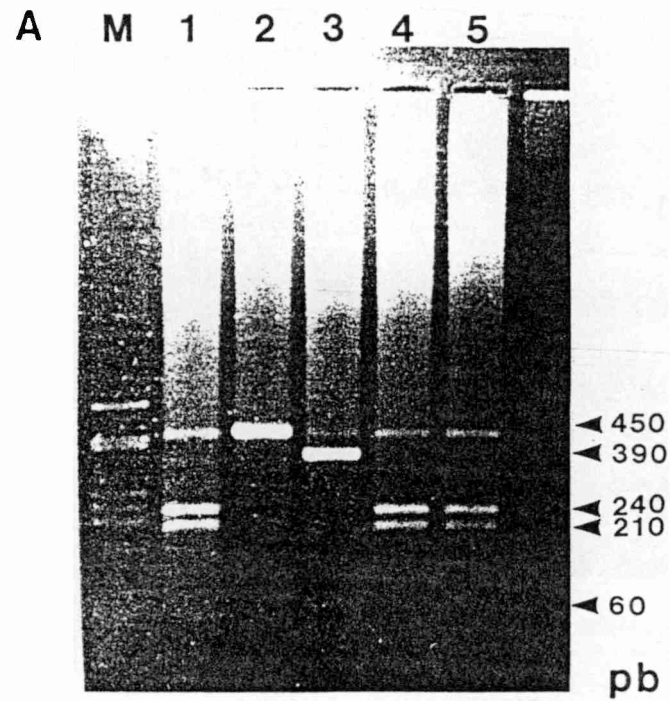


Figura 29: Electroforesis en gel de agarosa 2% de digestiones de los fragmentos de PCR de dos aislamientos incógnita (RN5 y RN7) con *Bst*NI(A) y *Hinc*II (B). Calle 1: M316; calle 2: LP941; calle 3: ER25; calle 4: RN5; calle 5: RN7. M: Marcador de peso molecular (pUC9/*Hae*III).



3.2.6. Análisis proteico (DAS-ELISA)

Los resultados obtenidos en ensayos de DAS-ELISA con todos los aislamientos en estudio, permitieron confirmar aquéllos obtenidos mediante el análisis de secuencias de ARN. En este estudio los extractos de plantas infectadas con los aislamientos M23, M28, T101, T102, RN5 y RN7 (Figuras 30 a 32) mostraron la mayor reactividad, por medidas de absorbencia a 405nm, con el antisuero policlonal contra la proteína N de la especie GRSV. Los aislamientos ER25 y ER36 (Figura 33) dieron mayor reactividad con el antisuero de la especie TCSV en tanto que los aislamientos LP2, LP87, LP940, LP941 y ER30 lo dieron con el de la especie TSWV (Figuras 34 a 36).

3.2.7. Microscopía electrónica

Los aislamientos LP87 y ER25, que según nuestro análisis corresponden a las especies TSWV y TCSV, respectivamente, se analizaron también en secciones ultrafinas al microscopio electrónico. Dichos análisis muestran en ambos casos partículas virales típicas de *Tospovirus*, dentro de la luz del retículo endoplásmico (Figuras 37A y B). En ambos casos no se detectaron agregados densos de material fibrilar correspondiente a la acumulación de proteína NS₅.

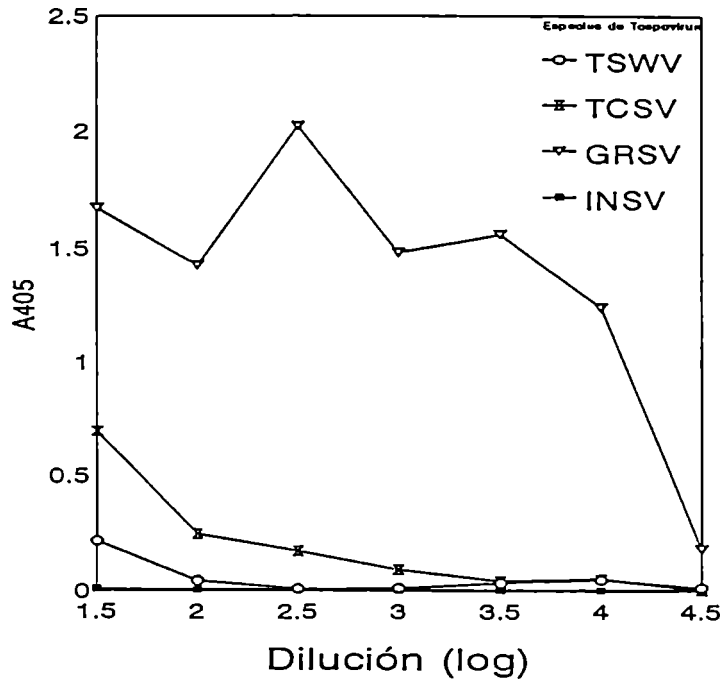
3.3. Análisis filogenético

Como se mencionara en materiales y métodos, el estudio se llevó a cabo a dos niveles distintos. El primero de ellos denominado nivel "contexto" se realizó con el objetivo de poder establecer qué miembros del género o géneros de la familia *Bunyaviridae* podrían ser utilizados como *outgroup* en el estudio del nivel "género *Tospovirus*".

En el nivel contexto se construyeron dos matrices de datos; una cuyos estados de carácter fueron los diferentes nucleótidos del gen N (ADN) y en la otra los distintos aminoácidos codificados por el mismo gen (proteínas). La dimensión de la matriz de ADN fue de 16 taxa por 1301 caracteres. Del total de caracteres 984, fueron informativos desde el punto de vista filogenético. Mediante la búsqueda heurística de la hipótesis filogenética más corta se obtuvo un solo cladograma (Figura 38A). Dicho cladograma mostró una estructura jerárquica en la cual se

Figura 30: Análisis serológico en formato de DAS-ELISA con antisueros correspondientes a las cuatro especies virales descritas, de diluciones crecientes de extracto de *N. rustica* infectada con los aislamientos M23 y M28.

M23



M28

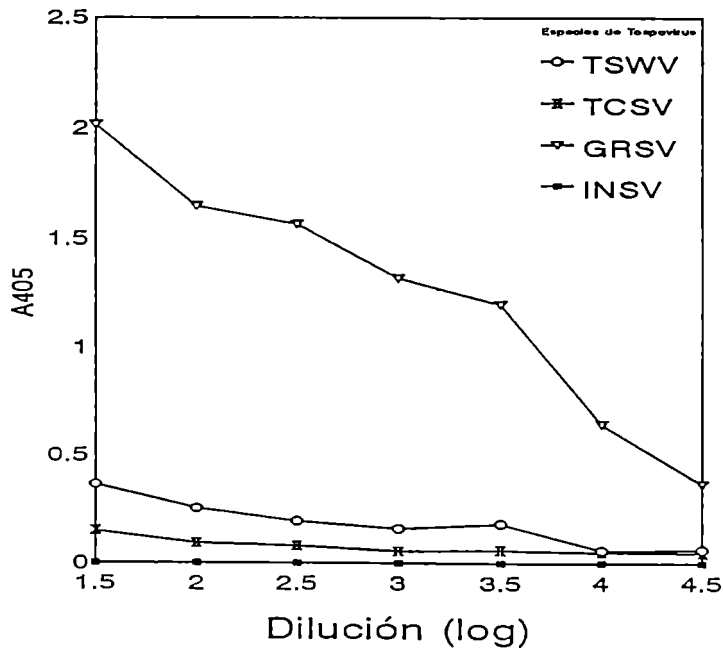
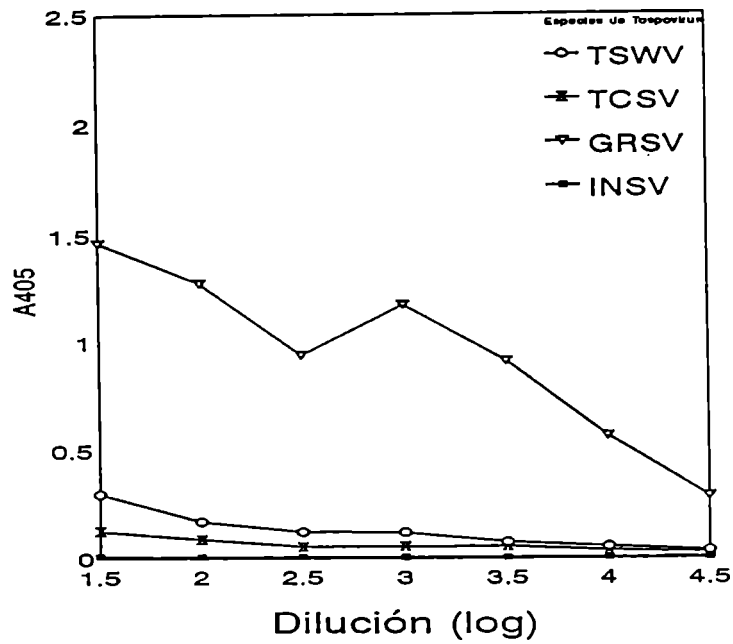


Figura 31: Análisis serológico en formato de DAS-ELISA contra antisueros correspondientes a las cuatro especies virales descritas, de diluciones crecientes de extracto de *N. rustica* infectada con los aislamientos T101 y T102.

T101



T102

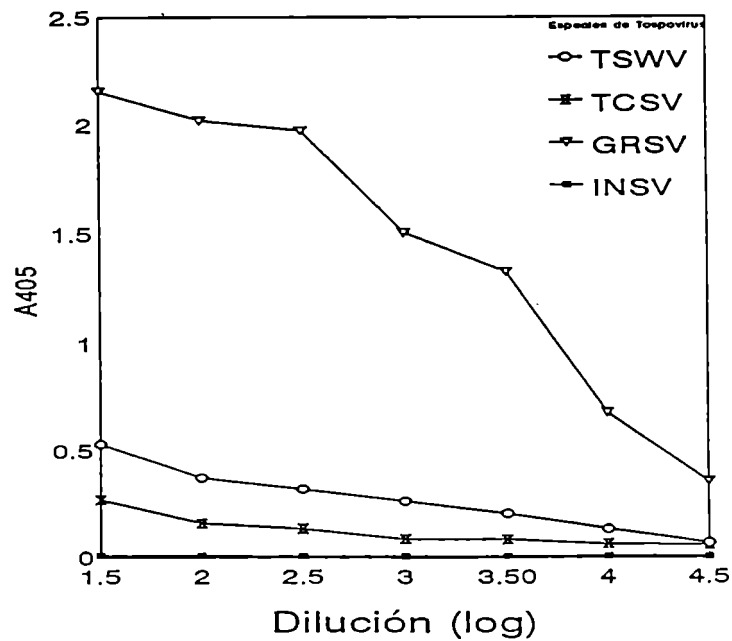
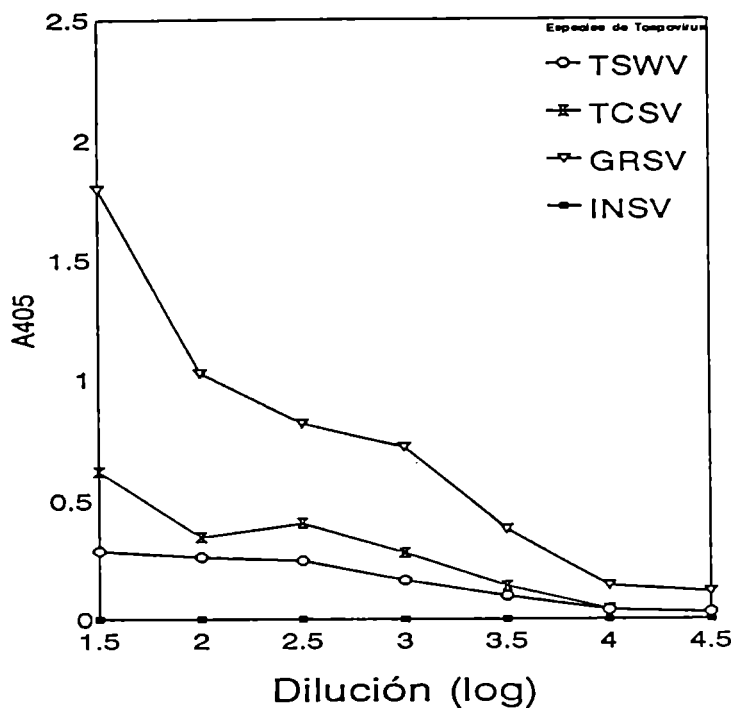


Figura 32: Análisis serológico en formato de DAS-ELISA contra antisueros correspondientes a las cuatro especies virales descritas, de diluciones crecientes de extracto de *N. rustica* infectada con los aislamientos RN5 y RN7.

RN5



RN7

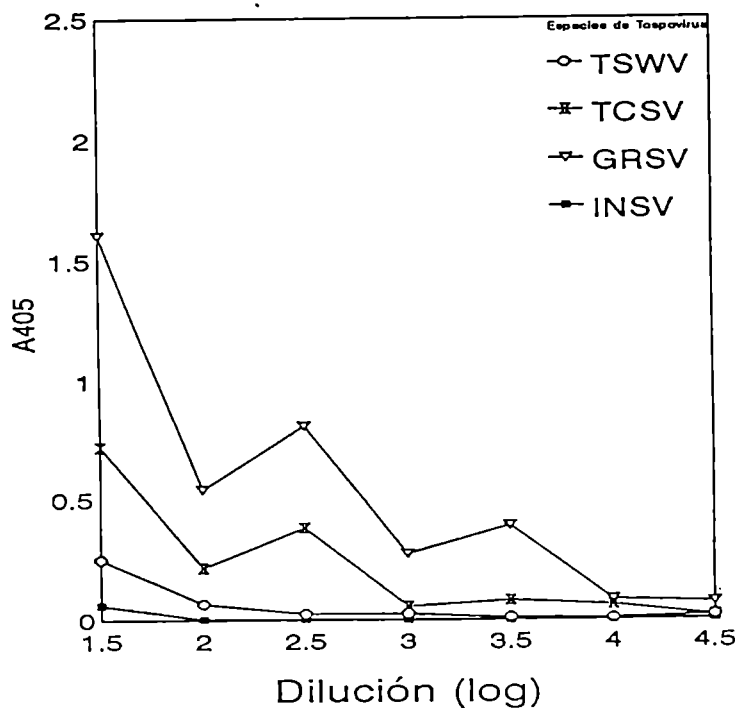
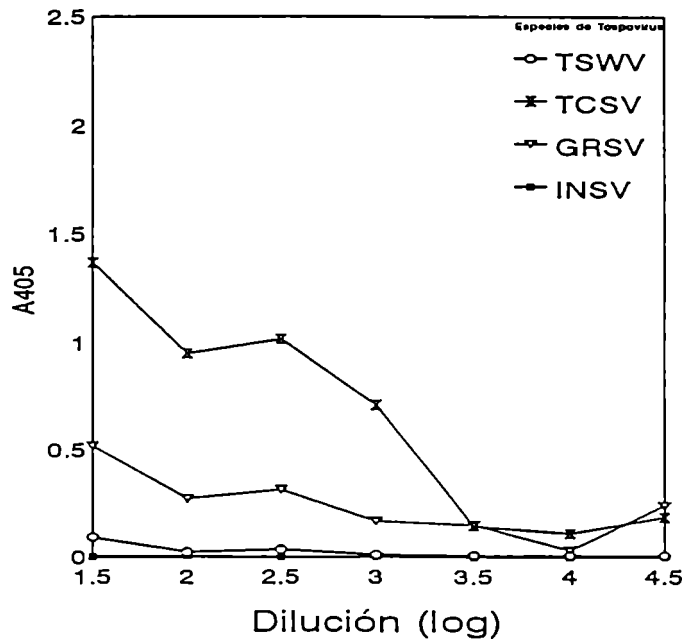


Figura 33: Análisis serológico en formato de DAS-ELISA contra antisueros correspondientes a las cuatro especies virales descritas, de diluciones crecientes de extracto de *N. rustica* infectada con los aislamientos ER25 y ER36.

ER25



ER36

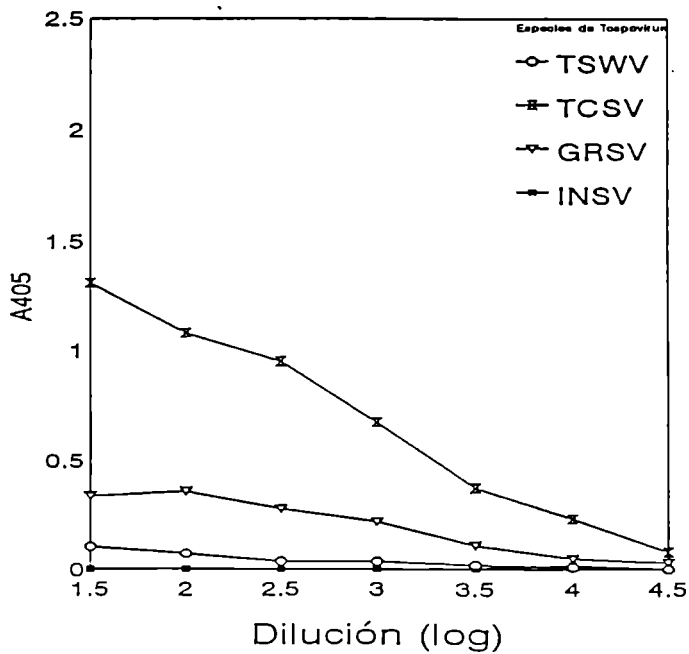
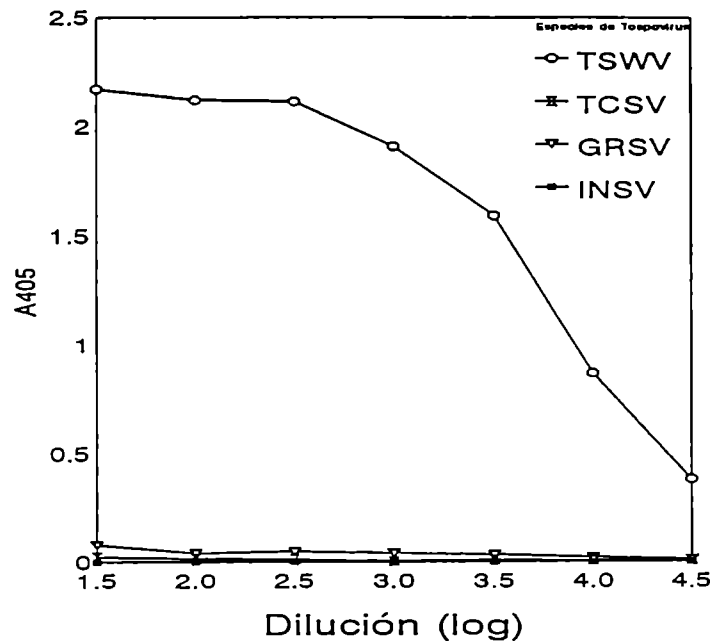


Figura 34: Análisis serológico en formato de DAS-ELISA contra antisueros correspondientes a las cuatro especies virales descritas, de diluciones crecientes de extracto de *N. rustica* infectada con los aislamientos LP2 y LP87.

Lp2



LP87

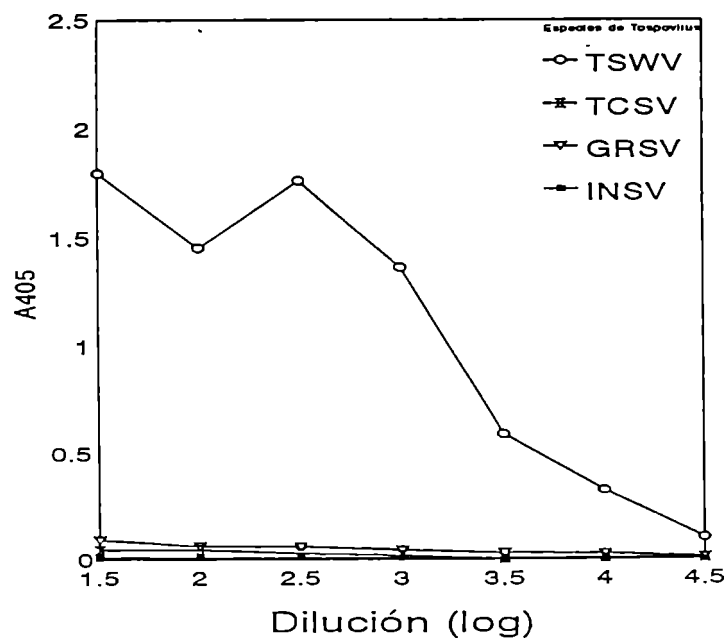
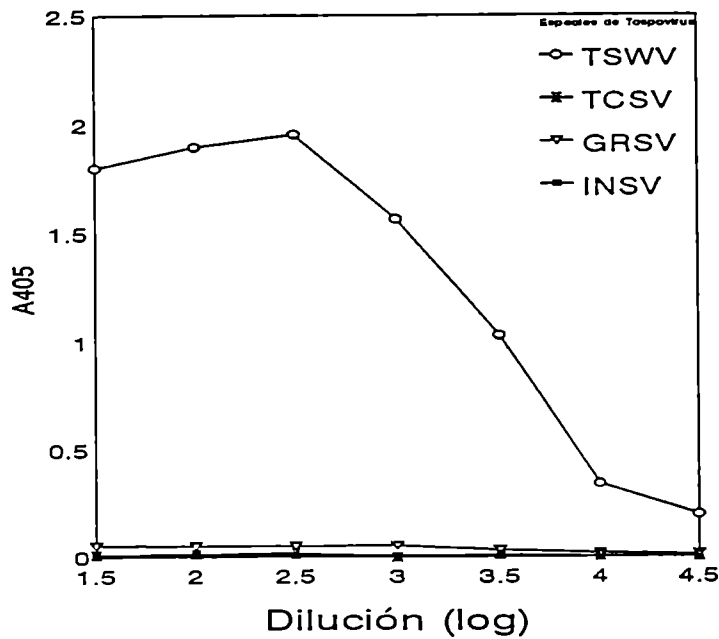


Figura 35: Análisis serológico en formato de DAS-ELISA contra antisueros correspondientes a las cuatro especies virales descritas, de diluciones crecientes de extracto de *N. rustica* infectada con los aislamientos LP940 y LP941.

LP940



LP941

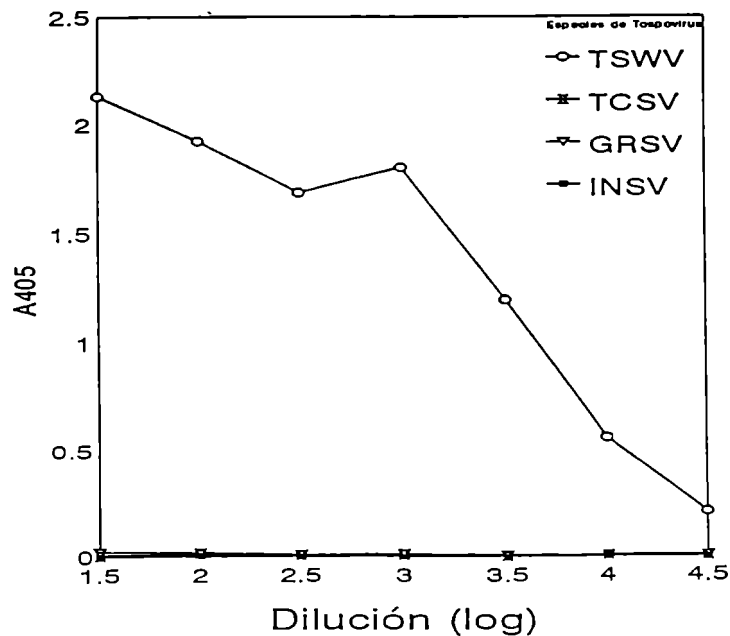


Figura 36: Análisis serológico en formato de DAS-ELISA contra antisueros correspondientes a las cuatro especies virales descritas, de diluciones crecientes de extracto de *N. rustica* infectada con el aislamiento ER30.

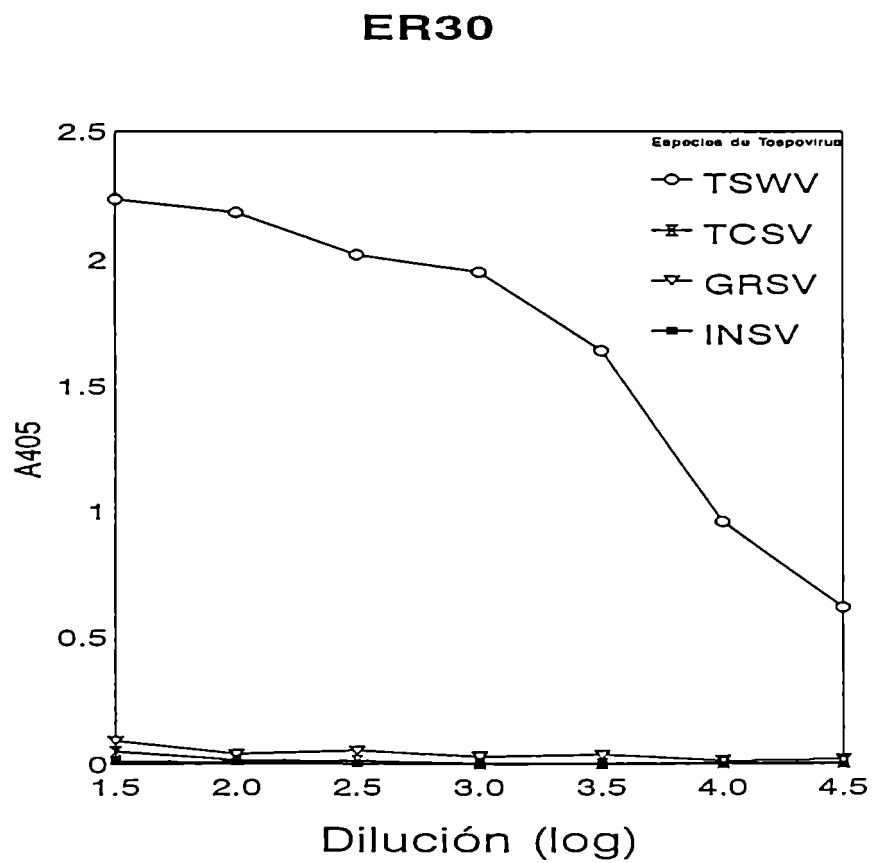
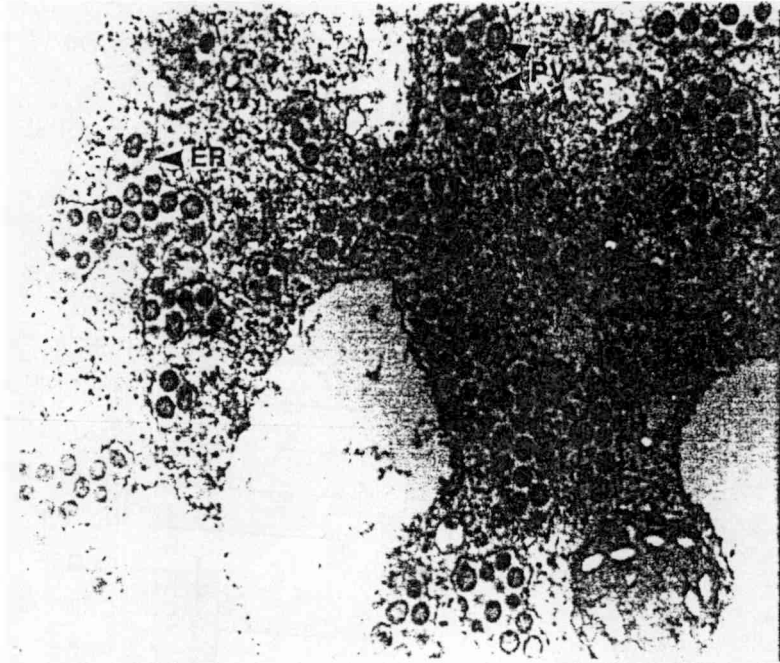


Figura 37: análisis de secciones ultrafinas de los aislamientos LP87 (A) y ER25 (B). PV: partícula viral; ER: retículo endoplásmico; M: mitocondria

A



B

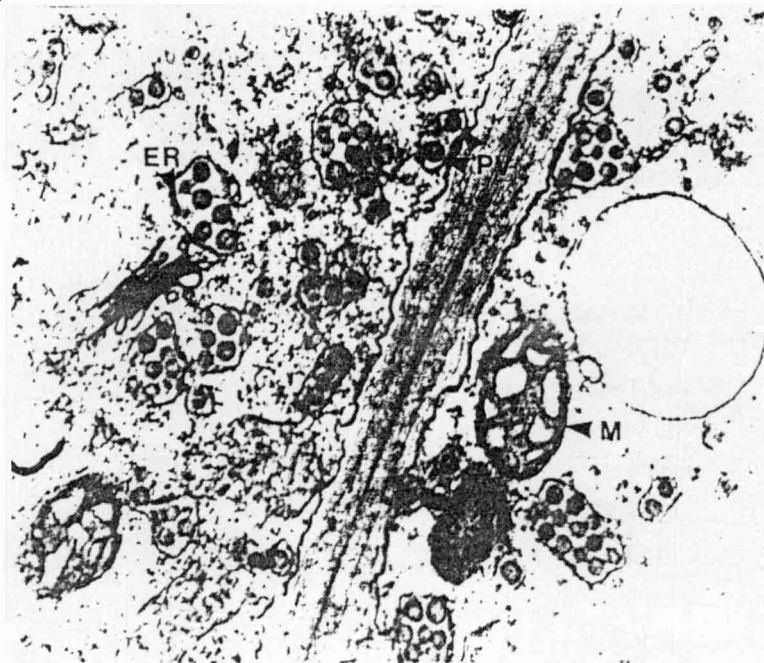
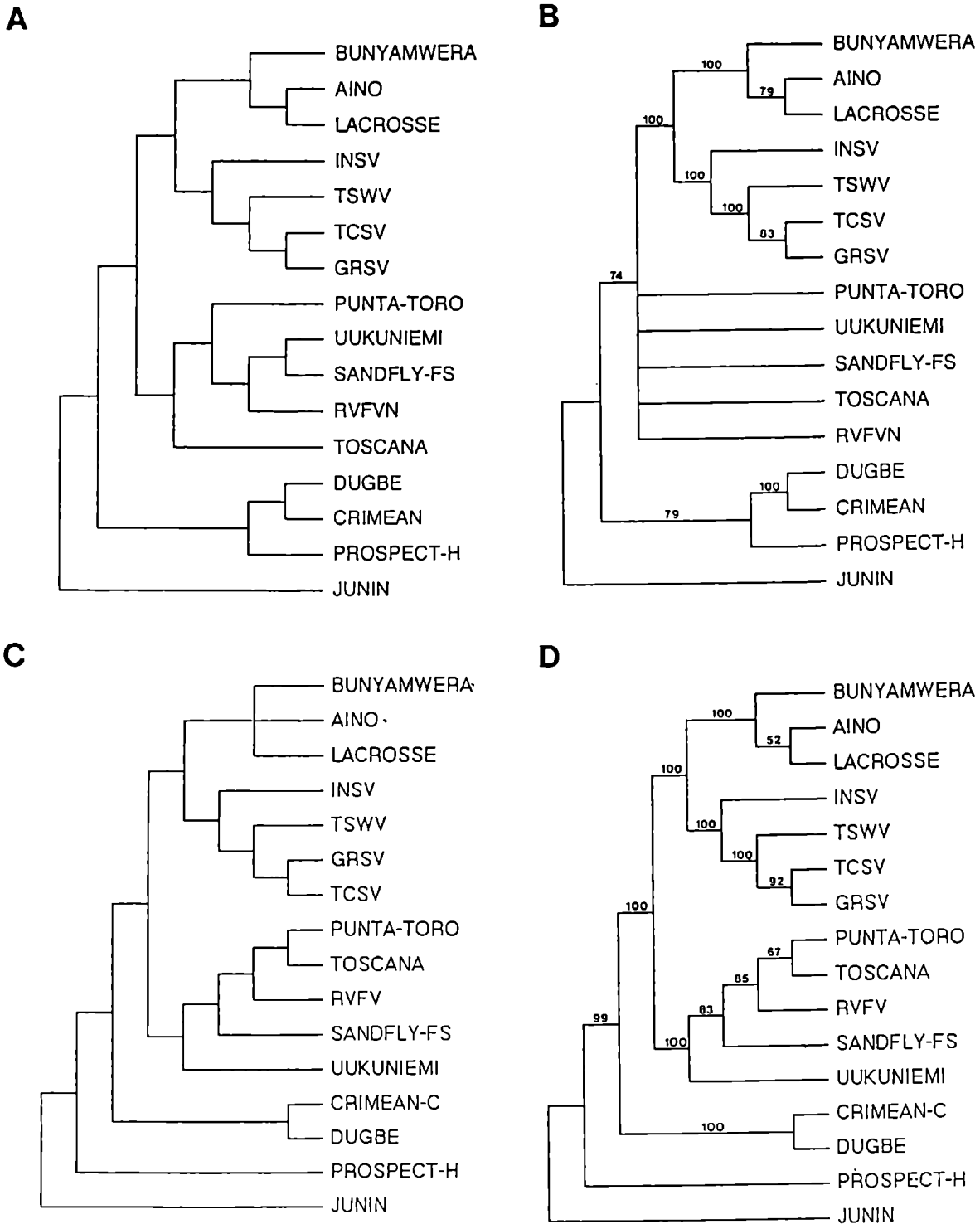


Figura 38: Análisis filogenético a nivel "contexto". A y B: cladograma más simple y árbol de consenso de mayoría producto del análisis de *bootstrapping* obtenidos a partir de datos de secuencias de ADN, respectivamente. C y D: árbol de consenso estricto y árbol de consenso de mayoría producto del análisis de *bootstrapping* obtenidos a partir de datos de secuencias de proteínas, respectivamente.



puede observar que los miembros del género *Tospovirus* (INSV, TSWV, TCSV y GRSV) forman un grupo monofilético con los miembros del género *Bunyavirus* (Bunyamwera, Aino y Lacrosse). Estos dos géneros se encuentran conformando un grupo monofilético con el género *Phlebovirus* (Punta Toro, Uukuniemi, Sandfly Fever Sicilian, Toscana y Rift Valley Fever) y los tres están relacionados con dos géneros muy relacionados entre sí como son los *Hantavirus* (Prospect Hill) y los *Nairovirus* (Dugbe y Crimean Congo Haemorrhagic Fever). La longitud de dicho árbol fue de 3796 pasos, el índice de consistencia (C) fue de 0,546 y el de retención (R) de 0,467. Con respecto a la señal filogenética mediante análisis de *skewness*, el valor del índice *GI* fue de -0,65 para la distribución de 10.000 árboles al azar. Dicho valor es una evidencia que existe señal filogenética en el conjunto de datos.

Con el fin de establecer la estabilidad (= grado de confianza) de los grupos formados se realizó el análisis de *bootstrapping* con 100 repeticiones. Mediante dicho análisis se obtuvo un árbol de consenso de mayoría (Figura 38B) en el cual la rama de los *Tospovirus* (INSV, TSWV, TCSV y GRSV) tuvo una estabilidad de 98%; la rama de los *Bunyavirus* (Bunyamwera, Aino y Lacrosse) una estabilidad del 100%. La rama que sostiene ambos grupos en conjunto dio una estabilidad del 100% reflejando que este grupo es muy robusto. Con respecto a la rama de los *Phlebovirus* (Punta Toro, Uukuniemi, Sandfly Fever Sicilian, Toscana y Rift Valley Fever) mostró una estabilidad muy baja (51%) demostrando que este grupo es muy débil. Por otra parte, la rama formada por los *Nairovirus* (Dugbe y Crimean Congo Haemorrhagic Fever) y los *Hantavirus* (Prospect Hill) presenta una estabilidad del 75%. Dentro de este grupo la rama de los *Nairovirus* mostró una estabilidad del 100%.

Con respecto al análisis filogenético de las secuencias de proteínas N en el nivel "contexto", las dimensiones de la matriz de datos fue de 16 taxa por 500 caracteres, de los cuales 486 fueron informativos. En el caso de análisis de secuencias de proteínas no puede obtenerse ni el índice de retención ni el de consistencia por limitaciones del método computacional. A este nivel se obtuvieron 2 árboles igualmente simples con 4147 pasos. Con estos dos árboles se obtuvo un árbol de consenso estricto que se muestra en la Figura 38C. En dicho árbol puede observarse una topología similar a la obtenida con datos de secuencia de ADN. Las únicas diferencias encontradas son la politomía observada dentro del grupo de los *Bunyavirus* (Bunyamwera, Aino, Lacrosse) y la ubicación de los *Hantavirus* (Prospect Hill). El análisis de *bootstrapping* (Figura 38D) mostró que tanto la rama

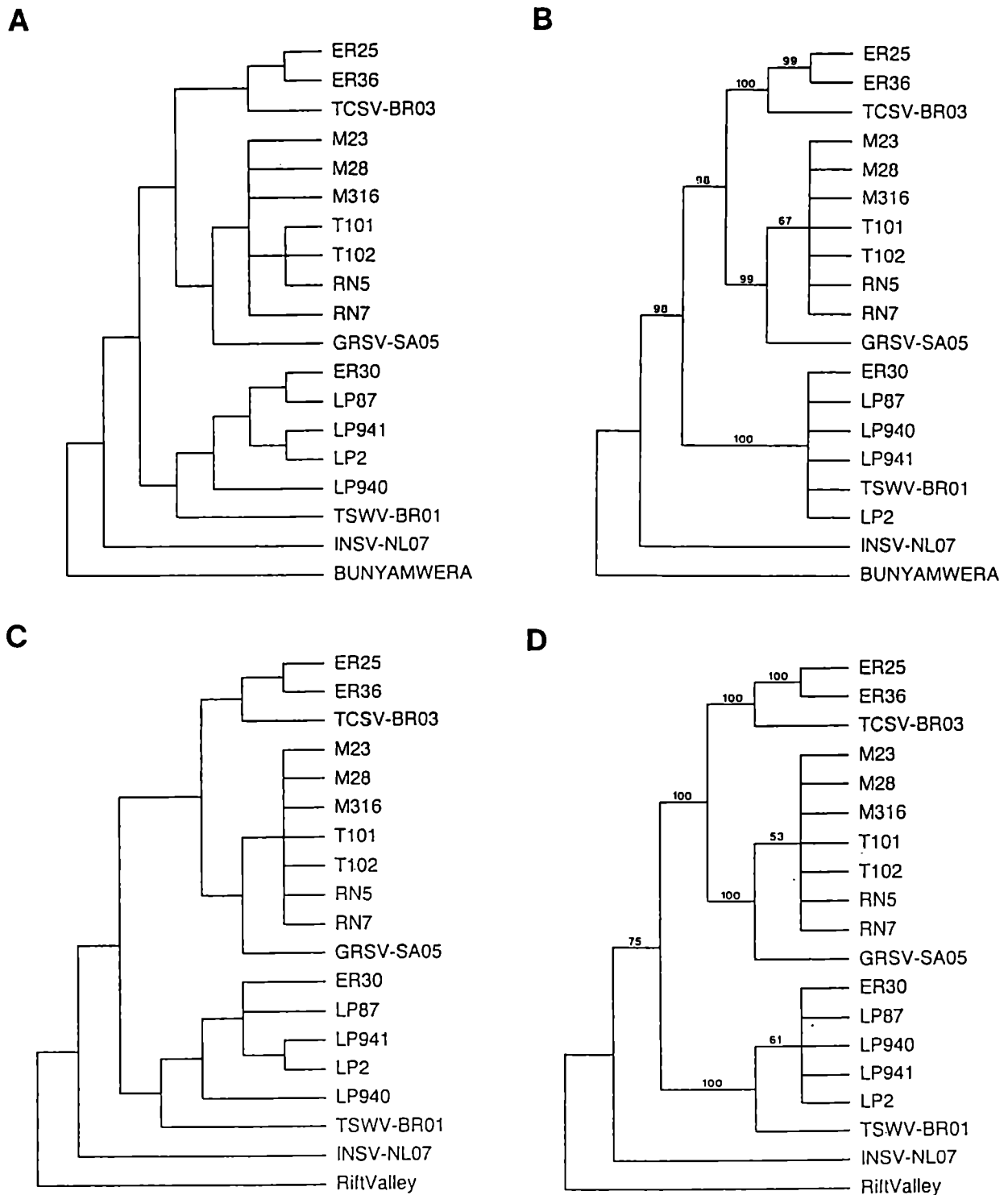
que incluye a todos los miembros de la familia Bunyaviridae como las que sustentan a cada uno de los 5 géneros poseen una estabilidad de alrededor del 100%. Dentro del clado de los *Phlebovirus* (Punta Toro, Toscana, RVFV, Sandfly Fever Sicilian y Uukuniemi) los valores de *bootstrapping* que sustentan las relaciones internas entre ellos son menores que el 100%, pero significativamente altos (83% y 85%), excepto en el caso de la rama formada por Punta Toro y Toscana que tiene una estabilidad del 67%. Por otra parte, dentro del clado de los *Bunyavirus*, la relación entre Aino y Lacrosse es bastante débil. En ese caso el valor de *bootstrapping* estuvo en el 52%.

A partir del análisis a nivel "contexto" se obtuvieron como probables *outgroups* para el análisis a nivel "género *Tospovirus*" a los géneros *Bunyavirus* y *Phlebovirus*.

Para el análisis a nivel género "*Tospovirus*", se utilizó como *outgroup* la secuencia de ADN y el producto proteico del gen N de la especie Bunyamwera (gén. *Bunyavirus*) y de la especie Rift Valley Fever (gén. *Phlebovirus*).

Para los análisis filogenéticos utilizando uno u otro *outgroup*, se confeccionaron matrices con datos de secuencias de ADN y de proteínas. La dimensión de la matriz de datos de ADN con la especie Bunyamwera como *outgroup* fue de 19 taxa por 464 caracteres. Del total de caracteres 172 fueron informativos. Mediante la búsqueda heurística se obtuvieron 3 árboles igualmente simples, cuyas longitudes fueron de 374 pasos. Los índices de consistencia (C) y de retención (R) fueron de 0,73 y 0,866, respectivamente. Respecto al valor de *Skewness (GI)* fue de -0,69 demostrando que los datos reflejan señal filogenética. Con los tres cladogramas obtenidos se confeccionó un árbol de consenso estricto (Figura 39A). En dicho árbol puede observarse la formación de cuatro ramas bien resueltas representadas por las cuatro especies de *Tospovirus* propuestas (De Avila *et al.*, 1993). Se puede observar que los miembros de la especie TCSV (ER25, ER36 y BR-03) con los miembros de la especie GRSV (M23, M28, M316, T101, T102, RN5, RN7 y SA-05) se encuentran estrechamente relacionados. En el siguiente nivel se observó que los miembros de las dos especies antes mencionadas se encuentran relacionados con los miembros de la especie TSWV (LP2, LP87, LP940, LP941, ER30 y BR-01), formando un grupo monofilético. Con respecto a la especie INSV, se observó que forma un grupo monofilético con el resto de las especies pero está más distantemente relacionada con las otra tres. Por otra parte, mediante el análisis de *bootstrapping* se obtuvo un árbol de consenso basado en la regla de la mayoría (*majority rule consensus*) que muestra la estabilidad de los grupos

Figura 39: Análisis filogenético a nivel "género *Tospovirus*" utilizando datos de secuencias de ADN con la especie Bunyamwera (A y B) y a la especie Rift Valley Fever (C y D) como *outgroup*. A y C: cladogramas de consenso estricto. B y D: árbol de consenso de mayoría producto del análisis de *bootstrapping*.



conformados (Figura 39B). De este modo, el grupo conformado por todos los *Tospovirus* posee una estabilidad del 98%. En el siguiente nivel de inclusión pueden observarse dos ramas, la de los aislamientos de la especie TSWV (100%) y la de GRSV más TCSV (98%). Dentro de esta última rama se visualizan claramente dos grupos, por un lado todos los aislamientos pertenecientes a GRSV con una estabilidad del 99% y por otro, la correspondiente a TCSV con el 100%. Dentro de la primera, el aislamiento brasileño SA05 se encuentra separado de los aislamientos argentinos, pero la estabilidad que sustenta esa separación es bastante baja (67%). Dentro del clado correspondiente a los aislamientos correspondientes a la especie TCSV (ER25, ER36 y BR03) los dos aislamientos argentinos se encuentran separados del brasileño (BR03) con una estabilidad del 99%.

Respecto al análisis de secuencias de ADN del gen N, utilizando como *outgroup* a un miembro del género *Phlebovirus* (Rift Valley Fever), se utilizó una matriz compuesta de 19 taxa por 454 caracteres. Del total de caracteres, 163 fueron informativos. Mediante el análisis heurístico se obtuvieron 60 árboles igualmente simples. La longitud de dichos árboles fue de 340 pasos y los índices de consistencia y retención fueron de 0,735 para el primero y de 0,878 para el segundo. La señal filogenética fue de -0,66 (*GI*). A partir de los 60 árboles obtenidos se obtuvo un árbol de consenso estricto (Figura 39C). Dicho árbol mostró un patrón similar al obtenido utilizando Bunyamwera como *outgroup*, es decir TCSV muy relacionado con GRSV, ambos relacionados con TSWV y los tres con INSV. Con respecto al análisis de *bootstrapping*, se obtuvo un árbol de consenso basado en la regla de la mayoría (Figura 39D). En dicho árbol se puede observar que la rama que incluye a las especies GRSV, TCSV y TSWV muestra una estabilidad del 75%. La rama que se forma con los aislamientos de las especies TCSV y GRSV tuvo una estabilidad del 100%, así como también las ramas que conforman ambas especies por separado. El clado que conforman los miembros de la especie TSWV mostró una estabilidad del 100%. Dentro de la rama correspondiente a cada una de las especies virales, se puede observar nuevamente que para la especie TCSV, los aislamientos argentinos (ER25 y ER36) se encuentran separados del aislamiento brasileño (BR03) con una estabilidad del grupo del 100%. Dentro de la rama conformada por los aislamiento correspondientes a la especie GRSV, se observa también que los aislamientos argentinos (M23, M28, M316, T101, T102, RN5 y RN7) se encuentran separados del aislamiento brasileño SA05. El grupo conformado por los aislamientos argentinos mostró una estabilidad muy baja (53%). En el caso de la

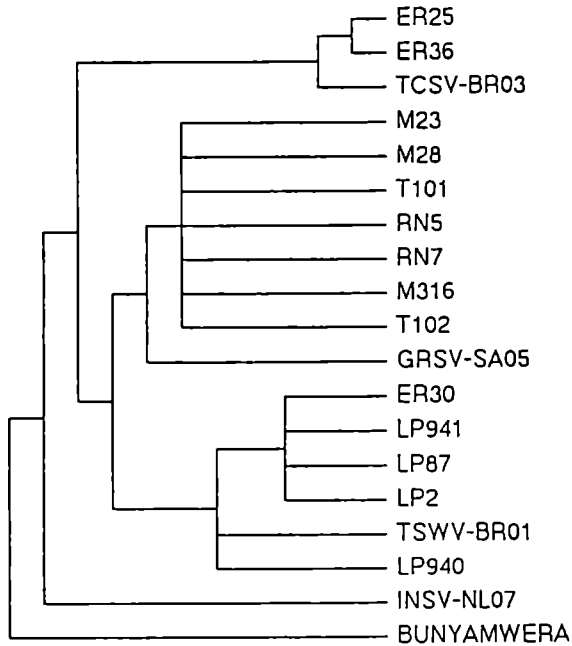
rama correspondiente a la especie TSWV, nuevamente los aislamientos argentinos se encuentran separados del brasileño (BR01). El grupo conformado por los aislamientos argentinos mostró una estabilidad muy baja (61%).

Para el análisis de secuencias de proteínas del gen N en el nivel género *Tospovirus* con *Bunyamwera* como *outgroup* se utilizó una matriz de datos de 19 taxa por 232 caracteres. Del total de caracteres sólo 63 fueron informativos desde el punto de vista filogenético. Mediante la búsqueda heurística de la hipótesis filogenética más corta, se obtuvieron 50 árboles igualmente simples con 603 pasos. Con dichos árboles se confeccionó un árbol de consenso estricto que se muestra en la figura 40A. En dicho árbol se puede ver una topología algo diferente a la observada en los análisis con datos de secuencia de ADN. Pese a que se pueden visualizar las cuatro ramas correspondientes a las cuatro especies de *Tospovirus*, se puede observar que los aislamientos de la especie GRSV (M23, M28, M316, T101, T102, RN5, RN7 y SA05) se encuentran más relacionados con los de la especie TSWV (ER30, LP940, LP941, LP87, LP2 y BR01) que con los de la especie TCSV (ER25, ER36 y BR03). El análisis de *bootstrapping* arrojó un árbol de consenso basado en la regla de la mayoría (Figura 40B) que muestra que la rama que sustenta a las especies TSWV, GRSV y TCSV una estabilidad del 56%; GRSV y TSWV un 58%; TCSV un 84% y GRSV sólo 100%. Dentro de los clados correspondientes a cada una de las especies virales se observó una topología similar a la visualizada utilizando datos de secuencias de ADN. En la rama conformada por los aislamientos correspondiente a la especie TCSV se vió nuevamente que los dos aislamientos argentinos (ER25 y ER36) se encuentran separados del aislamiento BR03 (Brasil). La rama que sustenta a los aislamientos argentinos posee una alta estabilidad (84%). En el caso de los aislamientos pertenecientes a la especie GRSV, se vio que no existen diferencias entre ellos. La rama correspondiente a los aislamientos de la especie TSWV, mostró que cuatro de los cinco aislamientos argentinos (LP2, LP87, LP941 y ER30) forman un grupo separado del aislamiento brasileño (BR01) y del aislamiento argentino LP940. El clado que conforman los cuatro primeros posee una estabilidad muy débil (52%).

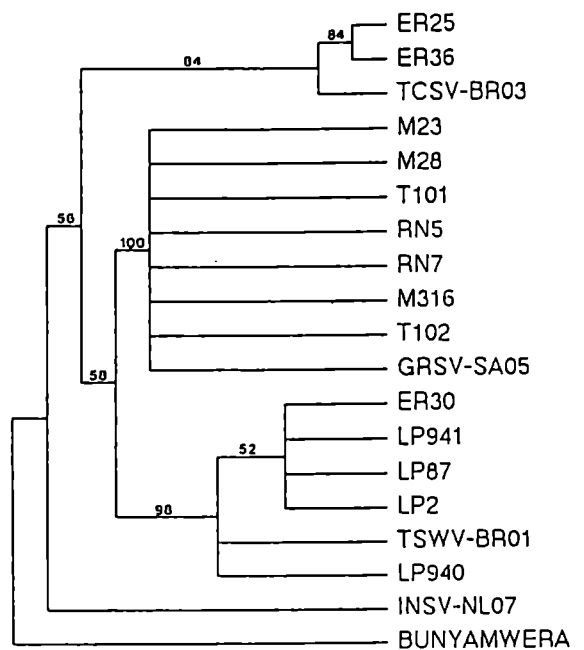
Para el análisis filogenético a nivel de la secuencia de aminoácidos con la especie Rift Valley Fever, se utilizó una matriz de 19 taxa por 108 caracteres, de los cuales 53 fueron informativos. Mediante la búsqueda heurística se obtuvieron 50 árboles igualmente simples que emplearon 242 pasos. A partir de esos 50 árboles se obtuvo un árbol de consenso estricto que se muestra en la figura 40C. La topología

Figura 40: Análisis filogenético a nivel "género *Tospovirus*" utilizando datos de secuencias de aminoácidos con la especie *Bunyamwera* (A y B) y Rift Valley Fever (C y D) como *outgroup*. A y C: cladogramas de consenso estricto. B y D: árbol de consenso de mayoría producto del análisis de *bootstrapping*.

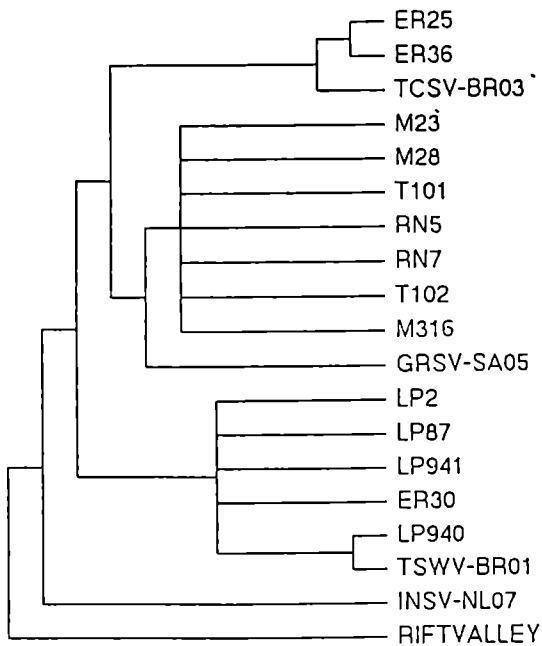
A



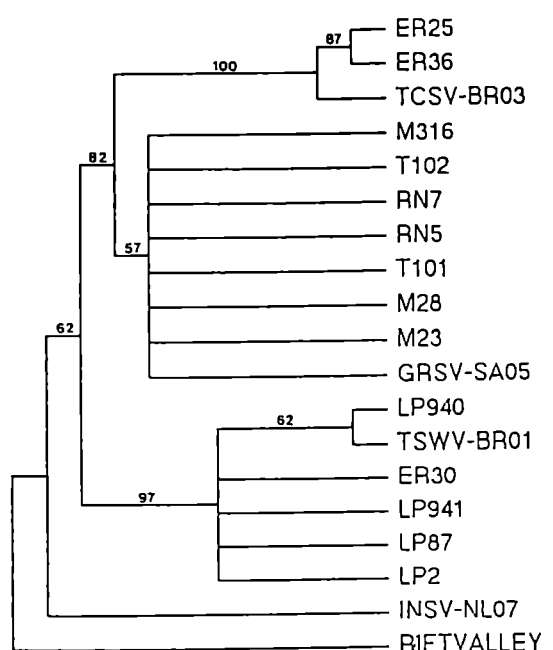
B



C



D



de dicho árbol es similar a la ya observada en los árboles de consenso estricto utilizando datos de secuencias de ADN. En el *ingroup* se pueden observar las cuatro ramas correspondientes a las cuatro especies virales (TSWV, TCSV, GRSV e INSV) con los aislamientos correspondientes a la especie GRSV más relacionados con los de la especie TCSV. El análisis de *bootstrapping* (Figura 40D) mostró que el *ingroup* en su totalidad tiene una estabilidad del 94%; la rama que conforman las especies TSWV, GRSV y TCSV, una estabilidad del 62%; TSWV por separado 97%; GRSV más TCSV, 82%; GRSV sólo, 57% y TCSV sólo, 100%. En el caso de las ramas correspondientes a cada especie, la topología fue muy similar a la obtenida utilizando la especie Bunyamwera como *outgroup* siendo los valores del *bootstrapping* también muy similares.

DISCUSSION

4.1 Diversidad de *Tospovirus* en Argentina

Los estudios realizados con el aislamiento M316 indican claramente que el mismo corresponde a la especie viral *groundnut ring spot virus* o GRSV. En una primera etapa, con los datos de las secuencias del gen y de la proteína N, se observó que en la comparación de las mismas con las de los aislamientos BR-01, BR-03, SA-05 y NL-07, M316 presentaba el máximo grado de identidad de nucleótidos e identidad y similitud de aminoácidos con SA-05 (GRSV). El valor de 95% de identidad de nucleótidos entre M316 y SA-05 (GRSV) difería de valores previamente hallados por De Avila *et al.* (1993) para comparaciones entre aislamientos distintos de GRSV. En dicho trabajo y aplicando metodologías similares a las empleadas en el presente trabajo, los porcentajes de identidad de nucleótidos entre dos aislamientos de la especie GRSV (SA-05 y BR-08), alcanzaron valores de alrededor del 99%. Al principio del año 1993, fecha de inicio de este trabajo, era escaso aún el conocimiento existente con respecto a la diversidad de los *Tospovirus*. A partir de la diferencia de porcentaje de identidad de nucleótidos encontrada en los miembros de una misma especie, se planteó la necesidad de comprobar si el aislamiento M316 correspondía a la especie GRSV mediante otro tipo de estudio y de ese modo demostrar que el método utilizado de secuenciación-comparación del gen N podía utilizarse como un marcador especie-específico, sin necesidad de otro tipo de estudio adicional. Para tal fin, los estudios serológicos fueron determinantes y mostraron que el aislamiento M316 correspondía a la especie GRSV y que el método de secuenciación-comparación era útil para determinar especies de *Tospovirus*. Durante el desarrollo de este trabajo Pang *et al.* (1993b) caracterizaron un aislamiento brasileño, como TSWV-B. Con el panel de antisueros empleado, diferente al empleado en este trabajo, detectaron que no correspondía a TSWV ni tampoco a INSV. Además, el análisis de secuenciación-comparación contra las cuatro especies descritas arrojó resultados similares a los obtenidos por nosotros con el aislamiento M316. Así, los porcentajes de identidad de nucleótidos encontrados por ellos fueron de 78% (TSWV), 63% (INSV), 81.5% (TCSV) y 94.4% (GRSV). Este análisis demostraba que el aislamiento TSWV-B correspondía a la especie GRSV. Alineando esa secuencia con la de M316 se halló que comparten alrededor de 97% de identidad de nucleótidos y 99.6% de similitud e identidad de aminoácidos. Todo indica que, efectivamente, el aislamiento TSWV-B es también un miembro de la especie GRSV

Con respecto a los porcentajes de similitud de aminoácidos hallados entre M316 y los cuatro aislamientos correspondientes a las especies descritas, se vió que compartía un 96% de similitud con GRSV, un 91% con TSWV y TCSV y un 69% con INSV. Estos valores demostraban que, pese a que las cuatro especies difieren en cuanto a la secuencia de ARN, las proteínas N de TSWV, GRSV y TCSV son muy similares. INSV, en cambio, es claramente distinto como se había observado con anterioridad (Law y Moyer, 1990; De Avila *et al.* 1992).

Como se mencionó en la sección 1.12, la resistencia a *Tospovirus* en plantas de tabaco transgénicas, que contienen el gen N, se propone como debida a un doble mecanismo de protección. Por uno de los mecanismos, la protección estaría dada por el ARN del gen N, sintetizado por la planta transgénica y no por la proteína N. La identidad de nucleótidos debe ser muy grande, ya que no se observó protección entre aislamientos de especies distintas, como en el caso de plantas transgénicas que contienen el gen N de TSWV y no son resistentes a GRSV y mucho menos a INSV. Esta estrategia funciona bien con aislamientos de la misma especie cuyos miembros compartan niveles elevados de identidad de nucleótidos (> 90%). Se produciría así una hibridación entre el ARN del gen N de la planta transgénica y el ARN del gen viral, inhibiendo de algún modo la replicación del virus. En la segunda estrategia propuesta, sería la proteína N, sintetizada por la planta transgénica, la que produciría la protección. Se propone que este mecanismo ocurriría entre especies de *Tospovirus* que presentan un elevado porcentaje de diferencias tanto a nivel de secuencia de ARN como de proteína N como ocurre por ejemplo entre TSWV e INSV. Aparentemente, la proteína N, sintetizada por la planta transgénica, produciría una heteroencapsidación del ARN viral del virus heterólogo haciendo que el desarrollo posterior del mismo sea inviable. Este ejemplo se observó sólo generando transgénicas con TSWV y observando resistencia sólo a INSV, ya que no se logró resistencia contra el aislamiento TSWV-B (GRSV). Para esta última especie al igual que para TSWV y TCSV, teniendo en cuenta que existe una elevada similitud de aminoácidos entre ellas, es razonable que no se produzca la heteroencapsidación inviable, ya que es probable que las proteínas sean funcionalmente equivalentes. Resta estudiar cuál sería la estrategia de elección en el caso de protección contra aislamientos de especies no muy distintas (por ej. TSWV/GRSV) ya que ninguna de las dos propuestas solucionan dicho problema.

Considerando las dificultades existentes para controlar esta virosis es evidente

que las aproximaciones más probables son las genéticas (plantas transgénicas resistentes o resistencia natural). A la luz de lo expuesto anteriormente sería la resistencia natural la más aconsejable, debido a que se han encontrado variedades de tomate con resistencia natural a TSWV, GRSV y TCSV. Las dos últimas serían las especies problemáticas de adquirir resistencia por vía de plantas transgénicas conteniendo el gen N. De acuerdo a lo expuesto en la sección 1.12, para establecer cualquiera de estas estrategias es de vital importancia el conocimiento de la diversidad genética de *Tospovirus* presente en una determinada área de estudio.

Habiendo observado que el análisis de la secuencia de ARN y de aminoácidos del gen N ofrecía una aproximación útil para la discriminación de especies y dada la problemática de la protección antes mencionada, se intentó estudiar la diversidad de *Tospovirus* presente en diversas regiones hortícolas de la República Argentina.

En este estudio se demostró la presencia en el país de tres de las cuatro especies descritas de *Tospovirus*. Se encontró GRSV en Mendoza, Tucumán y Río Negro; TCSV en Entre Ríos y TSWV en la zona de La Plata y en Entre Ríos. En todos los casos los porcentajes de identidad de secuencia de ARN indicaron la presencia de una u otra especie, siendo los porcentajes de identidad o similitud de aminoácidos menos precisos para tal fin. Dichos resultados se corroboraron mediante estudios de ELISA indicando, una vez más, la utilidad de las secuencias de ARN del gen N como marcador específico. Por otra parte, quedó demostrado que el análisis de una porción de 450bp del gen N, además del gen completo, permitía arribar a resultados de la misma índole. Los porcentajes de identidad de nucleótidos entre los miembros de una misma especie variaron entre el 96 y el 97% para el caso de GRSV, 93% para TCSV y 93-94% para TSWV. Contrariamente a lo propuesto por De Avila *et al.* (1993), que los valores porcentuales de identidad de nucleótidos del gen N de los aislamientos pertenecientes a una misma especie alcanza el 99%, pudo constatarse una vez más que dichos valores, suelen ser menores sin sobrepasar en todos los casos el límite inferior del 93%. En el caso de los porcentajes de identidad de aminoácidos del gen N, observados entre aislamientos de una misma especie, los valores mostraron que las proteínas comparten valores de identidad que excepcionalmente están por debajo del 90%. Los valores de similitud dentro de los miembros de cada especie, en líneas generales, fueron semejantes (ligeramente incrementados) a los de identidad de ARN. En el caso de los aislamientos correspondientes a TSWV, para todos los aislamientos los porcentajes de similitud de aminoácidos fueron de alrededor

del 98-99%.

En el caso de los porcentajes de identidad de ARN, analizados entre los miembros de las distintas especies, los miembros de la especie GRSV difieren, estimativamente, en un 15% de nucleótidos con los de TCSV; 20% con TSWV y 38% con INSV. Estas diferencias mostraron que GRSV es más parecido a TCSV que a TSWV y a INSV como habían observado De Avila *et al.* (1993). Los porcentuales obtenidos de la misma comparación de TCSV y TSWV con el resto de las especies indicaron, además, que a pesar que las especies GRSV y TCSV son más parecidas entre ellas, TSWV es más parecida a GRSV que a TCSV. En todos los casos INSV mostró una diferencia de nucleótidos muy alta (34-38%) con las otras tres especies. Dada esta diferencia de secuencia entre los miembros de las distintas especies resulta evidente que para que las plantas transgénicas muestren protección, el virus infectante debe ser extremadamente parecido a la cepa elegida para la generación de la planta transgénica. En el caso del análisis de los porcentajes de identidad de aminoácidos entre las 4 especies, se observó que GRSV presenta diferencias de alrededor del 15% tanto con TCSV como con TSWV y de un 30% con INSV. Estos datos no permitieron discriminar a TSWV de TCSV. Por el contrario, si la comparación se hace entre TSWV y el resto de las especies se observa que la proteína muestra diferencias de alrededor de un 10% con GRSV, un 20% con TCSV y un 35% con INSV. Valores similares se observaron comparando TCSV contra las cuatro especies. Esto indicaría también que GRSV y TCSV son más similares entre sí que con el resto y que, a su vez, TSWV sería más similar a GRSV que a TCSV como se observó con los porcentajes de identidad de nucleótidos. Los porcentajes de similitud de aminoácidos obtenidos entre las cuatro especies, parecen ser los valores más interesantes. Tanto para GRSV, TCSV y TSWV, sea cual fuese la especie comparada, rondaron entre el 0 al 16% de aminoácidos diferentes, mostrando una elevada similitud entre las proteínas N de estas especies. En cambio, en líneas generales, la diferencia de similitud de aminoácidos entre ellas e INSV es de un 20%. El método de generación de plantas resistentes mediante la expresión del gen N, según se propuso, sería efectivo en casos de aislamientos heterólogos (por ej., entre TSWV con INSV y no contra las otras especies). Dicho mecanismo incluye una heteroencapsidación del virus infectante que lo torna inviable. Para que esto ocurra, según los resultados obtenidos en el presente trabajo, la diferencia en la similitud de los aminoácidos debería ser de alrededor de un 20%.

Pese a que los valores pueden estar ligeramente distorsionados de los que se hubieran obtenido utilizando el gen y la proteína entera, se los puede considerar representativos, en términos relativos, de lo que se observa en la naturaleza. Además, es útil mencionar que, dada la metodología utilizada de RT-PCR, es factible que se produzcan errores durante la polimeración debido a incorporaciones incorrectas producidas tanto por la transcriptasa reversa como por la *Taq* polimerasa y, de ese modo, los valores pueden estar aún más distorsionados. A pesar del alto grado de similitud de aminoácidos entre GRSV, TCSV y TSWV es posible identificar, de un modo preciso, a los miembros de cada especie, utilizando antisueros policlonales contra la proteína N.

En base a estos resultados y teniendo *in mente* los métodos de control del virus, la estrategia de construcción de plantas transgénicas resistentes a *Tospovirus* es una alternativa que podría ser utilizada en el futuro. Para tal fin sería necesario estudiar aún más la diversidad del grupo y profundizar los estudios de aquellos mecanismos involucrados en la protección. Por otra parte, la utilización de cultivares con resistencia natural a *Tospovirus* como es el linaje de *Lycopersicon esculentum* "TSW10", del cultivar Stevens (resistente a GRSV, TSWV y TCSV) se constituye en la más utilizable al corto plazo.

Una alternativa válida que permitiría solucionar los problemas comentados de las plantas transgénicas por incorporación del gen N viral, sería la identificación del gen de resistencia en aquellas plantas de tomate que toleran naturalmente la infección viral. Una vez identificado el gen, éste podría ser incorporado a plantas de tomate y generar, de ese modo, cultivares transgénicos resistentes a la virosis en cuestión.

Todo lo expuesto anteriormente resulta útil sólo en el caso de que el género *Tospovirus* estuviera compuesto por las especies antes mencionadas. Si a partir de otros estudios surgen nuevas especies, con características distintas en los parámetros analizados en esta tesis, es factible que deban modificarse o replantearse las estrategias de control.

En otro plano, mediante los resultados de secuenciación se detectó también que la proteína N de algunos aislamientos (M316, T101, T102, M28, ER25, ER36, RN5 y RN7) presenta un sitio potencial de glicosilación. Este sitio está representado por el triplete de aminoácidos N-Q-S (arginina-glutamina-serina). El hecho de la presencia de este sitio no significa que efectivamente ocurra el evento de glicosilación en la naturaleza pero, como se mencionó en la introducción

(sección 1.1), Mohamed *et al.* (1973) encontraron que la proteína que hoy se conoce como de la nucleocápside viral, estaba glicosilada. Posteriormente, Tas *et al.* (1977b), demostraron que esa proteína carecía de glicosilación y atribuyeron esa diferencia al hecho de trabajar con aislamientos distintos. Por lo tanto, si llegara a ser cierto que la proteína N puede glicosilarse, los sitios potenciales de glicosilación, hallados en varios aislamientos argentinos, serían sitios reales de glicosilación y también sería cierto que existiría una diferencia entre aislamientos como observaron Tas *et al.* (1977b). De corroborarse todos estos hechos, existirían discrepancias con las rutas de morfogénesis propuestas (sección 1.7) ya que en ninguna de ellas las proteínas N, solas o formando nucleocápsides, están dentro de la luz del aparato de Golgi, lugar en el cual se sabe ocurren esas modificaciones post-traduccionales. De cualquier manera, muchas de estas cuestiones aún permanecen sin esclarecerse y son sólo especulaciones.

En cuanto a la distribución de las distintas especies de *Tospovirus* en el territorio nacional, se pudo observar que la especie más ampliamente distribuida es GRSV. Esta especie, como se mencionó anteriormente, se encontró en tres zonas geográficas distintas como son las provincias de Tucumán en el Noroeste, Mendoza en Cuyo y el Alto Valle del Río Negro, en la Patagonia. La otra especie que se encontró en dos regiones distintas, muy cercanas entre sí, es TSWV. Dicha especie se encontró en la zona hortícola de La Plata, en la provincia de Buenos Aires y en Entre Ríos (regiones Pampeana y Mesopotámica, respectivamente). En esta última región coexiste la especie TCSV. Es importante mencionar que no se observó especificidad entre especie viral y tipo de cultivo infectado. Además, debido a la poca información existente sobre la distribución de trips en Argentina y sobre la capacidad de ellos para transmitir *Tospovirus*, se hace difícil establecer patrones de superposición virus/vector.

Es importante resaltar que el relevamiento descripto aquí dista mucho de ser completo dado que los tamaños muestrales fueron pequeños. Dada la metodología empleada, solamente pudo establecerse un relevamiento parcial pero indicativo de la presencia de especies de *Tospovirus*. Para realizar un relevamiento más completo, en caso de considerarlo pertinente, una de las alternativas válidas sería el análisis serológico o genético (mediante la aproximación de RT-PCR y digestión con enzimas de restricción descripta en la sección 3.2.5) de mayor número de muestras de aislamientos provenientes de las distintas zonas productoras de flores o de hortalizas de nuestro país.

Desde el punto de vista del análisis en el microscopio electrónico de secciones ultrafinas de tres aislamientos tipo (M316, ER25 y LP87) correspondientes a las tres especies encontradas en Argentina, no se observaron diferencias en cuanto a la partícula viral. Estos resultados se corresponden con las observaciones hechas con 30 aislamientos distintos y en las cuales no se encontraron diferencias entre ellos (Kitajima *et al.*, 1992). Por otra parte, de los aislamientos analizados por este método ninguno es defectivo morfológico. Es importante resaltar que de los tres aislamientos estudiados, M316 es el único que presenta acúmulos de material fibrilar correspondientes a proteína NS₅. Se desconoce la función de dicha proteína y de esa acumulación.

4.2 Identificación y diagnóstico de especies de *Tospovirus*

Sobre la base de los datos de secuenciación del fragmento amplificado de 450bp de todos los aislamientos, se pudo diseñar una estrategia de detección rápida, simple, sensible y que permite identificar con precisión la especie viral, sin necesidad de clonar y secuenciar el gen N. Todas estas características del método se constituyen en herramientas muy importantes en el momento de brindar asesoramiento a los horticultores y floricultores o de ampliar el conocimiento sobre la epidemiología de los *Tospovirus*. A pesar de que los sitios de restricción encontrados para la resolución de estas especies se obtuvieron a partir de secuencias de una porción del gen N de 16 aislamientos de *Tospovirus*, posteriores aislamientos analizados por esta técnica (RN5 y RN7) se diagnosticaron como GRSV. Posteriormente, se secuenció el fragmento de 450bp y las secuencias indicaron, como se había predicho mediante RT-PCR y análisis de restricción, que se trataban de la especie GRSV.

Los resultados obtenidos con dicha técnica mostraron ser reproducibles y de este modo se constituye en un método de elección para analizar un gran número de muestras. Anteriormente, la única manera de identificar y diagnosticar especies de *Tospovirus* era mediante ensayos de ELISA. Con este tipo de ensayos pueden obtenerse resultados ambiguos que enmascaran la detección y llevan a la pérdida de especificidad. De este modo, el método de amplificación de un fragmento del gen N por RT-PCR y posterior análisis por RFLP resulta un avance en la identificación y diagnóstico de especies de *Tospovirus*.

4.3 Análisis filogenético del género *Tospovirus*

En las hipótesis filogenéticas obtenidas en el análisis del nivel "contexto", pudo detectarse que el género *Bunyavirus* forma un grupo monofilético con los *Tospovirus* y no con el género *Phlebovirus*. Pero, como se mencionó en la sección introductoria 1.8, de acuerdo a la estrategia de replicación, los *Tospovirus* son más parecidos a los *Phlebovirus* que al resto de los miembros de la familia Bunyaviridae. Por lo tanto, en base a esa incongruencia dada para la elección del *outgroup*, se utilizó a un miembro del género *Bunyavirus* (Bunyamwera) y a un miembro del género *Phlebovirus* (Rift Valley Fever) como *outgroup* en estudios separados.

En los análisis a nivel "género *Tospovirus*", fue imposible establecer cuál es el mejor *outgroup*. Si el criterio para definir esa situación estuviera dado por la hipótesis que utiliza un menor número de pasos, la especie Rift Valley Fever sería la mejor, con respecto a la especie Bunyamwera, ya que utiliza 340 y 242 pasos contra 374 y 603 para datos de secuencias de ADN y de proteínas, respectivamente. Por otra parte, si el criterio estuviera dado por la hipótesis que se viera representada por el menor número de árboles igualmente simples, la especie Bunyamwera sería la elegida ya que para el análisis utilizando secuencias de ADN se observan 3 árboles contra 60 utilizando a la otra especie como *outgroup*. En el caso del análisis utilizando secuencias de proteínas, con ambas especies como *outgroup*, se obtuvieron 50 árboles igualmente simples. Por lo tanto, si bien no se podría hacer una elección del mejor *outgroup* uno se inclinaría por elegir al que da menor número de árboles igualmente simples (Bunyamwera; 3 árboles). Dada esta cuestión, en este trabajo, no se tomó a ninguno de los dos *outgroups* como preponderante y las conclusiones se realizaron teniendo en cuenta los resultados obtenidos con uno y otro *outgroup*.

Analizando comparativamente los resultados del análisis filogenético utilizando uno u otro *outgroup*, se pudo observar que los aislamientos correspondientes a cada una de las cuatro especies de *Tospovirus* (TSWV, GRSV, TCSV e INSV) (De Avila *et al.*, 1993), forman parte de clados distintos bien diferenciados y sustentados estadísticamente con un nivel de confianza alto, mediante análisis de *bootstrapping*. Respecto a la posición topológica de los mismos existen algunas diferencias. En los cladogramas obtenidos utilizando datos de secuencias de ADN y de proteínas con Rift Valley Fever (*Phlebovirus*), o con secuencias de ADN de Bunyamwera (*Bunyavirus*), como *outgroup*, los aislamientos

correspondientes a la especie TCSV (ER25, ER36 y BR03) se encuentran formando un grupo monofilético con los miembros de la especie GRSV (M23, M28, M316, T101, T102, RN5, RN7 y SA05), separados de la especie TSWV (LP2, LP87, LP940, LP941, ER30 y BR01). Contrariamente, cuando se analizan datos de secuencia de proteínas con Bunyamwera como *outgroup*, se invierte esa topología formando GRSV y TSWV un grupo monofilético.

Es importante analizar las ramificaciones existentes dentro del clado correspondiente a cada especie. Dentro de la especie GRSV, en todos los análisis heurísticos realizados, el aislamiento SA05 de Brasil mostró estar separado de los aislamientos argentinos. En dichos casos, el análisis de *bootstrapping* indicó que esa separación está sustentada, en el mejor de los casos, por un 67% (análisis de ADN con Bunyamwera) siendo este grado de confianza (estabilidad) relativamente bajo. Contrariamente, en los casos del análisis de *bootstrapping* utilizando datos de secuencias de proteínas con ambos *outgroups*, no existe separación entre el aislamiento brasileño y los aislamientos argentinos. Todo estaría indicando una gran homogeneidad dentro de la especie GRSV. En el caso del análisis de los aislamientos dentro del clado de la especie TSWV se observó, mediante análisis de *bootstrapping*, que el aislamiento brasileño BR01 y el aislamiento argentino LP940 están separados del resto de los aislamientos argentinos menos en el análisis con secuencias de nucleótidos con Bunyamwera como *outgroup*. En esos casos esa separación está sustentada por una estabilidad entre el 52 y el 62%. Este grado de confianza es bajo. Todo estaría indicando que el clado formado por esos aislamientos es también altamente homogéneo. Un punto importante para discutir es lo que ocurre dentro del clado formado por los aislamientos correspondientes a la especie TCSV. En todos los análisis realizados, independientemente del *outgroup* y del tipo de datos analizados, el aislamiento brasileño BR03 se encontró separado de los dos aislamientos argentinos (ER25 y ER36). Estos últimos siempre formaron un grupo separado con una estabilidad bastante elevada en análisis de *bootstrapping* (entre el 84 y el 100%). Esta sería la única de las cuatro especies descritas que muestra, mediante este tipo de análisis, una diferencia apreciable con el resto de los datos obtenidos en esta tesis. Dentro del terreno de las especulaciones se podría decir que, de confirmar dicha hipótesis, se estaría en presencia de un grupo de *Tospovirus* divergente que todavía no ha logrado adquirir diferencias feno/genotípicas que permita diferenciarlo del resto ya sea mediante estudios serológicos o de RT-PCR. Pese a que ésta es una especulación, sería necesario

estudiar un número mayor de aislamientos de supuestos miembros de la especie TCSV con la finalidad de poder contrastar la hipótesis filogenética propuesta en esta tesis.

Dada esta última consideración, el análisis filogenético parece coincidir con la clasificación de *Tospovirus* propuesta por De Avila *et al.* (1993) basada en similitudes globales.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- A) Desde el punto de vista molecular, en Argentina, existen tres de las cuatro especies de *Tospovirus* descritas; *groundnut ringspot virus* (GRSV) en el noroeste, Cuyo y patagonia; *tomato spotted wilt virus* (TSWV) en la Mesopotamia y pampa húmeda y *tomato chlorotic spot virus* (TCSV) en la Mesopotamia.

- B) Esa diversidad pudo ser corroborada mediante un método de detección rápido, sensible y reproducible basado en la técnica de RT-PCR y digestión con enzimas de restricción que a su vez podrá ser utilizada como un método rápido de diagnóstico de la enfermedad.

- C) Las hipótesis filogenéticas planteadas corroboran en todos los casos que el género *Tospovirus* está formado por al menos cuatro especies virales diferentes como había sido propuesto por De Avila *et al.* (1993) basándose en similitudes globales.

BIBLIOGRAFIA

-
- Akashi, H., Gay, M., Ihara, T. y Bishop, D. H. (1984). Localized conserved regions of the S RNA gene products of bunyaviruses are revealed by sequence analyses of the simbu serogroup Aino virus. *Virus Res.* 1, 51-63.
- Amin, P. W., Reddy, D. V. R., Ghanekar, A. M. y Reddy, M. S. (1981). Transmission of tomato spotted wilt virus, the causal agent of bud necrosis of peanut, by *Scirtothrips dorsalis* and *Frankliniella schultzei*. *Plant Dis.* 65, 663-665.
- Archie, J. W. (1989). A randomization test for phylogenetic information in systematic data. *Syst. Zool.* 38, 239-252.
- Beaton, A. R. y Krug, R. M. (1984). Synthesis of templates for influenza virion RNA replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 81, 4682-4686.
- Beaton, A. R. y Krug, R. M. (1986). Transcription, antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 6282-6286.
- Beaty, B. J. y Calisher, C. H. (1991). Bunyaviridae -natural history. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 169, 27-78
- Best, R. J. (1968). Tomato spotted wilt virus. *Adv. Virus Res.* 13, 65-146.
- Best, R. J. y Gallus, H. P. D. (1953). Strains of tomato spotted wilt virus. *Aust. J. Sci.* 15, 212-214.
- Best, R. J. y Katekar G. F. (1964). Lipid in a purified preparation of tomato spotted wilt virus. *Nature* 203, 671-672.
- Best, R. J. y Palk, B. A. (1964). Electron microscopy of strain E of tomato spotted wilt virus and comments on its probable biosynthesis. *Virology* 23, 445-460.
- Bishop, D. H. L. (1990). Bunyaviridae and their replication: Part I, Bunyaviridae. En: *Fields Virology*. (Fields, B. N. y Knipe, D. M. Eds.). New York: Raven. 2nd ed. pp. 1155-1173.
- Black, L. M., Brakke, M. K. y Vatter A. E. (1963). Purification and electron microscopy of tomato spotted wilt virus. *Virology* 20, 120-130.
- Boiteux, L. S. y Giordano, L. de B. (1992). Screening *Lycopersicon* germplasm for resistance to a Brazilian isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV). *TGC Report* 42, 13-14.
-

-
- Boiteux, L. S. y Giordano, L. de B. (1993). Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 71, 1514-154.
- Boiteux, L. S., Giordano, L. de B. y De Avila, A. C. (1993a). Avaliação de germoplasma de tomate para resistencia a tres espécies de *Tospovirus* causadoras do "vira-cabeça" do tomateiro no Brasil. *Hort. bras.* 11, 51.
- Boiteux, L. S., Giordano, L. de B., De Avila, A. C. y Santos, J. R. M. (1993b). "TSW 10": Linhagem de tomate para mesa resistente a tres espécies de *Tospovirus* causadoras do "vira-cabeça". *Hort. bras.* 11, 163-164.
- Brittlebank, C. C. (1919). Tomato diseases. *J. Agric. Victoria.* 17, 231-235.
- Brooks, D. R. y McLennan D. A. (1991). *Phylogeny, Ecology and behavior.* (Univ. of Chicago Press, Chicago)
- Brown, L. G., Simone, G. W. y Christie R. G. (1991). Diagnostic strategy development for tomato spotted wilt virus. En: *Virus-thrips-plant interactions do TSWV, Proceedings of USDA workshop, Beltsville, U.S.A.* (H. T. Hsu & R. H. Lawson, Eds.). National Technology Information Service, Springfield, pp. 94-99.
- Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A. y Wilson, A. C. (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18, 225-239.
- Calisher, C. H. (1991). Bunyaviridae. *Arch. Virol.* suppl. 2, 273-283.
- Cavalier-Smith, T. (1985). Eukaryote gene numbers, noncoding DNA and genome size. En: *The evolution of genome size.* (Cavalier-Smith, T. ed.). Wiley, Chichester, UK. pp. 69-103.
- Cave, D. R., Hendrickson, F. M. y Huang, A. A. (1985). Defective interfering virus particles modulate virulence. *J. Virol.* 55, 366-373.
- Chanekar, A. M., Reddy, D. V. R., Iizuka, N., Amin, P. W. y Gibbous, R. W. (1979). Bud necrosis of groundnut (*Arachis hypogaea*) in India caused by tomato spotted wilt virus. *Annals of Applied Biology* 93, 173-179.
- Childers, C. C. y Achor, D. S. (1991). Feeding and oviposition injury to flowers and developing floral buds of 'Navel' orange by *Frankliniella bispinosa* (Thysanoptera:Thripidae) in Florida. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 84, 272-282.
-

- Cho, J. J., Mau, R. F. L., German, T. L., Hartmann, R. W., Yudin, L. S., Gonsalves, D. y Provvidenti, R. (1989). A multidisciplinary approach for tomato spotted wilt virus (TSWV) management in Hawaii. *Plant Dis.* **73**, 375-383.
- Cho, J. J., Mau, R. F. L., Gonsalves, D. y Mitchell, W. C. (1986). Reservoir weed hosts of tomato spotted wilt virus. *Plant Dis.* **70**, 1014-1017.
- Cho, J. J., Mau, R. F. L., Hamasaki, R. T. y Gonsalves, D. (1988). Detection of tomato spotted wilt virus in individual thrips by enzyme linked immunosorbent assay. *Phytopathology* **78**: 1348-1352.
- Cho, J. J., Mau, R. F. L., Ullman, D. E. y Custer, D. M. (1991). Detection of tomato spotted wilt virus within thrips. En: *Virus-thrips-plant interactions do TSWV, Proceedings of USDA workshop, Beltsville, U.S.A.* (H. T. Hsu & R. H. Lawson, Eds.). National Technology Information Service, Springfield, p. 144.
- Cho, J. J., Mitchell, W. C., Mau, R. F. L. y Sakimura, K. (1987). Epimemiology of tomato spotted wilt virus disease on crisphead lettuce in Hawaii. *Plant Dis.* **71**, 505-508.
- Chomczynski, P y Sacchi, N. (1987). Single step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chorophorm extraction. *Analyt. Biochem.* **162**, 156-159.
- Clark, M. F. y Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme linked inmunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**, 475-483.
- Crisci, J. V. (1982). Parsimony in`evolutionary theory: law or methodological prescription? *J. Theor. Biol.* **97**, 35-41.
- Crisci, J. V. y Lopez Armengol, M. F. (1983). *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Secretaría General de la O.E.A., Serie de Biología, Monografía 26.
- De Avila, A.C. (1992). Diversity of tospoviruses. Ph.D. diss. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands. pp. 83-105.
- De Avila, A.C., De Haan, P., Kitajima, E. W., Kormelink, R., Resende, R. de O., Goldbach, R. y Peters, D. (1992). Characterization of a distinct isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Impatiens* sp. in the Netherlands. *J. Phytopathology* **134**, 133-151.
- De Avila, A.C., De Haan, P., Kormelink, R., Resende, R. de O., Goldbach, R. y Peters, D. (1993). Classification of tospovirus based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J. Gen. Virol.* **74**, 153-159.

- De Avila, A.C., Huguenot, C., Resende, R. de O., Kitajima, E. W., Goldbach, R. y Peters, D. (1990). Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* **71**, 2801-2807.
- De Avila, A.C., Peña, L., Kitajima, E. W., Resende, R. de O., Diaz-Múgica, M. V., Diaz-Ruís, J. R. y Peters, D. (1991). Characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV), isolated from *Capsicum annuum* L. in the Canary Islands. *Phytopathologia Mediterranea* **30**, 23-28.
- DeBry, R. W. y Slade, N. A. (1985). Cladistic analysis of restriction endonuclease cleavage maps within a maximum-likelihood framework. *Syst. Zool.* **34**, 21-34.
- De Haan, P., De Avila, A. C., Kormelink, R., Westebroek, A., Gielen, J. J. L., Peters, D. y Goldbach, R. (1992a). The nucleotide sequence of the S RNA of *Impatiens* necrotic spot virus, a novel Tospovirus. *FEBS letters* **306**, 27-32.
- De Haan, P., Gielen, J. J. L., Prins, M., Wijkamp, I. G., Van Schepen, A., Peters, D., Van Grinsven, M. Q. J. M. y Goldbach R. (1992b). Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *Bio/Technology* **10**, 1133-1137.
- De Haan, P., Wagemaker, L., Peters, D. y Goldbach, R. (1989a). Tomato spotted wilt virus, a new member of the Bunyaviridae? En: *Genetics and Pathogenicity of Negative Strand Viruses*. (Kolakofsky, D. & B. W. J. Mahy Eds.) Amsterdam: Elsevier. pp. 287-290.
- De Haan, P., Wagemaker, L., Peters, D. y Goldbach, R. (1989b). Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNA of tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* **70**, 3469-3473.
- De Haan, P., Wagemaker, L., Peters, D. y Goldbach, R. (1990). The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J. Gen. Virol.* **71**, 1001-1007.
- De Haan, P., Kormelink, R., Resende, R. de O., Van Poelwijk, F., Peters, D. y Goldbach, R. (1991). Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **72**, 2207-2216.
- Devereaux, J., Haerberli, P. y Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12**, 387-295.
- Dower, W. J., J. F. Miller y Ragsdale CH. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Eck, R. V y Dayhoff, M. O. (eds.) (1966). *Atlas of Protein Sequence and structure 1966*. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, MD.

-
- Elliott, R. M. (1989). Nucleotide sequence analysis of the small(S) RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.* **70**, 1281-1285.
- Elliot, R. M. (1990). Molecular biology of the Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.* **71**, 501-522.
- Faith, D. P. y Cranston, P. S. (1991). Could a cladogram this short have arisen by chance alone?: On permutation tests for cladistic structure. *Cladistics* **7**, 1-28.
- Farris, J. S. (1970). Methods of computing Wagner trees. *Syst. Zool.* **19**, 83-92.
- Farris, J. S. (1983). The empirical basis of Phylogenetic Systematics. En: *Advances in Cladistics: Proceedings of the second meeting of the Willi Hennig Society*. (Platnick, N. y Funk, V. A., eds). Columbia University Press, New York. pp. 7-36.
- Farris, J. S. (1989). The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* **5**, 417-419.
- Feinberg, A. P. y Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Ann. Rev. Genet.* **22**, 521-565.
- Felsenstein, J. (1991). PHYLIP: Phylogeny Inference Package, version 3.5. Department of Genetics, SK-50, University of Washington, Seattle.
- Finlay, K. W. (1953). Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato. II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. *Aust. J. Biol. Sci.* **6**, 153-163.
- Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: Minimal change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**, 404-416.
- Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L. y Brown, F. (1991). Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* Supplement 2.
- Francki, R. I. B. y Grivell, C. J. (1970). An electron microscope study of the distribution of tomato spotted wilt virus in systemically infected *Datura stramonium* leaves. *Virology* **42**, 969-978.

-
- Francki, R. I. B. y Hatta, T. (1981). Tomato spotted wilt virus. En: *Handbook of plant virus infection and comparative diagnosis*. (E. Kurstak Ed.). Amsterdam, Elsevier/North Holland. pp. 491-512.
- Francki, R. I. B., Milne, R. G. y Hatta, T. (1985). *Atlas of plant viruses*. CRC Press, Boca Raton, vol.1.
- Frelin, C. y Vuilleumier, F. (1979). Biochemical methods and reasoning in systematics. *Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* 17, 1-10.
- German, T. L., Ullman, D. E. y Moyer, J. W. (1992). *Tospoviruses: Diagnosis, molecular biology, and vector relationships*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 315-348.
- Ghiringhelli, P. D., Rivera Pomar, R. V., Baro, N. I., Rosas M. F., Grau, O. y Romanowski, V. (1989). Nucleocapsid protein gene of Junin arenavirus (cDNA sequence). *Nucleic Acids Res.* 17, 8001-8001.
- Gielen, J. J. L., De Haan, P., Kool, A. J., Peters, D., Van Grinsven, M. Q. J. M. y Goldbach, R. W. (1991). Engineered resistance to tomato spotted wilt virus, a negative-strand RNA virus. *Bio/Technology* 9, 1363-1367.
- Giorgi, C., Accardi, L., Nicoletti, L., Gro, M. C., Takehara, K., Hilditch, C. y Bishop, D. H. (1991). Sequences and Coding Strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley Fever Viruses Compared to Those of Punta Toro, Sicilian Sandfly Fever, and Uukuniemi Viruses. *Virology* 180, 738-753.
- Gonzalez-Scarano, F. y Nathanson, N. (1990). Bunyaviruses. En: *Fields Virology*. (Fields, B. N. y Knipe, D. M. Eds.). New York: Raven. 2nd ed. pp. 1195-1228.
- Gonsalves, D. y Trujillo, E. E. (1986). Tomato spotted wilt virus in papaya and detection of the virus with ELISA. *Plant Dis.* 70, 501-506.
- Gorman, O. T., Bean, W. J., Kawaoka, Y., Donatelli, I., Guo, Y. y Webster, R. G. (1991). Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J. Virol.* 65, 3704-3714.
- Griffin, A. M. y Bournsnel, M. E. G. (1990). Analysis of the nucleotide sequence of DNA from the region of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus; potential evolutionary relationships between the herpesvirus subfamilies. *J. Gen. Virol.* 71, 841-850.
- Gubler, U. y Hoffman, B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraires. *Gene* 25, 263-269.
-

-
- Gumpf, D. J. y Weathers, J. G. (1972). Identification and purification of tomato spotted wilt virus isolated from *ageratum*. *Pl. Dis. Repr.* **56**, 869-872.
- Harrison, B. D., Finch, J. T., Gibbs, A. J., Hollings, M., Shepherd, A. J., Valenta, V. y Wetter, C. (1971). Sixteen groups of plant viruses. *Virology* **45**, 356-363.
- Hedman, M. (1985). The evolution of bacterial genomes. En: *The evolution of genome size*. (Cavalier-Smith, T. ed.). Wiley, Chichester, UK. pp. 37-68.
- Hennig, W. (1950). Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. Berlin: Deutscher Zentra-Iverlag. 370 pp.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetic systematics*. Univ. of Illinois Prees, Urbana.
- Higgins, D. G. y Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**, 237-244.
- Higgins, D. G. y Sharp, P. M. (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* **5**, 151-153.
- Hillis, D. M. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 23-42.
- Hillis, D. M. (1991). The phylogeny of amphibians: current Knowledge and the role of cytogenetics. En: *Amphibian Cytogenetics and Evolution* (D. M. Green and S. K. Sessions, eds.). Academic Press, New York. pp. 7-31.
- Hillis D. M., Allard, M. W. y Miyamoto, M. M. (1993). Analysis of DNA Sequence data: phylogenetic inference. En: *Molecular systematics* (D. M. Hillis and C. Moritz, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp. 456-487.
- Hillis, D. M. y Moritz, C., Eds. (1990). *Molecular Systematics*. (Sinauer, Sunderland, MA).
- Hillis, D. M. y Huelsenbeck, J. P. (1992). Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. *J. Hered.* **83**, 196-198.
- Hillis, D. M., Huelsenbeck, J. P. y Cunningham, C. W. (1994). Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science* **264**, 671-677.
- Huang, A. S. y Baltimore, D. (1970). Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* **266**, 325-327.
-

- Hugenot, C., Van den Dobbelsteen, G., De Haan, P., Wagemakers, C. A., Drost, G. A., Osterhaus, A. D. M. E. y Peters, D. (1990). Detection of tomato spotted wilt virus using monoclonal antibodies and riboprobes. *Arch. Virol.* **110**, 47-62.
- Ie, T. S. (1964). An electron microscope study of tomato spotted wilt virus in the plant cell. *Neth. J. Pl. Path.* **70**, 114-115.
- Ie, T. S. (1970). Tomato spotted wilt virus. *CMI/AAB Plant virus Descrip.* No. 39.
- Ie, T. S. (1971). Electron microscopy of developmental stages of tomato spotted wilt virus in plant cells. *Virology* **43**, 468-479.
- Ie, T. S. (1982). A sap-transmissible, defective form of tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* **59**, 387-391.
- Ihara, T., Akashi, H. y Bishop, D. H. (1984). Novel coding strategy (ambisense genomic RNA) revealed by sequence analyses of Punta Toro phlebovirus S RNA. *Virology* **136**, 293-306
- Jones, R. K. y Baker, J. R. (1991). TSWV: host range and spread. En: *Virus-thrips-plant interactions do TSWV, Proceedings of USDA workshop, Beltsville, U.S.A.* (H. T. Hsu & R. H. Lawson, Eds.). National Technology Information Service, Springfield, pp. 89-93.
- Jones, T. D., Buck, K. W. y Plumb, R. T. (1991) The detection of beet western yellows virus and beet mild yellowing virus in crop plants using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **35**, 287-296.
- Joubert, J. J., Hahn, J. S., Von Wechmar, M. B. y Van Regenmortel, M. H. V. (1974). Purification and properties of tomato spotted wilt virus. *Virology* **57**, 11-19.
- Källersjö, M., Farris, J. S., Kluge, A. y Bult, C. (1992). Skewness and permutation. *Cladistics* **8**, 275-293.
- Kameya-Iwaki, M. K., Hanada, K. y Honda, Y. (1988). A watermelon strain of tomato spotted wilt virus (TSWV-W) and some properties of its nucleic acid. (Abstract). En: *Abstracts of papers, Fifth International Congress of Plant Pathology*, **64**.
- Kikuta, K. y Frazier, W. A. (1946). Breeding tomatoes for resistance to spotted wilt in Hawaii. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **47**, 271-276.

- Kim, J. W., Sun, S. S. M. y German, T. L. (1994). Disease resistance in tobacco and tomato plants transformed with the tomato spotted wilt virus nucleocapsid gene. *Plant Dis.* **78**, 615-621.
- Kitajima, E. W. (1965). Electron microscopy of vira cabeça virus (Brazilian tomato spotted wilt virus) within the host cell. *Virology* **26**, 11-19.
- Kitajima, E. W., De Avila, A. C., Resende, R. de O., Goldbach, R. W. y Peters, D. (1992). Comparative cytological and immunogold labelling studies on different isolates of tomato spotted wilt virus. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **24**, 1-14.
- Kluge, A. G. (1989). A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among Epicrates (Boidae, Serpents). *Syst. Zool.* **38**, 7-25.
- Kluge, A. G. y Farris, J. S. (1969). Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* **18**, 1-32.
- Kooning, E. V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **72**, 2197-2206.
- Kormelink, R., Kitajima, E. W., De Haan, P., Zuidema, D., Peters, D. y Goldbach, R. (1991). The non-structural protein (NS_S) encoded by the ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology* **181**, 459-468.
- Kormelink, R., De Haan, P., Peters, D. y Goldbach, R. (1992a). Viral synthesis in tomato spotted wilt virus-infected *Nicotiana rustica* plants. *J. Gen. Virol.* **73**, 687-693.
- Kormelink, R., Van Poelwijk, F., Peters, D. y Goldbach, R. (1992b). Non-viral heterogeneous sequences at the 5' ends of tomato spotted wilt virus (TSWV) mRNAs. *J. Gen. Virol.* **73**, 2125-2128.
- Kormelink, R., De Haan, P., Meurs, C., Peters, D. y Goldbach, R. (1992c). The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J. Gen. Virol.* **73**, 2795-2804.
- Kormelink, R., Storms, M., Van Lent, J., Peters, D. y Goldbach, R. (1994). Expression and subcellular location of the NS_M protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* **200**, 56-65.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

-
- Law, M. D. y Moyer, J. W. (1990). A tomato spotted wilt-like virus with serologically distinct N protein. *J. Gen. Virol.* **71**, 933-938.
- Law, M. D., Speck, J. y Moyer, J. W. (1991). Nucleotide sequence of the 3' non-coding region and N gene of the S RNA of a serologically distinct tospovirus. *J. Gen. Virol.* **72**, 2597-2601.
- Law, M. D., Speck, J. y Moyer, J. W. (1992). The M RNA of Impatiens necrotic spot *Tospovirus* (Bunyaviridae) has an ambisense genomic organization. *Virology* **188**, 732-741.
- Leary, J. J., Brigati, D. J. y Ward, D. C. (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: bioblots. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **80**, 4045-4049.
- Løvtrup, S. (1974). *Epigenetics, a treatise on theoretical biology*. J. Wiley and Sons, New York.
- Løvtrup, S. (1978). On von Baerian and Haeckelian recapitulation. *Syst. Zool.* **27**, 348-352.
- Maddison, W. P. y Maddison, D. R. (1992). MAC CLADE: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 3. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Margush, T. y McMorris, F. R. (1981). Consensus n-trees. *Bull. Math. Biol.* **43**, 239-244.
- Marriott, A. C., Ward, V. K. y Nuttall, P. A. (1989). The S RNA segment of Sandfly fever sicilian virus: Evidence for an ambisense genome. *Virology* **169**, 341-345.
- Marriott, A. C., Polysoni, T., Antoniadis, A. y Nuttall, P. A. (1994). Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic Fever Virus using expressed viral nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* **75**, 2157-2161.
- Martin, M. M. (1964). Purification and electron microscope studies of tomato spotted wilt virus (TSWV) from tomato roots. *Virology* **22**, 645-649.
- Matthews, R. E. F. (1982). Classification and nomenclature of viruses: Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **17**, 1-200.
- Mau, R. F. L., Bautista, R., Cho, J. J., Ullman, D. E., Gusukuma-Minuto, L. R. y Custer, D. (1991). Factors affecting the epidemiology of TSWVF in field crops: Comparative virus acquisition efficiency of vectors and suitability of alternate hosts to *Frankliniella occidentalis* (Pergande). En: *Virus-thrips-plant interactions do TSWV, Proceedings of USDA workshop, Beltsville, U.S.A.* (H. T. Hsu & R. H. Lawson, Eds.). National Technology Information Service, Springfield, pp. 21-27.
-

-
- Maxson, L. R. y Wilson, A. C. (1974). Convergent morphological evolution by studying proteins of tree frogs in the *Hyla eximia* species group. *Science* 185, 66-68.
- Mayr, E. (1969). *Principles of systematic zoology*. Mc Graw Hill Book Co., New York.
- Mayr, E. (1982). *The growth of biological thought. Diversity, evolution and inheritance*. The Bilknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- Milne, R. G. (1970). An electron microscope study of tomato spotted wilt virus in sections of infected cells and in negative stain preparations. *J. Gen. Virol.* 6, 267-276.
- Milne, R. G. y De Zoeten, G. A. (1967). A comparison of some methods of preparation of thin sections of virus-infected leaves for electron microscope. *J. Ultrastruct. Res.* 19, 398-407.
- Milne, R. G. y Francki, R. I. B. (1984). Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family Bunyaviridae? *Intervirology* 22, 72-76.
- Miyamoto, M. M. (1985). Consensus cladograms and general classifications. *Cladistics* 1, 186-189.
- Mohamed, N. A., Randles, J. W. y Francki, R. I. B. (1973). Protein composition of tomato spotted wilt virus. *Virology* 56, 12-21.
- Mohamed, N. A. (1981). Isolation and characterization of subviral structures from tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* 53, 197-206.
- Morris, T. J. y Knorr, D. A. (1990). Defective interfering viruses associated with plant virus infection. En: *New Aspects of Positive-Strand RNA Viruses*. (Brinton, M. A. y Heinz, F. X. Eds.). Washington D. C.: American Society of Microbiology. pp. 123-127.
- Mumford, R. A., Barker, I. y Wood, K. R. (1994). The detection of tomato spotted wilt virus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 46, 303-311.
- Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970). A general methods applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
- Nei, M. (1975). *Molecular Population Genetics and Evolution*. Elsevier, North Holland.
- Nelson, G. J. (1978). Ontogeny, phylogeny, and the biogenetic law. *Syst. Zool.* 27, 324-345.
- Nelson, G. y Platnick, N. I. (1981). *Systematics and Biogeography: Cladistics and vicariance*. Columbia Univ. Press, New York.
-

- Nerome, K., Kanegae, Y., Yoshioka, Y., Itamura, S., Ishida, M., Gojobori, T. y Oya, A. (1991). Evolutionary pathways of N2 neuraminidases of swine and human influenza A viruses: origin of the neuraminidase genes of two reassortants (H1N2) isolated from pigs. *J. Gen. Virol.* **72**, 693-698.
- Nome, F. y Docampo, D. (1969a). Virus del marchitamiento manchado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*). *Bol. Técn. Est. Exp. Agron., Univ. Chile.* **29**, 14-22.
- Nome, F. y Tolosa, J. (1969b). Estimación de perdidas producidas por los virus del marchitamiento manchado y del mosaico en tomate. *Bol. Técn. Est. Exp. Agron., Univ. Chile.* **29**, 32-38.
- Norris, D. O. (1946). The strain complex of and symptom development of spotted wilt virus. *Bulletin of the Australian Council of Science and Industrial Research*, no. 202.
- Paliwal, Y. C. (1974). Some properties and thrip transmission of tomato spotted wilt virus in Canada. *Can. J. Bot.* **52**, 1177-1182.
- Paliwal, Y. C. (1976). Some characteristics of the thrips vector relationship of tomato spotted wilt virus in Canada. *Can. J. Bot.* **54**, 402-404.
- Pang, S. Z., Nagpala, P., Wang, M., Slightom, J. L. y Gonsalves, D. (1992). Resistance to heterologous isolates of tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco expressing its nucleocapsid protein gene. *Phytopathology* **82**, 1223-1229.
- Pang, S. Z., Slightom, J. L. y Gonsalves, D. (1993). Different mechanisms protect transgenic tobacco against tomato spotted wilt and Impatiens necrotic spot *Tospovirus*. *Bio/Technology* **11**, 819-824.
- Parrington, M. A. y Kang, C. Y. (1990). Nucleotide sequence analysis of the S genomic segment of Prospect Hill virus: Comparison with the prototype hantavirus. *Virology* **175**, 167-175.
- Patterson, C. (1982). Morphological characters and homology. En: *Problems of Phylogenetic Construction*. (Joysey, K. A. y Friday, A. E., eds.). Academic Press, London, New York. pp. 21-74.
- Patterson, J. L., Cabradilla, C., Holloway, B. P., Obijeski, J. F. y Kolakofsky, D. (1983). Multiple leader RNAs and messenger RNAs are transcribed from the La Crosse virus small genome segment. *Cell* **33**, 791-799.

-
- Penny, D. y Hendy, M. D. (1985). Testing methods of evolutionary tree construction. *Cladistics* 1, 266-278.
- Penny, D. y Hendy, M. D. (1986). Estimating the reliability of evolutionary trees. *Mol. Biol. Evol.* 3, 403-417.
- Peters, D., De Avila, A. C., Kitajima, E. W., Resende, R. de O., De Haan, P. y Goldbach, R. (1991). An overview of tomato spotted wilt virus. En: *Virus-thrips-plant interactions do TSWV, Proceedings of USDA workshop, Beltsville, U.S.A.* (H. T. Hsu & R. H. Lawson, Eds.). National Technology Information Service, Springfield, pp. 1-44.
- Pittman, H. A. (1927). Spotted wilt of tomatoes. Preliminary note concerning the transmission of the "spotted wilt" of tomatoes by an insect vector (*Thrips tabaci* Lind.). *J. Counc. Sci. Ind. Res. Aust.* 1, 74-77.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. y Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8, 3867-3874.
- Popper, K. (1968). *The logic of Scientific Discovery*. Harper Torchbooks, New York.
- Razvyazkina, G. M. (1953). The importance of the tobacco thrips in the development of outbreaks of tip chlorosis of Makhorka. *Dokl. Vses. Akad. Skh. Nauk.* 18, 27-31 (en Ruso). (Abstr. en *Rev. Appl. Entomol.* A 42, 146).
- Reddy, D. V. R. y Wightman, J. A. (1988). Tomato spotted wilt virus: Thrips transmission and control. En: *Advances in disease vector research*. New York. Springer-Verlag. 8, 203-220.
- Reddy, D. V. R., Ratna, A. S., Sudarshana, M. R., Poul, F. y Kiran Kumar, I. (1992). Serological relationships and purification of bud necrosis virus, a tospovirus occurring in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in India. *Annals of Applied Biology.* 120, 279-286.
- Reddy, D. V. R., Sudarshana, M. R., Ratna, A. S., Amin, P. W., Kiran Kumar, I. y Murphy, A. K. (1991). The occurrence of yellow spot virus, a member of tomato spotted wilt virus group, on peanut (*Arachis hypogaea* L.) in India. En: *Virus-thrips-plant interactions do TSWV, Proceedings of USDA workshop, Beltsville, U.S.A.* (H. T. Hsu & R. H. Lawson, Eds.). National Technology Information Service, Springfield, pp. 77-78.
- Rees, H. (1972). DNA in higher plants. En: *Evolution of Genetic Systems*. (H. H. Smith, Ed.). Gordon & Breach, New York. pp. 394-418.
-

-
- Resende, R. de O. (1993). Generation and characterization of mutants of tomato spotted wilt virus. Ph.D. diss. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands.
- Resende, R. de O., Kitajima, E. W., De Avila, A. C., Goldbach, R. y Peters, D. (1991). Defective isolates of tomato spotted wilt virus. En: *Virus-thrips-plant interactions do TSWV, Proceedings of USDA workshop, Beltsville, U.S.A.* (H. T. Hsu & R. H. Lawson, Eds.). National Technology Information Service, Springfield, pp. 71-76.
- Rice, D. J., German, T. L., Mau, R. F. L. y Fujimoto, F. M. (1990). Dot blot detection of tomato spotted wilt virus RNA in plant and thrips tissues by cDNA clones. *Plant Dis.* **74**, 274-276.
- Robles, J. y Doers, M. (1994). T-vector tips. *Promega Notes* **45**, 19-20.
- Ronco, A.E., Dal Bó, E., Ghiringhelli, P.D., Medrano, C., Romanowski, V., Sarachu, A.N. y Grau, O. (1989) Cloned cDNA probes for the detection tomato spotted wilt virus. *Phytopathology* **79**, 69-74.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., et al. (1988). Primer directed enzymic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sakimura, K. (1940). Evidence for the identity of the yellow-spot virus with the spotted-wilt virus: Experiments with the vector, *Thrips tabaci*. *Phytopathology* **30**, 281-299.
- Sakimura, K. (1962a). *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera:Thripidae), a vector of the tomato spotted wilt virus, with special reference to color forms. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **55**, 387-389.
- Sakimura, K. (1962b). The present status of thrips-borne viruses. En: *Biological transmission of disease agents.* (Maramorosch, K., Ed.) New York. Academic. pp. 33-40.
- Sakimura, K. (1963). *Frankliniella fusca*, an additional vector for the tomato spotted wilt virus, with notes on *Thrips tabaci*, another vector. *Phytopathology* **53**, 412-415.
- Sakimura, K. (1969). A comment on the color forms of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera:Thripidae) in relation to transmission of the tomato spotted wilt virus. *Pac. Insects* **11**, 761-762.
- Saksena, N. K., Hervé, V., Sherman, M. P., Durand, J. P., Mathiot, C., Muller, M., Love, J. L., LeGuanno, B., Barré Sinoussi, F., Dube, D. K. y Poiesz, B. J. (1993). Sequence and phylogenetic analyses of a new STLVI from a naturally infected tantalus monkey from central Africa. *Virology* **192**, 312-320.
-

-
- Sambrook, J., E.J. Fritsch y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuel, G., Bald, J. G. y Pittman, H. A. (1930). Investigations on "spotted wilt" of tomatoes, Australia. *Commonw. Counc. Sci. Ind. Res. Bull. No 44*.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schmaljhon, C. S. y Patterson, J. L. (1990). Bunyaviridae and their replication: Part II. Replication of Bunyaviridae. En: *Fields Virology*. (Fields, B. N. y Knipe, D. M. Eds.). New York: Raven. 2nd ed. pp. 1175-1195.
- Sether, D. M. y De Angelis, J. D. (1992). Tomato spotted wilt virus host list and bibliography. *Agricultural Experiment Station Oregon State University. Special report 888*.
- Sherwood, J. L., Sanborn, M. R., Keyser, G. C. y Myers, L. D. (1989). Use of monoclonal antibodies in detection of tomato spotted wilt virus. *Phytopathology* 79, 61-64.
- Simons, J. F., Hellman, U. y Pettersson, R. F. (1990). Uukuniemi virus S RNA segment: Ambisense coding strategy, packaging of complementary strands into virions, and homology to members of the genus Phlebovirus. *J. Virol.* 64, 247-255.
- Simpson, G. G. (1961). *Principles of Animal Taxonomy*. Columbia University Press, New York.
- Smith, P. G. (1944). Reaction of *Lycopersicon* spp. to spotted wilt virus. *Phytopathology* 34, 504-505.
- Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973). *Principles of Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1981). Taxonomic congruence in the Leptopodomorpha reexamined. *Syst. Zool.* 30, 309-325.
- Stevens, M. R., Scott, S. J. y Gergerich, R. C. (1992). Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59, 9-17.
-

-
- Stobbs, L. W., Broadbent, A. B., Allen, W. R. y Stirling, A. L. (1992). Transmission of tomato spotted wilt virus by the western flower thrips to weeds and native plants found in southern Ontario. *Plant Dis.* 76, 23-29.
- Swofford, D. L. (1991). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Tas, P.W.L., Boerjan, M.L. y Peters, D. (1977a). Purification and serology of tomato spotted wilt virus. *Neth. J. Plant. Pathol.* 83, 61-72.
- Tas, P.W.L., Boerjan, M.L. y Peters, D. (1977b). The structural proteins of tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* 36, 267-279.
- Templeton, A. R. (1983a). Convergent evolution and non-parametric inferences from restriction fragment and DNA sequence data. En: *Statistical Analysis of DNA Sequence Data.* (Weir, B., ed.) Marcel Dekker, New York. pp. 151-179.
- Templeton, A. R. (1983b). Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the humans and apes. *Evolution* 37, 221-244.
- Towbin, H., Staehelin, G. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 76, 4350-4354.
- Tsakiridis, J. P. y Gooding, G. V. (1972). Tomato spotted wilt virus in Greece. *Phytopath. mediterr.* 11, 42-47.
- Ullman, D. E., Westcot, D. M., Mau, R. F. L., Cho, J. J. y Custer, D. M. (1991). Tomato spotted wilt virus and one thrips vector: *Frankliniella occidentalis* (Pergande) internal morphology and virus location. En: *Virus-thrips-plant interactions do TSWV, Proceedings of USDA workshop, Beltsville, U.S.A.* (H. T. Hsu & R. H. Lawson, Eds.). National Technology Information Service, Springfield, pp.127-136.
- Ullman, D. E., Cho, J. J., Mau, R. F. L., Hunter, W. B., Westcot, D. M., y Custer, D. M. (1992a). Thrips-tomato spotted wilt virus interactions: Morphological, behavioral and cellular components influencing thrips transmission. En: *Advances in disease vector research.* New York. Springer-Verlag. 9.
- Ullman, D. E., Cho, J. J., Mau, R. F. L., Westcot, D. M., y Custer, D. M. (1992b). A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flower thrips. *Phytopathology* 82, 1333-1342.
-