



Tesina final para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas



# Detección molecular del virus IYSV en plantas de cebolla

Rodrigo Achigar

Orientador: Dra. María Julia Pianzola

Co-orientador: Dr. Guillermo Galván

Julio 2011

# Índice

---

Resumen.....	3
Abstract .....	4
1. Introducción .....	5
1.1. Generalidades de los Tospovirus.....	5
1.2. Rango de hospederos y sintomatología asociada a infecciones tospovirales .....	6
1.2.1. Vector de transmisión y sintomatología asociada a IYSV .....	6
1.2.2. Epidemiología de IYSV .....	7
1.2.3. IYSV en Uruguay .....	8
1.3. Estructura viral .....	9
1.4. Generalidades del vector de transmisión .....	12
1.5. Ciclo viral .....	14
1.5.1. Desarrollo en el vector .....	14
1.5.2. Morfogénesis en la célula vegetal.....	16
1.6. Fundamento de las técnicas utilizadas.....	19
1.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	19
1.6.2. Reacción de transcripción reversa (RT).....	20
1.6.3. PCR en tiempo real.....	20
1.6.4. Análisis filogenético.....	22
2. Objetivos y estrategia de trabajo .....	24
2.1. Objetivo general.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
2.3. Estrategia de trabajo .....	24
3. Materiales y métodos .....	26
3.1. Medios de cultivo y reactivos.....	26
3.2. Muestras.....	26
3.3. Extracción de ARN .....	27
3.3.1. Extracción de ARN utilizando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) .....	27
3.3.2. Extracción de ARN utilizando TRizol (Invitrogen).....	27
3.4. Síntesis de ADNc.....	28
3.5. Reacciones de PCR .....	29

3.6.	Real-Time PCR .....	30
3.7.	Preparación del material para secuenciar .....	30
3.7.1.	Preparación de células electro competentes.....	30
3.7.2.	Ligación.....	31
3.7.3.	Transformación .....	32
3.7.4.	Extracción del ADN plasmídico.....	32
3.8.	Generación de bases de datos para realizar los análisis filogenéticos .....	33
3.8.1.	Filogenia del género <i>Tospovirus</i> .....	33
3.8.2.	Filogenia de IYSV .....	34
3.9.	Construcción de filogenias .....	34
4.	Resultados y Discusión .....	37
4.1.	Extracción de ARN .....	37
4.2.	Detección basada en PCR.....	37
4.3.	Real-Time PCR .....	40
4.3.1.	Primeros ensayos de detección.....	40
4.3.2.	Comparación de los métodos de extracción de ARN .....	41
4.3.3.	Análisis de muestras.....	42
4.3.4.	Ventajas de la detección basada en Real-Time PCR.....	44
4.4.	Clonado y secuenciado.....	47
4.4.1.	Análisis de clones .....	48
4.5.	Análisis filogenético.....	52
4.5.1.	Análisis filogenético del género <i>Tospovirus</i> .....	52
4.5.2.	Análisis de secuencias de IYSV .....	54
5.	Primeros ensayos con plantas nativas .....	56
6.	Conclusiones y Perspectivas.....	58
7.	Bibliografía .....	59
8.	Apéndice.....	63
8.1.	Clones analizados .....	63
8.2.	Árbol filogenético del género <i>Tospovirus</i> con valores de <i>bootstrap</i> .....	66
8.3.	Árbol filogenético de IYSV con valores de <i>bootstrap</i> .....	67
9.	Agradecimientos .....	68

## Resumen

---

*Iris yellow spot virus (IYSV)* es un fitopatógeno perteneciente al género *Tospovirus* (familia *Bunyaviridae*). El genoma del IYSV consiste en tres segmentos de ARN de cadena simple. El virus es transmitido exclusivamente por *Thrips tabaci*, comúnmente llamado trips de la cebolla. IYSV causa grandes pérdidas económicas en algunas regiones del mundo, especialmente en los cultivos destinados a producción de semilla de cebolla. La sintomatología asociada con IYSV son manchas cloróticas en forma de rombo, o lesiones necróticas sin forma definida sobre los escapos florales o sobre las hojas. Estas lesiones pueden causar la caída de la inflorescencia y, en casos extremos, la muerte de la planta. En Uruguay, desde 2005 se observaron síntomas típicos de IYSV en floración desde 2005 constituyendo una amenaza para la producción. Los objetivos de este estudio fueron, en primer lugar, confirmar la presencia del virus en Uruguay por técnicas moleculares, y en segundo lugar, determinar el posible origen y entrada de las variantes de IYSV encontradas. En 2007 y 2009 se colectaron muestras de plantas de cebolla en floración. La detección del virus se realizó a partir de ARN total extraído a partir de 100 mg de tejido vegetal, seguida por una reacción reversa de la transcriptasa. El ADNc obtenido fue amplificado tanto por PCR convencional como por real-time PCR. La reacción reversa de la transcriptasa y las reacciones de PCR fueron realizadas en base a primers específicos para IYSV reportados en la literatura. Los amplicones obtenidos presentaron el largo esperado confirmando la presencia de IYSV en las muestras analizadas. Seguidamente, se realizó un análisis filogenético a fin de inferir el posible origen de IYSV de Uruguay, utilizando las secuencias virales obtenidas en las evaluaciones de PCR, y secuencias disponibles en GenBank de diversas partes del mundo. Sorpresivamente, las secuencias de las cepas IYSV detectadas en Uruguay se asemejaron a las secuencias de cepas de Oceanía y Asia, pero no con las determinadas en otros países de Sudamérica. Este resultado haría sospechar que el ingreso de este virus no fue a partir de países limítrofes sino que habría sido importado de Asia u Oceanía, quizás en producto vegetal con la infección que pueda haber sido fuente de inóculo para la infección de cultivos (p.ej. ajos). Otra alternativa lo representarían trips asociados a hortalizas importadas.

## Abstract

---

Iris yellow spot virus (IYSV) is a plant pathogen member of the *Tospovirus* genus (family *Bunyaviridae*). IYSV possess a negative-strand segmented RNA genome and it is transmitted by *Thrips tabaci*, the onion thrips. This virus is able to cause huge economic losses, especially in seed-producing onion crops. Symptoms associated with IYSV infections are diamond-shaped chlorotic or necrotic lesions on leaves and seed-stalk tissues, which can cause the fall of the inflorescence and, in extreme cases, the death of the whole plant. In Uruguay, typical symptoms had been observed both in flowering plants and onion fields since 2005. The objectives of this study were first, to confirm the presence of the virus in Uruguay by molecular techniques, and second, to determine the possible origin and gateway of the viral strains found. Samples from onion seed-producing crops were collected in 2007 and 2009. Virus detection was carried out by extracting total RNA from a 100 mg fragment of plant tissue, followed by a reverse transcription reaction. The obtained cDNA was amplified by both conventional and real time PCR. The reverse transcription and PCR reactions were carried out using specifically designed primers previously reported. Amplicons with the expected length confirmed the presence of IYSV virus. Thereafter, phylogenetic analysis were performed to infer the possible source of infection in our country, using as input the viral sequences obtained in the PCR assays, and the available sequences in GenBank from all over the world. A counterintuitive result was that IYSV sequences from Uruguay clustered with sequences from Oceania or Asia, but not with sequences from South America. This result leads to suspect that this virus did not enter our country from neighbor countries through the borders, but it may have been introduced on imported materials, presumably from Asia or Oceania.

# 1. Introducción

## 1.1. Generalidades de los Tospovirus

El primer reporte de un miembro del género *Tospovirus* se remonta a la década de 1930, cuando se demostró la etiología viral de una enfermedad conocida como “*spotted wilt*”, observada por primera vez en plantas de tomate australianas en 1915 (30). Este virus fue nombrado *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) y desde entonces se han realizado muchos estudios que determinaron que se le considere el agente causal de enfermedades epidémicas en regiones templadas, sub tropicales y tropicales de todo el mundo(14).

Durante mucho tiempo se consideró a TSWV único por sus características entre los virus de plantas, y permaneció como singular miembro del *Tomato Spotted Wilt Virus Group*. En los últimos años esta idea ha sido modificada. En primer lugar y gracias al incremento de información acerca de la biología molecular del virus TSWV, éste fue reclasificado e incluido en la familia *Bunyaviridae* como miembro tipo del nuevo género *Tospovirus*, creado para agrupar fitovirus dentro de dicha familia. En segundo lugar, sucesivos ensayos serológicos realizados a diferentes aislamientos de TSWV (TSWV-L aislado de *Latuca* y TSWV-I aislado de *Impatiens*) revelaron que existía suficiente evidencia para separarlos en dos especies diferentes. Desde ese momento TSWV-I pasó a llamarse *Impatiens Necrotic Spot Virus*, siendo esta la segunda especie de *Tospovirus* identificada(30). De ahí en más, diferentes especies han sido descritas, como *Tomato Chlorotic Spot Virus* (TCSV), *Groundnut Ring Spot Virus* (GRSV), *Iris Yellow Spot Virus* (IYSV), etc. Los tospovirus son clasificados dentro del grupo V de Baltimore (Figura 1), que agrupa virus ARN de cadena simple y polaridad negativa (expasy.org/viralzone).

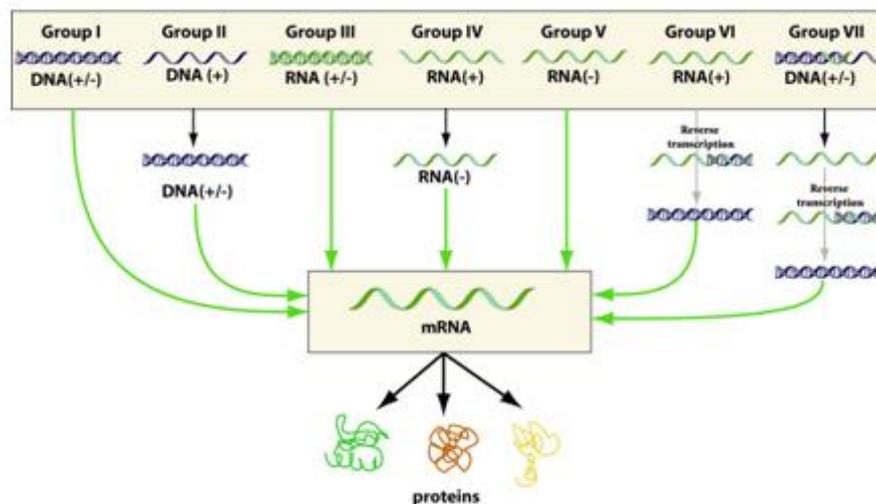


Figura 1: clasificación de Baltimore. Los *Tospovirus* son clasificados dentro del grupo V, que agrupa virus ARN de cadena simple y polaridad negativa. Fuente: expasy.org/viralzone

En 1998 fue descrito un nuevo tospovirus que infectaba plantas de iris (*Iris hollandica*) en los campos y al puerro (*Allium porrum*) en invernaderos (6). Este nuevo virus fue bautizado *Iris Yellow Spot Virus* (IYSV), y mediante ensayos serológicos y moleculares fue identificado como el agente causal de diferentes brotes infecciosos asociados a tospovirus en plantaciones de cebolla en Brasil en 1981 (29), en Estados Unidos en 1989 y en Israel en 1998 (12).

Los tospovirus son un grupo muy cosmopolita. Algunos miembros del género se han reportado en cincuenta países, abarcando los cinco continentes(7, 14, 27, 30). Muchas de las plantas son hospederos tanto del virus como de su vector de transmisión, los trips (*Thysanoptera: Thripidae*), y sirven como reservorios de infección que contribuyen a la aparición de epidemias en cultivos. El daño producido en cultivos comerciales puede ser extremadamente alto, alcanzando valores en pérdidas de entre 50 y 90%(12, 30).

## **1.2. Rango de hospederos y sintomatología asociada a infecciones tospovirales**

Los tospovirus poseen uno de los rangos de hospederos más amplio entre los virus de plantas, con alrededor de 650 especies susceptibles, pertenecientes a 70 familias tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas(30).

Los síntomas de una infección tospoviral son muy variados y dependen en gran manera del tipo de combinación virus-planta hospedera y de factores ambientales, particularmente la temperatura. Entre estos síntomas pueden verse clorosis, necrosis, formación de manchas en forma de anillo, bronceado, varios tipos de lesiones foliares, etc.

### **1.2.1. Vector de transmisión y sintomatología asociada a IYSV**

*Iris Yellow Spot Virus* (IYSV), es transmitido por un insecto llamado *Thrips tabaci*, conocido comúnmente como trip de la cebolla. No existe ninguna evidencia de que el virus pueda transmitirse por semilla u otros insectos, por lo que los principales agentes de dispersión son plantas y trips infectados.

La sintomatología clásica asociada con ataques de IYSV son lesiones cloróticas en forma de diamante (Figuras 2 y 3), con o sin tejido verde dentro de ellas, o extensas regiones necróticas que en última instancia causan la desecación de las hojas y tallos florales y caída de las inflorescencias(12).

Los patrones espaciales y temporales de dispersión de IYSV son todavía desconocidos. La incidencia de la enfermedad varía dentro y entre cultivares de cebolla. Además, la severidad de la enfermedad depende de la densidad de plantas y la distribución en el campo de los focos de infección(12). En los cultivos comúnmente se observan distintos gradientes direccionales de infección durante las epidemias, pero la base y significancia de éstos permanece poco clara.

Observaciones realizadas en cultivos infectados muestran que los gradientes de dispersión de la enfermedad no son consistentes con el direccionamiento preferencial del viento, sino que más bien reflejan interacciones complejas entre la abundancia de vectores y la susceptibilidad de las plantas relacionada al estrés abiótico (12).

La severidad de las epidemias en los cultivos de cebolla varía de año a año, sin embargo la aparición de plantas sintomáticas aumenta marcadamente cuando comienzan a desarrollarse los bulbos. El momento exacto del desarrollo de la planta en el que ocurren las infecciones permanece incierto. En diferentes regiones, la aparición de IYSV se ha documentado en distintas estaciones del año y en diferentes etapas del desarrollo de la planta.



Figura 2: Sintomatologías asociadas a infecciones por IYSV en plantas de cebolla. (A y D) manchas cloróticas sin islas verdes en el centro, (B y C) típica lesión en forma de diamante con tejido verde en el centro. (E, F y G) formación de extensas lesiones necróticas que causan la caída de los escapos. Fuente: Gent et al. 2006.

### 1.2.2. Epidemiología de IYSV

IYSV ha sido reportado en todos los continentes (3, 5, 12, 13, 29). En América del Sur los países en los que se ha reportado la presencia de IYSV son Perú (3), Chile y Brasil (29) y Uruguay (4). Hasta la fecha, se han identificado al menos 47 especies de plantas que son de manera natural afectadas por IYSV en campo. Entre estas especies se destacan la cebolla (*Allium cepa*), puerro (*Allium porrum*), ajo (*Allium sativum*), cebolleta (*Allium schoenoprasum*), chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*), morrón (*Capsicum annuum*), papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*). IYSV también afecta plantas ornamentales como: iris (*Iris spp.*), lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), varias especies de “lirio de los Incas” (*Alstroemeria spp.*), rosales

(*Rosa spp.*), malvón (*Pelargonium hortorum*), y varias especies de cica (*Cycas spp.*). Además, infecta una variedad de malezas, como por ejemplo: *Vicia sativa*, *Geralium carolinianum* y *Linaria canadensis*(12). Datos recogidos por Gent y colaboradores (2006) en el estado de Colorado (Estados Unidos) revelaron que, en un período de dos años, IYSV pasó de ser detectado en 6 % de los campos de cultivos de cebollas a ser detectado en el 73 % de los campos. La epidemia sufrida en Colorado en el año 2003 causó pérdidas a los productores de alrededor de cinco millones de dólares (10 % del ingreso anual). Los cálculos estiman que el impacto económico en el oeste de los Estados Unidos podría ir desde 60 a 90 millones de dólares anuales en pérdidas (10 a 15 %). A esto, debe sumársele el costo de fumigación de 48.500 hectáreas para frenar la expansión del vector (12 millones y medio de dólares por año) lo que suma alrededor de 100 millones de dólares anuales en pérdidas para los productores de la región (12).

### 1.2.3. IYSV en Uruguay

En 2005, se detectaron por primera vez en nuestro país, plantas de cebolla con síntomas de infección por IYSV en cultivos semilleros del departamento de Canelones (Figura 3). En 2006 se colectaron plantas sintomáticas de cuatro granjas y fueron analizadas mediante ELISA por la empresa Adgia, Inc. (Elkhart, Indiana, USA), utilizando un antisuero específico para IYSV. Los resultados de estos ensayos fueron positivos para los cuatro campos monitoreados. La incidencia del virus ese año (Figura 4), expresada en número de plantas con síntomas en relación al número total de plantas evaluadas, varió entre <1% (una planta en 120 evaluadas) hasta un 20% (24 plantas en 120 evaluadas). En el año 2007 se monitorearon dos cultivos entre octubre y diciembre. En uno de los cultivos se observó un incremento en este periodo del 2% en octubre a un 7% en diciembre, mientras que en el otro el incremento observado fue de un 3% en octubre a un 40% en diciembre (4).

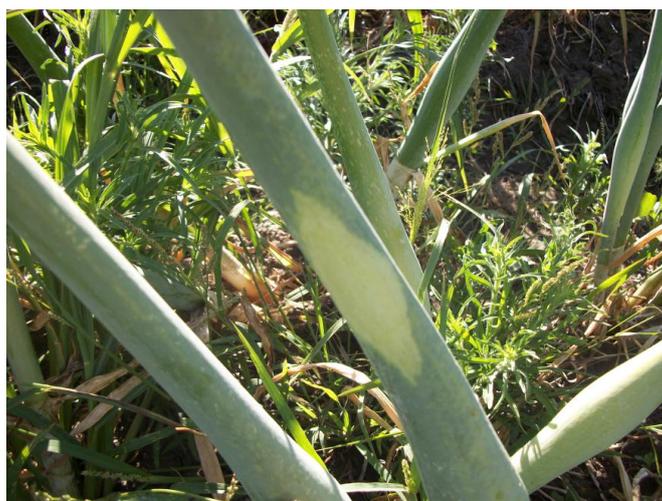


Figura 3: síntomas de infección causada por IYSV observados en campos de cebolla del departamento de Canelones en el año 2010

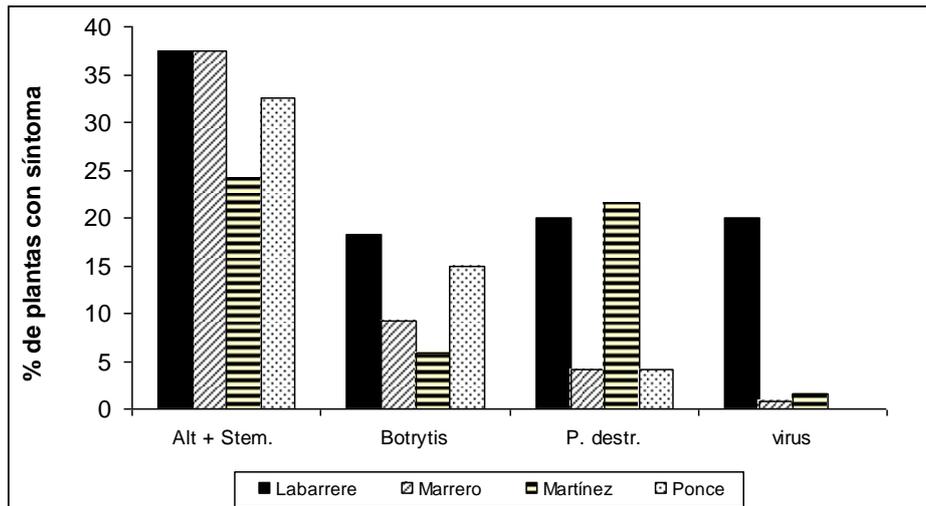


Figura 4: Incidencia de los patógenos evaluados en cuatro cultivos semilleros de cebolla en predios comerciales del departamento de Canelones (Labarrere, Marrero, Martínez y Ponce), año 2006. Fuente: P. Colnago, R. Achigar, P. H. González, S. Peluffo, H. González Idiarte, M. J. Pianzola, y G. A. Galván. Presencia del *virus Iris Yellow Spot Virus* (IYSV) en semilleros de cebolla. Jornada Anual de Presentación de Resultados de Investigación en Ajo y Cebolla. INIA Las Brujas, marzo de 2010

### 1.3. Estructura viral

La morfología de los tospovirus es típica de la familia *Bunyaviridae*. Las partículas miden entre 80 y 110 nm de diámetro y poseen una membrana externa que les otorga una forma esférica (Figura 5). Embebidas en esta membrana y proyectándose desde su superficie hay dos glicoproteínas G1 (78kD) y G2 (58kD). Dentro de la partícula se encuentran tres moléculas de ARN lineal de cadena simple diferentes: la cadena S (2.9kb), la cadena M (4.8kb) y la cadena L (8.9kb)(30).

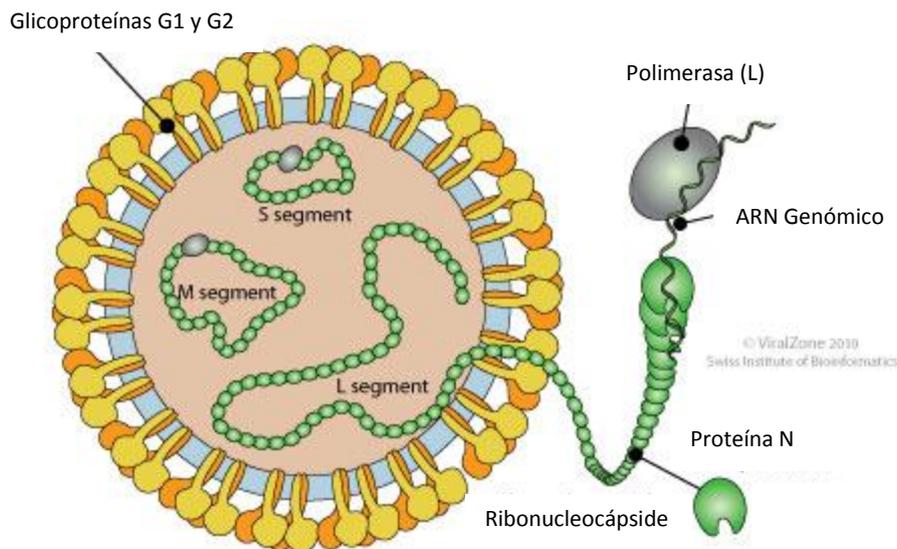


Figura 5: morfología típica del virión. Fuente: expasy.org/viralzone

Estos ARN se encuentran en estrecha asociación con una proteína llamada N (21kD) formando 3 nucleocápsides pseudocirculares. Además las partículas contienen aproximadamente diez copias de la proteína L (330kD) o replicasa viral.

El segmento S, presenta dos ORFs (*open reading frame*, marco abierto de lectura) codificados en sentidos opuestos separados por una región intergénica rica en A-U (Figura 6). Este ARN genómico posee una estrategia de codificación en ambisentido y el producto de sus genes es expresado a partir de ARNs mensajeros subgenómicos. El ORF más grande (en sentido viral) codifica una proteína con un peso molecular de aproximadamente 52,4kD llamada NSs (*non structural*). Esta proteína desempeñaría un papel fundamental en la patogenia del virus, ya que existen evidencias de que es capaz de suprimir el mecanismo de silenciamiento de genes mediado por ARN (*RNA interference*) o silenciamiento génico post transcripcional (*PTGS*), mecanismo antiviral muy común en células vegetales(1, 2). El otro marco abierto de lectura (en sentido complementario) codifica la proteína estructural N o de nucleocápside, cuyo peso estimado es de 28,8kD(30).

El segmento de ARN M también posee dos marcos abiertos de lectura, separados por una región intergénica rica en A-U, la cual forma una horquilla estable (Figura 6). Este ordenamiento en ambos sentidos del segmento M es único en los tospovirus, ya que el resto de los miembros de la familia *Bunyaviridae* presentan polaridad negativa (32). De los dos marcos abiertos de lectura presentes en este segmento, el complementario (de polaridad negativa) codifica un solo producto génico largo, el precursor de las glicoproteínas G1 y G2. Luego de sintetizado el precursor es cortado en el retículo endoplasmático de la célula hospedera (37), y las dos nuevas proteínas (previamente glicosiladas) se dirigen al Golgisoma donde son retenidas (22). G1 por sí misma es incapaz de abandonar el RE, necesita de la coexpresión de G2 para poder dirigirse al aparato de Golgi lo que indica que su interacción es muy importante para la correcta localización subcelular (22). Ambas proteínas están presentes en la superficie del virión, interactúan entre sí y su función es adherir la partícula viral a las células del vector y facilitar su internalización (39). El marco abierto de lectura codificado en sentido viral (polaridad positiva) codifica una pequeña proteína de alrededor de 34kD llamada NSm, involucrada en el movimiento intercelular del virus. Esta proteína interactúa con los plasmodesmos (canales de comunicación intercelular de las células vegetales) facilitando el pasaje de nucleocápsides sin envoltura entre células (21, 35).

El segmento de ARN L posee un único marco abierto de lectura de polaridad negativa, el cual se transcribe en un ARN subgenómico del cual la replicasa viral se traduce (Figura 6). El peso de esta proteína es de aproximadamente unos 330kD (38). La polimerasa viral es una ARN polimerasa ARN dependiente, y es la encargada de llevar a cabo tanto la transcripción como la replicación del virus(30).



Además de secuencias virales con roles regulatorios, se han encontrado secuencias no virales empalmadas a los extremos 5' de los ARNm virales. Se presume que estas secuencias de 12-20 nucleótidos tendrían una función de *primers* iniciando la transcripción de los ARNm. Este proceso conocido como secuestro de la caperuza (mediante el cual los *primers* son generados mediante el clivado de la caperuza de ARNs mensajeros del hospedero), es frecuente entre virus animales incluidos los *Bunyaviridae*, pero es inusual entre los virus de plantas. Por otra parte, mediante comparación de secuencias con otros *Bunyaviridae*, ha sido posible identificar un motivo consenso (CAAUUUGG) ubicado en el pico de la horquilla del segmento S, el cual probablemente funcione como terminador de la transcripción de los ARNm subgenómicos(30).

#### 1.4. Generalidades del vector de transmisión

Uno de los factores principales que contribuyen al estatus de los *Tospovirus* como patógenos globales, es la distribución cosmopolita y la baja especificidad para especies y familias de plantas hospederas de sus vectores. Los *Tospovirus* son transmitidos por trips (*Thysanoptera: Thripidae*)(40).

Los trips son pequeños insectos con alas muy pequeñas o inexistentes. Cuando presentan alas, éstas son delgadas y con flecos, de ahí su nombre *Thysanoptera* (que en latín quiere decir "alas con flecos"). Son posiblemente los insectos alados más pequeños, con medidas que van desde los 1.5 a 3 milímetros de largo. El desarrollo de los trips pasa por una etapa en huevo, uno o dos estadios larvales (durante los cuales ocurre la alimentación inmadura) y uno, dos o tres estadios pupales, en los cuales el insecto no se alimenta (Figura 7). La estrategia reproductiva más común es la sexual, aunque pueden darse casos de partenogénesis. Los machos son generalmente de talla menor a las hembras, y el apareamiento tiene lugar en etapas tempranas de la vida adulta. Los huevos son alargados o con forma de riñón y al igual que en otros insectos diminutos, su tamaño es proporcionalmente muy grande, llegando a ocupar hasta dos segmentos abdominales de la hembra antes de la puesta (<http://www.discoverlife.org>).

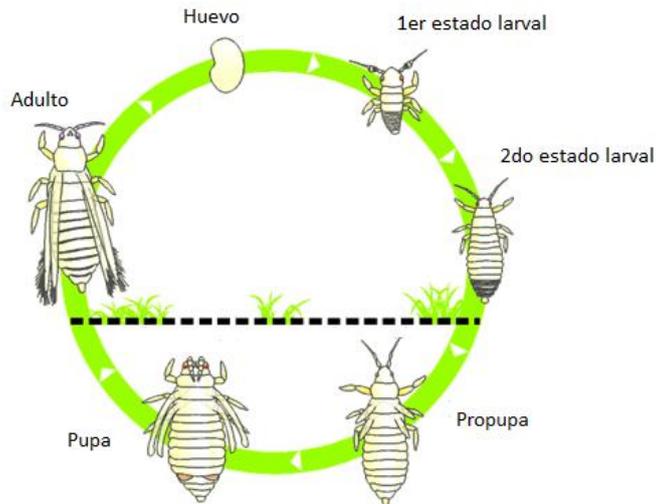


Figura 8: estados de desarrollo del vector. Fuente <http://www.discoverlife.org>

El vector de transmisión de IYSV es el trip de la cebolla (*Thrips tabaci*) (23, 28). Las hembras adultas poseen un cuerpo alargado de alrededor de un milímetro de largo de color amarillento, con alas pequeñas con flecos y con pequeñas “vejigas” en las patas en lugar de pinzas (Figura 9). Durante los estadios ninfales, los individuos son similares a los adultos con la excepción de que las ninfas carecen de alas completamente desarrolladas. Se reproducen principalmente por partenogénesis. Las hembras depositan huevos con forma de riñón dentro del tejido de las hojas de la planta y entre cinco y diez días después emerge una ninfa. El desarrollo de las ninfas se extiende por un período de 15 a 30 días, y comprende cuatro etapas: dos etapas larvales, una etapa de pre-pupa y una de pupa. El insecto pasa las dos etapas larvales alimentándose sobre la superficie de la hoja para luego pasar por las etapas de pre-pupa y pupa en el suelo. Por año pueden generarse hasta ocho generaciones de insectos adultos (<http://www.discoverlife.org>).



Figura 9: *Thrips tabaci* en estado adulto. Fuente: <http://www.hdc.org.uk/>

Las piezas bucales de los trips están especializadas para raspar, perforar y succionar. Aunque esta especie vive y se alimenta principalmente de plantas de cebolla, también atacan a gran

cantidad de plantas cultivadas y silvestres. Las larvas y adultos utilizan su mandíbula con forma de espada para romper el tejido de la superficie de las hojas y luego succionan el contenido de estos presionando con sus piezas bucales la región dañada.

Los trips son una plaga del cultivo más allá de su rol como transmisores de tospovirus. Sus conductas alimenticias causan heridas en las hojas conocidas comúnmente como “rayado plateado”. Hojas severamente atacadas pueden presentar desecación e incluso morir, afectando el desarrollo del bulbo de la cebolla, principalmente durante estaciones secas (<http://www.discoverlife.org>).

El clima juega un rol importante en la dinámica de población de los trips. Se han reportado incrementos sustanciales en poblaciones monitoreadas cuando el clima es seco y cálido, especialmente en los meses de verano (9). Esta información es de suma importancia, ya que según datos de la Dirección Nacional de Meteorología, en los últimos 20 años, la temperatura media en primavera y verano ha aumentado en 0,5°C y las precipitaciones han decaído en estas estaciones en la última década (a excepción del verano 2009-2010 (datos obtenidos de [www.meteorología.gub.uy](http://www.meteorología.gub.uy) el 29/12/2010). Este cambio en el clima, hace que las condiciones se hagan cada vez más favorables para los trips.

## 1.5. Ciclo viral

El ciclo vital de los tospovirus se desarrolla pasando por el vector a la planta y de la planta al vector sin que exista otra forma de propagación. Se han realizado estudios de los procesos infectivos que involucran a IYSV con *Allium cepa*, que demuestran que el virus sería incapaz de infectar al bulbo o a las semillas. Por tanto, una planta infectada sería incapaz de transmitir el virus directamente a las plantas vecinas en un cultivo, transmisión que solo ocurre a través de trips infectados, y sería incapaz de transmitir el virus a su progenie (23).

### 1.5.1. Desarrollo en el vector

Los tospovirus son transmitidos por varias especies de trips (*Thysanoptera*, *Thripidae*), pequeños insectos encontrados en diversos hábitats alrededor del mundo dentro de los más estudiados se encuentran: *Frankliniella occidentalis* (Western flower trip), *F. fusca* (trips del tabaco) y *Thrips tabaci* (trips de la cebolla)(26).

El virus es adquirido por el vector vía ingesta de plantas previamente infectadas. En *Thrips tabaci*, el período de adquisición (que va entre la ingesta e incorporación del virus) dura unos 15 minutos, seguido por un período de incubación (en el que el virus se propaga dentro del organismo) de entre cuatro y 18 días, luego del cual el insecto se vuelve transmisor toda su vida. El virus invade el organismo presumiblemente por la interacción entre la proteína G2 del virus y una proteína de 94kD del tracto del insecto (19) y la proteína G1 de la envoltura viral y

un receptor de 50kDa en las células del epitelio intestinal del vector posiblemente una integrina  $\beta 3$ (34). Luego de la llegada del virus a las glándulas salivales del vector, este puede ser transmitido a plantas sanas por la saliva producida durante la alimentación del trip, cerrando de esta manera el ciclo infeccioso. Los trips son capaces de contraer el virus únicamente durante etapas larvales tempranas. El virus se replica y circula por el vector luego de su adquisición y es transmitido a su hospedador final por individuos en segundo estadio larval y adultos (25).

El intestino de los trips consiste en dos lazos que lo dividen en tres regiones Mg1, Mg2 y Mg3 (Figura 3). Después de 16 horas de haberse alimentado con plantas infectadas, se observa infección en las células epiteliales de la región Mg1 y en la parte anterior de Mg2, la cual se hace más clara luego de 24 horas(25). Entre las 24 y 36 horas de la adquisición del virus no se observan signos de infección en el intestino de la larva pero vuelven a observarse a las 72 horas, lo que es concordante con la muda del tejido epitelial que se produce en esta etapa. Cuando estos individuos alcanzan la edad adulta desaparecen los signos de infección a nivel intestinal. Esta observación sugiere que la reabsorción del tejido epitelial intestinal durante la formación de la pupa elimina los rastros de virus en este tejido a posteriori (25).

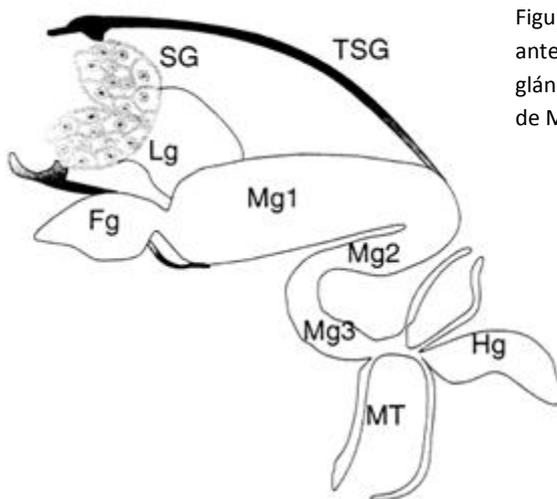


Figura 10: tracto digestivo de un trip. Fg: intestino anterior, Mg: intestino medio, Hg: intestino grueso, SG: glándula salival, TSG: glándula salival tubular, MT: túbulos de Malpighi, Lg: ligamento. . Fuente: Nagata et al., 1999

La infección del tejido epitelial es seguida por la invasión del tejido muscular longitudinal y circular que rodea al intestino (observada a las 72hs). En adultos se observa infección en todo el tejido muscular que rodea las regiones Mg1, Mg2 y Mg3, aunque hay casos que se restringe a Mg2 y Mg3. El hecho de que se observe infección en las regiones que rodean Mg2 y Mg3 en el adulto y la ausencia de epitelio infectado en la etapa larval de estas regiones sugiere una migración lateral célula a célula del virus desde el tejido visceral que rodea la región Mg1 hacia estas zonas.

También se observa en adultos infección en tejidos del tracto digestivo anterior (equivalentes al esófago y estómago de vertebrados) a diferencia de lo que ocurre en la etapa larval, lo que evidencia un tropismo marcado de las partículas víricas hacia su puerta de entrada en el intestino.

Luego de 72 a 96 horas, se observan signos de infección en el ligamento que conecta la parte anterior de Mg1 y las glándulas salivales y en las regiones periféricas de éstas. En individuos adultos se observan las glándulas salivales completamente infectadas. Es a partir de este momento que estos se vuelven transmisores del virus, pudiendo transmitirlo a plantas sanas a través de la saliva cuando se alimentan de estas (40).

Se ha observado que trips adultos no portadores sometidos al mismo tratamiento de alimentación que larvas de su propio linaje no se vuelven transmisores, lo que apoya la hipótesis general de una barrera intestinal en los adultos que impide la infección del epitelio de Mg1 y, por ende, cierra la puerta de entrada del virus al organismo(25).

### **1.5.2. Morfogénesis en la célula vegetal**

Las partículas virales no poseen receptores especiales asociados a estructuras de la pared celular o membrana plasmática de las células vegetales. El único mecanismo de ingreso es a través de heridas producidas por el vector al alimentarse de la planta.

Los procesos de síntesis de proteínas virales, replicación del genoma y formación del virión se llevan a cabo en su totalidad en el citoplasma de la célula vegetal (21) (Figura 11-H). Estudios de microscopía electrónica en tejidos vegetales infectados han identificado cinco estructuras características asociadas con la infección tospoviral: viroplasma (VP), agregados de nucleocápsides (NCA), membranas paralelas pareadas (PPM), partículas con doble envoltura (DEV) y partículas con envoltura simple (SEV). Se ha observado que mientras que VP, NCA, PPM y DEV son estructuras que se encuentran presentes en etapas tempranas de la infección, las SEVs se observan en estados tardíos y finales de la maduración (20).

El viroplasma se caracteriza por ser un material amorfo de densidad media, presente a lo largo de casi toda la infección y muy a menudo asociado con agregados de nucleocápsides (NCAs), los cuales son mucho más densos. Ambas estructuras poseen elevadas cantidades de proteína N. En las etapas tempranas de la infección, pueden observarse mayoritariamente pequeños grupos (*patches*) de VP y NCA dispersos en el citoplasma (Figura 11-A), mientras que en etapas tardías se observa usualmente una o dos grandes áreas de NCA y VP. Durante el proceso infectivo se observa una sobreproducción de nucleocápsides, las cuales no están destinadas en su totalidad a la formación de nuevos viriones. Una gran parte de ellas están involucradas en la propagación de la infección en la misma planta. Dado que el virión envuelto es incapaz de atravesar las paredes celulares, la propagación ocurre mediante el pasaje de nucleocápsides desnudas a través de los plasmodesmos, ayudadas por la proteína no estructural NSm (35).

Las membranas paralelas pareadas (PPM) son cisternas membranosas fuertemente curvadas con material denso estrechamente asociado a ellas, derivadas del Aparato de Golgi (Figura 11-B). En células infectadas, las proteínas G1 y G2 son sintetizadas en el retículo endoplasmático y posteriormente transportadas hacia el aparato de Golgi (21) donde se insertan en las

membranas de las pilas, de tal forma que los dominios receptores de las proteínas quedan orientados hacia el interior de la cisterna. Las cisternas en una pila de Golgi comienzan a separarse entre sí (Figura 11-C) y comienza a acumularse entre ellas material denso en nucleocápsides (20).

El siguiente paso en la morfogénesis implica el curvamiento de las cisternas modificadas sobre sí mismas (Figura 11-D), rodeando de esta manera al material denso en nucleocápsides. Este proceso da lugar a la formación de las partículas virales de doble envoltura (DEVs) (Figura 11-E y 11-F).

Las partículas con envoltura simple (SEVs) pueden formarse mediante dos mecanismos: la fusión de DEVs a través de su membrana externa, o la fusión de DEVs con membranas del retículo endoplasmático (Figura 11-G). Como consecuencia de las sucesivas fusiones, se forman sacos membranosos llenos de SEVs o viriones funcionales, los cuales permanecen en este estado hasta ser nuevamente ingeridos por el vector de transmisión y comenzar nuevamente el ciclo(20).

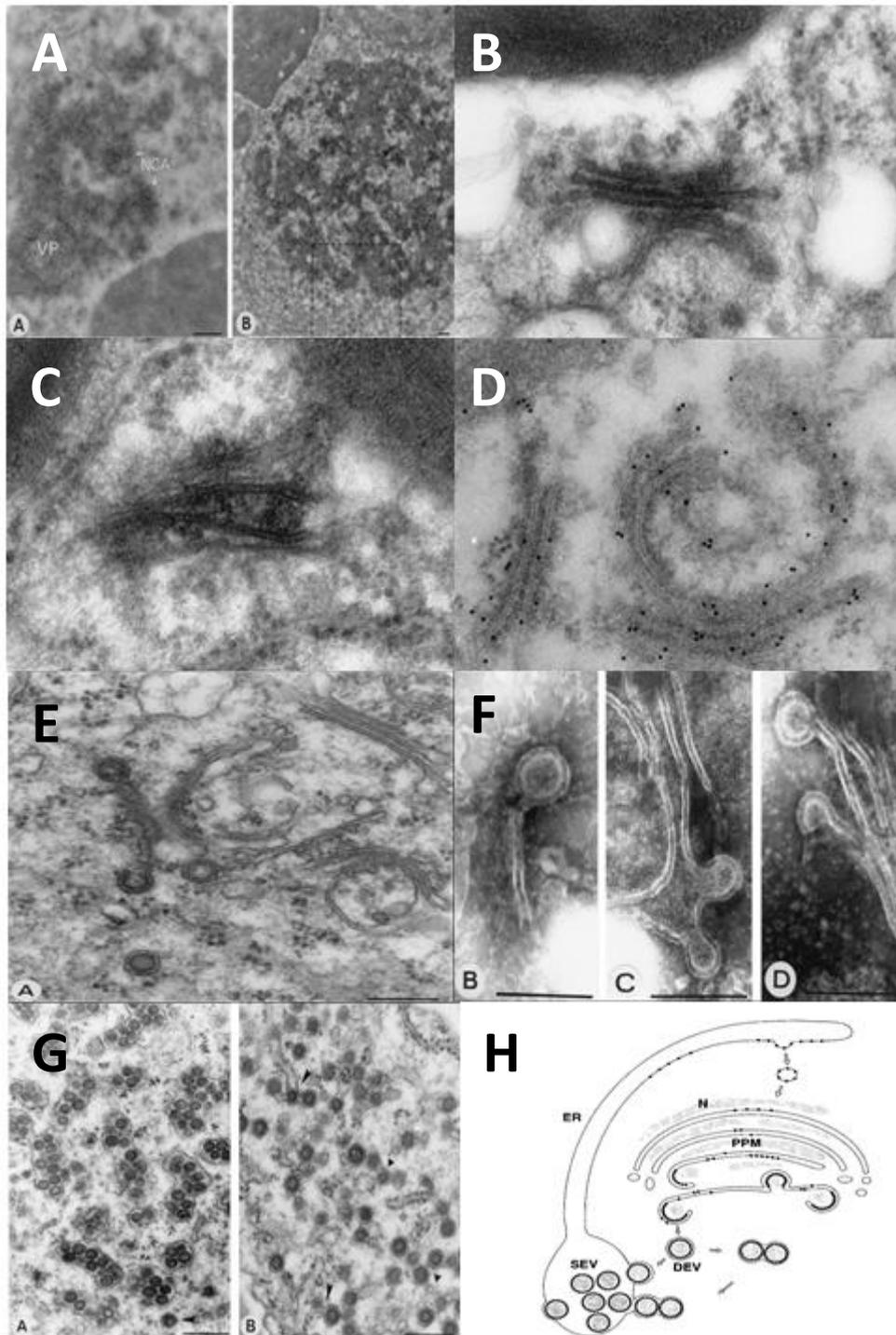


Figura 11: (A) viroplasma y agregados de nucleocápsides. (B) membranas paralelas pareadas. (C) inicio de la separación de cisternas modificadas, (D) cisternas levemente curvadas, (E y F) Formación de DEVs, (G) Formación de SEVs, (H) Representación esquemática de la morfogénesis de la partícula viral en la célula vegetal. Fuente: Kikkert et al., 1999

## 1.6. Fundamento de las técnicas utilizadas

### 1.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*polymerase chain reaction*) desarrollada por Kary Mullis e 1983, es una técnica que permite generar en un número discreto de ciclos, millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una cantidad mínima de material de partida. Por ejemplo si partimos de una única molécula de ADN, luego del primer ciclo tendremos dos copias (2<sup>1</sup>), y pasados 35 ciclos de replicación obtendremos aproximadamente 70.000.000.000 de copias del fragmento de interés.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo una amplificación por PCR son: el ADN que servirá como molde; un par de cebadores o *primers*, secuencias de ADN cortas de unos 20 pares de bases complementarias a una de las dos hebras del molde, que al unirse a éstas fijan el punto de inicio de la amplificación; una ADN polimerasa termoestable (31), que no pierda su actividad al ser expuesta a las altas temperaturas de la reacción (por lo general se utiliza la *Taq* polimerasa, proveniente de la bacteria termófila *Thermophilus acuaticus*); una solución buffer que mantenga el pH de la mezcla de reacción en los valores necesarios para el correcto funcionamiento de la enzima; magnesio (Mg<sup>++</sup>) en forma de MgCl<sub>2</sub>, el cual actúa como cofactor de la ADN polimerasa y es necesario para que esta funciones y desoxirribonucleosidos-trifosfato (dNTPs).

La reacción de PCR por lo general consiste en la repetición del proceso unas 30-40 veces. Cada uno de los ciclos consta de tres pasos con temperaturas diferentes. En el primer paso, el ADN es desnaturalizado a 94-95°C, para separar ambas hebras. El segundo paso se realiza a una temperatura más baja, y adecuada para que los cebadores o *primers* sean capaces de hibridarse con su secuencia complementaria en el ADN molde (temperatura de hibridación o de *annealing*). A partir de este híbrido cebador-molde, la ADN polimerasa termoestable extiende el extremo 3' del molde mediante la adición de los dNTPs adecuados. La temperatura utilizada para esta etapa de extensión es, por lo general, la temperatura a la cual la polimerasa funciona más eficientemente. En el caso de la *Taq* polimerasa, la temperatura óptima es entre 70 y 74°C.

Además de los ciclos de amplificación propiamente dichos, existen pasos únicos en la reacción, como es el caso de la activación inicial y la extensión final, al terminar la reacción. La activación se lleva a cabo durante algunos minutos (entre 1 y 10) a una temperatura de entre 94-98°C. El objetivo de esta etapa es, como dice su nombre, activar a las polimerasa que requieren activación por calor. La duración de esta etapa y la temperatura a la que se lleva a cabo depende de la polimerasa utilizada (información aportada por el fabricante). Respecto a la extensión final, se lleva a cabo después del último ciclo de amplificación, y tiene como objetivo extender todos los ADNs de cadena simple que puedan quedar. Por lo general se lleva a cabo a la misma temperatura utilizada en la extensión en los ciclos de amplificación (entre 72 y 74°).

Una vez finalizada la reacción, los productos son observados mediante electroforesis en gel. La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas (en el caso del ADN cargada negativamente), según su movilidad. Al hacer pasar un campo eléctrico a través de un gel previamente cargado con ADN, los fragmentos migrarán a diferentes velocidades dependiendo de sus tamaños, permitiendo así identificar sus tamaños aproximados en pares de bases mediante la comparación con un marcador de peso molecular, con bandas de tamaños previamente conocidos. Para poder visualizar las bandas de ADN es necesario teñirlo con un agente revelador. El más común es el bromuro de etidio, el cual se intercala en el ADN doble hebra y fluoresce al ser expuesto a la luz ultravioleta.

### **1.6.2. Reacción de transcripción reversa (RT)**

La reacción de transcripción reversa o RT es una reacción que permite obtener ADN de cadena simple a partir de un molde de ARN. La reacción necesita de cebadores (ya sea específicos, oligo dT o *random primers* dependiendo de las necesidades del experimento), dNTPs y una polimerasa. En este caso es necesario utilizar una ADN polimerasa dependiente de ARN, que únicamente son producidas por algunos virus. La más comúnmente utilizada es la M-MLV RT polimerasa. Esta enzima es el producto del gen *pol* del *Moloney Murine Leukemia Virus*. Por lo general las reacciones de RT PCR son llevadas a cabo en un único paso de hibridación extensión, a la temperatura ideal de funcionamiento de la polimerasa, en el caso de la M-MLV RT a 42°C. Una vez finalizada la reacción de retro transcripción, el ADN de cadena simple obtenido puede utilizarse como molde para llevar a cabo una reacción de PCR.

### **1.6.3. PCR en tiempo real**

La PCR en tiempo real es una variación de la PCR convencional(16), que permite monitorear ciclo a ciclo la acumulación de producto mediante fluorescencia(15, 33). La fluorescencia es medida ciclo a ciclo mediante excitación de agentes reveladores y posterior recepción de la emisión de los mismos. El incremento en la fluorescencia en los sistemas utilizados es proporcional a la cantidad de producto en cada ciclo, por tanto es posible monitorear la cinética completa de la reacción. Existen varios tipos de Real-Time PCR que se diferencian en el tipo de agente emisor de fluorescencia, pero todos tienen en común, que al ser excitados a una longitud de onda dada, emiten una señal capaz de ser detectada por el receptor en el termociclador. En este trabajo se utilizó un tipo de revelador llamado SYBR Green. El SYBR Green es un agente intercalante, que se une al ADN doble hebra de forma inespecífica(24). Este colorante, al ser excitado con luz de longitud de onda azul, fluoresce emitiendo luz de longitud de onda verde (por eso su nombre). Además posee la particularidad de que al unirse al ADN se incrementa notablemente su capacidad de emitir fluorescencia, lo cual lo hace un agente ideal para monitorear la acumulación de producto durante una reacción de PCR.

La cinética de una reacción de PCR teóricamente sería una función de tipo exponencial. Sin embargo en la práctica se observa que la reacción es exponencial únicamente hasta cierto punto, ya que en el momento que comienzan a ser escasos los reactivos (como los dNTPs y *primers*), la acumulación de producto ciclo a ciclo comienza a ser menor hasta llegar a un estancamiento. Es por eso que las curvas de cinética tienen una forma sigmoide (15). La PCR en tiempo real se enfoca únicamente en la fase exponencial de la reacción para evaluar una amplificación exitosa y realizar la cuantificación. El ciclo de la reacción en el que la señal aumenta por encima del nivel de ruido de fondo, es utilizado como indicador de amplificación exitosa. Este ciclo es llamado comúnmente ciclo umbral o Ct por sus siglas en inglés. Por lo general, los termocicladores especializados son capaces de distinguir una señal positiva por encima del ruido de fondo, cuando la acumulación de producto alcanza las  $10^{10}$  copias de producto (24). El ciclo en el que la acumulación de producto alcanza un nivel detectable es proporcional a la cantidad de ADN inicial, es por eso que esta técnica permite cuantificar el material de partida. También permite calcular la eficiencia de la reacción. Empíricamente, si una reacción posee una eficiencia del 100%, dos muestras con una concentración inicial que difieran en un factor de 10, poseen una diferencia en el Ct de 3,34 ciclos. La diferencia entre valores de Ct de diluciones seriadas de una muestra permite calcular la eficiencia de la reacción.

$$X_n = X_o(1+E)^n$$

Formula 1: ecuación de cálculo de eficiencia.  $X_o$  es la cantidad de material de partida,  $X_n$  es la cantidad de producto acumulado después de  $n$  ciclos,  $E$  es la eficiencia que puede tomar valores de entre 0 (0%) y 1 (100%)

Una de las principales ventajas del uso de esta técnica sobre la PCR convencional es el tiempo que insume. Además de que los ciclos de amplificación solo necesitan dos pasos (desnaturalización e hibridación-extensión), la detección se lleva a cabo sin la necesidad de alcanzar la acumulación de producto final ni realizar una electroforesis, lo que también reduce los riesgos de contaminación por manipulación del operador.

Como ya se mencionó, en este trabajo utilizamos como agente revelador SYBR Green, el cual se une inespecíficamente a cualquier ADN doble hebra presente en la mezcla de reacción, por tanto es necesario un segundo paso para confirmar que la señal obtenida se corresponde con una amplificación específica. La identificación del producto de amplificación se da mediante la construcción de una curva de *melting*. El fundamento de esta técnica se basa en que cada amplicón posee una temperatura media de desnaturalización (temperatura a la cual la mitad del ADN doble hebra se encuentra disociado) o  $T_m$ , la cual depende del largo de la secuencia y del contenido GC de la misma. Una vez terminada la reacción de amplificación, se realizan aumentos sucesivos de temperatura en intervalos regulares y se monitorea la fluorescencia. A medida que la temperatura aumenta, la fluorescencia va disminuyendo, alcanzando la tasa máxima de pérdida al alcanzar la  $T_m$  del amplicón. La  $T_m$  puede visualizarse como un pico en

la curva de *melting*. La  $T_m$  también depende en gran medida de la concentración de iones en la mezcla de reacción, es por eso que es importante identificar claramente el pico de *melting* cada vez que se utiliza una mastermix (mezcla de reacción comercial compuesta por todos los elementos necesarios para la reacción, excepto los cebadores) diferente, ya que las diferencias en los buffers utilizados pueden causar diferencias en las curvas(24).

#### **1.6.4. Análisis filogenético**

Un análisis filogenético tiene como finalidad reconstruir las relaciones de parentesco entre diferentes taxones (entendiendo por taxones a organismos, secuencias de ADN parciales, genes completos, secuencias de aminoácidos, etc.). Las filogenias moleculares utilizan secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos como objeto de comparación.

El primer paso a la hora de realizar un análisis filogenético, es elegir correctamente el conjunto o set de secuencias a emplear. La correcta selección de secuencias está dada por el tipo de análisis que se busca efectuar, las secuencias deben ser comparables en el marco de los parámetros establecidos en nuestra hipótesis. Esto quiere decir, que si buscamos establecer relaciones entre diferentes especies o miembros de una misma especie (como es el caso de este trabajo), las secuencias elegidas deben ser homólogas.

El segundo paso es alinear el set de secuencias elegido. El alineamiento múltiple tiene como propósito asignar homología posicional. Se asume que los nucleótidos o aminoácidos agrupados en una misma columna de un alineamiento múltiple poseen una historia evolutiva común e independiente del resto de las posiciones de las secuencias. Los programas de análisis filogenéticos utilizan estas historias evolutivas independientes para establecer relaciones entre las secuencias(11).

El último paso es realizar el análisis propiamente dicho. Un árbol filogenético es una representación gráfica bidimensional de relaciones evolutivas (en el caso de árboles con raíz) o similitud genética (en el caso de árboles sin raíz) entre un grupo de secuencias determinado. Cada árbol está compuesto por ramas y nodos. Cada rama representa el camino evolutivo seguido por determinada secuencia, mientras que cada nodo representa una separación en los caminos evolutivos seguidos por una secuencia. A partir de ese punto, los caminos evolutivos seguidos por las secuencias son completamente independientes entre ellos. Por ende, cada nodo representa a un ancestro común hipotético entre dos secuencias divergentes. Por otro lado, la longitud de las ramas representa la cantidad de cambios que tuvieron lugar hasta alcanzar la/s secuencia/s en esa rama (ya sea entre nodos o de un nodo a la secuencia actual). El tiempo que les ha llevado a dos secuencias divergir desde su último ancestro común, es por lo general desconocido. El largo de las ramas determina el número de cambios sufridos por una y otra desde el punto en que se separaron, pero la tasa de cambio es dependiente de múltiples factores que por lo general no pueden estimarse. Por tanto, que una secuencia haya

sido el resultado de más mutaciones que otra, no necesariamente implica que el tiempo de divergencia sea mayor.

Existen varios métodos de inferencia filogenética. El método de máxima parsimonia como dice su nombre, identifica los árboles que reflejen el menor número de cambios evolutivos posibles para definir las relaciones entre secuencias. En otras palabras, el método parte de la hipótesis que las diferencias entre dos secuencias estudiadas pueden ser explicadas por el número más bajo de cambios evolutivos que expliquen esas diferencias. Los métodos de distancia convierten el alineamiento múltiple en una matriz de distancia, a partir de la cual agrupan las secuencias de acuerdo al número de diferencias entre ellas. Otro método que se ha utilizado con mucha frecuencia en los últimos años para datos moleculares, en particular secuencias de ADN, es el de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*), que considera las fuerzas evolutivas y las características genéticas de los caracteres (10), escogiendo la hipótesis (árbol filogenético) que maximiza la probabilidad de observar los datos obtenidos. El análisis de máxima verosimilitud considera el ajuste entre un modelo del proceso evolutivo (las probabilidades de mutación de una base en otra, la importancia de la deriva génica, etc.), los datos (secuencias de ADN) y cada uno de los árboles filogenéticos posibles. Así, se encuentra el mejor árbol o el que proporciona el valor de verosimilitud más apropiado(36).

## 2. Objetivos y estrategia de trabajo

---

### 2.1. Objetivo general

Generar conocimiento respecto a la presencia del virus *Iris Yellow Spot Virus* en cultivos de cebolla en Uruguay

### 2.2. Objetivos específicos

- Confirmar por técnicas moleculares la presencia del virus *Iris Yellow Spot Virus* en cultivos de cebolla en Uruguay
- Optimizar las técnicas de detección en cebolla basadas en PCR y PCR en tiempo real
- Determinar el posible origen de las cepas de virus detectadas, por medio de análisis filogenético de las secuencias obtenidas

### 2.3. Estrategia de trabajo

Para realizar este trabajo, se utilizaron como materiales de partida muestras de tallos de cebolla con síntomas de infección recolectadas en campos semilleros asociados a la Facultad de Agronomía en el año 2007 y 2009.

Los ensayos más comúnmente utilizados para la detección de *Tospovirus* están basados en técnicas serológicas, las cuales consumen más tiempo y por lo general son menos sensibles y confiables que las técnicas de detección moleculares. Es por eso que en este trabajo elegimos el ajuste de técnicas moleculares como estrategia para llevar a cabo nuestros objetivos.

Dado que se trata de un virus a ARN la estrategia se basó en la extracción del ARN total de la planta y a partir de *primers* específicos se realizó una transcripción inversa (*reverse transcription*) utilizando una ARN transcriptasa reversa para obtener el ADN copia. A partir de éste se realizaron las reacciones de amplificación por PCR y Real-Time PCR, tomando como referencia el trabajo realizado por Pappu y colaboradores (28). Los *primers* que se utilizaron en las reacciones de PCR amplificarán una región del gen N del genoma del virus, el cual codifica la proteína de nucleocápside (Figura 13). El amplicón esperado como resultado de las reacciones de PCR tiene unas 226 pares de bases. A partir de los resultados obtenidos para las distintas muestras analizadas, se seleccionaron amplicones correspondientes a muestras de distintos años, los cuales fueron clonados y secuenciados. Tanto la transcripción reversa como las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo utilizando *primers* específicos previamente reportados (28).

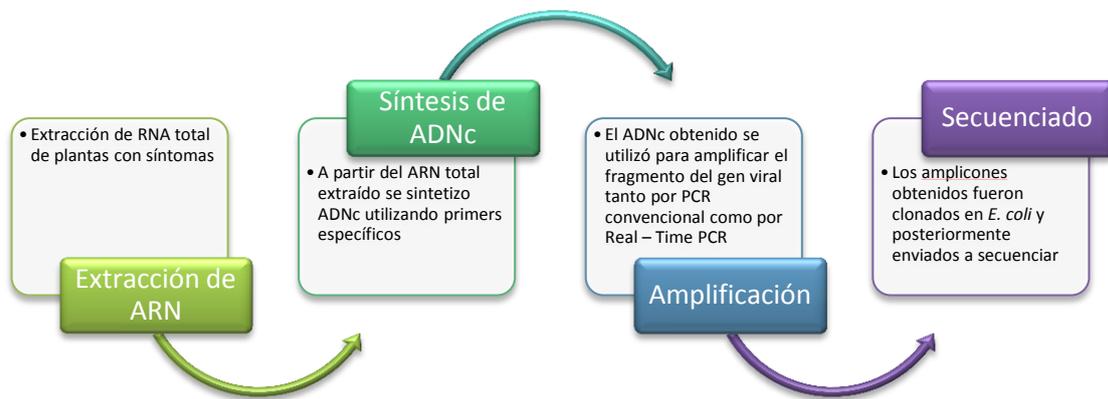


Figura 12: Representación esquemática de los pasos seguidos en este trabajo para la detección e identificación de muestras infectadas por IYSV

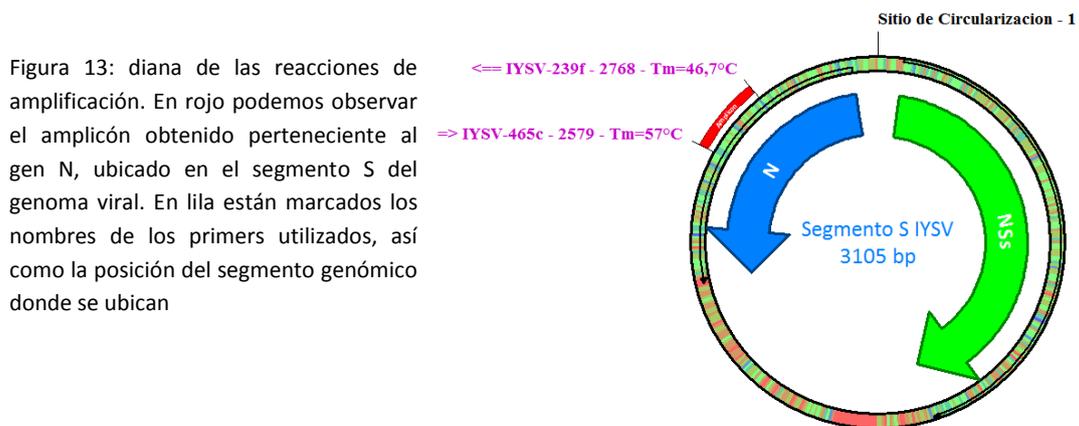


Figura 13: diana de las reacciones de amplificación. En rojo podemos observar el amplicón obtenido perteneciente al gen N, ubicado en el segmento S del genoma viral. En lila están marcados los nombres de los primers utilizados, así como la posición del segmento genómico donde se ubican

La bibliografía disponibles al comienzo del trabajo, organizaba al género en diferentes serotipos, basados en resultados de ensayos de ELISA sobre antígenos virales. Por otra parte, los datos filogenéticos presentes en dicha bibliografía eran escasos(8). Es por esto que en primera instancia nos abocamos a construir una filogenia del género *Tospovirus* completo utilizando como entrada secuencias del gen N. Se utilizó para este estudio el gen N dado que es la región del genoma de tospovirus con mayor número de registros en GenBank, y por tanto cubre la mayor diversidad de secuencias virales.

En segundo lugar, se realizó un análisis para determinar el parentesco de las secuencias detectadas en Uruguay al compararlas con otras de la misma especie del resto del mundo. Para eso se obtuvieron secuencias del gen N de GenBank, con las cuales se realizaron PCRs *in silico* con las secuencias de los primers utilizados en los ensayos de detección. En paralelo se alinearon las secuencias de la base de datos con la de los amplicones obtenidos en nuestros ensayos para confirmar que los fragmentos producidos en las PCRs *in silico* no pertenecían a regiones diferentes del gen. A partir de este alineamiento se realizó una construcción filogenética que permitió identificar el posible origen de la cepa/s viral/es presente/s en nuestro país.

## 3. Materiales y métodos

---

### 3.1. Medios de cultivo y reactivos

**Buffer de carga (para ARN):** 80µl de Buffer NaPO<sub>4</sub> (100mM), 100µl de Azul de carga, 25µl de bromuro de etidio (10mg/ml), 500µl de glicerol y 295µl de agua.

**Azul de carga (para ARN):** 1ml de Buffer NaPO<sub>4</sub> (100mM), 5ml de glicerol, 0,025g de azul de bromo fenol, 0,025g de Xilenxianol y 4ml de agua

**Agua DECP:** 200µl de solución comercial de DECP (USB™) en un litro de agua destilada. Se deja una noche en campana y se esteriliza en autoclave (15 minutos a 121°C)

**Buffer Tris Borato (TBE) (10x):** 108g de Tris base, 55g de ácido bórico y 40ml de EDTA 0,5M pH=8 en un litro de agua destilada

**Buffer de carga (5x) (para ADN):** 0,25% de azul de bromo fenol y 30% de glicerol en agua destilada.

**Medio Luria-Bertani (LB):** 10g de bacto-triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl en un litro de agua destilada. Ajustar el pH a 7. Esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C). Para obtener LB agar, agregar 1,5% de bacto-agar ante de esterilizar.

**Medio LB+Ampicilina+X-gal+IPTG (para selección de transformantes):** una vez esterilizado el medio LB-Agar, termostatar a 50°C. Luego añadir Ampicilina (concentración final 50µg/ml), 40µl de X-gal (2%) y 4µl de IPTG (20%).

**Medio SOB:** 20g de bacto-triptona, 5g de extracto de levadura, 5g de NaCl en un litro de agua destilada. Ajustar el pH a 7. Esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C).

**Medio SOC:** a 10 ml de SOB esterilizado y termostatizado a 50°C, añadir 50µl de MgCl<sub>2</sub> (2M) y 200µl de glucosa (1M)

### 3.2. Muestras

Se trabajó con un total de 21 muestras de plantas de cebolla, 13 del año 2007 y ocho del año 2009, colectadas por el grupo del Dr. Guillermo Galván de semilleros asociados a la Facultad de Agronomía. Las muestras fueron congeladas y conservadas a -20°C hasta el momento de realizar los ensayos.

### 3.3. Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total de las células vegetales, a partir de aproximadamente 100 mg de tejido adyacente a las heridas producidas por la infección. El tejido vegetal fue pulverizado en mortero utilizando nitrógeno líquido. Una vez obtenido, el material triturado se congeló rápidamente a  $-70^{\circ}$  para evitar la degradación del ARN, hasta ser utilizado para la extracción.

La extracción fue llevada a cabo mediante el uso del kit comercial RNeasy Plant Mini Kit de Qiagen (Valencia, CA) y un protocolo a base de TRizol de Invitrogen (Carlsbad, CA)

#### 3.3.1. Extracción de ARN utilizando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

- A 100mg de muestra pulverizada añadir 450 $\mu$ l de buffer RLC y mezclar con vortex durante 15 segundos.
- Transferir el lisado a una columna lila y centrifugar dos minutos a máxima velocidad.
- Recuperar el eluido en un eppendorf de 1,5ml limpio, añadir 220 $\mu$ l de etanol puro para análisis y mezclar pipeteando.
- Transferir el contenido del eppendorf a una RNeasy spin mini column y centrifugar durante 15 segundos a 10krpm. Descartar el contenido del tubo colector.
- Añadir 700 $\mu$ l de buffer RW1 a la columna y centrifugar por 15 segundos a 10krpm. Descartar el contenido del tubo colector.
- Añadir 500 $\mu$ l de buffer RPE a la columna y centrifugar durante 15 segundos a 10krpm.
- Añadir 500 $\mu$ l de buffer RPE a la columna y centrifugar durante dos minutos a 10krpm.
- Colocar la columna en un eppendorf de 1,5ml estéril. Añadir 30 $\mu$ l de RNase free wáter y centrifugar durante un minuto a 10krpm.
- Congelar a  $-70^{\circ}$ C.

#### 3.3.2. Extracción de ARN utilizando TRizol (Invitrogen)

- A 100mg de muestra pulverizada añadir 1ml de TRizol. Mezclar con vortex brevemente e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Agregar 200 $\mu$ l de cloroformo, mezclar con vortex durante 10 segundos e incubar a temperatura ambiente por tres minutos.
- Centrifugar durante 15 minutos a 10krpm a  $4^{\circ}$ C.
- Recoger cuidadosamente el sobrenadante (incolore) y transferirlo a un eppendorf de 1,5ml.

- Agregar 500µl de isopropanol, mezclar con vortex durante 10 segundos y dejar precipitar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 10 minutos a 10krpm a 4°C.
- Remover el sobrenadante.
- Lavar el pellet de ARN con 1ml de etanol 75%, aplicar vortex por 10 segundos y centrifugar a 7krpm durante 5 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y secar brevemente el pellet a temperatura ambiente.
- Re suspender el pellet en 30-50µl de agua DEPC.
- Congelar a -70°C.

### 3.4. Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc fue llevada a cabo utilizando el kit M-MLV Reverse Transcriptase de Invitrogen y el cebador IYSV-465c (Tabla 2).

Mezcla de reacción A para una reacción:

- 1µl de dNTPs 10mM
- 0,5µL de *primer* IYSV-465c 10µM
- 5,5µl de agua DECP

Mezcla de reacción B para una reacción:

- 4µl de 5x first strand buffer
- 2µl DTT 0,1M
- 1µL RNase OUT

Procedimiento:

- Mezclar 7µl de Mezcla de reacción A con 5µl de ARN.
- Incubar durante 5 minutos a 65°C.
- Añadir 7µl de Mezcla de reacción B y mezclar suavemente.
- Incubar durante dos minutos a 37°C.
- Añadir 1µl de M-MLV RT (200U/µl) y mezclar suavemente.
- Incubar a 42° por 45 minutos y paso seguido inactivar a 70° por 15 minutos.

### 3.5. Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo utilizando la *Taq DNA Polymerase* de Invitrogen. El producto esperado para estas reacciones es una banda de 226 pares de bases.

Mezcla de reacción para una reacción:

- 5µl de PCR buffer 10x
- 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> 50Mm
- 3,125µl de dNTPs 10Mm
- 1,25µl de *primer* IYSV-465c 10µM
- 1,25µl de *primer* IYSV-238f 10µM
- 2µl de ADNc (obtenido de la RT-PCR)
- 0,4µl de *Taq* polimerasa
- 35,475µl de agua MQ

Reacción:

- 94°C por 30 segundos
  - 60°C por 30 segundos
  - 72°C por 20 segundos
  - Extensión final: 72°C por cinco minutos
- } 40 ciclos

Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2% con bromuro de etidio (0,5µg/ml). Se sembraron 3µl de producto de PCR más 2µl de Buffer de carga y se hicieron migrar durante media hora a 100V. Como referencia se sembró 1µl del marcador de peso molecular SmartLadder (Eurogentec)

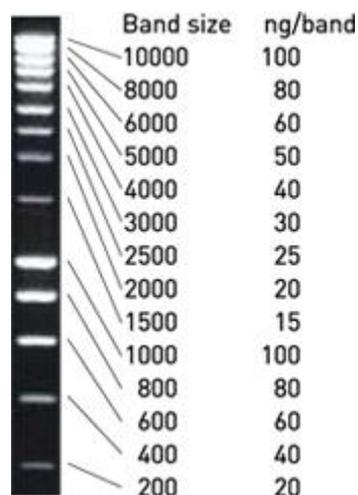


Figura 14: Marcador de peso molecular SmartLadder MW.1700-10 (Eurogentec)

### 3.6. Real-Time PCR

Las reacciones de Real –Time PCR fueron llevadas a cabo en el equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett Research), utilizando las mastermix Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen) y QuantiTec SYBR Green PCR Kit (Qiagen).

Mezcla de reacción para una reacción:

- 5µl de SYBR Green mastermix
- 0,5µl de *primer* IYSV-465c 10µM
- 0,5µl de *primer* IYSV-239f 10µM
- 3µl de agua MQ
- 1µl de ADNc

Reacción:

- 95°C durante 5 minutos
  - 95°C durante 5 segundos
  - 60°C durante 20 segundos
- } 35 ciclos

Melt: aumento de 60°C a 95°C a una tasa de 1°C cada 20 segundos

### 3.7. Preparación del material para secuenciar

Los fragmentos obtenidos por PCR fueron ligados al vector pCR 2.1 de Invitrogen (Figura 15). El vector posee una región múltiple de clonado en el gen que codifica la subunidad alfa de la beta-galactosidasa y un gen de resistencia a ampicilina. Además posee regiones complementarias a los cebadores universales M13 que flanquean la región múltiple de clonado, los cuales fueron utilizados para secuenciar los fragmentos clonados. Las transformaciones se realizaron por electroporación en células de *E. coli* genotipo TOP10 [F-*mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*]. La elección de transformantes con inserto se realizó mediante el método de selección por alfa complementación (colonias blancas con inserto, colonias azules sin inserto).

#### 3.7.1. Preparación de células electro competentes

Los fragmentos de PCR fueron clonados en células de *E. coli* Top 10. Para la preparación de células electro competentes se realizó un pre cultivo en 3ml de LB durante una noche a 37°C. Con 1ml de este pre cultivo se inocularon 250ml de LB y se incubó a 37 con agitación (300rpm)

hasta que la  $DO_{600}$  del cultivo se encontró entre 0,5 y 0,7. Posteriormente se transfirió el cultivo a tubos de centrifuga de 50ml y se dejaron enfriar en hielo durante 20 minutos. Se centrifugaron durante 15 minutos a  $4^{\circ}C$  a 4000g, se eliminó todo el sobrenadante y se re suspendió el pellet en 1 volumen de glicerol 10%. Se juntaron las células en dos tubos, se centrifugó en las mismas condiciones y se re suspendieron en  $\frac{1}{2}$  volumen de glicerol 10%. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y el pellet fue re suspendido en  $\frac{1}{25}$  de volumen de glicerol 10%. Se realizaron alícuotas de 50 $\mu$ l en tubos eppendorf, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-70^{\circ}C$ .

### 3.7.2. Ligación

La ligación se realizó utilizando el TA cloning kit de Invitrogen

Mezcla de reacción de ligación:

- 2 $\mu$ l de producto de PCR
- 1 $\mu$ l de 10X Ligation Buffer
- 2 $\mu$ l de pCR 2.1 (25ng/ $\mu$ l)
- 4 $\mu$ l de agua MQ
- 1 $\mu$ L DE T4 Ligase

Incubar la mezcla de reacción a  $14^{\circ}$  durante una noche

Precipitación con tRNA

Mezcla de reacción:

- 5 $\mu$ l de mezcla de reacción de ligación
- 5 $\mu$ l de solución de tRNA
- 10 $\mu$ l de agua MQ
- 50 $\mu$ L de etanol 96%

Procedimiento:

- Centrifugar a 12krpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}C$
- Descartar el sobrenadante
- Lavar el pellet con 100 $\mu$ l de etanol 70%
- Centrifugar a 12krpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}C$
- Descartar el sobrenadante y secar el pellet a  $45^{\circ}C$  durante 40 minutos
- Re suspender el pellet en 2 $\mu$ l de agua MQ

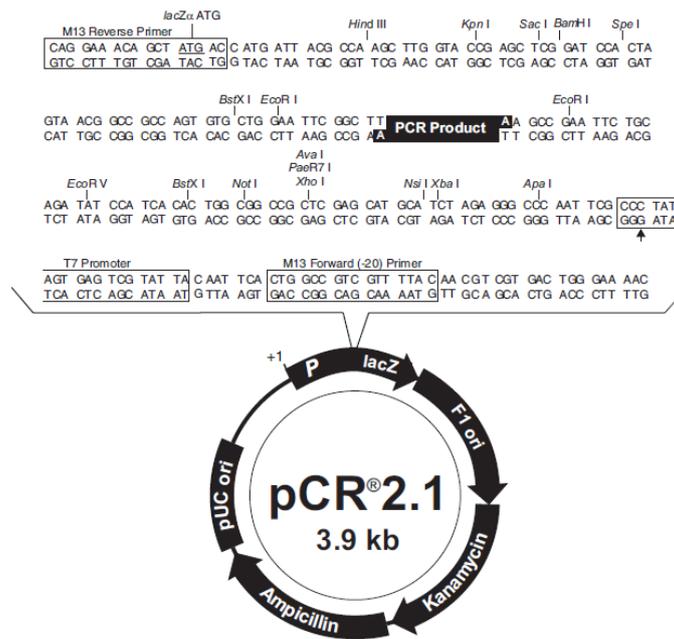


Figura 15: vector de clonado pCR 2.1 (Invitrogen)

### 3.7.3. Transformación

Procedimiento:

- Enfriar celdas en freezer, eppendorf y soluciones en hielo.
- Descongelar células en hielo durante dos minutos.
- Luego de descongeladas las alícuotas de células, transferirlas al eppendorf con los 2µl de ADN precipitado con tRNA y dejar en hielo un minuto.
- Transferir la mezcla a la celda y electroporar (2,5 KV durante 5 milisegundos)
- Agregar rápidamente 1ml de SOC y mezclar por inversión.
- Incubar durante una hora a 37°C.
- Plaquear en LB+Ampicilina+Xgal+IPTG 10µl de cultivo en una placa, 100µl de cultivo en otra placa y el resto del cultivo en una tercer placa e incubar una noche a 37°C.

### 3.7.4. Extracción del ADN plasmídico

Procedimiento:

- Tomar una colonia blanca de la placa de LB+Ampicilina+Xgal y realizar un cultivo overnight en 3ml de LB+Ampicilina a 37°C con agitación moderada.
- Transferir 1ml del cultivo a un eppendorf y centrifugar a 9krpm durante dos minutos. Eliminar el sobrenadante.

- Añadir 0,2ml de buffer TE + ARNasa (0,1mg/ml) y re suspender el pellet.
- Añadir 0,2ml de solución II (1% SDS, 0,2M NaOH).
- Añadir 0,2ml de solución III (60% KAc 5M, 11,5% HAc glacial).
- Dejar 15 minutos en hielo.
- Centrifugar a 12krpm durante 10 minutos, recuperar el sobrenadante
- Añadir un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico y mezclar por inversión. Centrifugar durante seis minutos a 9krpm y luego recuperar la fase acuosa.
- Añadir un volumen de cloroformo:isoamílico. Centrifugar durante seis minutos a 9krpm y recuperar la fase acuosa.
- Añadir dos volúmenes de etanol 96% y centrifugar a 12krpm durante 15 minutos a 4°C.
- Lavar el pellet con 1ml de etanol 70%, y centrifugar a 12krpm durante 15 minutos a 4°C.
- Re suspender el pellet en 30µl de agua MQ.

El ADN extraído se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2% con bromuro de etidio (0,5µg/ml). Se mezcla 1µl de ADN con 2µl de Buffer de carga y se carga el gel. Luego se migra durante 45 minutos a 100V. Como referencia se siembra 1µl del marcador de peso molecular SmartLadder (Eurogentec)

Tabla 1: primers utilizados en los ensayos de detección. Fuente: Pappu et al. 2008

Nombre	Secuencia 5´-3´
IYSV-465c	CAGCAAAGTGAGAGGACCACC
IYSV.239f	TGAGCCCCAATCAAGACG

### 3.8. Generación de bases de datos para realizar los análisis filogenéticos

#### 3.8.1. Filogenia del género Tospovirus

Para realizar la construcción filogenética del género Tospovirus, se seleccionaron secuencias de aminoácidos completas de la proteína N viral. Se tomaron todas las secuencias anotadas en GenBank hasta julio de 2010 (aproximadamente 1000 secuencias) y luego se procedió a depurar la base de datos. El primer paso fue separar las secuencias por especie y luego recuperar (en los casos que fuera posible) las tres secuencias más informativas por especie. Para realizar esta tarea se crearon archivos multi fasta que incluían únicamente secuencias de una misma especie. Estos archivos fueron procesados utilizando el software Toffee instalado en una computadora con sistema operativo Linux.

Procedimiento desde la línea de comandos:

En primer lugar debemos dirigirnos al directorio donde se encuentra nuestro archivo multi fasta y luego escribir lo siguiente:

```
t_coffee -other_pg seq_reformat -in BASE_DE_DATOS.prt -action +trim _seq_n3  
-output fasta_se
```

Esta orden nos devuelve un archivo con las tres secuencias más informativas del grupo. Muchas veces encontramos anotadas secuencias anotadas incompletas que el programa considera informativas, es por eso que la base de datos original debe depurarse manualmente cada vez que una de estas aparece y repetir el proceso hasta que el programa nos devuelva tres secuencias completas.

### 3.8.2. Filogenia de IYSV

Un total de 15 secuencias del gen N de IYSV fueron obtenidas de GenBank, intentando contemplar la más amplia distribución geográfica posible. A estas secuencias se les practicaron PCRs *in silico* utilizando el software pDRAW 32 (AcaClone Software) utilizando como *primers* las mismas secuencias de los *primers* usados en los ensayos de detección (Tabla 1). Una vez obtenidos estos fragmentos, fueron alineados uno a uno con la secuencia 1T3 obtenida en este trabajo, para confirmar que no se trataran de regiones diferentes del gen.

### 3.9. Construcción de filogenias

Ambos árboles fueron construidos siguiendo los mismos parámetros. El set de secuencias obtenido fue alineado usando el programa MUSCLE. Los árboles fueron construidos utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud; el método de sustitución elegido fue el Jones-Taylor-Thornton, el método de inferencia heurístico fue el *Nearest-Neighbor-Interchange*, y el test elegido fue el de *bootstrap* con 500 repeticiones. Tanto los alineamientos como las construcciones filogenéticas fueron realizados usando la suite bioinformática *MEGA 5* (Tamura, Peterson, Stecher, Nei, and Kumar 2011).

Las representaciones gráficas de los árboles usadas en la sección Resultados y Discusión, fueron creadas usando el software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk>) a partir de los archivos de salida producidos con el software *MEGA 5*.

Tabla 2: números de acceso de secuencias utilizadas en el análisis del género

<b>Nombre</b>	<b>Número</b>
<i>Groundnut bud necrosis virus</i>	170282972
<i>Groundnut bud necrosis virus 2</i>	170282970
<i>Groundnut bud necrosis virus 3</i>	170282968
<i>Peanut bud necrosis virus</i>	224038466
<i>Peanut bud necrosis virus 2</i>	224038464
<i>Peanut bud necrosis virus 3</i>	224038462
<i>Groundnut ringspot virus</i>	7582413
<i>Groundnut ringspot virus 2</i>	21314572
<i>Groundnut ringspot virus 3</i>	5705889
<i>Melon yellow spot virus</i>	77681093
<i>Melon yellow spot virus 2</i>	77681091
<i>Melon yellow spot virus 3</i>	77681089
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	102695474
<i>Impatiens necrotic spot virus 2</i>	102695461
<i>Impatiens necrotic spot virus 3</i>	90307983
<i>Tomato chlorotic spot virus</i>	15778427
<i>Tomato chlorotic spot virus 2</i>	10802904
<i>Tomato chlorotic spot virus 3</i>	265007
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	110752466
<i>Tomato spotted wilt virus 2</i>	110752464
<i>Tomato spotted wilt virus 3</i>	110752462
<i>Watermelon bud necrosis virus</i>	222822707
<i>Watermelon bud necrosis virus 2</i>	222822705
<i>Watermelon bud necrosis virus 3</i>	222822703
<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i>	6119733
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>	6119731
<i>Capsicum chlorosis virus</i>	170282980
<i>Capsicum chlorosis virus 2</i>	163717337
<i>Capsicum chlorosis virus 3</i>	238558291
<i>Iris yellow spot virus</i>	225195558
<i>Iris yellow spot virus 2</i>	73532976
<i>Iris yellow spot virus 3</i>	33621127
<i>Physalis severe mottle virus</i>	4958987
<i>Peanut yellow spot virus</i>	43300992
<i>Peanut yellow spot virus 2</i>	2735924
<i>Tomato zonate spot virus</i>	170676270

Tabla 3: números de acceso de secuencias utilizadas en filogenia de IYSV

<b>Origen</b>	<b>Número de acceso</b>
BRASIL	AF067070
CASMA (PERU)	DQ838588
CHILE	DQ150107
GEORGIA (USA)	D1838594
GUATEMALA	DQ838589
INDIA	DQ270004
ISRAEL	AF271219
JAPON	AB121025
WASHINGTON (USA)	D1233470
AUSTRALIA	AY345226
URUGUAY 1T3	GU550518
URUGUAY 093F	SIN ANOTAR
URUGUAY 091T	SIN ANOTAR
SRI LANKA	GU901211
SERBIA	EU750697
ITALIA	FJ842095
HAWAI	HM776016
TSWV	AB175809

## 4. Resultados y Discusión

---

### 4.1. Extracción de ARN

En la figura 16 podemos observar una electroforesis en gel de agarosa para siete muestras de ARN, tres extraídas siguiendo el protocolo a base de TRizol y cuatro mediante el RNeasy Plant Mini Kit de Qiagen. Es posible observar dos bandas bien definidas que corresponden a las subunidades 28S y 18S de ARN ribosomal de la planta. La aparición de estas bandas demuestra que el ARN no se degradó en el proceso de extracción

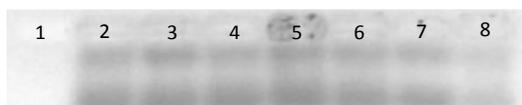


Figura 16: electroforesis en gel de agarosa del ARN total extraído de plantas infectadas. En los carriles dos al cinco podemos observar el ARN extraído utilizando el kit comercial, mientras que en los carriles del seis al ocho el ARN extraído siguiendo el protocolo a base de TRizol. En el carril uno se observa el blanco (los carriles se cuentan de izquierda a derecha).

### 4.2. Detección basada en PCR

Para los primeros ensayos se seleccionaron dos muestras con síntomas claros de virosis recolectadas en el año 2007 que se identificaron como 1T3 y 2T1. A estas muestras se les hicieron extracciones de ARN por cuadruplicado en el caso de 1T3 y por triplicado en el caso de 2T1. Luego de realizada la extracción se procedió a la síntesis de ADNc. El ADNc obtenido fue utilizado como molde para los ensayos de PCR, los cuales llevaron muchos ajustes y variaciones en el protocolo hasta llegar al utilizado en este trabajo (datos no incluidos). La figura 17 presenta una electroforesis en gel de agarosa con los primeros resultados positivos para estas muestras. La banda observada es ligeramente mayor a 200 pares de bases, lo cual se corresponde con los resultados esperados (una banda de 226 pares de bases). El producto de PCR de la muestra 1T3 fue enviado a secuenciar, confirmando de esta manera que el amplicón correspondió a un fragmento del genoma viral (GenBank Accesion GU550518) (Figura 18)

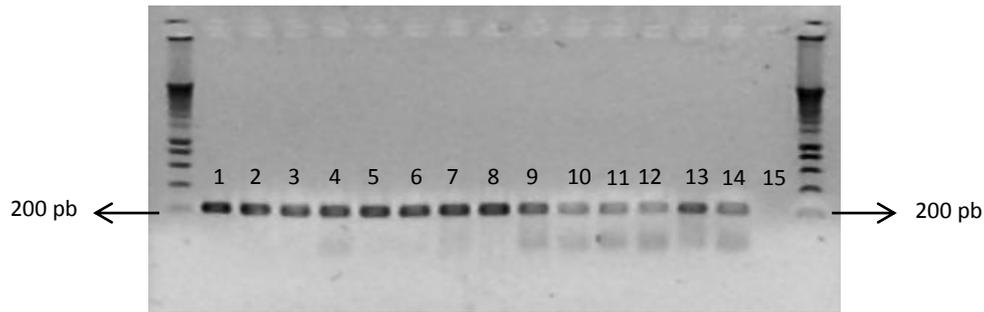


Figura 17: electroforesis en gel de agarosa de las muestras 1T3 y 2T1. En la figura se observan los resultados de las amplificaciones por duplicado para las 4 extracciones de ARN de la muestra 1T3 (carriles del 1 al 8) y las 3 extracciones de la muestra 2T1 (carriles del 9 al 14). En el carril 15 se corrió el blanco

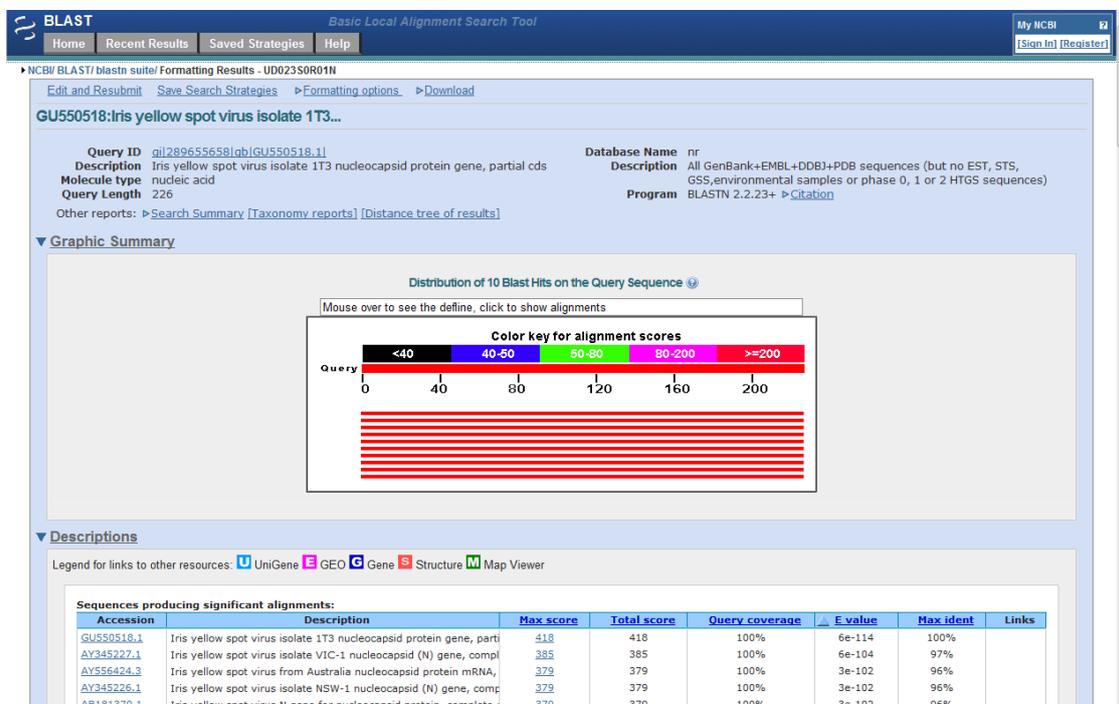


Figura 19: captura de pantalla de un BLAST realizado a la secuencia del amplicón 1T3. Es posible observar la similitud con otras secuencias de IYSV, lo que confirma la presencia del virus en muestras nacionales.

Una vez optimizado el protocolo de detección se procedió a realizar el análisis de más muestras correspondientes tanto al año 2007 como del 2009. En la figura 19 observamos dos gels correspondientes a muestras positivas del año 2007 y 2009. La figura 20 muestra una electroforesis de 5 muestras positivas y la sintomatología observada en dichas plantas. Las muestras 1T3, 2T1 y 092T1 presentaban síntomas clásicos asociados a la enfermedad, mientras que en la muestra 093T presenta heridas de una forma más irregular y la muestra 094T prácticamente no presentaba síntomas.

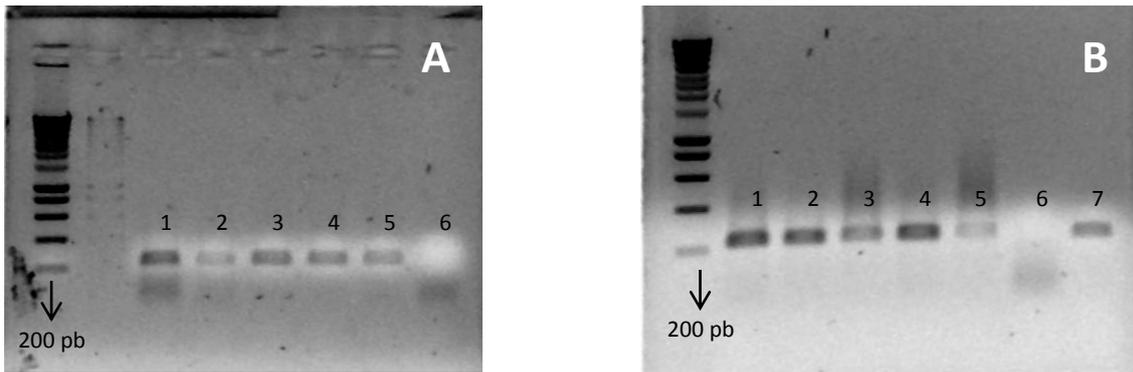


Figura 19: muestras positivas. El gel A muestra resultados positivos para muestras 2007 y el gel B para muestras 2009. Gel A: carril 1-muestra 1T3, carril 2-muestra 2T1, carril 3-muestra 1T5, carril 4-muestra 1T2, carril 5-muestra 1T7, carril 6-blanco. Gel B: carril 1-muestra 091T, carril 2-muestra 092T2, carril 3- muestra 092T1, carril 4-muestra 093T, carril 5-muestra 093F, carril6-blanco, carril 7-control 1T3.

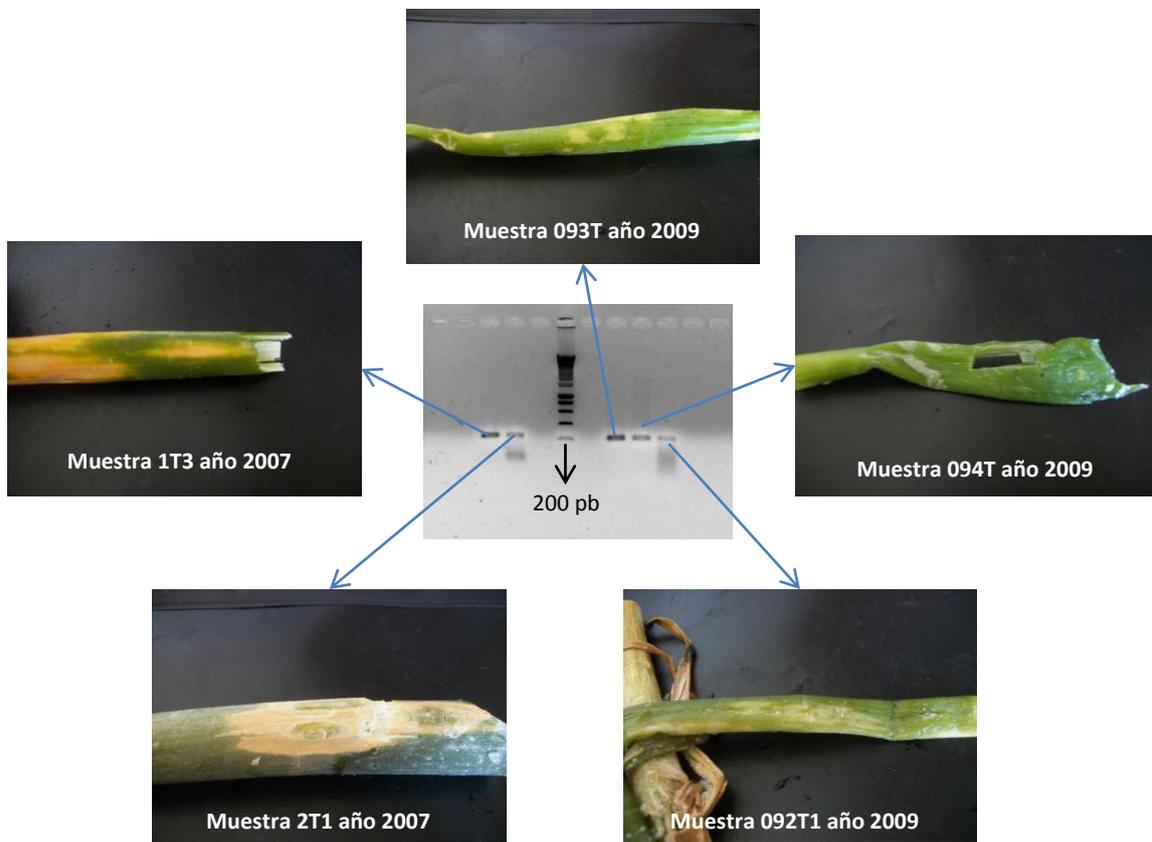


Figura 20: distintas sintomatologías asociadas a la infección por IYSV

Estos resultados corroboraron la sospecha inicial de que el virus está presente en nuestro país. Asimismo, permitieron asociar diferentes síntomas con la infección viral como por ejemplo el resultado positivo de la muestra 093T con manchas necróticas irregulares. Otro punto

interesante es que se detectó la presencia del virus en una muestra asintomática que se encontraba cercana a plantas infectadas al momento de su recolección.

### 4.3. Real-Time PCR

#### 4.3.1. Primeros ensayos de detección

La detección por Real-Time PCR fue llevada a cabo según se describe en materiales y métodos. Para realizar los ajustes se utilizó el ADNc de la muestra 1T3. La figura 21 presenta la gráfica de cinética de la reacción y la curva de *melting* utilizando la mastermix de Qiagen Rotor-Gene SYBR Green. Es posible observar amplificación positiva para ambos duplicados y un pico de *melting* a una temperatura aproximada de 81°C. Como parte de la optimización se probó el protocolo con otra mastermix también de Qiagen, la QuantiTec SYBR Green para comparar cual daba mejores resultados. La figura 22 presenta las gráficas de cinética y curvas de *melting* para la muestra 1T3 con ambas mastermix. Podemos observar claramente que la mezcla de reacción Rotor-Gene SYBR Green (color rosa) es mucho más sensible que la mezcla de reacción QuantiTec SYBR Green (azul), ya que la diferencia en los valores de CT es de alrededor de 10 ciclos. También se observó una diferencia de 2°C en la curva de *melting*.

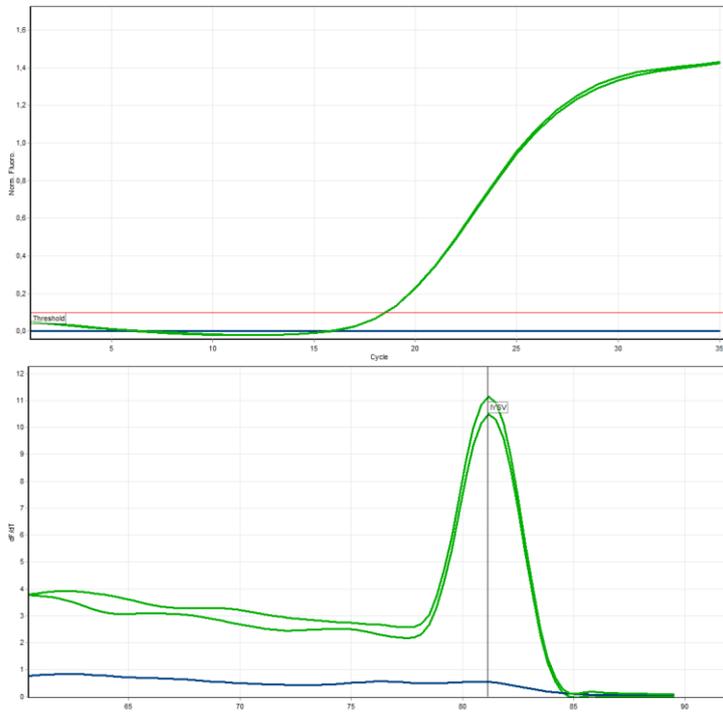


Figura 21: amplificación de la muestra 1T3. En la parte superior de la figura podemos observar la curva de amplificación para la muestra 1T3 por duplicado en color verde. En color azul se observa el blanco. La imagen inferior muestra la curva de *melting* de la reacción. Es posible identificar claramente un pico a la temperatura de 81°C.

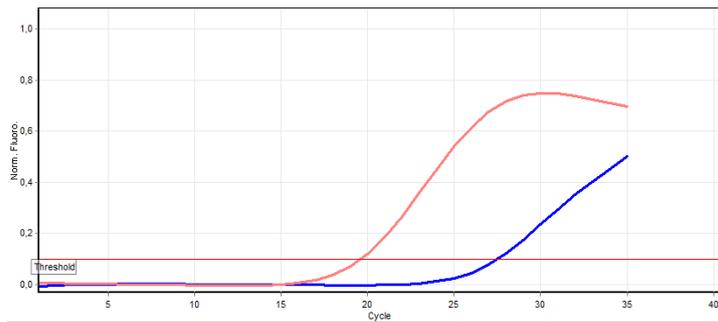
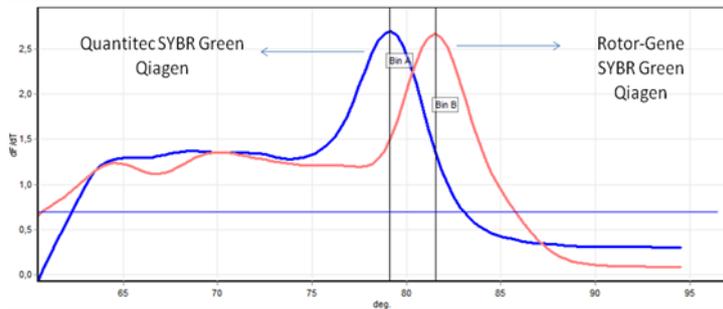


Figura 22: comparación de la sensibilidad de la mastermix Rotor-Gene SYBR Green y QuantiTec SYBR Green. Se observa la clara diferencia de sensibilidad de ambas mastermix, además de la diferencia de 2°C en los picos de *melting*.



La diferencia tan significativa observada en el grado de sensibilidad de la reacción de los dos protocolos evaluados, determinó el uso de la mastermix Rotor-Gene SYBR Green para continuar con los ensayos de detección.

#### 4.3.2. Comparación de los métodos de extracción de ARN

Se realizó un ensayo para comparar la influencia del método de extracción de ARN utilizado a la hora de detectar la presencia del virus. Para esto se pulverizaron 200µg de la muestra 1T3 y se utilizaron 100µg para realizar una extracción siguiendo el protocolo a base de TRizol y 100µg para realizar la extracción utilizando el kit comercial. Luego de terminadas las extracciones se realizaron las retro amplificaciones y amplificación por Real-Time PCR en paralelo, de forma de poder comparar si existen diferencias en la detección que hagan inclinarse por un método u otro.

La figura 23 presenta las curvas de cinética para las muestras. Podemos observar un Ct menor para la muestra extraída con TRizol de aproximadamente dos ciclos. Aunque esta diferencia implique una cantidad mayor de ADNc inicial, no fue tan significativa como para preferir un método sobre otro. Sin embargo la extracción utilizando el kit garantiza la ausencia de contaminación con ADN genómico de la planta y otros agentes inhibidores (como fenol y cloroformo). Por lo tanto, este método de extracción es el que se eligió para continuar con los ensayos.

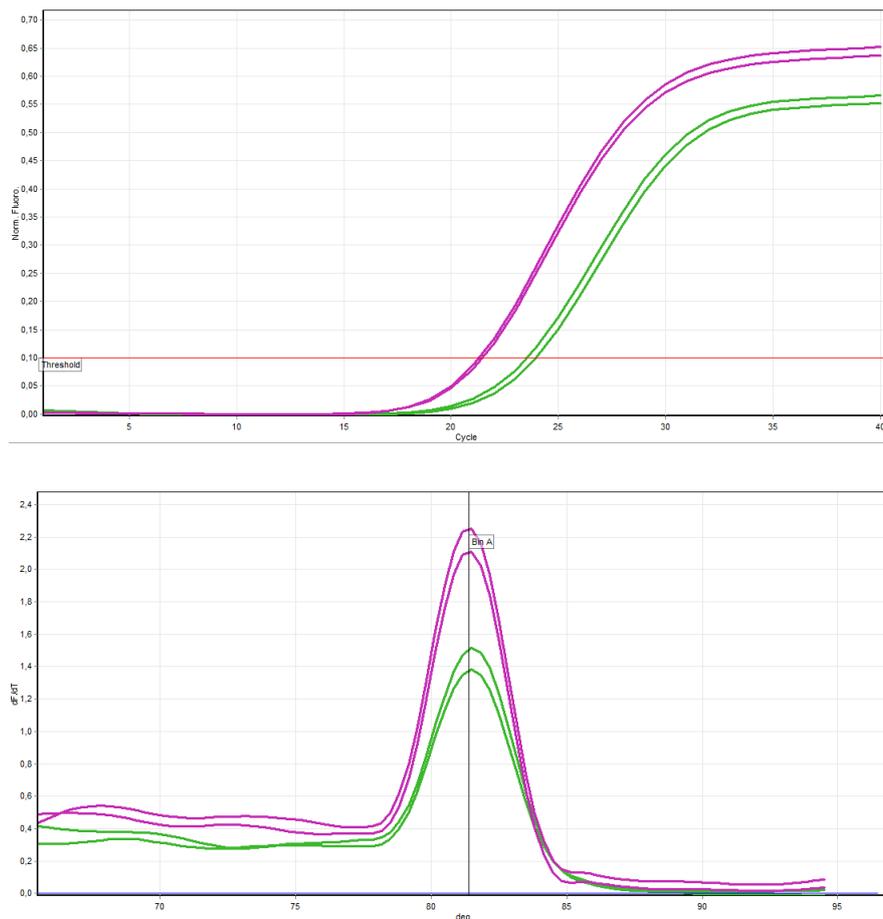


Figura 23: comparación entre métodos de extracción de ARN. En la parte superior observamos las curvas de cinética para las muestras testeadas y en la parte inferior las curvas de *melting*. La muestra extraída utilizando TRizol se muestra en color lila y la extraída con el kit comercial en verde

### 4.3.3. Análisis de muestras

Luego de realizados los ajustes metodológicos, se procedió a realizar ensayos de detección con un set de muestras del año 2007 y 2009. Fue posible detectar la presencia del virus en cinco muestras del año 2007 y cinco del año 2009

En la figura 24 observamos las curvas de amplificación de las muestras 1T3, 2T1, 1T5, 1T2 y 1T7. De los valores de Ct se deduce que la cantidad de ADNc inicial es bastante similar para las muestras 1T3, 1T5, 1T2 y 1T7, mientras que para la muestra 2T1 es algo menor.

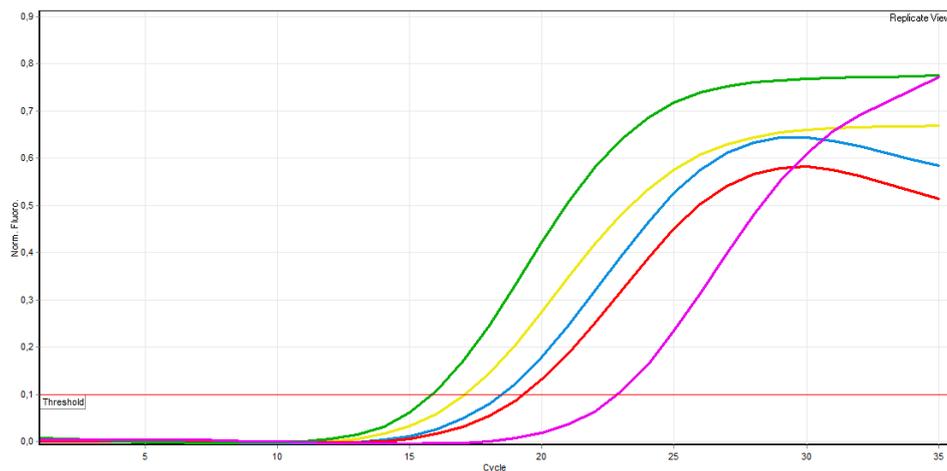


Figura 24: amplificación de muestras del año 2007. En verde 1T3, en amarillo 1T5, en azul 1T2, en rojo 1T7 y en lila 2T1

Los resultados de la curva de *melting* muestran que las amplificaciones obtenidas fueron específicas, ya que todas las muestras presentaron un pico en el entorno a los 81°C. Es interesante observar la presencia de un segundo pico en la muestra 2T1. La razón de esta observación, es que el ARN de esta muestra fue obtenido siguiendo el protocolo a base de TRizol (ver Materiales y Métodos) y no se realizó ningún tratamiento con DNAsa, por lo que es posible que la muestra contenga restos de ADN genómico de la planta, los cuales se revelan a la hora de realizar la curva de *melting*.

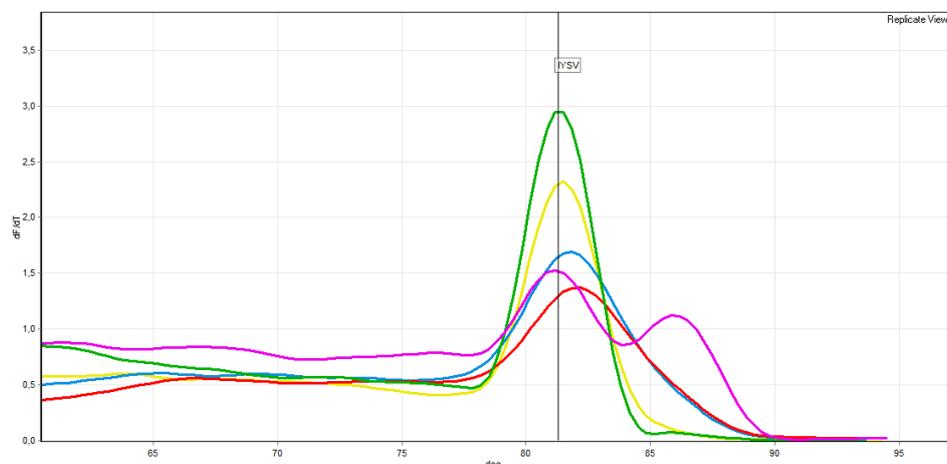


Figura 25: *melting* de muestras del año 2007. En verde 1T3, en amarillo 1T5, en azul 1T2, en rojo 1T7 y en lila 2T1

La figura 26 muestra la amplificación de las muestras 091T, 092T2, 092T1, 093T y 093F, correspondientes al año 2009.

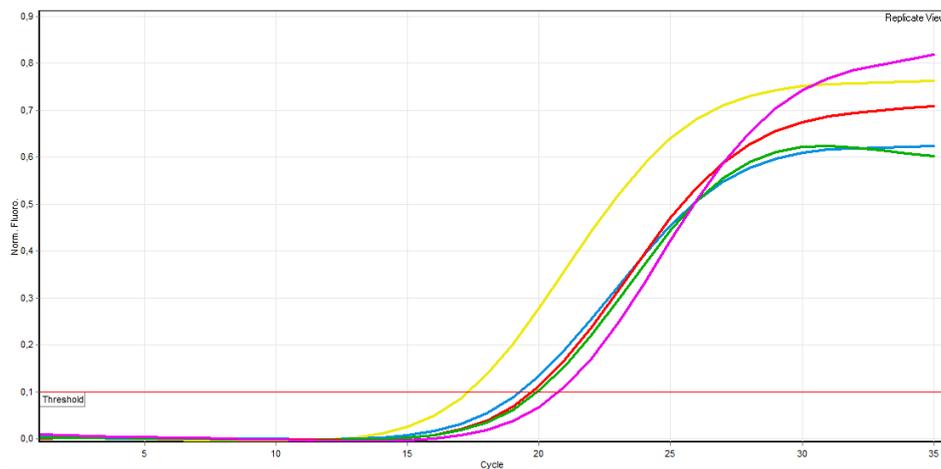


Figura 26: amplificación de muestras del año 2009. En amarillo 091T, en azul 092T2, en rojo 092T1, en verde 093T y en lila 093F

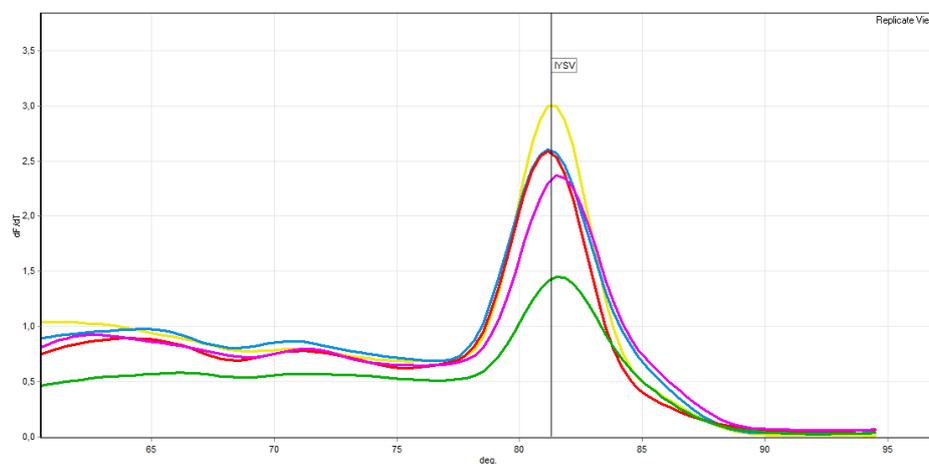


Figura 27: *melting* de muestras del año 2009. En amarillo 091T, en azul 092T2, en rojo 092T1, en verde 093T y en lila 093F

#### 4.3.4. Ventajas de la detección basada en Real-Time PCR

Existen varias ventajas en el uso de Real-Time PCR sobre el uso de PCR convencional, además del menor tiempo que insume y la menor manipulación por parte del operador. La primera es que la PCR en tiempo real nos permite evaluar la eficiencia de la reacción, dándonos la opción de realizar las modificaciones necesarias hasta lograr obtener un protocolo realmente fiable. La segunda ventaja que posee esta técnica es su mayor sensibilidad. Muchas veces la cantidad de producto final de la reacción no es suficiente como para poder ser visualizada en un gel y por tanto podemos llegar a obtener resultados negativos falsos. La cantidad de producto final depende principalmente de la disponibilidad de reactivos (dNTPs, Taq y *primers*), y una vez que uno de estos se acaba, la reacción entra en una fase estacionaria en la cual no hay más amplificación sin importar cuantos ciclos más haya por delante. Pero también existe una relación entre la cantidad de muestra inicial y el tiempo. A menor cantidad de muestra (en este

caso ADNc), mas ciclos son necesarios para alcanzar la cantidad máxima de producto, y muchas veces la cantidad de muestra inicial no es la suficiente para alcanzar una cantidad de producto necesaria para ser detectada en un gel después de la cantidad de ciclos elegida para la reacción (generalmente entre 35 y 40 ciclos). La PCR en tiempo real permite observar la cinética completa de la reacción, y la interpretación de un resultado como positivo es independiente del producto al final de la reacción; está dado en primer lugar por la identificación del punto en que la reacción entra en fase exponencial (Ct) y, en el caso de usar SYBR Green como agente revelador, por la curva de *melting*. Es por esto que la detección basada en PCR en tiempo real presenta una importante ventaja sobre la PCR convencional.

Para comparar los límites de detección de ambas técnicas y calcular la eficiencia de la reacción, se realizaron diluciones seriadas del ADNc de la muestra 092T2 (1:10, 1:100 y 1:1000), y se procedió a amplificar las mismas por ambos métodos en paralelo. Mediante la técnica de Real-Time PCR se logran amplificaciones positivas en las tres diluciones, mientras que por PCR convencional únicamente logramos detectar el ADNc diluido al décimo y al céntimo (Figuras 28 y 29).

Este resultado demostró que la detección por Real-Time PCR es más sensible que la detección por PCR convencional, ya que es posible detectar cantidades menores de ADNc viral y evitar falsos negativos. Esto es importante ya que la cantidad de ADNc obtenido al final del proceso de síntesis puede variar, dependiendo de la cantidad de ARN viral presente en las muestras, errores en la extracción o degradación, e incluso posibles inhibiciones o bajo rendimiento de la transcripción reversa. También se comprobó que la eficiencia de la reacción fue alta (98%).

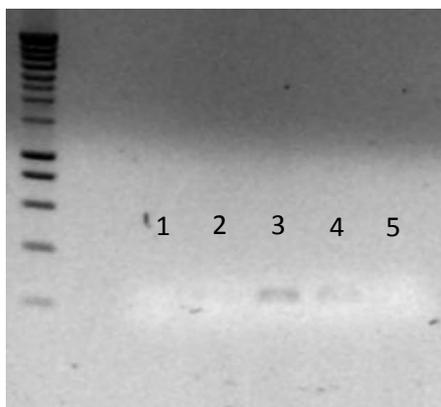


Figura 28: electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR de las diluciones de la muestra 092T2. Es posible observar amplificación positiva únicamente en las diluciones 1:10 y 1:100 (carriles 3 y 4). El control negativo, el blanco y la dilución 1:1000 no muestran amplificación (carriles 1,2 y 5 respectivamente)

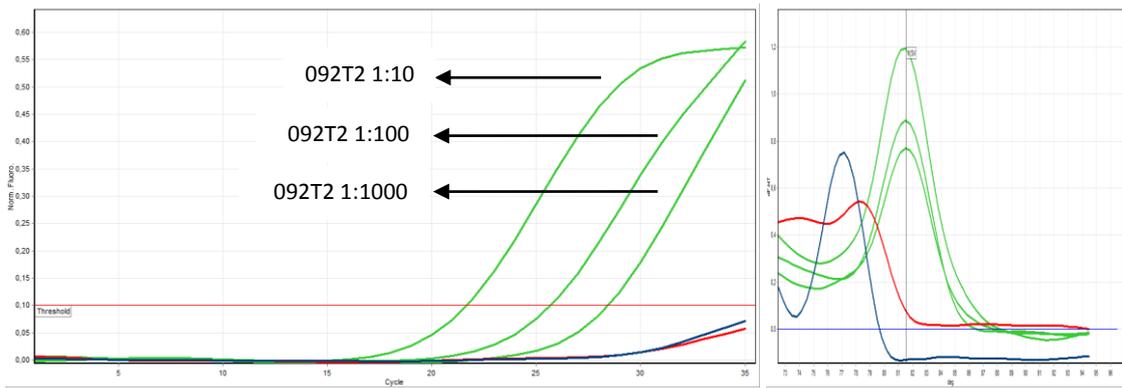


Figura 29: amplificación por Real-Time PCR de las diluciones de la muestra 092T2. En verde, las amplificaciones de las tres diluciones mientras que en rojo está marcado el control negativo y en azul el blanco. La curva de *melting* muestra que las tres diluciones tienen el mismo pico en la temperatura esperada, mientras que el blanco y el control negativo poseen picos inespecíficos, posiblemente debido a la formación de dímeros de *primers*

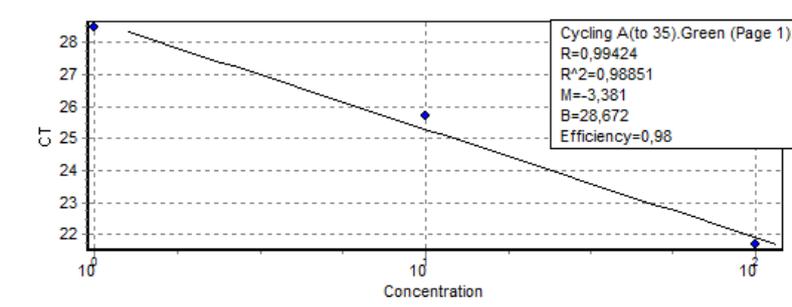


Figura 30: eficiencia de la reacción. La gráfica muestra que la eficiencia de la reacción es del 98%

#### 4.4. Clonado y secuenciado

El clonado de productos de PCR fue llevado a cabo con dos objetivos. El primero fue la conservación de dichos fragmentos para ensayos posteriores y el segundo para multiplicarlos y obtener cantidades suficientes de producto para su secuenciación. El proceso completo de ligación, clonación y extracción de ADN plasmídico fue llevado a cabo según se describió en materiales y métodos.

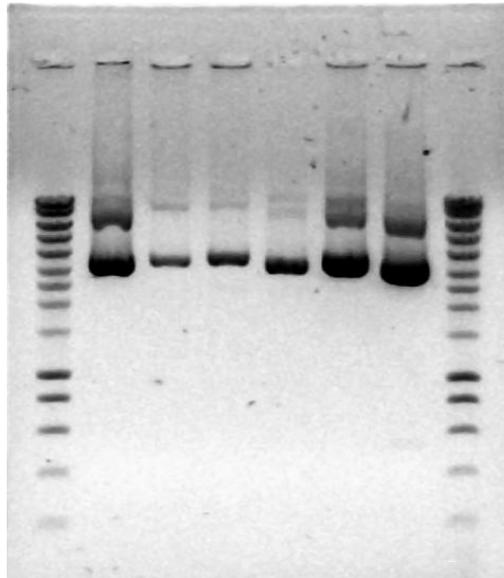


Figura 31: extracción de ADN plasmídico de clones transformados. En la figura se muestra un gel en el cual se corrió 1 $\mu$ l del ADN extraído de varios clones transformados con el fragmento viral ligado al vector

Se realizaron ensayos con productos de PCR de diez muestras diferentes, logrando clonar exitosamente dos de ellos (muestras 091T y 093F)

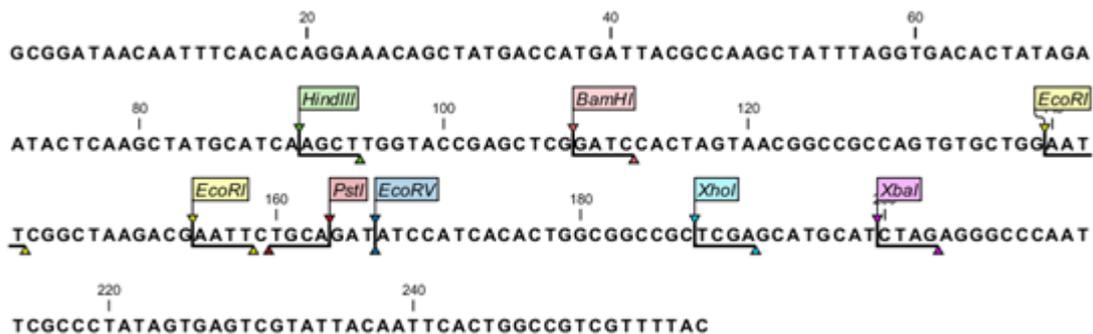


Figura 32: Región polilinker del vector pCR 2.1

En la figura 32 se observa la secuencia de la región *polilinker* del vector de clonación. El vector comercial viene en forma linealizada, abierto en la región entre los dos sitios de digestión de *EcoRI*, donde se liga el producto de PCR deseado.

#### 4.4.1. Análisis de clones

##### Clon A9 (muestra 091T)



Figura 33: fragmento ligado en el clon A9

La figura 33 muestra que dentro del SMC se ha insertado una secuencia foránea. La secuencia clonada es la siguiente:

```

CAGCAAAGTGAGAGGACCACCTAGCGTCAGCATGATCCTAGCTGTAGTTGCATCAAACCTGGTACTAGGTTTCAAACCATATGC
ACTTACCAGAGGAAGCCCGCAGATTTTTTCATACATTTTCTGTTTCTCCTTCTCATTCTTTTGTTC AATCAGTTCTACAAGCATTCTA
GCCCTGATAAAGCCTTCTAACCTCCTGAATGTCCAATCGTCTTGATTGGGGCTCA
  
```

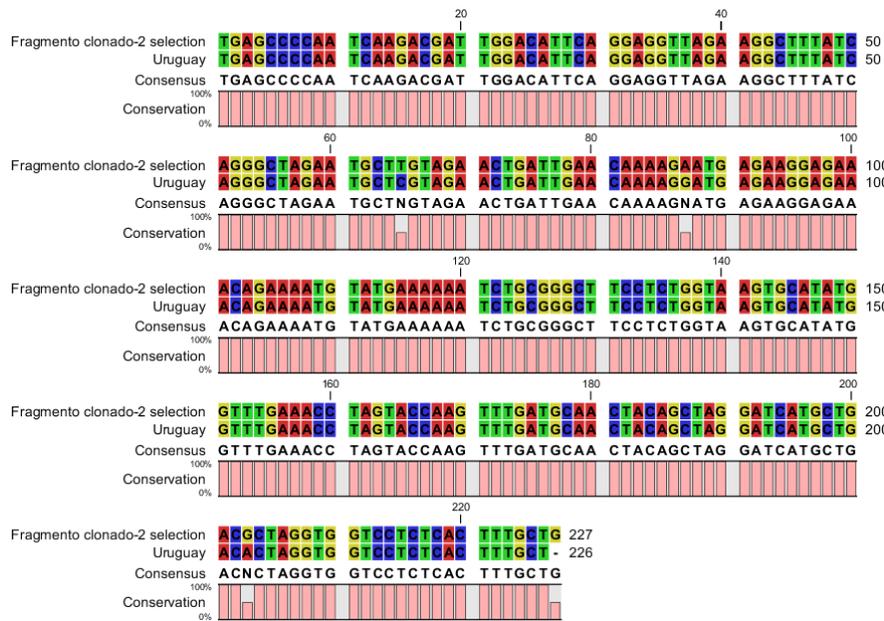


Figura 34: alineamiento de dos secuencias virales nacionales

La figura 34 muestra el alineamiento entre la secuencia complementaria al fragmento clonado y la secuencia de IYSV de Uruguay. Este alineamiento confirma que lo que se clonó fue el amplicón esperado.

### Clon E6 (muestra 093F)



Figura 35: fragmento ligado en el clon E6

La figura 35 muestra otro clon obtenido (E6 de la muestra 093F) para el cual se corrobora dentro del SMC se ha insertado una secuencia foránea. La secuencia clonada es la siguiente:

TGAGCCCAATCAAGACGATTGGACATTCAGGAGGTTAGAAGGCTTTATCAGAGCTAGAATGCTCGTGGAACTGATTGAACAA  
 AAGAATGAGAAGGAGAAAACAGAAAATGTATGAAAAATCTGCGGGCTTCTCTGGTTAGTGCATATGGTTTAAACCTAGTAC  
 CAAGTTTGATGCAACTACAGCTAGGATCATGCTGACACTAGGTGGTCTCTCACTTTGCTGA

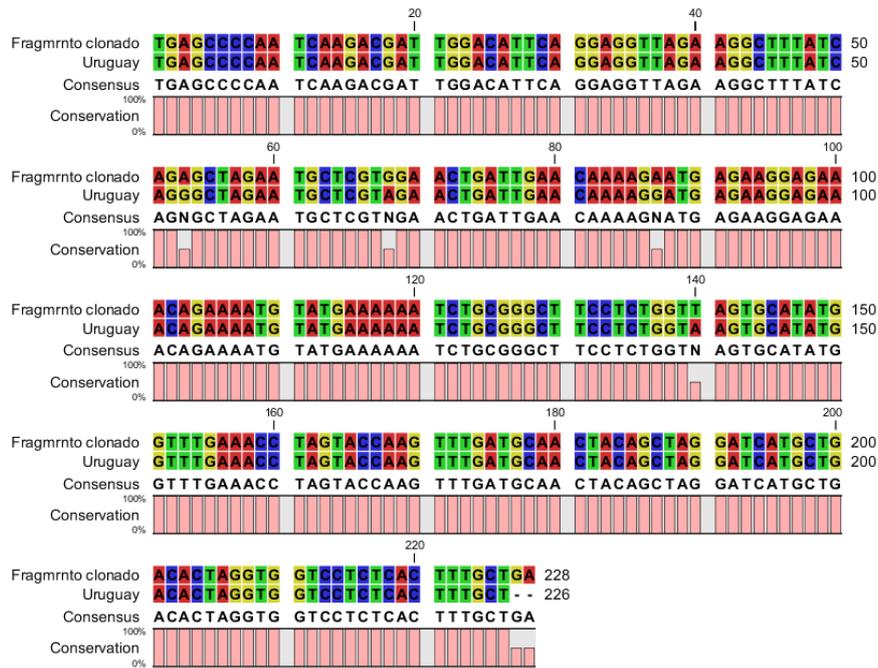


Figura 36: alineamiento de secuencias virales nacionales

El alineamiento de la secuencia clonada con la secuencia 1T3 confirmó que se trataba del amplicón esperado (Figura 36).

## Comparación de secuencias

El alineamiento múltiple de los clones positivos E6 (muestra 093F), A9 (muestra 091T) de 2009, más la secuencia 1T3 previamente secuenciada de 2007, no arrojó ninguna diferencia significativa entre ellas (Figura 37). Es más, se puede apreciar que las cepas 2009 no se diferencian de la cepa 2007, por tanto podemos afirmar que no estamos en presencia de nuevas cepas diferentes.

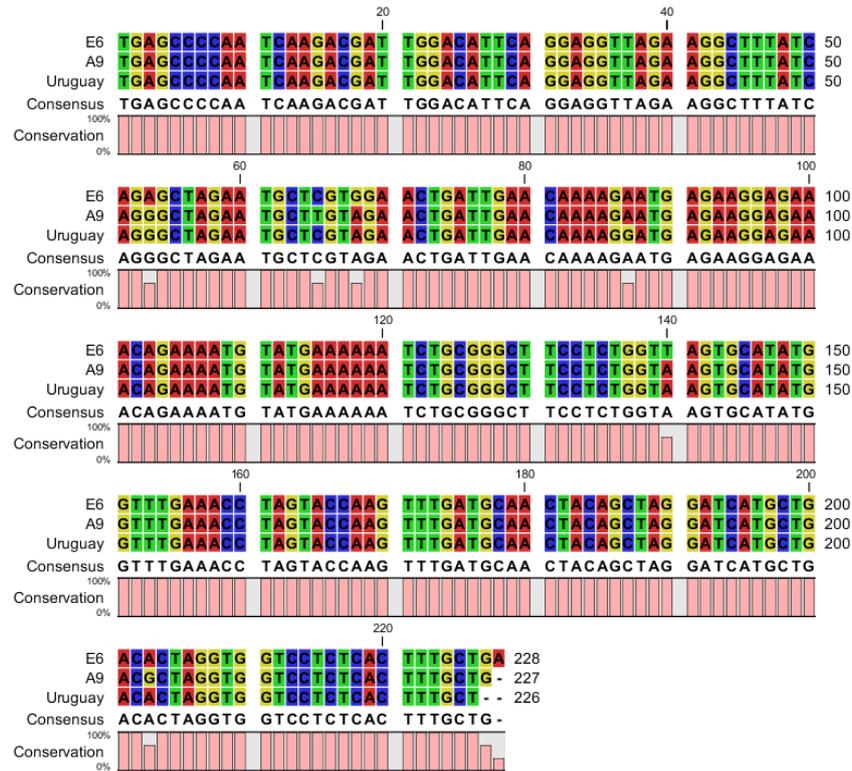


Figura 37: alineamiento múltiple de secuencias virales nacionales



anotaciones a la hora de tomar las secuencias identificadas como de IYSV para nuestro siguiente análisis.

En segundo lugar, la topología del árbol muestra que el género se encuentra dividido en tres grandes clústeres (marcados en verde, azul y rojo). Lo que encontramos es que todas las especies agrupadas en un mismo clúster presentan como transmisores primarios el mismo género de trip. Las especies coloreadas en verde son transmitidas por miembros del género *Thrips*, las especies en azul por miembros del género *Frankliniella* y en rojo por *Scirtothrips*. En algunos casos excepcionales, algunos virus presentan vectores de transmisión secundarios de otros géneros. En una revisión bibliográfica posterior a realizado nuestro análisis, encontramos que nuestros resultados son en esencia similares a lo observado por Inoue y Sakuraien el año 2007. Incluso en su trabajo, deducen que la agrupación de los clústeres pueden estar en cierta medida influenciada también por el tipo de plantas que infectan.(17)

Tabla 4: vectores de transmisión, serogrupos y clústeres para las especies de tospovirus usadas en el análisis. Las especies de vector y clasificación en serogrupos fueron obtenidas de Jones et al. 2005

<b>Especie</b>	<b>Serogrupo</b>	<b>Clúster</b>	<b>Vector</b>
<i>Groundnut bud necrosis virus</i>	IV	VERDE	<i>Thrips palmi</i>
<i>Peanut bud necrosis virus</i>	IV	VERDE	<i>Thrips palmi</i>
<i>Groundnut ringspot virus</i>	II	AZUL	<i>Frankliniella occidentalis</i>
<i>Melon yellow spot virus</i>	VII	VERDE	<i>Thrips palmi</i>
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	III	AZUL	<i>Frankliniella fusca</i>
<i>Tomato chlorotic spot virus</i>	II	AZUL	<i>Frankliniella intosa</i>
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	I	AZUL	<i>Frankliniella occidentalis</i>
<i>Watermelon bud necrosis virus</i>	IV	VERDE	<i>Thrips palmi</i>
<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i>	IX	AZUL	<i>Frankliniella zucchini</i>
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>	VIII	AZUL	<i>Frankliniella occidentalis</i>
<i>Capsicum chlorosis virus</i>	-	VERDE	<i>Thrips palmi</i>
<i>Iris yellow spot virus</i>	VI	VERDE	<i>Thrips tabaci</i>
<i>Physalis severe mottle virus</i>	VII	VERDE	<i>Thrips palmi</i>
<i>Peanut yellow spot virus</i>	-	ROJO	<i>Scirtothrips dorsalis</i>
<i>Tomato zonate spot virus</i>	-	AZUL	<i>Frankliniella occidentalis</i>

#### 4.5.2. Análisis de secuencias de IYSV

El objetivo de este análisis fue inferir el posible origen de la cepa viral presente en nuestro país, mediante comparación con secuencias de IYSV de otras partes del mundo, con particular énfasis en países de América. La construcción del árbol fue llevada a cabo según se detalla en Materiales y Métodos. Se utilizó una secuencia de TSWV como grupo externo.

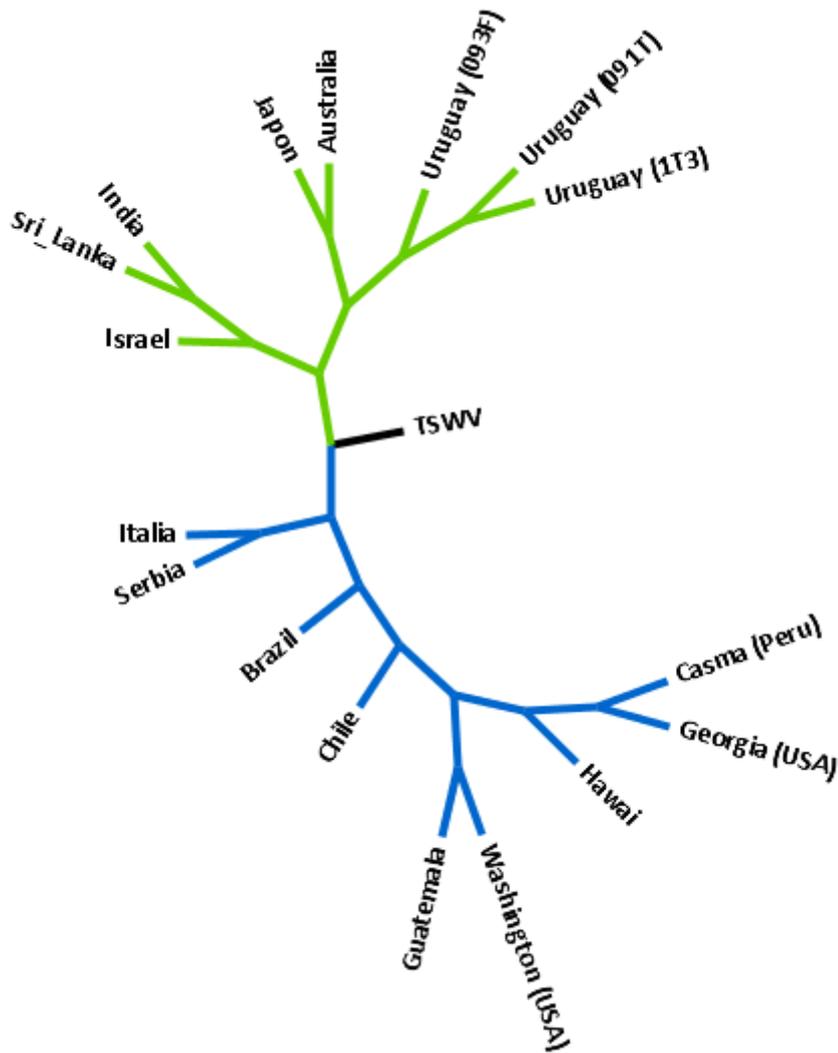


Figura 39: árbol filogenético de IYSV basado en secuencias del gen N

La figura 39 muestra una representación simplificada del árbol obtenido para el set de secuencias incluidas en el análisis. Para facilitar la interpretación de los resultados, se igualó el largo de todas las ramas para que tuvieran el mismo largo. El árbol original con valores de *bootstrap* puede verse en el Apéndice.

Las secuencias de IYSV se separaron en dos grandes clústeres (marcados en verde y azul).

El clúster azul agrupa a las secuencias provenientes de Europa y América. Es curioso observar que las secuencias aisladas en Perú y el Estado de Georgia (E.E.U.U.) son sumamente similares, cuando lo que se podría esperar es que la secuencia del Estado de Georgia fuera similar a la del Estado de Washington (E.E.U.U.). Esta observación ya había sido realizada por el grupo de trabajo de C. Nischwitz de la Universidad de Georgia (3), convirtiéndose así en el primer antecedente registrado de invasión transcontinental del virus.

El clúster verde, agrupa secuencias de cepas asiáticas, de Oceanía, y además sorpresivamente las secuencias uruguayas. De acuerdo a la bibliografía disponible, el virus no se transmite ni por semilla ni por bulbo, por lo que una hipótesis que podría explicar los resultados es que el virus habría llegado a nuestro país a través de trips o material vegetal infectado desde Asia. Quizás material vegetal o trips infectados pudieron haber ingresado en importaciones de ajo proveniente de China, ya que *Thrips tabaci* se alimenta de plantas de ajo, y ha sido reportado que en el estado adulto el insecto, una vez que ha adquirido el IYSV permanece infectado y es capaz de transmitir el virus a nuevas plantas. Aun así, carecemos de las evidencias necesarias para poder afirmar que esto sea lo que ha ocurrido.

## 5. Primeros ensayos con plantas nativas

Una vez confirmada la presencia del virus en los campos semilleros de cebolla en nuestro país, se realizaron análisis de detección del virus en malezas nativas que pudieran servir como reservorio autóctono del virus. Para ello se colectaron muestras de malezas en los alrededores de plantaciones de cebolla infectadas. Se evaluó particularmente la vegetación espontánea de *Nothoscordum spp.*, un género sudamericano de la familia *Amaryllidaceae*. La hipótesis de que IYSV afecte las especies locales de *Nothoscordum* se basa en que el género *Allium*, que tiene distribución en el hemisferio norte, también pertenece a *Amaryllidaceae*.

Los ensayos realizados fueron similares a los realizados en las muestras de cebolla, pero con algunas modificaciones. Por un lado se seleccionó un escapo de *Nothoscordum* con síntomas muy similares a los asociados a la infección por IYSV y se realizó a partir de él todo el proceso de extracción de ARN y detección. Por otro lado, se tomaron varios escapos con síntomas variados y realizamos un bulk, del cual obtuvimos 5 muestras de ARN.

Estos primeros ensayos arrojaron resultados positivos en la muestra seleccionada por su sintomatología y en una de las muestras del bulk. Estos resultados, más allá de ser preliminares, son de particular interés ya que no existe registro previo de infecciones por IYSV en esta planta.

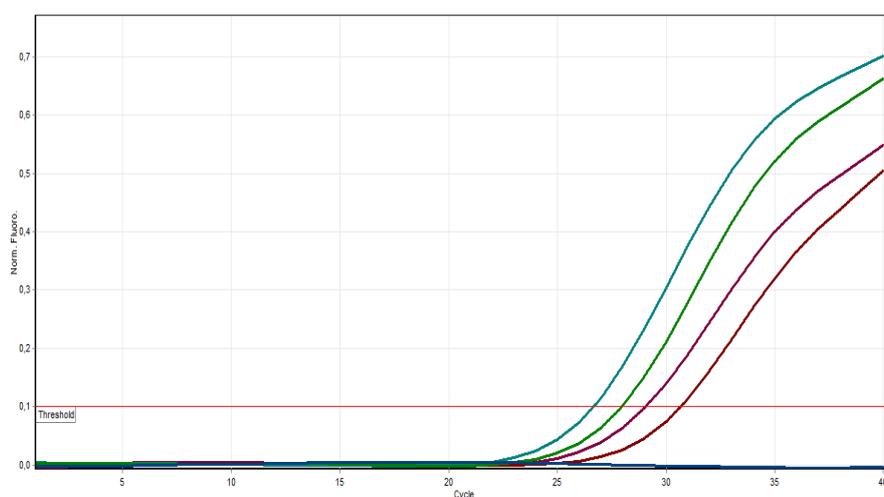


Figura 40: ensayos de detección en muestras de *Nothoscordum*. En azul y verde se observan dos controles positivos de IYSV. En violeta la muestra de *Nothoscordum* elegida por sintomatología, y en rojo la única muestra del bulk positiva. En azul se encuentra el blanco

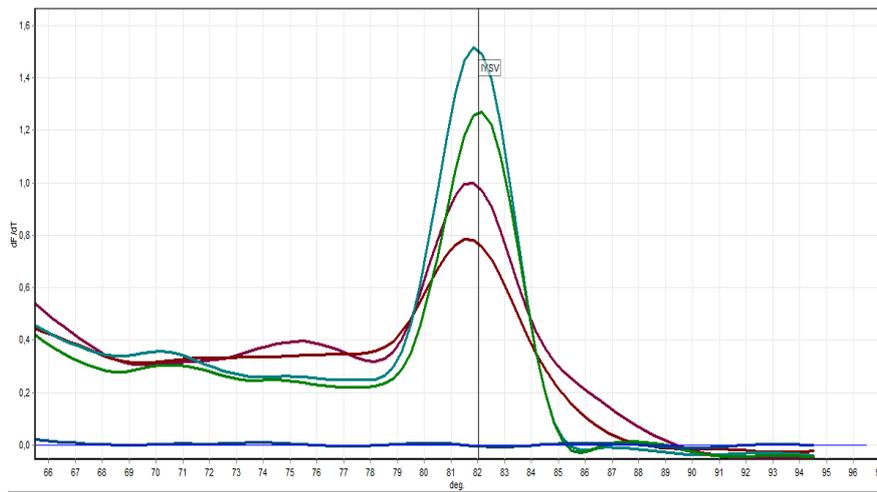


Figura 41: curva de *melting*. Como podemos observar el pico de *melting* para las muestras de *Nothoscordum* es similar al observado para las muestras de IYSV obtenidas de cebolla, lo que nos confirma que no se trata de falsos positivos

## 6. Conclusiones y Perspectivas

---

Este trabajo tuvo como objetivos confirmar la presencia del virus fitopatógeno *Iris Yellow Spot Virus* en campos semilleros de cebolla en Uruguay mediante técnicas moleculares, así como realizar los ajustes necesarios para poner a punto dichas técnicas. Además se realizó un análisis filogenético del género *Tospovirus* y otro con secuencias únicamente de IYSV para intentar determinar el posible origen de la cepa presente en nuestro país.

En lo que respecta a las técnicas moleculares, se logró optimizar la detección tanto por PCR como por Real-Time PCR, obteniendo resultados positivos para 10 muestras diferentes de plantas de cebolla de semilleros nacionales, pertenecientes a las cosechas 2007 y 2009. Entre los resultados más relevantes se identificaron diferentes síntomas asociados a la enfermedad, lo cual facilitará la identificación futura de la enfermedad en los campos. También se realizaron ensayos que permitieron demostrar que el método de detección por Real-Time PCR es superior al de detección por PCR convencional.

El análisis filogenético del género *Tospovirus* mostró que las secuencias anotadas con un mismo nombre se agruparon en clústeres definidos, y que por tanto son en efecto secuencias de la misma especie. Además, observamos que las especies se agruparon en tres clústeres que se corresponden al género del insecto vector.

La filogenia de secuencias de IYSV permitió inferir que el posible origen de la cepa uruguaya del virus está en Asia u Oceanía, aunque aún faltan evidencias para poder afirmar su procedencia certeramente.

Las perspectivas que surgen a partir de este trabajo son, 1) continuar con el análisis de muestras del año 2010 y 2011 para poder monitorear el grado de dispersión del virus en los semilleros tanto del departamento de Canelones como de Salto relacionando el rendimiento de plantas con diversos niveles de sintomatología, con los niveles de infección evaluados por real-time PCR; 2) empezar los análisis en otras plantas comerciales que puedan llegar a sufrir la infección (como el puerro); y 3) confirmar definitivamente a las especies de *Nothoscordum* como reservorios autóctonos del virus en nuestro país. Al momento de concluir la escritura de esta tesina, se comenzaron los primeros ensayos con muestras de cebolla y malezas recolectadas en diciembre de 2010.

## 7. Bibliografía

---

1. **Bridgen, A., F. Weber, J. K. Fazakerley, and R. M. Elliott.** 2001. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:664-669.
2. **Bucher, E., T. Sijen, P. de Haan, R. Goldbach, and M. Prins.** 2003. Negative-Strand Tospoviruses and Tenuiviruses Carry a Gene for a Suppressor of Gene Silencing at Analogous Genomic Positions. *J. Virol.* **77**:1329-1336.
3. **C. Nischwitz, H. R. P., S. W. Mullis, A. N. Sparks, D. R. Langston, A. S. Csinos, R. D. Gitaitis.** 2007. Phylogenetic Analysis of *Iris yellow spot virus* Isolates from Onion (*Allium cepa*) in Georgia (USA) and Peru. *Journal of Phytopathology* **155**:531-535.
4. **Colnago, P., R. Achigar, P. H. González, S. Peluffo, H. González Idiarte, M. J. Pianzola, and G. A. Galván.** 2010. First Report of Iris yellow spot virus on Onion in Uruguay. *Plant Disease* **94**:786-786.
5. **Córdoba.** 2005. Iris yellow spot virus (IYSV): nuevo virus en el cultivo de la cebolla en España.
6. **Cortes, I., I. C. Livieratos, A. Derks, D. Peters, and R. Kormelink.** 1998. Molecular and Serological Characterization of Iris Yellow Spot Virus, a New and Distinct Tospovirus Species. *Phytopathology* **88**:1276-1282.
7. **Chiemsombat, P., O. Gajanandana, N. Warin, R. Hongprayoon, A. Bhunchoth, and P. Pongsapich.** 2008. Biological and molecular characterization of tospoviruses in Thailand. *Archives of Virology* **153**:571-577.
8. **de avila, A. C., P. de Haan, R. Kormelink, R. d. O. Resende, R. W. Goldbach, and D. Peters.** 1993. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J Gen Virol* **74**:153-159.
9. **Duchovskiene, L.** 2006. The abundance and population dynamics of onion thrips (*Thrips tabaci* Lind.) in leek under field conditions. *Agronomy Research* **4**:163-166.
10. **Eguiarte, L. E., V. Souza, J. Nuñez-Farfán y B. Hernández-Baños.** 1997. El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **60**:169-181.
11. **Eisen, J. A.** 1998. Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. *Genome Res* **8**:163-167.
12. **Gent, D. H., L. J. du Toit, S. F. Fichtner, S. K. Mohan, H. R. Pappu, and H. F. Schwartz.** 2006. Iris yellow spot virus: An Emerging Threat to Onion Bulb and Seed Production. *Plant Disease* **90**:1468-1480.

13. **Gent, D. H., H. F. Schwartz, and R. Khosla.** 2004. Distribution and Incidence of Iris yellow spot virus in Colorado and Its Relation to Onion Plant Population and Yield. *Plant Disease* **88**:446-452.
14. **German, T. L., D. E. Ullman, and J. W. Moyer.** 1992. Tospoviruses: Diagnosis, Molecular Biology, Phylogeny, and Vector Relationships. *Annual Review of Phytopathology* **30**:315-348.
15. **Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams.** 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.
16. **Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith.** 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Nat Biotech* **10**:413-417.
17. **Inoue, T., and T. Sakurai.** 2007. The phylogeny of thrips (Thysanoptera: Thripidae) based on partial sequences of cytochrome oxidase I, 28S ribosomal DNA and elongation factor-1  $\alpha$ ; and the association with vector competence of tospoviruses. *Applied Entomology and Zoology* **42**:71-81.
18. **Jones, D.** 2005. Plant Viruses Transmitted by Thrips. *European Journal of Plant Pathology* **113**:119-157.
19. **Kikkert, M., C. Meurs, F. van de Wetering, S. Dorfmüller, D. Peters, R. Kormelink, and R. Goldbach.** 1998. Binding of Tomato Spotted Wilt Virus to a 94-kDa Thrips Protein. *Phytopathology* **88**:63-69.
20. **Kikkert, M., J. Van Lent, M. Storms, P. Bodegom, R. Kormelink, and R. Goldbach.** 1999. Tomato Spotted Wilt Virus Particle Morphogenesis in Plant Cells. *J. Virol.* **73**:2288-2297.
21. **Kikkert, M., F. van Poelwijk, M. Storms, W. Kassies, H. Bloksma, J. van Lent, R. Kormelink, and R. Goldbach.** 1997. A protoplast system for studying tomato spotted wilt virus infection. *J Gen Virol* **78**:1755-1763.
22. **Kikkert, M., A. Verschoor, R. Kormelink, P. Rottier, and R. Goldbach.** 2001. Tomato Spotted Wilt Virus Glycoproteins Exhibit Trafficking and Localization Signals That Are Functional in Mammalian Cells. *J. Virol.* **75**:1004-1012.
23. **Kritzman, A., M. Lampel, B. Raccah, and A. Gera.** 2001. Distribution and Transmission of Iris yellow spot virus. *Plant Disease* **85**:838-842.
24. **Mackay, I. M.** 2007. Real - Time PCR in Microbiology. From diagnosis to Chcharacterization. Caister Academy Press.
25. **Nagata, T., A. Inoue-Nagata, H. Smid, R. Goldbach, and D. Peters.** 1999. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt tospovirus. *J Gen Virol* **80**:507-515.

26. **Nagata, T., A. K. Inoue-Nagata, J. van Lent, R. Goldbach, and D. Peters.** 2002. Factors determining vector competence and specificity for transmission of Tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* **83**:663-671.
27. **Pappu.** 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead.
28. **Pappu, H. R., I. M. Rosales, and K. L. Druffel.** 2008. Serological and Molecular Assays for Rapid and Sensitive Detection of Iris yellow spot virus Infection of Bulb and Seed Onion Crops. *Plant Disease* **92**:588-594.
29. **Pozzer, L., I. C. Bezerra, R. Kormelink, M. Prins, D. Peters, R. d. O. Resende, and A. C. de Ávila.** 1999. Characterization of a Tospovirus Isolate of Iris Yellow Spot Virus Associated with a Disease in Onion Fields in Brazil. *Plant Disease* **83**:345-350.
30. **R A. Mumford, I. B., K R. Wood,.** 1996. The Biology of the Tospoviruses. *Annals of Applied Biology* **128**:159-183.
31. **Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, and H. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
32. **Satyanarayana, T., S. E. Mitchell, D. V. R. Reddy, S. Kresovich, R. Jarret, R. A. Naidu, S. Gowda, and J. W. Demski.** 1996. The Complete Nucleotide Sequence and Genome Organization of the M RNA Segment of Peanut Bud Necrosis Tospovirus and Comparison with other Tospoviruses. *J Gen Virol* **77**:2347-2352.
33. **Schmittgen, T. D., and K. J. Livak.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protocols* **3**:1101-1108.
34. **Sin, S.-H., B. C. McNulty, G. G. Kennedy, and J. W. Moyer.** 2005. Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:5168-5173.
35. **Soellick, T.-R., J. F. Uhrig, G. L. Bucher, J.-W. Kellmann, and P. H. Schreier.** 2000. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:2373-2378.
36. **Swofford, D. L., G.J. Olsen, P.J. Waddell, and D.M. Hillis.** 1996. *Molecular systematics.* Sinauer Associates, Sunderland, MA.
37. **Ullman, D. E., A. E. Whitfield, and T. L. German.** 2005. Thrips and tospoviruses come of age: Mapping determinants of insect transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:4931-4932.

38. **van Poelwijk, F., M. Prins, and R. Goldbach.** 1997. Completion of the impatiens necrotic spot virus genome sequence and genetic comparison of the L proteins within the family Bunyaviridae. *J Gen Virol* **78**:543-546.
39. **Whitfield, A. E., D. E. Ullman, and T. L. German.** 2004. Expression and Characterization of a Soluble Form of Tomato Spotted Wilt Virus Glycoprotein GN. *J. Virol.* **78**:13197-13206.
40. **Wijkamp, I., J. van Lent, R. Kormelink, R. Goldbach, and D. Peters.** 1993. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J Gen Virol* **74**:341-349.

## 8. Apéndice

### 8.1. Clones analizados

#### Clon A4

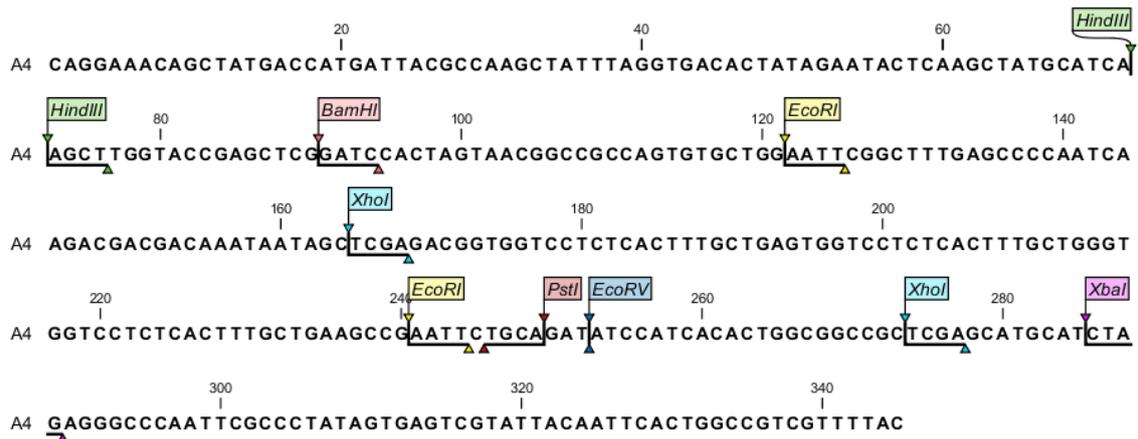


Figura 42: fragmento ligado en el clon A4

En esta imagen podemos corroborar que dentro del SMC se ha insertado una secuencia foránea.

Secuencia clonada:

TGAGCCCCAATCAAGACGACGACAAATAATAGCTCGAGACGGTGGTCTCTCACTTTGCTGAGTGGTCTCTCACTTTGCTGGGT  
GGTCTCTCACTTTGCT

El BLAST confirma que el fragmento que se ha clonado contiene secuencias pertenecientes a IYSV pero no el amplicón esperado

Lo que podemos observar es que el fragmento clonado está formado por la región 5' del amplicón esperado y por dos repeticiones de la región 3' del mismo separados por secuencias que no fue posible identificar.

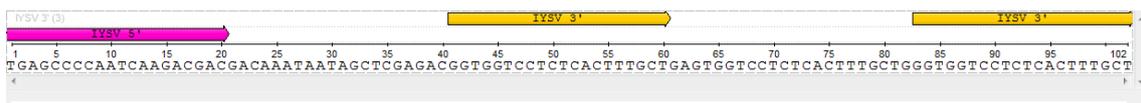


Figura 43: secuencia insertada en el vector. En amarillo y violeta observamos las secuencias de los primers forward y reverse respectivamente.

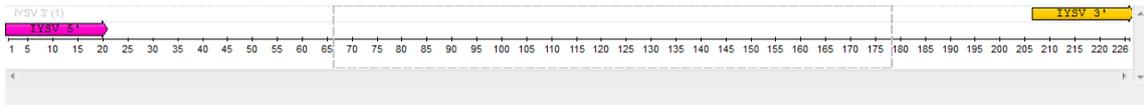


Figura 44: secuencia esperada

### Clon A5

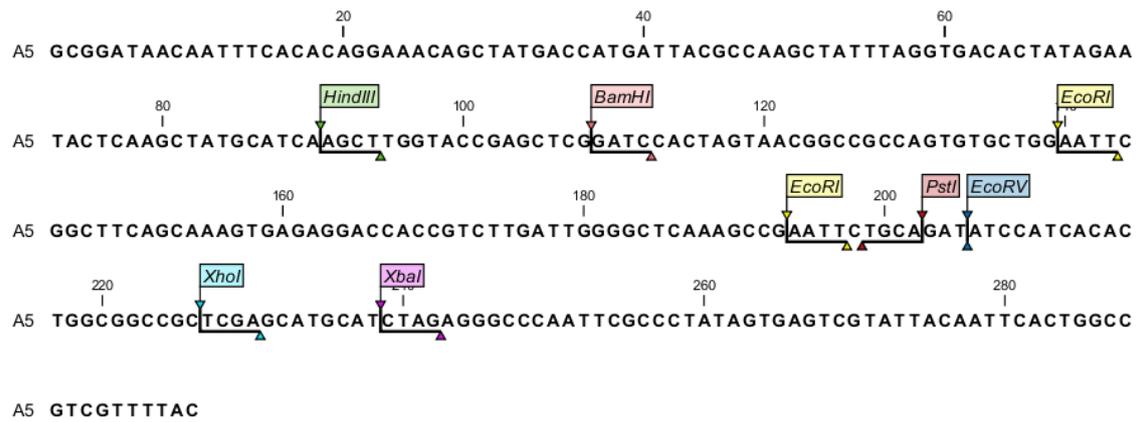


Figura 45: fragmento ligado en el clon A5

En esta imagen podemos corroborar que dentro del SMC se ha insertado una secuencia foránea.

Secuencia clonada:

CAGCAAAGTGAGAGGACCACCGTCTTGATTGGGGCTCAA

Los resultados del BLAST confirman que fue clonado un fragmento del amplicón compuesto por una fragmento de la región 5' y por otro fragmento de la región 3' faltando la región del medio. El segmento clonado se encuentra invertido.

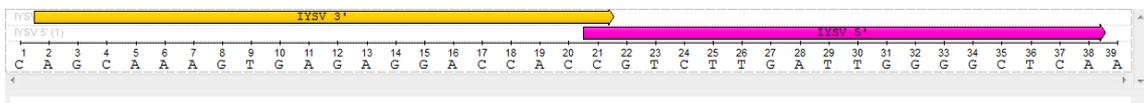


Figura 46: secuencia insertada en el vector. En amarillo y violeta observamos las secuencias de los primers forward y reverse respectivamente.

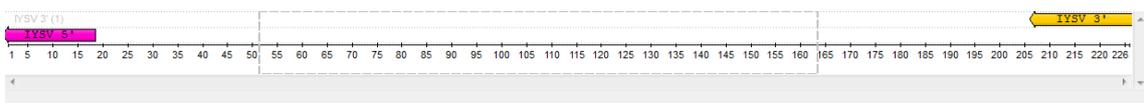


Figura 47: secuencia esperada

### Clon E3

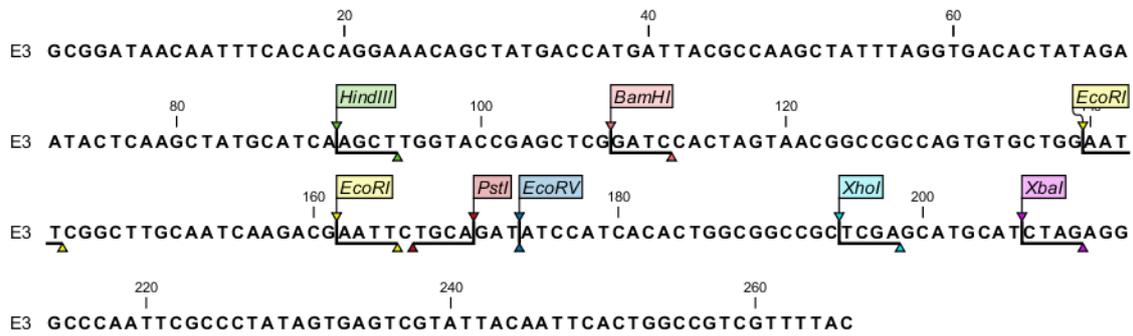


Figura 48: fragmento ligado en el clon E3

Esta imagen muestra que se ha introducido una secuencia de siete pares de bases en el SMC por tanto este clon fue descartado.

### Clon E8

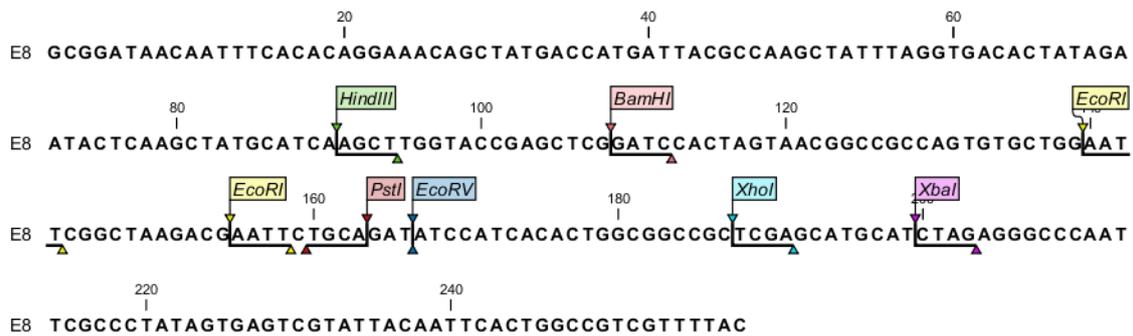
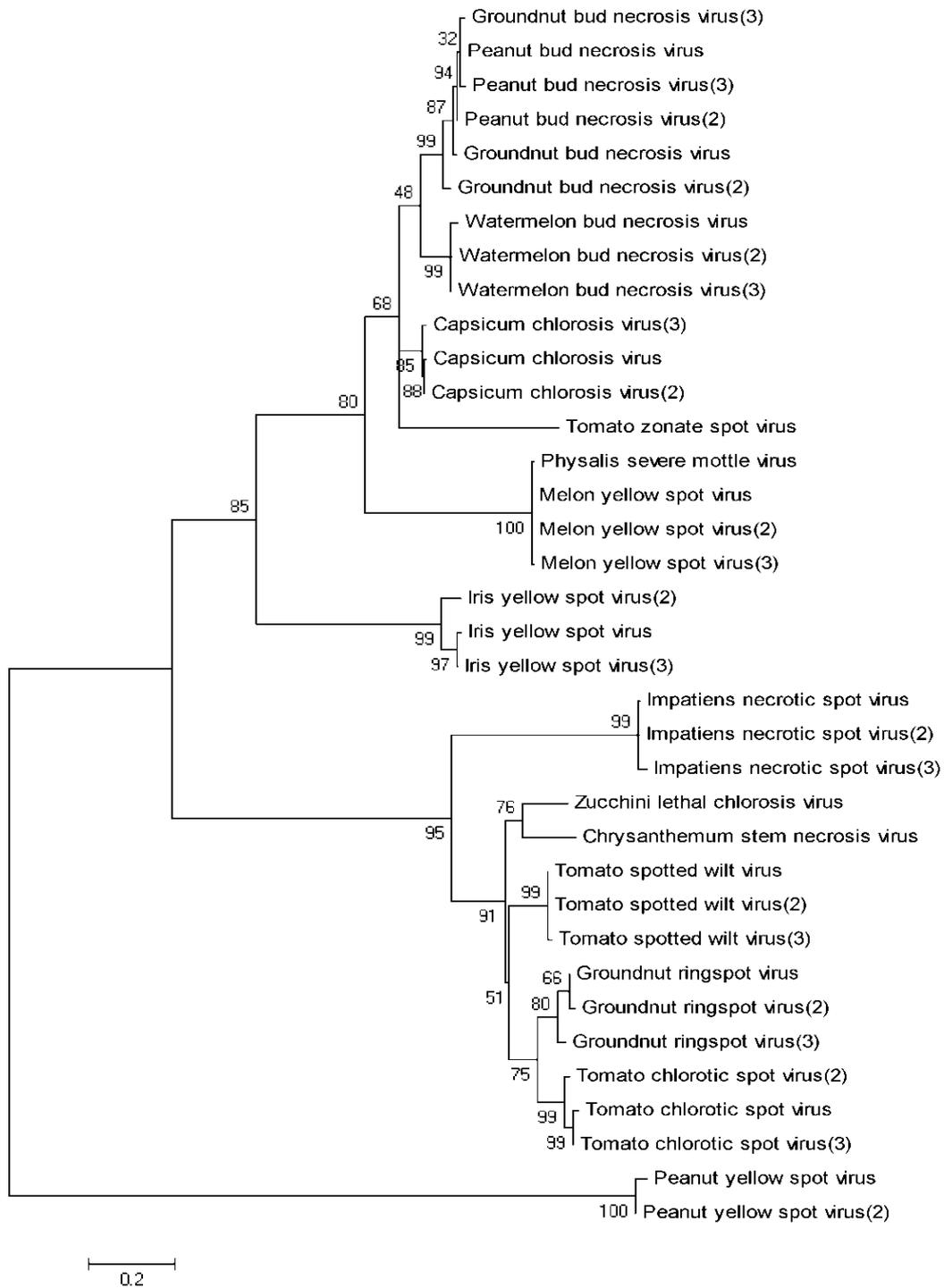


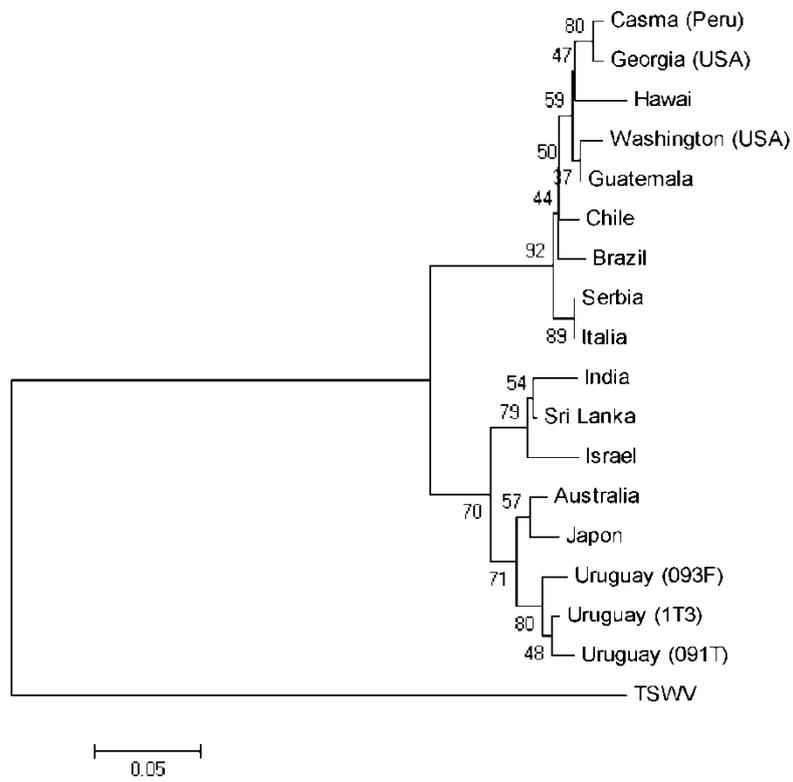
Figura 49: fragmento ligado en el clon E8

La imagen muestra que el SMC se ha reconstituido completamente, por tanto este clon se descartó.

## 8.2. Árbol filogenético del género *Tospovirus* con valores de *bootstrap*



### 8.3. Árbol filogenético de IYSV con valores de *bootstrap*



## 9. Agradecimientos

---

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutora, la Doctora María Julia Pianzola, que me dio y me sigue dando la oportunidad de trabajar en su grupo. Agradecerle por enseñarme a tener iniciativa, incentivar mi curiosidad, dejarme aprender de mis errores y por transmitirme confianza en todo momento.

A mi co director, el Doctor Guillermo Galván, también por la oportunidad de trabajar con él, por lo que me enseñó y por el apoyo que me brindó en este trabajo.

A mi compañera y maestra Analía Sanabria, por enseñarme y aconsejarme en todo momento, por tenerme paciencia, por su apoyo incondicional y por ser un ejemplo como investigador y persona.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, con los que compartí tantas horas estos años, por estar siempre dispuestos a dar una mano y hacer tan placentero ir a trabajar todos los días.

A Momi, que me acompañó como nadie, que se bancó todos mis mal humores, se alegró y se frustró conmigo a la par, por hacer suyo propio este proceso tan importante en mi vida.

A los crusheros, por estar siempre.

A mi familia, que desde chico me incentivaron a buscar mi vocación, por todo su apoyo y cariño

Gracias.