

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Análisis de variabilidad molecular de aislamientos
del virus de la tristeza de los cítricos (CTV).
Aplicación a la caracterización de aislamientos
virales de campo.**

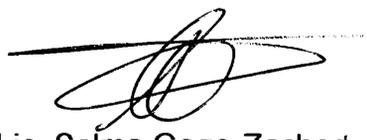
Selma Gago Zachert

Tesis Doctoral

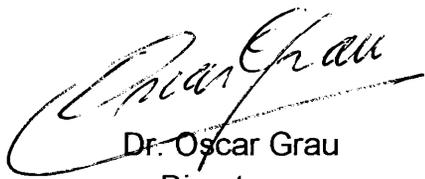
La Plata, 2001

El presente trabajo de Tesis, para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas, ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Oscar Grau y la codirección de la Dra. Liliana Semorile.

El presente trabajo de Tesis, para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas, ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Oscar Grau y la codirección de la Dra. Liliana Semorile.



Lic. Selma Gago-Zachert
Tesisista



Dr. Oscar Grau
Director



Dra. Liliana Semorile
Codirectora

A mis padres, Gladys y Álvaro

Las personas normales incluyen en su tesis una sola hoja con la dedicatoria pero como yo no soy demasiado normal voy a incorporar otra hoja para explayarme un poco más (espero que los jurados no me odien, pero en definitiva no necesitan corregir esta sección).

Este trabajo va dedicado especialmente a mis padres que me dieron todo lo que un hijo puede desear y sobre todo mucho amor. Nada de lo poco o mucho que pude lograr o realizar en mi vida hubiera sido posible sin su constante apoyo. A mi mamá, que siempre incentivó mi curiosidad y me enseñó que “no vale la pena hacer nada si uno no lo hace con amor”. A mi papá, que es una de las personas más “derechas” (en el buen sentido) que conozco y sigue “llevándose por delante a los molinos de viento” con la misma convicción de siempre. Al genio de mi abuelo, que lamentablemente no está, porque él me inculcó que las cosas debían hacerse de la mejor manera posible y que siempre se podían mejorar. A mi tío Fidel, un ejemplo de ética y trabajo.

A Alejandra Tortorici, que siempre creyó en mí y que nunca dudó que este momento iba a llegar.

En el plano académico a mi profesor de Genética, Dr. Claudio Juan Bidau. Por sus maravillosas clases, en las que siempre puso el corazón. Porque no se limitó a enseñarnos las leyes de Mendel, la teoría de la evolución y otras yerbas sino que también intentó formarnos como personas y sobre todo como científicos. Por todas las charlas de ética y conducta. Él es mi modelo de científico y espero no defraudarlo.

Por último, a todos mis alumnos y ex alumnos de la Universidad de Quilmes, ellos hacen que intente actualizarme y mejorar. Siempre tienen alguna pregunta que no sé y me obliga a volver a los libros. Por soportarme, por perdonarme cuando no respondo a sus expectativas y por compartir conmigo todos sus asombros frente a eso sorprendente y fascinante que es la Biología Molecular.

AGRADECIMIENTOS

Muchísimas personas colaboraron conmigo de distintas manera durante este período de mi vida, espero poder recordar a todas y si me olvido de alguien sepa disculparme porque fue totalmente involuntario.

A mi Director, Dr. Oscar Grau, por todas las facilidades materiales para el desarrollo del trabajo, por la discusión de ideas en el desarrollo y concreción de la presente tesis. Por no haberme estrangulado en alguna de nuestros "desencuentros" y porque si él no hubiera insistido miles de veces en que me apurara todavía estaría "perfeccionando" la tinción de los geles de SSCP o alguna otra cosa parecida.

A mi co-directora, Dra. Liliana Semorile, por su apoyo y más que nada por haber logrado que, a fuerza de miles y miles de litros (o kilómetros, no sé como definirlo) de tinta roja, esta tesis pasara de ser un bodrio a algo legible.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas oportunamente otorgadas.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme realizar el Doctorado en el marco de su Institución.

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) por permitirme desarrollar el presente trabajo en su ámbito. A todos sus integrantes.

A la Universidad Nacional de Quilmes por permitir mi desempeño como docente, algo que me agrada mucho y me brinda satisfacciones y oportunidades de crecer.

A los Dres. Pedro Moreno, José Guerri y Marcos Machado y a la Ing. Agrónoma Mercedes Peyrou por el dsRNA de los aislamientos de CTV de diverso origen geográfico utilizados en este estudio. A la Ing. Agrónoma Norma Costa por la corteza de plantas infectadas con aislamientos argentinos de CTV.

Al Dr. Robert Milne y al Lic. Gabriel Iglesias por permitirme utilizar la imagen del virión obtenida por inmunoelectromicroscopía.

Al Prof. Daniel Ghiringhelli, por creer en mí y permitirme trabajar y aprender en su cátedra. Por todas las charlas de Ciencia y de la vida.

A Oscar Deina, que me ayudó un montón cuando llegué al laboratorio y me enseñó, con mucha paciencia, los conceptos bioquímicos básicos que yo ignoraba.

A Silvia Moya, que me ayudó siempre con miles de cosas y papeles varios, por toda su disposición en resolver los problemas y facilitar, con su eficiencia, el desarrollo del trabajo.

A la Ing. Agrónoma Norma Costa, del INTA-Concordia. Por su seriedad en el trabajo, por todo el material y por toda su disposición en responder a mis dudas de “analfabeta” en cuanto a “los cítricos y sus circunstancias”. Por los momentos compartidos con ella y con María Inés Plata. Las dos aman su trabajo y lo hacen bien.

A Mercedes Peyrou, de la tierra de mi admirado Benedetti, por todos los buenos mates compartidos y por toda su disposición en responder mis preguntas.

A Roberto y Nancy, del servicio de secuenciación del INTA-Castelar. Por todo su trabajo y por los momentos compartidos cuando iba a colaborar en la puesta a punto del secuenciador.

A Martín Sarachu, a quién me pasé molestando (sólo porque las computadoras son tontas y no comprenden a los seres medio-humanos) durante todos estos años. Por compartir un montón de charlas interesantes (y normalmente un tanto cáusticas) de otros temas y estar siempre dispuesto a ayudar.

A Carlitos que es un maestro total y que siempre que se me ocurrió alguna cosa descabellada para el laboratorio se las ingenió para hacerla. A Rubencito y Caty.

A todos los “virus verdes psoróticos y afines” presentes y pasados. A María Laura García, Ricardo Dewey, María Eugenia Sánchez de la Torre, Gonzalo Legarreta, Leandro Jones, Omar Riva, Gabriela Naum, César Sommer, Cecilia Zaneck y Virginia. Ricardo me enseñó, como sufrido hinchado del Lobo, una frase que me ayudó a sobrevivir a los fracasos: “la adversidad no nos vence, nos retempla”.

A los “virus verdes tristes”, ellos me soportaron miles de horas en el laboratorio. A Jorge Trelles, Germán Robledo y Verónica El Mujtar. Germán me tuvo que sufrir como “pseudo-jefa” por lo cual merece al menos una condecoración. Vero siempre tuvo las cosas dispuestas, me hizo miles de *minipreps* y reacciones de secuencia. Como yo suelo tener la cabeza en cualquier lado, llevó un registro ordenado de mis cosas, con lo cual cada vez que yo no recordaba algo ella esgrimía la carpeta y me decía la fecha, el día, los microgramos y los pelos y señales del objeto en cuestión. Gracias a ambos por todo su apoyo, por los miles de pequeños grandes gestos que siempre tuvieron para conmigo y por la convivencia en el laboratorio, que, al menos para mí, fue sumamente placentera. Gracias por aguantar mis días malos (usualmente la mitad más uno) y ayudarme siempre en todo lo que necesité.

A los “junines” y “baculos”. A los de la “vieja guardia”, Daniel Ghiringhelli, Mario Lozano, César Albariño y Diego Posik, me la pasé molestandolos con preguntas, gracias por su paciencia y aprecio. Con los “contemporáneos”, Alejandra Tortorici, Alejandra Manzán y Alejandro Parola, compartí muchas

horas de trabajo y esfuerzo. Los más “nuevitos”, Eloísa Arana (en realidad no sé si va en contemporáneos o nuevitos, pero le concedo la eterna juventud), Ramiro Mendez y Christina (me es imposible escribir bien su apellido), me vieron en plena etapa de escritura, cuando estaba más alterada que de costumbre y tuvieron que soportar mis estados “catatónicos” más de una vez. A todos ellos gracias por todos los momentos compartidos.

A los rizobios y afines (perdón por englobarlos así, genéricamente), Tony, Daniela, Aníbal, Florencia, Picho, Mariano, Pity, Federico, Julieta, Tirso, Mario, Cecilia, Juan Carlos y Caty. Gracias a todos por su aguante. A Daniel (el Negro), Mónica, Laura y Verónica, a quienes conozco más que a los demás.

A los chicos de Quilmes, Mariano, Marcos, Marcela, Paola y Sandra. Por todo su afecto y ayuda. Especialmente a Mariano, Marcos y Sandra, con quienes comparto (o compartí) la docencia, por toda la seriedad y dedicación que ponen para que las clases salgan lo mejor posible y por toda su paciencia para conmigo.

A Ale con quien compartí la mayor parte de mi estadía en La Plata. Por las innumerables charlas (y discusiones) de trabajo, que me permitieron aprender muchísimo. Por compartir conmigo a su familia y hacerme sentir parte de ella. Por todo su afecto y cariño y porque su amor por el trabajo fue un ejemplo para mí, que soy bastante más “vaga” que ella.

A mis amigas de siempre, Cristina, Lucrecia, la Japo y Silvina, que supieron entender mis locuras. Por todo su apoyo y fuerza. Especialmente a Silvina, que a pesar de ser bastante impaciente, me soportó hasta el infinito.

A Vero, algo así como un “alma gemela” en lo referido al trabajo y a unas cuantas cosas más. Por su apoyo, afecto y gentileza; por sus retos (a los que a veces hago caso) y “por tener siempre la razón”, aunque yo todavía no me acostumbre a ello.

A Eloísa y Vero López, que me ayudaron en la resolución de dos problemas importantes de esta tesis. A Elo, harta de que la molestara con mis dudas existenciales acerca de la aceptación o rechazo de hipótesis cuando se trabaja con la tabla de chi-cuadrado, se le ocurrió la idea de recurrir a un experto en estadística. Además, lo localizó y me acompañó en la consulta, que sirvió para que aclarara mis ideas (en la medida que ello es posible). Vero encontró que los árboles filogenéticos no enraizados, imposibles de manejar con el programa CorelDraw 7, son sumamente “dóciles” en el Corel 8 o 9. Gracias a ambas.

A los miembros de la Iglesia Cristiana Evangélica de Posadas. Por todo su apoyo y afecto.

Y una mención especial a quien me acompañó en todos los experimentos hechos en el edificio viejo, y me escoltó fielmente en cada una de mis miles de idas y vueltas entre ambos edificios: Valentina.

INDICE

	PÁGINA
RESUMEN	1
PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN	3
ABREVIATURAS	4
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	6
OBJETIVOS	31
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	33
CAPÍTULO III: ANÁLISIS DE VARIABILIDAD INTER E INTRAPOBLACIONAL DEL GEN P27 EN AISLAMIENTOS DE CTV	
SECCIÓN A: INTRODUCCIÓN	59
SECCIÓN B: MÉTODOS	64
SECCIÓN C: RESULTADOS (AISL. DE DISTINTO ORIGEN)	89
SECCIÓN D: RESULTADOS (AISL. ARGENTINOS)	119
SECCIÓN E: DISCUSIÓN	149
CAPÍTULO IV: SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DE cDNA DEL AISLAMIENTO C268-2	
SECCIÓN A: INTRODUCCIÓN	154
SECCIÓN B: MÉTODOS	157
SECCIÓN C: RESULTADOS	162
SECCIÓN D: DISCUSIÓN	173
CAPÍTULO V: IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL DE CLONES DEL AISLAMIENTO C268-2 Y APLICACIÓN A LA CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CTV	
SECCIÓN A: INTRODUCCIÓN	175
SECCIÓN B: MÉTODOS	178
SECCIÓN C: RESULTADOS	187
SECCIÓN D: DISCUSIÓN	205
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES	207
APÉNDICE	209
BIBLIOGRAFÍA	242

RESUMEN

La tristeza de los cítricos es una de las enfermedades más importantes de estos cultivos debido a su gran impacto económico. El agente causal de la misma es el virus de la tristeza de los cítricos (*citrus tristeza virus*, CTV), un integrante del género *Closterovirus*. Este virus se encuentra asociado al floema de la planta, afecta a integrantes de la familia *Rutaceae* y se transmite por la acción de áfidos vectores y por injerto (Bar-Joseph and Lee, 1989). El genoma viral está constituido por una molécula de RNA de cadena simple (ssRNA) y de polaridad positiva (+). Las partículas virales tienen una morfología filamentosa, muy flexuosa y presentan, como característica distintiva del género, dos proteínas de cubierta dispuestas en forma de cola de víbora de cascabel (*rattlesnake*) (Agranovsky *et al.*, 1995; Febres *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1999). Los genes que codifican para ambas proteínas se encontraron en todos los *Closterovirus* estudiados, hecho que sugiere que ambos genes homólogos se originaron por duplicación en un antecesor común de la familia (Dolja *et al.*, 1991).

En Argentina, la primera epidemia de la enfermedad se inició en 1930 y produjo, a lo largo de quince años, la muerte de más de diez millones de árboles. Actualmente la enfermedad es endémica y en la región está presente el vector más eficiente del virus, el áfido *Toxoptera citricida*. Para evitar la muerte de las plantas, el naranjo dulce se injerta sobre pies tolerantes (trifolio, mandarino cleopatra y limón rugoso, entre otros). Sin embargo, la situación es compleja en el NOA, donde las plantaciones jóvenes de pomelos rojos y rosados se ven afectadas por tristeza.

Una de las características de la enfermedad causada por CTV es la amplia variedad de síntomas generados por los distintos aislamientos en las plantas infectadas. La expresión e intensidad de los mismos depende del ambiente, de la especie hospedante y de la severidad del aislamiento viral. Los aislamientos pueden producir decaimiento en plantas constituidas por copas injertadas sobre naranjo amargo (*decline*), acanaladuras en el tronco (*stem pitting*) y "amarillamiento" de plántines obtenidos a partir de semilla (*seedling yellows*) (Garnsey *et al.*, 1987). La observación de los síntomas en plantas indicadoras es una de las formas de caracterizar a los aislamientos de CTV.

Existen distintos métodos para el control de CTV y las medidas a tomar dependen de la incidencia del virus en un momento dado, de los vectores presentes, de los aislamientos virales y de las variedades de cítricos cultivadas en cada zona. Los diversos controles sólo son efectivos si se cuenta con métodos adecuados para la caracterización rápida de aislamientos, que permitan identificar plantas infectadas con variantes virulentas para producir su rápida erradicación.

En el presente trabajo de tesis se estudió la variabilidad de los aislamientos de CTV desde distintas perspectivas. Por un lado, se realizó el análisis exhaustivo de

la variabilidad del gen p27, que codifica para la proteína minoritaria de cubierta viral, que se dispone en uno de los extremos del virión. Este estudio se realizó en aislamientos originarios de distintas regiones citrícolas del mundo y en un grupo seleccionado de aislamientos argentinos. Los resultados obtenidos indican que existe una correlación entre las distintas variantes de secuencia encontradas y la patogenicidad de los aislamientos. Por otro lado, se encontró que, al menos al considerar la secuencia de este gen, los aislamientos sudamericanos forman un grupo diferente a los aislamientos de otras regiones geográficas.

La secuenciación de la totalidad de los clones de una biblioteca de cDNA de un aislamiento argentino de CTV, C268-2, permitió establecer que en este aislamiento de campo coexisten variantes con diferentes secuencias nucleotídicas. Por otro lado, pese a que la mayor parte de los cambios son conservativos, también se estarían expresando variantes proteicas para distintos genes virales, especialmente para p13, (de función desconocida) y p23, (con un probable rol regulatorio). Las distintas secuencias presentes en C268-2 presentan valores elevados de identidad nucleotídica con diferentes aislamientos secuenciados presentes en banco de datos.

Los resultados obtenidos en ensayos de *Southern blot* permitieron identificar regiones de los clones de la biblioteca de C268-2 que mostraron un comportamiento característico frente a sondas derivadas de dsRNA de diferentes aislamientos virales. Las sondas sintetizadas a partir de las secuencias de estos fragmentos resultaron útiles para discriminar entre aislamientos débiles, moderados y severos, permitiendo caracterizar de manera rápida a los distintos aislamientos de CTV analizados.

PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN

La información contenida en el presente trabajo de tesis se dividió en los capítulos que se describen a continuación con el fin de facilitar la presentación y lectura de los datos.

En el primer capítulo se describe la enfermedad producida por el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y su agente causal. También se especifican las estrategias utilizadas en el control de la enfermedad y en la caracterización de los distintos aislamientos virales.

En el segundo capítulo se detallan los materiales empleados y se describen las metodologías utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

En el tercer capítulo se expone el trabajo realizado para analizar la variabilidad inter e intrapoblacional del gen p27 de CTV en aislamientos argentinos y de diferente origen geográfico. Se describen las metodologías utilizadas para la identificación rápida y segura de variantes poblacionales presentes en los aislamientos (SSCP). También se exponen los resultados obtenidos a partir de la secuenciación de los haplotipos mayoritarios y minoritarios presentes en los aislamientos virales estudiados y las relaciones existentes entre ellos, que se establecieron por medio del análisis filogenético de los datos.

En el cuarto capítulo se reseñan los datos obtenidos al realizar la secuenciación de los clones de una biblioteca de cDNA de un aislamiento argentino de campo de CTV, C268-2. Se detallan los procedimientos empleados y los resultados obtenidos cuando se compararon las secuencias de los clones con las de otros aislamientos de CTV y entre sí.

En el quinto capítulo se realiza el análisis de los patrones de hibridación de los clones de la biblioteca del aislamiento C268-2 con sondas derivadas de distintos aislamientos virales. Asimismo, se especifican los resultados obtenidos en la caracterización de distintos aislamientos virales cuando se hibridaron con fragmentos con patrones de hibridación definidos.

En el sexto capítulo se establecen las conclusiones generales del presente trabajo.

Finalmente, se incluye un Apéndice con las secuencias de *primers*, tablas y alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas y un listado de las referencias bibliográficas de los trabajos citados.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AcHO	ácido acético glacial
AMV	<i>avian myeloblastosis virus</i>
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BSA	seroalbúmina bovina
Bisacrilamida	N,N'-metilenbisacrilamida
cDNA	<i>copy DNA</i>
cpm	cuentas por minuto
CTAB	<i>hexadecyltrimethyl-ammonium bromide</i>
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifostato
ddNTPs	2',3'-deoxirribonucleósidos 5'-trifosfato
DNA	ácido 2' desoxirribonucleico
DNA pol	DNA polimerasa dependiente de DNA
DNasa	deoxirribonucleasa
dNTPs	2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato
DO	densidad óptica
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
DTT	<i>dithiothreitol</i>
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
g	gramo(s)
h	hora(s)
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
KAcO	acetato de potasio
kDa	kilodaltons
LB	Luria Bertoni (medio de cultivo)
M	molar
μCi	microcurie
μF	microfaradios
μg	microgramo(s)
mg	miligramo(s)
min	minuto(s)
μl	microlitro(s)
ml	mililitro(s)
μM	micromolar
mM	milimolar
mmol	milimol
mRNA	RNA mensajero
MPM	marcador de peso molecular
N	normal
N x g	número multiplicado por la aceleración de la gravedad
NaAcO	acetato de sodio

Nal	ioduro de sodio
ng	nanogramo(s)
nm	nanómetro(s)
nt	nucleótido(s)
pdN6	<i>primers</i> hexaméricos de secuencia al azar
pb	pares de bases
PEG	polientilenglicol
PIPES	ácido piperazin-N,N'-bis[2-etanosulfónico]
PM	peso molecular
% p/v	porcentaje peso en volumen
% v/v	porcentaje volumen en volumen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PVP	polivinilpirrolidona
rATP	2'-riboadenosina 5'-trifosfato
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA pol	RNA polimerasa dependiente de DNA
RNasa	ribonucleasa
RNAasin®	<i>ribonuclease inhibitor</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
rNTPs	2'-ribonucleósidos 5'-trifosfato
RT	<i>reverse transcription</i>
s	segundo(s)
SSCP	<i>single-strand conformational polymorphism</i>
SDS	<i>sodium dodecil sulfate</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>
SSC	<i>salt sodium citrate</i>
STE	<i>sodium chloride-Tris-EDTA</i>
t	tonelada(s)
TAE	Tris-acetato-EDTA
<i>Taq</i> pol	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlen-diamina
tRNA	RNA de transferencia
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	ultravioleta
V	Volts
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1) CARACTERÍSTICAS DE LOS CÍTRICOS

Todas las variedades de cítricos de importancia económica se originaron a partir de especies nativas del sudeste asiático. Desde allí se expandieron por la acción del hombre y actualmente crecen en todas las regiones que les brinden sus requerimientos: suficiente cantidad de agua (por lluvia o por irrigación) y clima templado o cálido.

Inicialmente, los árboles se propagaban a partir de semillas, pero este proceso alargaba el tiempo necesario para alcanzar la productividad. Para acortar este tiempo actualmente se realiza el injerto de yemas de la variedad seleccionada sobre un pie determinado, el cual se produce a partir de semilla. En la elección del portainjerto se consideran: la compatibilidad con la yema, la tolerancia a las condiciones ambientales (tipo de suelo, humedad, temperatura, etc.) y la resistencia o tolerancia a enfermedades. Tanto los portainjertos como las yemas utilizadas comercialmente pertenecen al género *Citrus*; la excepción la constituyen los kinotos (*Fortunella* ssp.) y el trifolio (*Poncirus trifoliata*) que se usan exclusivamente como pie (*Compendium of citrus diseases*, 1988).

La producción mundial de cítricos en el período 1999/2000 alcanzó unos 70 millones de toneladas, mostrando un incremento en la producción global de alrededor de un 9% con respecto al período anterior. Los países con mayor producción cítrica son: Brasil, Estados Unidos, China, España, México, Italia, Egipto, Argentina, Turquía y Japón, con una producción anual de 19,6; 14,7; 8,6; 5,6; 4,5; 3; 2,5; 2,3; 2,1 y 1,7 millones de toneladas, respectivamente (FAS online, Horticultural & Tropical Products Division, 2000; informe del Ing. Agrónomo Jorge Amigo, FEDERCITRUS, 2000). Un porcentaje pequeño de esta producción se dedica al consumo como fruta fresca y la restante se procesa para obtener jugos concentrados, aceites esenciales, cáscara deshidratada y *pellets*.

En Argentina, los cítricos ocupan el segundo lugar en la producción de fruta fresca (en primer lugar se encuentran las uvas) y se cultivan tanto en las provincias del noreste (Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes y Misiones) como en las del noroeste (Jujuy, Salta y Tucumán). En la primera región existen plantaciones de naranjas y mandarinas mientras que en la segunda la producción se basa en distintas variedades de pomelos y limones. Estos últimos constituyen el cultivo más importante, con una producción de 1.050.000 t en el período mencionado, que representa el 28% de la producción mundial. Tucumán es la provincia que produce la mayor parte de los limones del país. En segundo lugar se cultivan las naranjas, con 663.000 t (las provincias de Entre Ríos y Corrientes son las principales productoras), de las

cuales se exportaron 73.000 t. La producción de mandarinas alcanzó las 340.000 t, también provenientes principalmente de Entre Ríos y Corrientes, mientras que la de pomelos llegó a 165.000 ton, siendo Salta la principal contribuyente (FAS online, Horticultural & Tropical Products Division). Los cítricos producidos en nuestro país se derivan a la industria, al consumo interno y a la exportación en fresco. La mayor parte de los limones (721.524 ton) es destinado a la industria mientras que 457.292 t de naranjas, 276.767 t de mandarinas y 112.452 t de pomelos se consumen en el mercado interno. Por otro lado, las exportaciones de limones alcanzan las 197.000 t (informe FEDERCITRUS, 2000). Los principales compradores de cítricos frescos argentinos son: Holanda (7.378.900 cajas), Rusia (2.947.600 cajas) y Francia (2.015.300 cajas). Los jugos concentrados y los aceites esenciales se exportan a Alemania, Canadá, Estados Unidos, Holanda y Francia entre otros, mientras que los principales compradores de pulpas congeladas son Japón, EE.UU y Dinamarca. Las cáscaras deshidratadas se exportan a Italia y Holanda es el principal comprador de *pellets*. En cuanto al valor de la producción, en el año 1999, se comercializaron cítricos en el mercado interno por un valor de 226,1 millones de dólares, mientras que las exportaciones ascendieron a 237 millones de dólares (informe FEDERCITRUS, 2000).

I.2) ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS

El término "enfermedad" comprende a cualquier desviación con respecto a la apariencia normal, a la forma o al funcionamiento de cualquier órgano o tejido de la planta. Desde este punto de vista las enfermedades pueden clasificarse como infecciosas (bióticas) o no-infecciosas (abióticas). Las enfermedades de origen biótico son aquellas causadas por una serie de agentes tales como bacterias, hongos, nemátodos, virus y viroides. Por otro lado, las condiciones ambientales y las derivadas de las prácticas de cultivo, así como los defectos genéticos y de nutrición se incluyen dentro de las enfermedades abióticas (*Compendium of citrus diseases*, 1988).

I.3) TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

La tristeza de los cítricos es una de las enfermedades más importantes de estos cultivos y es causada por un virus, que tomó su nombre del de la enfermedad que causa, virus de la tristeza de los cítricos (*citrus tristeza virus*, CTV) y cuyo origen se encuentra probablemente en Asia. Mientras los cítricos se multiplicaron a partir de semilla, la enfermedad no se dispersó ya que el virus no se transmite de este modo. Hasta el siglo XIX no era frecuente el uso de portainjertos, pero como consecuencia de una epidemia de la enfermedad llamada "podredumbre de las raicillas", causada por el hongo *Phytophthora* sp., el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) se convirtió en el pie más utilizado por su resistencia a *Phytophthora*. Este portainjerto posee, además, excelentes cualidades agronómicas y es tolerante a una amplia gama de patógenos. Sin

embargo, cuando las plantas constituidas por distintas variedades de copa injertadas sobre este pie se introdujeron en Sudáfrica y Australia se observó que decaían rápidamente en rendimiento y finalmente morían, mientras que las mismas copas injertadas sobre otros pies, como limón rugoso o *P. trifoliata*, no eran afectadas por este decaimiento. En un primer momento se atribuyó esta sintomatología a una "incompatibilidad" entre el pie y la copa.

En Argentina, la primera epidemia de este tipo se inició en 1930 y a lo largo de quince años murieron más de diez millones de árboles. En 1937 se manifestó en Brasil un brote de la misma enfermedad, cuyo agente era desconocido, produciendo el decaimiento y muerte de árboles injertados sobre naranjo agrio. La enfermedad se denominó "tristeza" debido al aspecto que presentaban las plantaciones afectadas (fig. I.1a y b). A lo largo de la década del cuarenta la tristeza causó la destrucción total de la industria citrícola de Argentina, Brasil y Uruguay, ya que la totalidad de las plantas estaban injertadas sobre naranjo agrio.

El análisis, por microscopía electrónica, de savia de distintas especies de cítricos infectadas permitió observar la presencia de partículas con forma de hilo, de unos 10 a 12 nm x 2000 nm, que no se encontraron en preparados de árboles sanos (Kitajima *et al.*, 1965; Bar-Joseph *et al.*, 1970a) (fig. I.2). En un principio, la identificación de estas partículas se utilizó como método para diagnosticar la enfermedad (Bar-Joseph *et al.*, 1970b). La primera evidencia de la asociación entre partículas flexuosas y enfermedad se obtuvo al lograr transmitir la misma mecánicamente, de un cítrico a otro. También se comprobó que las partículas purificadas a partir de tejido de cítricos enfermos resultaban infectivas, lo cual permitió confirmar que las varillas flexuosas observadas eran el agente causal de la enfermedad (Garnsey *et al.*, 1977).

La dispersión de la enfermedad se incrementó por la reintroducción del vector más eficiente del virus, el áfido *Toxoptera citricida*. La migración del áfido hacia el norte de Sudamérica expandió la enfermedad y dos años después de su llegada a Venezuela se produjo el primer brote severo de tristeza en ese país (Roistacher *and* Moreno, 1991). En los Estados Unidos la enfermedad se introdujo también a principios del siglo XX, pero no así el vector más importante, ya que *T. citricida* se estableció en el sur de Florida recién en 1995 (Halbert *and* Brown, 1996). Si bien en Estados Unidos el principal vector es otro áfido perteneciente al género *Aphis* (*A. gossypii*), muestreos extensivos realizados en años posteriores a la introducción de *T. citricida* al país demostraron una distribución más amplia del virus así como la detección del mismo en plantas anteriormente no infectadas (Brown *and* Davinson, 1997). En Israel la tristeza se difundió a partir de 1970 y en 1985 se encontró un aislamiento que ocasionó numerosas muertes de árboles, obligando a establecer programas drásticos de erradicación (Roistacher *and* Moreno,

1991). La tristeza también es endémica en España desde 1957 y ha causado la muerte de unos veinte millones de plantas (Cambra y col., 1995). El virus se encuentra en prácticamente todas las regiones citrícolas del mundo y su impacto es mayor en aquellas zonas donde se emplea como pie el naranjo agrio y donde está presente el vector más eficiente, *T. citricida*. Las copas que producen las combinaciones más susceptibles al virus son: naranjo dulce (*C. sinensis* (L.) Osb.), mandarino (*C. reticulata* Blanco) y pomelo (*C. paradisi* Macf.) (Moreno and Guerri, 1997).

Para evitar las cuantiosas pérdidas producidas por la tristeza, los países afectados se han visto obligados a realizar un cambio de portainjertos en las plantaciones. Esto trajo aparejado un conjunto de problemas ya que ninguno de los portainjertos tolerantes empleados posee las rusticidad y adaptabilidad del naranjo agrio (Moreno *et al.*, 1993). En la Argentina la enfermedad es endémica y por ello, para evitar la muerte de las plantas, el naranjo dulce se injerta sobre pies tolerantes (trifolio, mandarino cleopatra y limón rugoso entre otros).

Los daños ocasionados por la tristeza no se limitan a las plantas injertadas sobre naranjo agrio; se informaron una serie de casos en los que se produjeron daños severos en plantas de pomelo en Sudáfrica y Australia (Da Graça *et al.*, 1984; Broadbent *et al.*, 1991; Van Vuuren *et al.*, 1993). Una situación parecida ocurre en el noroeste argentino, donde las plantaciones jóvenes de pomelos rojos y rosados se ven afectadas por la enfermedad y presentan varios síntomas que incluyen acanaladuras en ramas y tronco (*stem pitting*), marcada reducción de la producción y frutos pequeños y deformados. Además se observa un rápido declinamiento y muerte de las plantas (Costa, 1995). Este mismo problema acaba de aparecer en pomelos rojos del noreste, en los alrededores de Concordia, Entre Ríos (Costa 2000, comunicación personal).

I.4) SÍNTOMAS: VARIABILIDAD BIOLÓGICA

Una de las características de la enfermedad causada por CTV es la amplia variedad de síntomas causados en las plantas infectadas. La expresión de los mismos depende del ambiente, de la especie hospedante y de la severidad del aislamiento viral. Los síntomas causados por CTV pueden agruparse en tres categorías: 1) decaimiento de plantas constituidas por copas injertadas sobre naranjo amargo (*decline*), 2) acanaladuras en el tronco (*stem pitting*) y 3) "amarillamiento" de plantines obtenidos a partir de semilla (*seedling yellows*) (Garnsey *et al.*, 1987).

En la reacción de declinamiento, que ocurre en naranjo dulce, mandarina o pomelo injertado sobre naranjo agrio, la infección viral causa la necrosis del tejido floemático del pie inmediatamente por debajo de la zona de unión entre pie y copa. La savia deja de llegar al sistema radicular y cuando se agotan las reservas de almidón de este tejido, se produce la muerte del mismo por falta de alimento. Como el sistema radicular ya no es funcional no llegan nutrientes

minerales ni agua a la copa, las ramas se van secando progresivamente y el árbol adquiere un tono amarillento generalizado hasta que finalmente muere. Durante el declinamiento pueden aparecer hoyos en la cara interna de la corteza (fig. 1.3a) debido a proyecciones del xilema (*Compendium of citrus diseases*, 1988). El proceso de decaimiento puede durar varios años aunque existen aislamientos virales que producen un declinamiento acelerado de los árboles (*quick decline*), de modo que en una o dos semanas quedan completamente secos, con hojas y frutos colgando (Ben-Ze'ev *et al.*, 1989).

Entre los síntomas más frecuentes están los hoyos en ramas y tronco, que a campo suelen producir fosas longitudinales o canales en la madera (fig. 1.3b). Esto produce el debilitamiento de las ramas que se quiebran con facilidad con el viento o cuando están cargadas de frutos. Los aislamientos que producen estos síntomas también inducen, en general, el "aclaramiento" de las nervaduras de hojas jóvenes (*vein clearing*, fig. 1.4a) así como la formación de una estructura de tipo "corcho" en las nervaduras de hojas viejas (*vein corking*, fig. 1.4b). Además, son responsables de la pérdida de vigor de la planta, de disminuciones de tamaño de la misma y de la producción de frutos pequeños y deformados. Las especies más afectadas por este tipo de aislamientos son los pomelos y las limas aunque también pueden resultar dañados los naranjos dulces (Rocha-Peña *et al.*, 1995).

El síntoma de tipo *seedling yellows* es una reacción que producen algunos aislamientos de tristeza en plantas originadas de semilla, cultivadas en invernáculo. Las especies que se utilizan para este ensayo son: pomelo, naranjo agrio o limonero. Los plantines se infectan en el invernáculo y se observa que las hojas van adquiriendo un tono amarillento que, casi siempre, se acompaña de una detención del crecimiento (fig. 1.4c). La detección de este síntoma se utiliza con frecuencia para indicar la presencia de aislamientos del virus que causan, además, acanaladuras en el tronco (Rocha-Peña *et al.*, 1995).

1.5) DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO

En plantaciones donde el portainjerto es naranjo agrio, la observación directa de los síntomas permite realizar un diagnóstico preliminar de la enfermedad, que debe confirmarse por ensayos de infectividad o pruebas de laboratorio. En los ensayos de infectividad se inoculan, por injerto, plantas provenientes de semilla de especies susceptibles a tristeza y se observa la aparición de síntomas. Como se mencionó anteriormente, una de las especies más utilizadas en estos ensayos es la lima mexicana (*C. aurantifolia*), en la que se observan aclaramiento de las nervaduras (*vein clearing*), hojas en forma de copa (*leaf cupping*) y acanaladuras en el tronco (*stem pitting*). Los aislamientos más virulentos pueden llegar a producir que las nervaduras tomen aspecto de corcho (*vein corking*) (*Compendium of citrus diseases*, 1988).



Figura I.1: Plantas de cítricos infectadas con el virus de la tristeza (CTV). **a:** Aspecto de una plantación afectada por la acción del virus. **b:** Comparación de dos árboles, uno enfermo y otro sano, en primer y segundo plano, respectivamente. Ilustraciones tomadas de "*Compendium of citrus diseases*".



Figura I.2: Morfología de la partícula viral. Micrografía electrónica de partículas virales extraídas a partir de corteza de cítricos infectados. Tinción negativa. Tomado de "*Compendium of citrus diseases*".

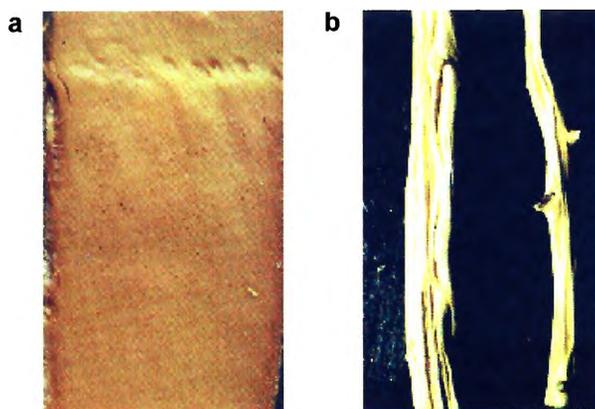


Figura I.3: Síntomas de infección con CTV. **a:** Huecos (*pinholing* o *honeycombing*) en la cara interna de la corteza de un pie de naranjo agrio con un copa infectada con CTV (tomado de "*Compendium of citrus diseases*"). **b:** Acanaladuras en el tronco (*stem pitting*) en una rama de un pomelo infectado (tomado de Garnsey *et al.*, 1995).

Para la expresión de estos síntomas las plantas deben mantenerse a temperaturas que oscilen entre los 18 y 26°C, lo que hace necesario contar con un invernáculo con temperatura controlada. Para uniformar los criterios de evaluación de aislamientos de CTV, se estandarizaron los hospedantes a utilizar y los síntomas a observar (Garnsey *et al.*, 1995).

Para la detección rápida del virus se emplean técnicas inmunoenzimáticas (Bar-Joseph *et al.*, 1979a; Cambra, 1993). La utilización de anticuerpos monoclonales permitió incrementar la sensibilidad y especificidad del método. Uno de los monoclonales más utilizados es el MCA-13, preparado a partir del aislamiento T36 de Florida, que detecta con eficiencia aislamientos que producen declinamiento en plantas de naranjo dulce injertadas sobre naranjo agrio (Permar *et al.*, 1990). Este anticuerpo reacciona contra un residuo fenilalanina (Phe) que se encuentra en la posición 124 de la proteína de cubierta viral. En los aislamientos severos, que dan reacción positiva, este residuo se halla conservado, mientras que en una serie de aislamientos débiles, no reactivos, está reemplazado por un residuo tirosina. Ensayos de mutagénesis confirmaron que el residuo Phe es necesario y suficiente para el reconocimiento por el anticuerpo (Pappu *et al.*, 1993). Por otro lado, el uso conjunto de los monoclonales 3DF1 y 3CA5 permitió detectar la totalidad de los aislamientos de CTV estudiados, lográndose una identificación rápida del virus (Cambra *et al.*, 1990). La técnica de inmunoensayo sobre improntas de tejido (*direct tissue blot immunoassay*, DTBIA) es una versión simplificada de las técnicas anteriores ya que evita el paso de preparación de extractos vegetales (Garnsey, *et al.*, 1993). El antígeno se une a una membrana de nitrocelulosa que tiene afinidad por proteínas y se detecta directa o indirectamente por medio del uso de anticuerpos. Las impresiones se realizan presionando cortes de brotes jóvenes contra la membrana. Como CTV es un virus asociado al floema, la región que debe dar reacción está bien definida; además, la concentración del virus en el tejido es muy alta, con lo cual no existe un problema de límite de sensibilidad. Esta metodología es rápida, puesto que no requiere procesamiento previo del material antes de realizar la "impresión" en membrana y permite la manipulación de gran cantidad de muestras a campo. Otra de las ventajas es la separación temporal de los procedimientos de toma y análisis de muestras debido a que las membranas pueden ser guardadas y procesadas cuando se desee.

I.6) TRANSMISIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

El rango de hospedadores naturales de CTV es muy estrecho ya que solamente afecta a vegetales de la familia *Rutaceae*. El virus infecta a la mayor parte de las especies del género *Citrus* y a unas pocas especies de los géneros *Fortunella*, *Aegle*, *Afraegle*, *Citropsis*, *Microcitrus* y *Pamburus* (Bar-Joseph and Lee, 1989). En condiciones experimentales se ha logrado infectar a algunos

integrantes del género *Passiflora*. CTV no tiene ningún hospedante herbáceo, por ello, para su multiplicación en invernáculo es necesario contar con plantines sanos de cítricos.

CTV, al igual que el resto de los closterovirus, se transmite por medio de insectos vectores y por injerto, pero no lo hace por semilla. Por otro lado, la transmisión por métodos mecánicos es muy poco eficiente. La vía más importante de dispersión inicial del virus fue la propagación de yemas infectadas, ya que de esta manera se introdujo a prácticamente todas las áreas citrícolas del mundo.

A nivel local, el virus es diseminado por al menos seis especies de áfidos de los géneros *Aphis* (*A. craccivora*, *A. gossypii* y *A. spiraecola*), *Myzus* (*M. persicae*) y *Toxoptera* (*T. aurantii* y *T. citricida*). El vector más eficiente de la enfermedad es *T. citricida* (fig. 1.5a, b y c). Este áfido se encuentra presente en la mayor parte de Asia, Sudáfrica, Sudamérica y Australia y también ha llegado a Centroamérica, islas del Caribe y Florida. Por otro lado, *A. gossypii* es el vector más importante en los países del Mediterráneo y en Estados Unidos. La dispersión del virus, en espacio y tiempo, se estudió en áreas donde cohabitan ambos vectores y se encontró que, en condiciones semejantes, *T. citricida* es unas veinte veces más eficiente que *A. gossypii* (Yokomi *et al.*, 1994). En estudios realizados en áreas de España y Florida (en este último lugar antes de la introducción de *T. citricida*), donde la dispersión ocurre a través de la acción de *A. gossypii*, CTV mostró un avance en la incidencia, desde niveles bajos (5% de los árboles infectados) hasta niveles altos (95% de los árboles infectados) en un período de ocho a quince años. Por otro lado, en Costa Rica y República Dominicana, los mismos niveles de incidencia se alcanzaron en sólo dos a cuatro años debido a la acción de *T. citricida* (Gottwald *et al.*, 1995). El tipo de vector presente en una zona citrícola no sólo afecta a la velocidad de dispersión del virus sino también a la distribución espacial de la enfermedad. Ambos áfidos tienen hábitos diferentes en cuanto al movimiento en una plantación; *A. gossypii* se mueve de un árbol a otro situado lejos, lo cual produce una distribución al azar de CTV dentro del campo. Por el contrario, *T. citricida* se traslada de un árbol a otro inmediatamente adyacente, produciendo una mayor agrupación de árboles infectados a campo (Gottwald *et al.*, 1995). Estos estudios demuestran que el control de la enfermedad es mucho más difícil cuando *T. citricida* está presente en la región.

La transmisión por áfidos es de tipo semipersistente, con tiempos de adquisición e inoculación del virus (por alimentación) que oscilan entre quince minutos y una hora. El tiempo de retención del virus en el insecto vector puede durar hasta tres días (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Murant *et al.*, 1988).

I.7) MÉTODOS DE CONTROL

Existen distintos métodos para el control de CTV y las medidas a tomar dependen de la incidencia del virus en un momento dado, de los vectores presentes, de los aislamientos virales y de las variedades de cítricos cultivadas en cada zona. Las estrategias se dividen en aquellas de corto, mediano y largo plazo.

Estrategias a corto plazo: **a)** un programa apropiado de cuarentena del material propagativo a ser introducido en una región determinada así como también la certificación de yemas y plantas utilizadas para la generación de nuevas plantaciones (Navarro *et al.*, 1984; Navarro, 1993). En Argentina este tipo de controles está a cargo del PROCITRUS, que es un programa aprobado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), cuya finalidad es la obtención, mantenimiento y distribución de material cítrico de alta calidad y libre de enfermedades, para la producción de plantines. Para ello se selecciona el material vegetal, se lo libera de enfermedades en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Concordia del INTA y se obtienen plantas sanas que se mantienen en invernáculo en dicho lugar. Un bloque fundacional se encuentra en Catamarca, que es una región libre de cancrrosis y tristeza. Un segundo grupo de plantas madre se mantienen en Concordia, en invernáculo, y su estado es controlado periódicamente. El material de estas plantas se utiliza en los centros de multiplicación. En estos últimos se propaga el material que se destina a la venta a productores citrícolas. De esta manera se garantiza que todo el material que se introduce al campo esté libre de enfermedades. **b)** En las zonas donde se introdujo la tristeza se intenta evitar la dispersión por medio de programas de erradicación de árboles enfermos (Bar-Joseph *et al.*, 1989a). El éxito de este tipo de programas requiere continuidad a lo largo de varios años y, además, debe estar acompañado de programas de certificación y control. **c)** En aquellos países donde la dispersión es incontrolable es necesario utilizar portainjertos tolerantes. En Argentina, donde la tristeza es endémica y se encuentra presente *T. citricida*, las plantaciones de naranjo dulce están injertadas sobre pies tolerantes a CTV. En este caso, si bien las plantas tienen tristeza no se produce declinamiento rápido de las mismas, como ocurre cuando el pie usado es naranjo agrio.

Estrategias a mediano plazo: en algunas áreas citrícolas el uso de portainjertos tolerantes a tristeza no resulta suficiente para evitar los daños causados por aislamientos virales muy agresivos. En esos casos se utiliza la protección cruzada (o "preinmunización"). Esta metodología consiste en infectar la planta con un aislamiento débil de modo tal que éste induzca "tolerancia" a la presencia de aislamientos severos (Costa and Müller, 1980). Se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esta interferencia. Este tipo de control debe aplicarse sólo en zonas donde la tristeza es endémica, las pérdidas

ocasionadas por aislamientos severos son importantes y, fundamentalmente, se disponga de aislamientos con capacidad protectora bien establecida. Los riesgos mayores de la protección cruzada son: a) que el aislamiento protector se convierta en virulento (por mutación o por interacción con otros aislamientos) y b) que el aislamiento protector consista en una "mezcla" de aislamientos cuya composición relativa cambie en el tiempo y resulte agresiva para la planta inoculada. Un problema adicional es que, generalmente, los aislamientos protectores sólo sirven como tales en una sola especie o incluso en un único cultivar (Müller *and* Costa, 1987).

Estrategias a largo plazo: el control eficiente de los virus requiere de la presencia de resistencia genética a los mismos. Para lograrla, se están desarrollando actualmente dos estrategias distintas. Por un lado se intenta clonar y caracterizar el gen de resistencia presente en *P. trifoliata* (Mirkov *et al.*, 1998) para poder introducirlo en las especies de interés comercial, mientras que por otro, se intenta obtener resistencia por medio de la introducción de genes virales en plantas de cítricos. El intento de obtención de plantas transgénicas es posible gracias al avance en la transformación de cítricos (Peña *et al.*, 1995; Cervera *et al.*, 1998) y a la disponibilidad de la secuencia completa de distintos aislamientos virales de características biológicas diferentes (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995; Mawassi *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Albiach-Martí *et al.*, 2000a).

I.8) DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CTV

Las medidas de control de la enfermedad dependen de las características de las plantaciones, del tipo de aislamientos virales y de las especies de vectores presentes en una región. La gran variabilidad del virus y la aparición de aislamientos sumamente severos ha hecho que la simple utilización de portainjertos tolerantes sea insuficiente para evitar daños económicos importantes (Roistacher *and* Moreno, 1991). Para contrarrestar esta situación es necesario evitar la multiplicación de yemas infectadas con aislamientos severos e implementar sistemas eficientes de protección cruzada. En ambos casos es crucial disponer de métodos de caracterización de los aislamientos para establecer con certeza su grado de virulencia.

I.8A) MÉTODOS TRADICIONALES DE DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CTV

Los métodos biológicos tradicionales de caracterización de aislamientos de CTV incluyen: 1) el tipo e intensidad de síntomas producidos en distintas especies de cítricos y en distintas combinaciones piel/ copa (Wallace *and* Drake, 1974; Da Graça *et al.*, 1984; Ballester-Olmos *et al.*, 1988 a y b), 2) la transmisibilidad por áfidos (Bar-Joseph *and* Loebenstein, 1973; Roistacher *et al.*, 1980; Broadbent *et al.*, 1996) y 3) la capacidad de brindar protección cruzada contra otros aislamientos (Wallace *and* Drake, 1974; Costa *and* Müller, 1980; Van Vuuren *et al.*, 1993; Gillings *et al.*, 1996). El problema de estas

metodologías es la necesidad de unificar los criterios de evaluación de los síntomas para clasificar de manera adecuada los aislamientos presentes en distintos lugares. Usualmente las evaluaciones se llevaban a cabo en condiciones ambientales diferentes y utilizando distintas plantas indicadoras. Dado que las condiciones ambientales y las diferencias genéticas entre cultivares de cítricos afectan notoriamente a los síntomas producidos por el virus, se propuso un sistema de condiciones de evaluación que permite uniformar los criterios para la clasificación de los aislamientos virales (Garnsey *et al.*, 1995). El crecimiento de las plantas indicadoras se hace en condiciones óptimas y se sigue un protocolo preestablecido para la evaluación de los síntomas. Los indicadores elegidos son plantines de: a) una propagación clonal de lima mexicana en pie de *C. macrophylla* Webster, b) naranjo agrio, c) naranjo dulce Valencia sobre naranjo agrio, d) naranjo dulce Madam vinous y e) pomelo Duncan. En base a la observación de síntomas en estos indicadores se agrupa a los aislamientos de CTV en diez categorías (Garnsey *et al.*, 1995). Es un método de clasificación laborioso y lento, que requiere condiciones de invernáculo, lo cual aumenta los costos y limita su aplicación masiva. Por estos motivos se desarrollaron una serie de técnicas de laboratorio para la clasificación de aislamientos virales.

I.8B) MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LA DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CTV

Los métodos de laboratorio utilizados para la caracterización de aislamientos de CTV pueden clasificarse en dos grandes grupos: 1) métodos basados en propiedades de la proteína de cubierta mayoritaria del virus y 2) metodologías basadas en la caracterización de los ácidos nucleicos del virus.

Dentro del primer grupo se encuentra la caracterización de aislamientos mediante anticuerpos monoclonales. Tal como se describió anteriormente, uno de los monoclonales más usados con este fin es el MCA-13, que reconoce un epítopo muy conservado entre aislamientos severos, que no está presente en aislamientos débiles (Permar *et al.*, 1990; Pappu *et al.*, 1993). La utilización de anticuerpos monoclonales permitió incluir a los aislamientos en distintos serogrupos y determinar la presencia de varios serotipos en un mismo aislamiento (Cambra *et al.*, 1993), controlar el título de distintos aislamientos en experimentos de protección cruzada (Rocha-Peña *et al.*, 1991) y detectar cambios en la composición de los epítopos de un aislamiento luego de transmisión por injerto o áfidos a un nuevo hospedante (Cambra *et al.*, 1993). La limitación evidente es que sólo se detectan variaciones presentes en una porción limitada de la proteína de cubierta. Además el gen que la codifica representa nada más que el 3,5% del genoma viral.

Otra estrategia desarrollada para la caracterización de aislamientos es la digestión parcial, con endoproteasas, de preparaciones de proteína de cubierta purificada y el análisis de los fragmentos generados en geles de poliacrilamida.

Como resultado de este procedimiento se obtiene un mapa peptídico que permite identificar diferencias entre aislamientos en base a cambios en la secuencia de la proteína de cubierta mayoritaria (Lee *et al.*, 1988; Guerri *et al.*, 1990; Albiach-Martí, 1995; Albiach-Martí *et al.*, 2000b). Esta metodología permite una diferenciación más precisa de los aislamientos virales pero es muy laboriosa para aplicarla como método de rutina y posee la misma limitación que el método anterior.

Los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos virales incluyen el estudio de los patrones de RNA de doble cadena (dsRNA) provenientes de tejidos infectados; la hibridación molecular utilizando sondas de RNA o DNA complementarias al genoma viral; el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) del gen de la proteína de cubierta mayoritaria; la secuenciación del gen de la proteína de cubierta mayoritaria y comparación de las secuencias obtenidas y el análisis del polimorfismo conformacional de moléculas de DNA de cadena simple (*single-strand conformation polymorphism*, SSCP).

En plantas sanas no se encuentran cantidades importantes de dsRNA mientras que en las infectadas se encuentran concentraciones relativamente elevadas de este tipo de ácido nucleico. El dsRNA corresponde a la forma replicativa de longitud total del genoma viral (*RNA full length*) y a los distintos RNAs subgenómicos que el virus produce para expresar los genes presentes en la mitad 3' de su genoma. Por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida y tinción con bromuro de etidio o nitrato de plata se observan las distintas moléculas presentes en un aislamiento (Dodds *et al.*, 1984 ; Dodds *et al.*, 1987a). Esta técnica se utilizó para analizar variabilidad de aislamientos de CTV a campo (Guerri *et al.*, 1991) o detectar cambios luego de la transmisión por injerto o áfidos a un nuevo hospedador (Albiach-Martí, 1995; Moreno *et al.*, 1991). El estudio de los patrones de dsRNA es sencillo y rápido pero tiene una serie de limitaciones: los patrones varían según la época del año y el hospedante empleado (Jarupat *et al.*, 1988, Moreno *et al.*, 1990), no necesariamente existe correlación entre los patrones de dsRNA y las características biológicas del aislamiento (Moreno *et al.*, 1990) y a campo los patrones de dsRNA muestran una fuerte variación estacional, por lo cual debe estandarizarse el momento de la toma de muestra si se quiere obtener un perfil completo de dsRNA (Dodds *et al.*, 1987b; Moreno *et al.*, 1990). Estudios posteriores demostraron, además, que algunos de los dsRNAs más abundantes, utilizados para caracterizar a los aislamientos virales, son formas replicativas de moléculas de RNAs defectivos (Moreno and Guerri, 1997).

La técnica de hibridación molecular consiste en sintetizar sondas de cDNA, a partir de dsRNA de distintos aislamientos virales, y utilizarlas en ensayos de hibridación para conocer el grado de homología entre aislamientos virales. Por

medio de esta metodología se logró una mayor discriminación entre aislamientos (Rosner *et al.*, 1986; Semorile *et al.*, 1993), se identificaron cambios en la composición de los aislamientos luego de la transmisión por áfidos (Albiach-Martí, 1995) y se controló la evolución de ensayos de protección cruzada (Albiach *et al.*, 1996). Una de las ventajas de esta técnica es la utilización de todo el genoma en la obtención de sondas con lo cual el análisis no está restringido a una región del mismo.

Respecto a los métodos basados en el análisis del gen de la proteína de cubierta mayoritaria, uno de los primeros trabajos consistió en la secuenciación del gen completo (Sekiya *et al.*, 1991). Posteriormente se caracterizaron distintos aislamientos por los patrones de RFLP logrados a partir de los productos de amplificación de dicho gen (Gillings *et al.*, 1993) o por comparación directa de las secuencias obtenidas (Pappu *et al.*, 1993; Mawassi *et al.*, 1993; Cevik *et al.*, 1996). El primer tipo de análisis se utilizó para identificar las distintas variantes de secuencia presentes en un mismo aislamiento y para detectar la introducción de aislamientos severos en plantas preinmunizadas con aislamientos protectores (Gillings *et al.*, 1996). También se secuenciaron y analizaron otros genes y regiones génicas de CTV. La comparación de secuencias de los genes p20 (Rubio, 1997) y p23 (Pappu *et al.*, 1997; López *et al.*, 1998) demostró que estas regiones están relativamente conservadas en distintos aislamientos. La comparación de secuencias de la región 5' no codificante (5' UTR) permitió clasificar a los aislamientos en tres grupos bien definidos (López *et al.*, 1998) y demostró la existencia de más de un tipo de secuencia en la mayoría de los aislamientos analizados (Ayllón *et al.*, 2001).

La técnica de SSCP (Orita *et al.*, 1988), una metodología inicialmente empleada para la detección de mutaciones puntuales en genes de humanos, también se empleó con éxito en el estudio de virus de plantas (Koenig *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1996). Con esta técnica es posible detectar mutaciones puntuales que afectan a la conformación de las hebras y se reflejan en cambios en la migración de las mismas en geles nativos de poliacrilamida. Este tipo de análisis es rápido, muy sensible y permite procesar un número elevado de muestras simultáneamente, reduciendo la necesidad de secuenciación cuando se desea realizar un análisis de variabilidad poblacional. Esta técnica se aplicó al estudio de diversos genes de CTV, entre ellos p25 (Rubio *et al.*, 1996; Nolasco and Sequeira, 1997), p18 y p20 (Rubio, 1997; Niblett *et al.*, 2000) y se utilizó para identificar cambios en los aislamientos virales luego de la transmisión de los mismos por áfidos (d'Urso *et al.*, 2000).

I.9) CARACTERÍSTICAS DE CTV

I.9A) CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN GENERAL

CTV pertenece a la familia *Closteroviridae* (del griego *kloster*, hilo). Dentro de dicha familia se agrupan una serie de virus con genoma RNA de cadena simple (ssRNA) y de polaridad positiva (+), asociados al floema. Las partículas virales presentan una morfología filamentosas y extremadamente flexuosa. Los vectores que transmiten a los closterovirus pertenecen a las familias *Aphididae* (áfidos), *Aleyrodidae* (moscas blancas) y *Pseudococcidae* (chinchas) del orden Homoptera (Karasev, 2000). De acuerdo a lo aprobado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (*International Comitee on Taxonomy of Viruses, ICTV*) la familia se ha dividido en dos géneros. El género *Closterovirus*, cuya especie tipo es *beet yellows virus* (BYV) (Bar-Joseph and Hull, 1974), comprende a los closterovirus con genoma monopartito transmitidos por áfidos, chinchas y posiblemente por moscas blancas (Karasev, 2000). CTV, que posee estas características (Bar-Joseph and Lee, 1989), se encuentra incluido en este género. Por otro lado, el género *Crinivirus* incluye a los virus que presentan genoma bipartito y son transmitidos por la mosca blanca, *Bemisia tabaci*. El virus tipo de este último género es *lettuce infectious yellows virus* (LIYV) (Duffus *et al.*, 1986). En las células vegetales infectadas los closterovirus inducen la formación de inclusiones intracelulares rodeadas de membrana. Estas inclusiones se denominan “vesículas tipo BYV” y constituyen una característica taxonómica importante de la familia ya que su sola presencia permite realizar el diagnóstico de la infección.

I.9B) ESTRUCTURA DE LA PARTÍCULA VIRAL

Las partículas virales tiene una longitud que oscila entre los 950 y los 2000 nm y un diámetro de alrededor de 12 nm (Kitayima *et al.*, 1965; Tollin and Wilson, 1988). La baja relación entre la masa del RNA viral y la longitud de la partícula hace que los closterovirus posean las partículas más flexuosas entre los virus con genoma RNA que afectan a vegetales. Este carácter constituyó un hecho clave en el reconocimiento como un grupo viral distinto (Brandes and Bercks, 1965).

Actualmente se sabe que en esta familia no se cumple el paradigma de “la proteína de cubierta única” de los virus de plantas con forma elongada ya que se ha establecido la presencia de dos proteínas asociadas con el RNA viral (fig. 1.6). Inicialmente se había determinado, en BYV, la presencia de una sola proteína de cubierta de 22 kDa (22K). Al analizar la secuencia del genoma de dicho virus se encontró que, además del gen que codifica para la proteína de 22 kDa existe otro gen muy semejante al anterior. Esta estructura de genes en doble copia se encontró en todos los demás closterovirus estudiados, sugiriendo que estos genes homólogos se originaron por duplicación en un antecesor común de la familia.

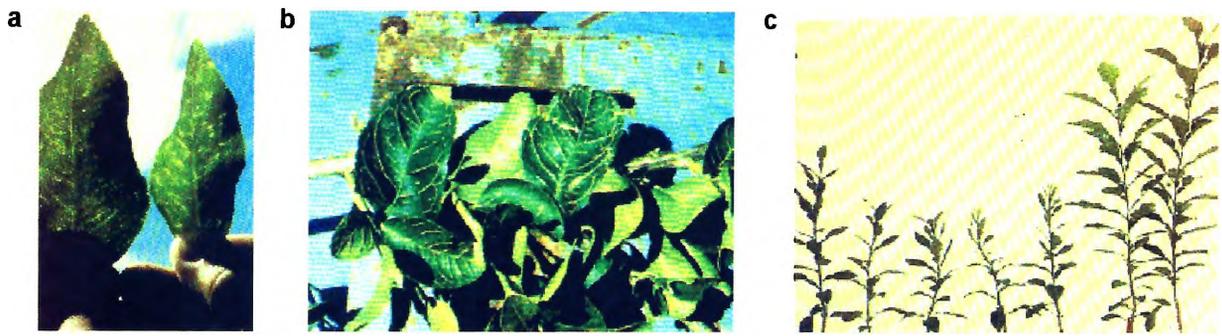


Figura I.4: Síntomas inducidos por CTV. **a:** Aclareamiento de nervaduras (*vein clearing*) en hojas jóvenes de cítricos infectados. **b:** Estructuras de tipo corcho (*vein corking*) en hojas viejas de cítricos enfermos. **c:** Amarillamiento de plantines (*seedling yellows*) asociado a disminución en el crecimiento en plantas de semilla mantenidas en invernáculo. Figuras tomadas de Garnsey *et al.*, 1995.



Figura I.5: Vector de la enfermedad (*T. citricida*). **a:** Áfidos en un brote joven de cítrico (tapa del volumen 89, número 6, de la revista *Phytopathology*, 1999). **b:** Adultos sin alas y ninfas sobre una hoja. **c:** Adulto alado. (Tomados de Garnsey *et al.*, 1995).



Figura I.6: Estructura de *rattlesnake*. Viriones detectados por inmunoelectromicroscopía en preparaciones realizadas a partir de corteza de cítricos infectados. Detección con anticuerpos contra P25. La flecha indica la región del virión no recubierta por anticuerpos, donde se encuentra P27. Gentileza Dr. Robert Milne y Lic. Gabriel Iglesias (preparación realizada durante el curso “*Enfermedades de cítricos. Diagnóstico moderno*”, 1999).

A pesar de la divergencia global entre las secuencias nucleotídicas de ambos genes, las proteínas derivadas han conservado los residuos que estarían involucrados en el plegamiento correcto de las mismas (Boyko *et al.*, 1992; Dolja *et al.*, 1991). Por medio del uso de inmunoelectromicroscopía se demostró, primero para BYV y luego para CTV y LIYV, la presencia de ambas proteínas de cubierta en el virión (Agranovsky *et al.*, 1995; Febres *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1999). Las mismas se disponen en forma de cola de víbora de cascabel (*rattlesnake*) (fig. I.6). En BYV, la proteína de 22K (*coat protein*, CP) está asociada a la mayor parte del RNA viral mientras que la proteína codificada por el gen divergente (24K, *minoritary coat protein*, mCP) se encuentra cubriendo el extremo 5' del mismo (Zinovkin *et al.*, 1999). Este tipo de disposición se encontró en todos los integrantes de la familia estudiados hasta este momento.

I.9C) ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Entre los virus de vegetales con genoma RNA, CTV es el de mayor tamaño. El aislamiento T36, el primero en ser totalmente secuenciado, consta de 19296 bases (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995). CTV comparte con BYV y LIYV la estructura típica de los genomas de los closterovirus, que incluye la presencia de elementos constantes. Las regiones conservadas en los distintos closterovirus codifican: dominios de proteasa tipo papaína (P-Pro), metiltransferasa (MET), helicasa (HEL) y RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp); una proteína hidrofóbica pequeña; la proteína homóloga a HSP70; una proteína de alrededor de 60 kDa (semejante a HSP90) y las dos proteínas de cubierta (mayoritaria, CP y minoritaria, CPM) (fig. I.7).

El genoma del aislamiento T36 de CTV contiene doce marcos abiertos de lectura (*open reading frame*, ORF) que codifican, potencialmente, diecisiete productos proteicos (Karasev *et al.*, 1995). Presenta, además, dos regiones no codificantes en los extremos del genoma. La región 5' no traducida (*untranslated region*, UTR) tiene 107 bases de longitud, un elevado contenido de adenina y citosina y un bajo contenido de guanina. En BYV este extremo presenta una estructura metilada o *cap* (m⁷GpppG) (Karasev *et al.*, 1989), pero en CTV no se demostró la presencia de una estructura semejante. El primer nucleótido del genoma es una adenina y la única evidencia que hace suponer la existencia de *cap* es la presencia de un dominio MET en el genoma viral. Esta región se ha estudiado con detalle por medio de la secuenciación de clones de distintos aislamientos virales. El análisis de los datos obtenidos mostró un elevado polimorfismo y se pudo clasificar a las secuencias en tres grupos (López *et al.*, 1998). La estructura más estable, predicha para la región 5' UTR, consta de dos *stem-loops* y se conserva prácticamente sin cambios debido a una serie de mutaciones compensatorias (López *et al.*, 1998).

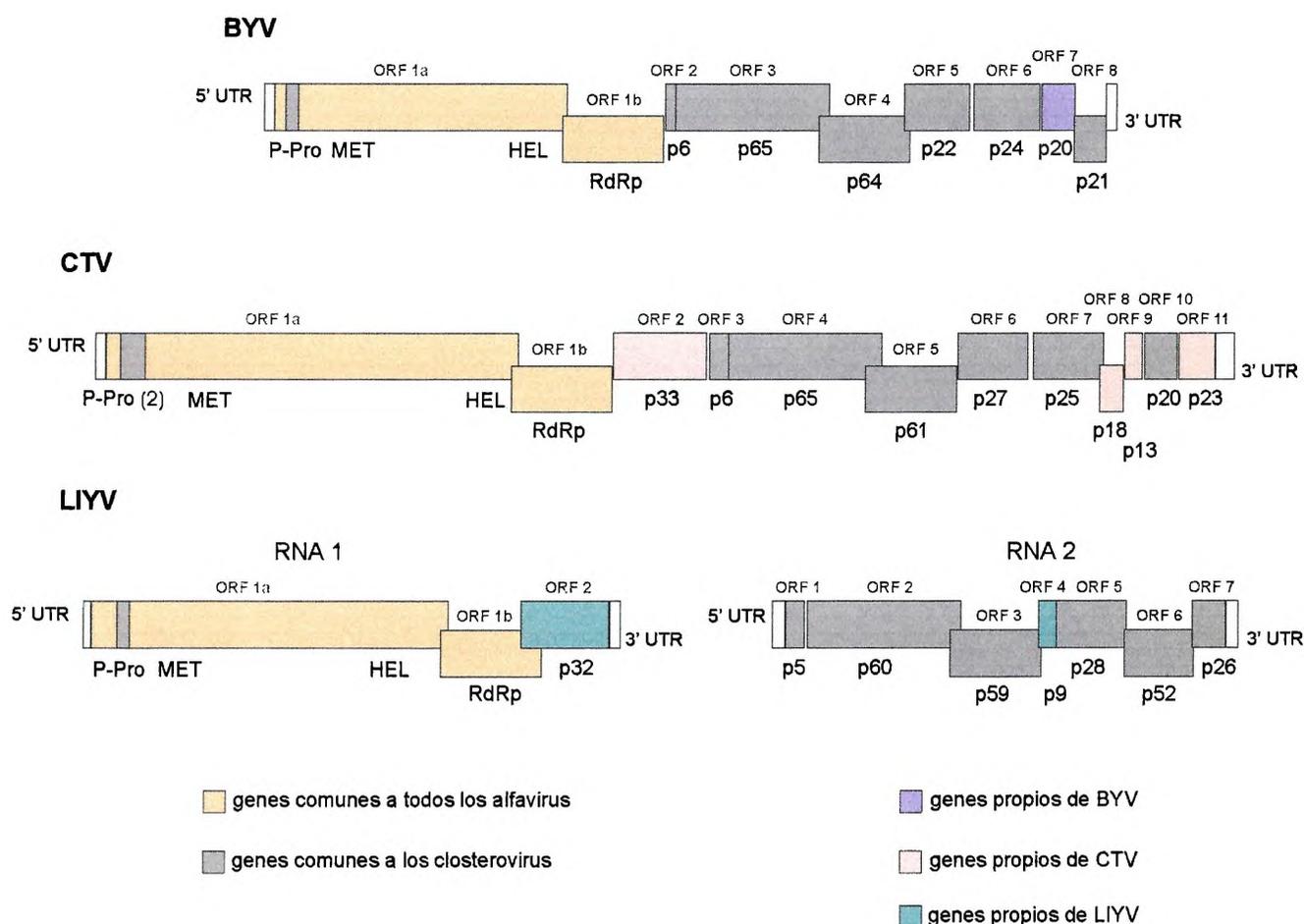


Figura I.7: Esquemas representativos de los genomas de tres integrantes de la familia *Closteroviridae*. Se indican los diferentes marcos abiertos de lectura (ORFs). Con distintos colores se representan grupos de genes conservados y otros propios de cada virus. p6 y p5 codifican para proteínas hidrofóbicas pequeñas; p65 y p60 son homólogos a HSP70 celulares; p64, p61 y p59 son homólogos a HSP90 celulares; p22, p27 y p52 codifican para proteínas de cubierta minoritarias; p24, p25 y p28 codifican para proteínas de cubierta mayoritarias. Figura modificada a partir del esquema de Dolja *et al.*, (1994).

La región 3' UTR del aislamiento T36 consta de 275 nucleótidos y no muestra similitud significativa con la secuencia de BYV, no presenta señales de poliadenilación ni estructura de tipo tRNA, pero muestra una estructura secundaria constituida por varias horquillas (Pappu *et al.*, 1994). Esta región también se analizó en detalle en la búsqueda de polimorfismos, sin embargo se encontraron muy pocos cambios de secuencia, existiendo una variación en cuanto a los últimos nucleótidos, que pueden ser CCA, CCAG, CTA o CCCGA (López *et al.*, 1998).

La región codificante del genoma de CTV puede dividirse en tres grandes bloques de genes. El primero está muy conservado en el supergrupo de los *Sindbis-like virus* y contiene los genes involucrados en la replicación (Karasev, 2000), el segundo comprende los genes conservados en los closterovirus (ORFs 3 a 7 inclusive y 10) y el tercero engloba los genes propios de CTV (ORFs 2, 8, 9 y 11) (Dolja *et al.*, 1994) (fig. I.7, donde también se indican los genes propios de los otros dos closterovirus analizados, BYV y LIYV).

Tal como se mencionó, los ORFs 1a y b de CTV corresponden al primer grupo y están involucrados en la replicación del RNA viral (Karasev *et al.*, 1995). El ORF 1a codifica para una poliproteína de unos 349 kDa que incluye los dominios P-Pro, MET y HEL. Una particularidad de CTV es que el dominio P-Pro se encuentra duplicado (Karasev *et al.*, 1995). Los dominios MET y HEL están conservados en una elevada proporción de los virus con genoma RNA (+) (Gorbalenya *and* Koonin, 1993; Rozanov *et al.*, 1992). Se postula que el dominio MET está involucrado en el *capping* de los mRNAs virales. Por otro lado, en varios virus se ha demostrado que el dominio HEL está involucrado en la separación de las hebras de las moléculas de dsRNA formadas durante la replicación del genoma de los virus de RNA (+) (Agranovsky, 1996). El dominio HEL presenta los siete motivos conservados comunes de la superfamilia I de helicasas (Koonin *and* Dolja, 1993). La región de la poliproteína viral ubicada entre los dominios MET y HEL no muestra similitud significativa con ninguna proteína presente en banco de datos y es la región más divergente cuando se comparan secuencias de distintos aislamientos virales. Los primeros ciento veintisiete nucleótidos del segundo ORF (ORF1b) se solapan con las últimas bases del ORF 1a. El ORF1b codifica un producto de 57 kDa que contiene los ocho dominios de las RNA polimerasas RNA dependientes (RdRp) del supergrupo III de los virus de RNA (+) (Koonin, 1991).

Los ORFs 3 a 7 y el ORF 10 están presentes en todos los closterovirus. Los genes p6, p65 y p61 (ORFs 3, 4 y 5, respectivamente) codifican tres proteínas de 6, 65 y 61 kDa. P6 es una pequeña proteína hidrofóbica semejante a una proteína codificada por el triple bloque génico de potex y carlavirus (Agranovsky *et al.*, 1991; Morozov *et al.*, 1989). En el primer grupo se ha demostrado que esta proteína se une a membranas *in vitro* (Morozov *et al.*, 1990) y que, *in vivo*, interviene en el transporte célula a célula (Beck *et al.*, 1991). P65 tiene un elevado porcentaje de similitud con integrantes de la familia de proteínas de *shock* térmico HSP70, que son chaperonas moleculares cuya función es participar en el plegamiento, oligomerización y transporte transmembrana de otras proteínas. A nivel estructural esta proteína contiene los ocho motivos conservados de la familia y presenta dos dominios funcionales. En la porción N terminal existe un dominio de ATPasa y en la región C terminal un dominio involucrado en el plegamiento proteico. En BYV se demostró que esta proteína tiene la capacidad de unir microtúbulos *in vitro* (Karasev *et al.*, 1992) y que el dominio de ATPasa es funcional pero la proteína no es capaz de realizar plegamiento de oligopéptidos *in vitro* (Agranovsky *et al.*, 1997). Esta falta de actividad puede deberse, probablemente, a la imposibilidad que muestra el extremo C-terminal para adoptar la estructura $\beta_4\alpha$, que es la conformación típica del dominio de unión a proteínas de las HSP70 (Agranovsky *et al.*, 1991a; Rippmann *et al.*, 1991). Recientemente se confirmó que esta proteína es esencial para el movimiento del virus célula a célula y que

se requiere la presencia de ambos dominios para que cumpla este rol (Peremyslov *et al.*, 1999). Las mutaciones puntuales que afectan residuos cruciales del dominio ATPasa (Asp⁷ y Glu¹⁸¹) impiden el movimiento, indicando que la actividad de este dominio es esencial para que la proteína cumpla su función (Peremyslov *et al.*, 1999).

El análisis de la secuencia peptídica deducida del ORF 5 mostró que codifica una proteína que presenta dominios similares a los de las HSP90 celulares (Pappu *et al.*, 1994). Para la proteína homóloga de BYV se postula un rol en el movimiento del virus de célula a célula, junto con p64 y p6, siendo necesaria pero no suficiente para dicha función (Peremyslov *et al.*, 1999).

Los ORF's 6 y 7 de CTV codifican las dos proteínas de cubierta virales, la minoritaria (mCP, P27) y la mayoritaria (CP, P25), respectivamente. Ambos genes son homólogos a los genes p24 y p22 de BYV y p28 (CP) y p52 (mCP) de LIYV. Con anticuerpos policlonales se detectaron ambas proteínas en plantas infectadas (Pappu *et al.*, 1993; Febres *et al.*, 1994) y se demostró que P27 se encuentra asociada, mayoritariamente, a la fracción de pared celular (Febres *et al.*, 1994). En la sección anterior se describió la estructura de tipo *rattlesnake* que presentan estos virus y si bien éste es un caso único dentro de los virus con partículas flexuosas, otros virus con genoma RNA, patógenos de plantas, también poseen más de un tipo de proteína de cubierta. Este es el caso de los furovirus, que tienen forma de varilla rígida y de los luteovirus, que son esféricos o semiesféricos con simetría icosaédrica. En estos virus, la proteína de cubierta minoritaria se expresa por medio de un mecanismo de "lectura a través" (*readthrough*) de un codón de terminación débil. De esta manera se producen unas pocas moléculas del péptido minoritario, que es idéntico a la proteína mayoritaria en toda su extensión con la excepción de la porción C-terminal (Bahner *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1994; Filichkin *et al.*, 1994). La existencia de los péptidos generados por este mecanismo asegura la persistencia de furovirus y luteovirus en sus vectores, que son zoosporas fúngicas y áfidos, respectivamente. Por otro lado se demostró que la proteína minoritaria se encuentra asociada a uno de los extremos del virión en el caso de los furovirus (Haeberle *et al.*, 1994). Debido a esta situación se presume que las proteínas de cubierta minoritarias de closterovirus podrían cumplir alguna función en la unión del virión a las células del epitelio del tracto alimenticio de los áfidos vectores y/o en el direccionamiento de la partícula viral hacia receptores de las células floemáticas de las plantas hospedadoras (Agranovski 1996).

El gen p20 de CTV (ORF 10) codifica para una proteína de 20 kDa y es homólogo al gen p21 de BYV. Se ha observado que P20 muestra una elevada afinidad por sí misma en sistemas de doble híbridos de levadura, sugiriendo que forma agregados en las células infectadas. Además, la inmunolocalización

con anticuerpos policlonales contra la proteína expresada en *Escherichia coli* demostró detección específica de la misma en los cuerpos de inclusión amorfos presentes en plantas infectadas (Gowda *et al.*, 2000).

Dentro de los genes únicos de CTV, el ORF 2 codifica una proteína de 33 kDa de función desconocida. Aunque la posición y el tamaño del gen p33 es semejante a la del gen p32 de LIYV, no existe relación entre los productos proteicos (Dolja *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995; Klaasen *et al.*, 1995). La proteína P33 no muestra homología con otras proteínas presentes en bancos de datos.

Los genes p18, p13 y p23 (ORF's 8, 9 y 11 respectivamente) no presentan homólogos en BYV ni en LIYV ni muestran valores significativos de similitud con proteínas de bancos de datos. Para los dos primeros genes no se ha demostrado aún su función. Sin embargo, en el caso de p23, el análisis de la secuencia aminoacídica deducida mostró motivos ricos en cisteínas y residuos básicos, característicos de proteínas con capacidad de unión a ácidos nucleicos. Estos motivos están conservados en las secuencias de distintos aislamientos analizados sugiriendo que cumplen alguna función importante (Pappu *et al.*, 1997; López *et al.*, 1998). Recientemente se ha demostrado que la proteína expresada en *E. coli* es funcional y que, *in vitro*, se une cooperativamente y de manera no específica de secuencia, a ssRNA y dsRNA (López *et al.*, 2000).

I.9D) ESTRATEGIAS DE EXPRESIÓN

Todos los virus que se multiplican en células eucarióticas utilizan una serie de estrategias para expresar sus genes y replicar su genoma. La mayor parte de los virus patógenos de plantas poseen genomas RNA de cadena simple y polaridad positiva (Matthews, 1991). Los RNAs mensajeros de células eucarióticas contienen, casi en la totalidad de los casos, un único ORF. Debido a esta característica los ribosomas están adaptados a iniciar la traducción en la región 5' del RNA mensajero y continuar la síntesis hasta encontrar el primer codón de terminación de traducción presente en la secuencia. De este modo, aunque el RNA viral sea de polaridad positiva, en cuyo caso es reconocido como un RNA "mensajero" y es traducido, el sistema permite únicamente la expresión de la información presente en el primer ORF del genoma (Matthews, 1991). Para resolver este problema y asegurar la expresión de la totalidad de la información contenida en su genoma, los virus recurren a una serie de distintas estrategias de modo tal que todos sus genes sean accesibles al sistema eucariota de síntesis de proteínas. Las tácticas utilizadas por los virus con genomas ssRNA (+) para evadir la restricción de los sistemas eucarióticos a los mensajeros policistronicos son las siguientes (Matthews, 1991):

i) síntesis de RNAs subgenómicos: en este caso se traduce el primer ORF (ORF 5') de cada subgenómico;

- ii) poliproteínas: el RNA codifica para más de una proteína. Las proteínas codificadas no están separadas por codones de terminación que interrumpen el marco abierto de lectura. Por ende se produce una gran proteína que luego es clivada por proteasas celulares o codificadas por el virus y se producen los péptidos individuales deseados;
- iii) genomas multipartitos: cada fragmento presenta un único gen que es traducido directamente;
- iv) sistemas de lectura "a través" de un codón de terminación (*read-through proteins*): en una fracción de los eventos de traducción, el codón de terminación del gen situado en la porción 5' del RNA es "ignorado" por el ribosoma, que continúa con el proceso hasta encontrar otra señal de terminación. De esta manera se genera un péptido más largo, que es exactamente igual al primero en su región N terminal pero presenta una región C terminal diferente.
- v) "corrimiento del marco de lectura" (*transframe proteins*): ocurre un cambio en el marco de lectura cerca del codón de terminación del primer marco abierto por "corrimiento" del ribosoma. Se genera una segunda proteína sin que tenga que volver a iniciarse la traducción.

Normalmente los virus utilizan más de una de las estrategias descritas, tal es el caso de CTV que expresa sus genes por al menos tres mecanismos: 1) la producción de una gran poliproteína, 2) la ocurrencia de un *frame-shift* de tipo +1 y 3) la síntesis de varios RNAs subgenómicos 3' coterminales (Karasev, 2000).

I.9D.1) POLIPROTEÍNA

El primer ORF de CTV se expresa por medio de la producción de una gran poliproteína de 349 kDa, que tiene en su secuencia dos dominios de proteasa con capacidad autocatalítica. El análisis de alineamiento de las secuencias de las proteasas de BYV y CTV permitió predecir que los sitios de corte en la poliproteína se encuentran en los dobletes de glicinas (Gly) de las posiciones 484-485 y 976-977 de la región aminoterminal. Los residuos catalíticos son Cys e His en posiciones 403 y 464 para el primer dominio y en posiciones 896 y 956 para el segundo. Como resultado del procesamiento de la poliproteína se obtienen dos péptidos de 54 y 55 kDa respectivamente y una proteína C-terminal de unos 240 kDa que contiene los dominios MET y HEL (Karasev *et al.*, 1995).

I.9D.2) CORRIMIENTO DEL MARCO DE LECTURA (*RIBOSOMAL FRAMESHIFTING*)

En los genomas de los closterovirus los dominios HEL y RdRp están separados en dos ORF's que se solapan, en una configuración 0/+1, indicando que la polimerasa se expresa por medio de un *frameshifting* ribosomal de tipo +1. La mayor parte de las RNA polimerasas virales se expresan por medio de corrimientos en el marco de lectura de genes solapados pero el mecanismo

más usado es el de tipo -1. En este tipo de *frameshift*, dos tRNAs unidos a una secuencia de RNA se mueven una posición hacia la región 5' del mRNA. El corrimiento del marco es estimulado, además, por la presencia de una estructura secundaria que posiblemente impide el movimiento de los ribosomas a lo largo del templado. El mecanismo de *frameshift* +1 se describió inicialmente en retrotransposones de levadura (Clare *et al.*, 1988); en este caso el corrimiento se ve favorecido por la presencia de un codón de uso no frecuente adyacente al sitio del cambio (Farabaugh *et al.*, 1993). En bacterias, la probabilidad del evento se incrementa por la presencia de un codón de terminación dentro del marco de lectura y por la interacción transiente del RNA ribosomal 16S con una secuencia del tipo Shine-Dalgarno situada *downstream* del mismo (Weiss *et al.*, 1993). De este análisis se desprende que, para que ocurran estos eventos resultan necesarios distintos tipos de señales que reduzcan la velocidad del movimiento del ribosoma sobre el templado, para incrementar las chances de reconocimiento de un triplete fuera del marco habitual.

En el sistema de retrotransposones de levadura no se presentan elementos de estructura importantes. Por analogía con este sistema, uno de los modelos planteados para explicar el *frameshift* de tipo +1 en CTV, predice que el ribosoma debe sufrir una pausa en su movimiento. Esta pausa puede ocurrir como consecuencia de la presencia de un codón de terminación, de una secuencia "resbaladiza" (rica en U), de un codón de uso poco frecuente o de la competencia de especies abundantes de tRNAs por codones vecinos (Farabaugh, 1993). Tanto en BYV como en CTV el evento de *frameshift* ocurre en el mismo lugar, pero por mecanismos diferentes. En el caso de BYV existe un elemento de estructura secundaria, una secuencia "resbaladiza" y un codón de terminación; en CTV, en cambio, existe un codón de uso poco frecuente para arginina (CGG) (Dolja *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995).

I.9D.3) RNAs SUBGENÓMICOS

Los genes localizados en sentido 3' de la RdRp se expresan por medio de la formación de RNAs subgenómicos (sgRNA) 3' coterminales. En tejidos de plantas infectadas con distintos closterovirus se han encontrado una serie de dsRNAs cuyos tamaños coinciden con el esperado para el RNA genómico y para RNAs mensajeros subgenómicos. Por medio de ensayos de *Northern blot* se ha demostrado, en el aislamiento T36, la existencia de nueve sgRNAs 3' coterminales correspondientes a los genes p33, p6/p65 (no es posible discriminar, debido a la pequeña diferencia en el tamaño, si existen uno o dos subgenómicos para estos dos genes), p61, p27, p25, p13, p18, p20 y p23 (Hilf *et al.*, 1995). Se obtuvieron idénticos resultados con material de extracciones de dsRNA y RNA total de plantas infectadas. En T36, los subgenómicos más abundantes son los correspondientes a los genes p20, p23, p13 y p25 que se

encuentran precedidos por regiones intergénicas no codificantes. Por el contrario, en la mayor parte de los casos donde la cantidad de subgenómicos es baja, el inicio del gen se solapa con el final del ORF anterior (p61, p27 y p18) o la región intergénica es muy pequeña (p33, p6 y p65).

I.9E) RNA'S DEFECTIVOS

En plantas infectadas con CTV se encuentran una variedad de moléculas de ssRNA y dsRNA correspondientes a la forma replicativa del virus y a los distintos RNAs subgenómicos. Se demostró que también existen moléculas de RNA de menor tamaño que el RNA genómico y diferente del de los subgenómicos (Hilf *et al.*, 1995). En plantas infectadas de Florida e Israel se aisló un ssRNA (+) muy abundante, de 0,8 kb, al que se denominó LMT 5' RNA (*low molecular weight tristeza*) y que corresponde al extremo 5' del genoma viral (Mawassi *et al.*, 1995b). En CTV se encontró que, además del RNA viral, se encapsidan otras moléculas de menor tamaño. El tamaño de algunas moléculas de ssRNA se corresponde con los sgRNAs de los genes p25, p20 y p23 (Mawassi *et al.*, 1995a) mientras que la longitud de otras no coincide con la de ningún subgenómico. Estas últimas son RNAs defectivos (D-RNAs), que poseen los extremos 5' y 3' del genoma pero carecen de la porción central del mismo (Mawassi *et al.*, 1995b; Yang *et al.*, 1997 a y b; Bar-Joseph *et al.*, 1997). Por lo general los D-RNAs tienen una porción 5' terminal de al menos 881 bases y una región 3' terminal de al menos 442 bases y están constituidos exclusivamente por secuencias virales con la excepción de un D-RNA encontrado en Israel que posee una repetición directa de 8 bases, de origen no viral, en la zona de unión de las regiones 5' y 3' (Mawassi *et al.*, 1995b). Estas moléculas no pueden replicarse en ausencia de un virus *helper* pero son reconocidos y replicados por la RdRp de este último. El hecho de que sean encapsidados es un indicio de la presencia de señales para este evento en las regiones 5' o 3' del genoma viral (Mawassi *et al.*, 1995).

Para explicar el origen de estas moléculas se proponen dos modelos: el de recombinación por salto de cadena sobre un molde negativo (*minus strand RNA jumping model*) y el de transcripción iniciada por un *primer* de una secuencia líder (*leader-primed transcription model*). El primer modelo se basa en la existencia de una serie de D-RNAs que presentan tamaño y secuencia semejante a la del subgenómico de p23 pero con una C extra en el punto de unión. Se propone que se sintetiza primero la hebra de polaridad (-) de longitud total complementaria al genoma viral y luego, utilizando a ésta como molde, se sintetiza la hebra positiva del sgRNA de p23. Posteriormente, ésta sirve de molde para la síntesis de una hebra de polaridad negativa complementaria que tiene un nucleótido G agregado, de manera no dependiente de templado, en el extremo 3'. En este punto la polimerasa "salta" hacia el extremo 5' del genoma

y continúa la síntesis generando la cadena (-) del D-RNA. El paso siguiente es la síntesis de una hebra complementaria a ésta (Bar-Joseph *et al.*, 1997).

En el segundo modelo se plantea que las moléculas de D-RNAs se generarían durante la síntesis del RNA (+) *full-length*. Se supone que el RNA naciente se disocia del molde y la RNA polimerasa se une en otro lugar de la cadena de longitud total y polaridad negativa desde donde sigue con el proceso de síntesis. Se cree que la región elegida para la segunda unión es la región promotora del subgenómico de p23, lo cual explica que las moléculas defectivas tengan extremos 5' y 3' comunes (Bar-Joseph *et al.*, 1997).

En otros virus que infectan a vegetales, la presencia de moléculas defectivas modifica los niveles de RNA genómico y puede incrementar o disminuir la intensidad de los síntomas (Matthews, 1991). En CTV no se demostró ningún tipo de efecto sobre la sintomatología de los aislamientos virales y, además, se encontró este tipo de moléculas tanto en aislamientos severos como en débiles por lo cual no es posible correlacionar su presencia con la virulencia del aislamiento.

I.10) EVOLUCIÓN DE GENOMAS DE CLOSTEROVIRUS

Para estudios evolutivos el genoma de los closterovirus se puede dividir, tentativamente, en cuatro módulos. El primero consiste en la maquinaria de replicación y está conservado en todo el supergrupo de los alfavirus (Koonin *and* Dolja, 1993); en él se incluyen los dominios MET, HEL y RdRp. El resto de los bloques comprende genes propios de los closterovirus. El segundo grupo incluye al dominio de proteasa (duplicado en CTV) mientras que el tercero, que está separado del bloque de replicación por una región intergénica, contiene los ORFs que codifican para la proteína hidrofóbica pequeña y para los péptidos similares a chaperonas celulares. El cuarto módulo comprende los genes que codifican para las proteínas de cubierta virales y una serie de genes de acuerdo al virus estudiado (Dolja *et al.*, 1994).

Dentro de los dominios del primer módulo, el de la RdRp es el único universalmente conservado entre virus RNA (+). La comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de este dominio permitió incluir a los closterovirus en el bloque de los "tobamovirus". Como contraposición a la conservación de secuencias, los closterovirus son los únicos virus del supergrupo que utilizan el mecanismo de *frameshifting* ribosomal para expresar su RNA polimerasa. También presentan una gran expansión de la región del genoma que se encuentra entre los dominios de MET y HEL (Dolja *et al.*, 1994).

La presencia de un gen de la familia de las HSP70 celulares es un hecho único, característico de los closterovirus. La presencia de este gen en todos los integrantes descritos de la familia indica que el gen fue "capturado" del

genoma celular por un antecesor común. A partir de análisis filogenéticos de las secuencias aminoacídicas deducidas de estos genes en BYV y CTV se estableció que las proteínas tipo HSP70 de ambos virus están muy relacionadas entre sí y son muy diferentes a las de los demás organismos (Dolja *et al.*, 1994). Esta divergencia podría deberse a una mayor velocidad de evolución de este gen en los virus.

La duplicación de los genes que codifican para las proteínas de cubierta virales también es un hecho que caracteriza a la familia *Closteroviridae*, ya que, tal como se mencionó anteriormente, es el único caso de virus con partículas elongadas que presenta dos proteínas de cubierta. Los análisis filogenéticos de las secuencias de estos genes muestran que existe mayor homología entre genes que codifican para la copia divergente entre especies distintas que entre la copia divergente y el gen mayoritario en la misma especie. Esta situación, junto con la aparición de la duplicación en todos los integrantes de la familia, indicaría que dicho evento ocurrió en un antecesor común de estos virus (Dolja *et al.*, 1994).

De acuerdo a todos los datos analizados se postuló que existe un "camino" evolutivo de los closterovirus que incluye una serie de eventos que ocurrieron a lo largo del tiempo. El antecesor propuesto para todo el supergrupo debía presentar los genes que codificaban para MET, HEL, P-Pro, POL y CP. Para explicar las diferencias entre la composición del genoma de los closterovirus actuales respecto del antecesor ancestral, Dolja y colaboradores (1994) propusieron la siguiente sucesión de hechos: 1) delección del dominio de P-Pro, 2) reemplazo del gen de la proteína de cubierta de los alfavirus por el que forma parte de los virus con moléculas flexuosas, 3) adquisición del mecanismo de *frameshifthing* ribosomal para la expresión de la RNA polimerasa viral, 4) incorporación de los genes homólogos a las chaperonas celulares de tipo HSP70 y HSP90, posiblemente por recombinación con un mRNA de la célula hospedante, 5) duplicación del gen de proteína de cubierta viral, 6) inserción de secuencias codificantes entre los dominios MET y HEL, 7) incorporación del dominio de proteasa de tipo papaína (Pap-Pro), posiblemente a partir de un potyvirus u otro virus relacionado, 8) diversificación y adquisición de los genes del extremo 3' y 9) división del genoma en dos componentes (LIYV).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Como se ha señalado en la Introducción, los aislamientos de CTV difieren notablemente en sus características biológicas, en particular en la expresión de síntomas en sus distintos hospedadores, y las posibilidades de controlar los efectos causados por este virus en una región dependen, en gran medida, del tipo de aislamientos presentes en la misma. En el caso de aislamientos muy severos, la disponibilidad de métodos rápidos de identificación de los mismos, ayudará en la prevención de su dispersión. Asimismo, resulta importante la caracterización rápida de aislamientos débiles candidatos a ser utilizados en ensayos de protección cruzada. Las diferencias de patogenicidad entre aislamientos virales pueden deberse, en parte, a variaciones de secuencia en determinadas regiones del genoma del virus, pero aún no se dispone de información sobre cuáles son los genes responsables de los distintos síntomas.

Por otra parte, se han acumulado evidencias que demuestran que los aislamientos de CTV son poblaciones virales que pueden variar en composición con cambios en el ambiente, en el hospedante y durante los procesos de transmisión por áfidos. La aplicación del análisis de SSCP al estudio de variabilidad de unos pocos genes de CTV ha mostrado que, dependiendo del gen en consideración, la población puede exhibir mayor o menor grado de estabilidad y homogeneidad.

Asimismo, la disponibilidad actual de la secuencia del genoma completo de seis aislamientos de CTV de características biológicas diferentes, ha abierto nuevas posibilidades de comparaciones genómicas entre poblaciones de este virus.

También, se han acumulado evidencias sobre la existencia, en algunos aislamientos de CTV, de RNAs de tamaño inferior al genómico que no se corresponden con los sgRNAs y cuya población se modifica durante los procesos de transmisión por áfidos o por injerto. Los RNAs defectivos (D-RNAs) se han detectado tanto en aislamientos virales israelíes como españoles y resulta de interés indagar si los mismos están presentes en aislamientos argentinos, ya que este tipo de moléculas puede estar implicado en la modulación de los síntomas de CTV.

Por todo esto, los objetivos propuestos en la realización del siguiente trabajo fueron:

- 1) Analizar la variabilidad poblacional del gen p27, que codifica para la proteína de cubierta minoritaria de CTV, en aislamientos argentinos y de distinto origen geográfico.
- 2) Identificar regiones genómicas que puedan ser utilizadas en la caracterización de aislamientos de CTV.

3) Caracterizar aislamientos de CTV por medio del uso de las regiones que muestran patrones de hibridación diferencial característicos.

Para lograr los objetivos se realizarán una serie de actividades.

Para alcanzar el objetivo 1 se propone:

1.1) Identificar las distintas variantes poblacionales por medio del análisis de SSCP.

1.2) Secuenciar clones representativos de los haplotipos mayoritarios y minoritarios de los distintos aislamientos virales.

1.3) Buscar y seleccionar árboles filogenéticos que permitan establecer el grado de relación entre aislamientos o entre secuencias presentes en la población de un aislamiento.

Para cumplir el objetivo 2 se propone:

2.1) Realizar ensayos de *Southern blot* utilizando sondas producidas a partir de dsRNA de aislamientos virales pertenecientes a distintos biogrupos.

2.2) Identificar regiones de los clones de una biblioteca de cDNA del aislamiento C268-2 que respondan de manera característica a las distintas sondas utilizadas.

2.3) Secuenciar los clones de la biblioteca de cDNA de C268-2 y determinar a qué región genómica pertenecen los fragmentos que muestran hibridación diferencial.

Para lograr el objetivo 3 se propone:

3.1) Sintetizar sondas marcadas por métodos radiactivos utilizando como molde los fragmentos que mostraron hibridación diferencial.

3.2) Realizar ensayos de *dot blot* con las sondas mencionadas en el punto anterior para caracterizar aislamientos de CTV.

3.3) Determinar la existencia de moléculas de RNAs defectivos en los aislamientos argentinos de CTV.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

II.A) MATERIALES

II.A.1) REACTIVOS COMERCIALES

II.A.1A) PRODUCTOS QUÍMICOS Y ENZIMAS

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico de *Merck* (Darmstadt, Alemania), *Sigma* (St. Louis, EE.UU.), *Fluka* (Buchs, Suiza), *Carlo Erba* (Milán, Italia) o *Mallinkrodt* (New York, EE.UU.). Las drogas y enzimas empleadas en los experimentos de manipulación de genes fueron de grado Biología Molecular de *Sigma* (St. Louis, EE.UU.), *Boehringer Mannheim* (Mannheim, Alemania), *Stratagene* (La Jolla, EE.UU.), *Promega* (Madison, EE.UU.), *New England Biolabs* (Beverly, EE.UU.) o *Gibco BRL* (Gaithersburg, EE.UU.). Los componentes de los medios de cultivo para bacterias se adquirieron en *Difco* (Detroit, EE.UU.).

Las fotografías se obtuvieron con un equipo FOTODYNE (Polaroid) o con un aparato de *Electrophoresis Documentation and Analysis System 120* (Kodak digital science). Para la toma de imágenes se utilizó un *scanner VistaScan 240*. La cuantificación de muestras se realizó con el programa *Gel Compare* (*Applied Math*).

II.A.1B) MATERIAL RADIATIVO

Se utilizó material de *New England Nuclear* (NEN) (Boston, EE.UU.). Los nucleótidos radiactivos empleados en las reacciones de marcación de ácidos nucleicos (α [³²P]ATP y α [³²P]dATP), se sintetizaron a partir del precursor γ [³²P]ATP. El dosaje de material radiactivo se realizó por medición con un contador Geiger (para ³²P) o por medio de un contador de centelleo líquido por efecto Cerenkov. Para las autorradiografías se usó película X-OmatTM K de Kodak que se reveló con revelador manual para placas radiográficas.

II.A.2) AISLAMIENTOS VIRALES UTILIZADOS

II.A.2A) ORIGINARIOS DE DIVERSAS REGIONES GEOGRÁFICAS

Para el estudio de variabilidad de secuencia del gen p27 se seleccionaron diez aislamientos virales de distinta procedencia geográfica correspondientes a cada uno de los cinco biogrupos determinados por *indexing* en plantas indicadoras (Tabla I). Para el análisis se introdujeron al país los dsRNAs (no infectivos) correspondientes a los distintos aislamientos virales.

II.A.2B) ORIGINARIOS DE ARGENTINA

Para el estudio de la variabilidad inter e intrapoblacional del gen p27 en aislamientos argentinos de CTV se seleccionaron once aislamientos originarios

de distintas regiones cítricas del país y provenientes de diferentes especies de cítricos infectados. Dichos aislamientos se caracterizaron por *indexing* biológico en la Estación Experimental Concordia-INTA de Entre Ríos, Argentina (Costa, 1995) (Tabla II).

Tabla I. Clasificación de los aislamientos de CTV de acuerdo a los síntomas producidos en plantas indicadoras.

indicador	biogrupo I	biogrupo II	biogrupo III	biogrupo IV	biogrupo V
lima mexicana ^z	+	+	+	+	+
naranja dulce/ naranja agrio ^y	-	+	+	+	+
pomelo o naranja agrio ^x	-	-	+	+	+
pomelo ^z	-	-	-	+	+
naranja dulce ^z	-	-	-	-	+
aislamiento^w	T32^v T55 T385 K	T300 T312 T346 50	T36 VT C268-2 Pera GS	C269-6 C270-3 Baraõ B P6	T305 T388 Capaõ bonito

Síntomas observados: ^zacanaladuras en el tronco (*stem pitting*), ^ydecaimiento (*decline*), ^xamarillamiento de plantines (*seedling yellows*).

^wOrigen de los aislamientos: T32, T300, T305, T312, T346, T385 y T388, España; C268-2, C269-6 y C270-3, Argentina; 50, Baraõ B, Capaõ Bonito (multiplicado en naranja *Valencia* y en naranja *Calderón*) y Pera GS, Brasil; T36, T55 y K, Estados Unidos; VT, Israel; P6, Uruguay. ^vEn negrita se indican los aislamientos seleccionados para el análisis del gen p27.

Tabla II. Aislamientos argentinos de CTV. Origen geográfico, hospedador original y biogrupo.

Aislamiento	Origen geográfico	Hospedador original	Biogrupo ^z
C257-2	Entre Ríos	naranja dulce <i>Pineapple</i>	II
C257-7	Salta	pomelo <i>Henninger</i> / mandarina <i>Cleopatra</i>	V
C257-9	Corrientes	naranja dulce <i>Valencia late</i>	III
C257-10	Corrientes	naranja dulce <i>Valencia late</i>	III
C268-2	Entre Ríos	naranja dulce <i>Valencia frost</i>	III
C269-1	Tucumán	pomelo <i>Red blush</i> / limón rugoso	IV
C269-6	Salta	pomelo <i>Star ruby</i> / citrumelo	IV
C270-3	Entre Ríos	pomelo <i>Rio red</i> / citrumelo	IV
C271-2	Catamarca	naranja dulce <i>Hamlin</i> / mandarina <i>Cleopatra</i>	II
C271-8	Catamarca	mandarina/ naranja agrio	II
C278-1	Tucumán	pomelo <i>Ruben pink</i>	IV

^zDe acuerdo a la sintomatología producida en los siguientes hospedadores: lima mejicana, naranja agrio, naranja dulce *Pineapple* y pomelo *Duncan*.

II.A.2C) AISLAMIENTOS VIRALES PRESENTES EN BANCO DE DATOS UTILIZADOS EN LAS COMPARACIONES DE SECUENCIAS

En las comparaciones de secuencias de distintas regiones del genoma de CTV se utilizaron secuencias de distintos aislamientos depositadas en el *GenBank* (*National Institute of Health*, Bethesda, Maryland, USA). A continuación se indican los números de acceso y las características de los aislamientos utilizados.

T385: aislamiento débil, de España (Vives *et al.*, 1999; GI:4239714).

T30: aislamiento débil, de Florida (Albiach-Martí *et al.*, 2000a; GI:7839606).

T36: aislamiento que causa declinamiento rápido, de Florida (Karasev *et al.*, 1995; GI: 806738)

VT: aislamiento que causa *seedling yellows*, de Israel (Mawassi *et al.*, 1996; GI: 1732493)

SY568: aislamiento que causa *stem pitting* severo, de California (Yang *et al.*, 1999; GI: 2098825)

NUagA: aislamiento que causa *seedling yellows*, de Japón (Suastika *et al.*, 2000; GI: 11414863)

II.A.3) CEPAS BACTERIANAS

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron bacterias de la especie *Escherichia coli* con genotipos modificados genéticamente. Las cepas que se usaron son: DH5 α F' e INVITRO α F' [*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*]. Básicamente, ambas cepas son deficientes en recombinación y permiten que ocurra α -complementación si se utilizan vectores que codifican para la región aminoterminal de la β -galactosidasa. Poseen además el episoma F', que codifica para el *pilus* sexual, por lo que pueden ser infectadas por el fago M13.

II.A.4) VECTORES DE CLONADO

El plásmido pcDNA II (*Invitrogen Corporation*), utilizado para generar los clones de la biblioteca genómica de CTV, se empleó también para el subclonado de los fragmentos de dichos clones. Dicho vector está compuesto de: un gen de resistencia a ampicilina; un fragmento del DNA de *E. coli* que contiene la secuencia regulatoria y la región que codifica para los primeros 146 aminoácidos del gen de la β -galactosidasa (*lacZ*); el origen de replicación del plásmido pBR322; el origen del fago f1 y el sitio de clonado múltiple ubicado dentro del gen *lac Z*. Este tipo de vector se utiliza para transformar bacterias que codifican la región carboxilo terminal del gen *lacZ*, de modo que se produzca el fenómeno de α -complementación. Las bacterias transformadas con plásmido no recombinante degradan el sustrato cromogénico X-gal en presencia del inductor gratuito IPTG y producen colonias azules. La inserción de un fragmento de DNA interrumpe el marco de lectura de dicho gen y, a

causa de ello, en las bacterias transformadas con plásmidos recombinantes no se produce la α -complementación y las colonias resultantes son blancas. Esta característica fenotípica se utiliza para identificar las colonias transformadas con plásmidos recombinantes.

Los productos de amplificación del gen p27 se clonaron en los vectores pGEM-T y pGEM-T *Easy* (Promega). Estos vectores derivan del plásmido pGEM-5Zf(+) digerido con *EcoR* V, al que se le agregan timidinas 3' terminales en ambos extremos. La presencia de estos nucleótidos permite la ligación exitosa de los productos de amplificación generados con *Taq* polimerasa (que incorpora, con frecuencia y de manera independiente del templado, una adenina en los extremos 3' de los productos que genera). Ambos plásmidos poseen también un gen de resistencia a ampicilina. Contienen, además, la secuencia regulatoria y la región codificante para el extremo aminoterminal de la proteína codificada por el gen *lac Z*.

Los tres vectores presentan los sitios de *annealing* de los *primers* universales de M13 y de los *primers* T7 *promotor* y SP6 *promotor*, que permite utilizarlos para la secuenciación de los insertos clonados. Además, contienen las secuencias de los promotores de las RNA polimerasas DNA dependientes de los fagos SP6 (de *Salmonella typhimurium*) y T7 (*E. coli*) en la secuencia flanqueante al *polylinker*. La presencia de estos promotores permite sintetizar transcriptos *in vitro* utilizando las RNA polimerasas citadas.

II.A.5) SOLUCIONES

En todos los casos, si no se indica lo contrario, los valores de concentraciones expresadas corresponden a concentraciones finales. Las soluciones se esterilizan por filtración (filtros de 0,2 μ m) o calor húmedo (autoclave 15 min a 121 °C).

II.A.5A) PARA CULTIVO DE BACTERIAS

Medio LB: se disuelven 5 g de NaCl, 10 g de bacto triptona y 5 g de extracto de levadura en 900 ml de agua destilada. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el volumen a 1000 ml con agua destilada. Se esteriliza en autoclave.

Medio *Terrific Broth*: se disuelven 12 g de bacto triptona y 24 g de extracto de levadura en 800 ml de agua destilada, se agregan 4 ml de glicerol y luego se lleva el volumen a 900 ml con agua destilada. Se esteriliza en autoclave. Antes de usar se agregan 100 ml de una solución estéril de KH_2PO_4 (0,17 M) y K_2HPO_4 (0,72 M).

Para preparar medios de cultivo sólidos se agregan 15 g de agar por cada 1000 ml de medio líquido.

Ampicilina: se disuelven 100 mg de droga sólida en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

II.A.5B) PARA EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Solución I: glucosa 50 mM, EDTA 10 mM (pH 8), TrisHCl 25 mM (pH 8).

Solución II: NaOH 0,2 N, 1% SDS.

Solución III: KAcO 5M 60 ml, AcOH glacial 11,5 ml y 28,5 ml de agua destilada (la solución resultante tiene una concentración 3 M de K y 5 M de acetato).

Las soluciones I y III se esterilizan por filtración.

Fenol (pH 8): cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 25:24:1 (v/v).

Cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 24:1 (v/v).

PEG₈₀₀₀ 13% (P/V) en agua bidestilada estéril. Se esteriliza por autoclave.

Fenol pH 8: se funde el fenol, se le agrega hidroxiquinoleína (0,1% p/v) y se adiciona un volumen de Tris-HCl pH 8 (0,5 M). Se agita durante 30 min, se estaciona hasta que se separen las fases y se elimina la fase acuosa. Este procedimiento se repite hasta que la fase fenólica alcance pH >7,8. Se agregan 0,1 volúmenes de Tris-HCl pH 8 (0,1 M) y se guarda en botella oscura a 4°C.

II.A.5C) PARA EXTRACCIÓN DE dsRNA

Buffer STE 1x: NaCl (0,1 M), Tris-HCl pH 8 (10 mM), EDTA pH 8 (1 mM). Se lleva a pH 6,5 con ácido clorhídrico.

Fenol ácido: se funde el fenol, se lo mezcla con un volumen de *buffer* STE 2x (pH 6,5), se agita durante 30 min y luego se deja separar las fases. El proceso se repite hasta que la fase acuosa (y por ende la fase fenólica) alcance el pH deseado.

Acetato de sodio (NaAcO) 3M (pH 5,5): se disuelve el acetato y se lleva a pH mediante el agregado de ácido acético glacial.

II.A.5D) PARA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES DE CÍTRICO

Buffer de extracción: Tris-HCl pH 7,5 (50 mM), NaCl (700 mM); EDTA pH 8 (10mM), CTAB 2%, p/v).

II.A.5E) PARA ELECTROFORESIS

Buffer de electroforesis TAE 50x: se disuelven, en 700 ml de agua destilada, 242 g de Tris base y se agregan 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M (pH 8). El volumen se ajusta a 1000 ml con agua destilada.

Buffer de electroforesis TBE 5x: se disuelven 54 g de Tris base y 27,5 g de ácido bórico en 800 ml de agua destilada. Se agregan 20 ml de EDTA pH 8 (0,5 M) y el volumen se ajusta a 1000 ml con agua destilada.

Agarosa disuelta en *buffer* TAE 1x.

Solución *stock* de poli(acrilamida): acrilamida y bis(acrilamida) disueltas en agua bidestilada estéril.

Geles de poliacrilamida: volumen necesario de solución *stock* de acrilamida para llegar a la concentración final deseada, TBE 1x, TEMED (0,1% v/v) y persulfato de amonio (1% v/v a partir de una solución *stock* de 100 mg/ml).

Buffer de siembra (6x): glicerol (30% v/v), azul de bromofenol (0,25% p/v), azul de xilencianol (0,25% p/v) en TAE 1x o TBE 1x.

Buffer de desnaturalización para análisis de SSCP: formamida desionizada (95% v/v), EDTA (20 mM), azul de bromofenol (0,25% p/v).

II.A.5F) PARA TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA CON NITRATO DE PLATA

Solución de fijación: ácido acético glacial 10% (v/v) en agua bidestilada.

Solución de tinción: nitrato de plata 0,2% (p/v) disuelto en agua bidestilada con el agregado de 250 μ l de formaldehído 40%.

Solución de revelado: carbonato de sodio 3% (p/v) disuelto en agua bidestilada con el agregado de 200 μ l de formaldehído 40% y 24 μ l de tiosulfato de sodio de concentración inicial 10 mg/ml por cada 100 ml de solución.

Solución de *stop*: ácido acético glacial 10% (v/v) en agua bidestilada.

II.A.5G) PARA PREHIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN

SDS 10%: se disuelven 100 g del detergente en 900 ml de agua, se ajusta el pH a 7,2 con HCl y se lleva el volumen a 1000 ml. Se esteriliza en autoclave.

SSC 20x: se disuelven 175,3 g de NaCl y 88,2 g de citrato trisódico en 800 ml de agua. Se ajusta el pH a 7 con HCl y luego se lleva el volumen a un litro. Se esteriliza en autoclave.

Denhardt 50x (*Denhardt*, 1966): se disuelven 5 g de Ficoll, 5 g de PVP y 5 g de BSA en 500 ml de agua bidestilada. Se esteriliza por filtración.

DNA de esperma de arenque: se disuelven 100 mg en 10 ml de agua bidestilada estéril. A continuación se agrega NaCl hasta alcanzar una concentración final de 0,1 M y se extrae con fenol pH 7,8 hasta que se reduzca la interfase de proteínas desnaturalizadas. Luego se realizan extracciones con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (relaciones 25:24:1) y se recupera la fase acuosa. Esta se pasa a través de una aguja hipodérmica para reducir el tamaño de los fragmentos de DNA. El ácido nucleico se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se centrifuga y el *pellet* se disuelve en agua bidestilada estéril (a concentración 10 mg/ml). La concentración se determina por absorbancia a 260 nm. En la solución de prehibridación se usa este DNA a una concentración final de 100 μ g/ml.

Solución de trabajo para prehibridación: SSC (6x), SDS (1%), *Denhardt* (5x) y RNA de levadura (2 mg/ml) o DNA de esperma de arenque (100 μ g/ml), como agente bloqueante.

II.A.5H) PARA TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Colony blot: a) solución de desnaturalización: NaOH (0,5 N); b) solución de neutralización: Tris-HCl pH 7,5 (0,5 M); c) solución salina: SSC 2x; d) solución alcohólica (etanol 96%).

Southern blot: a) solución de desnaturalización: NaCl (1,5 M), NaOH (0,5 N); b) solución de neutralización: NaCl (1,5 M), Tris-HCl pH 7,5 (0,5 M); c) solución de transferencia: SSC 10x.

Northern blot: a) solución de desnaturalización: NaCl (10 mM), NaOH (50 mM); b) solución de neutralización: *buffer* fosfato 25 mM (dilución 1/10 v/v de una solución *stock* 250 mM), c) solución de transferencia: *buffer* fosfato 25 mM.

Solución *stock* de *buffer* fosfato (250 mM): se disuelven 23,4 g de NaH₂PO₄ 2H₂O en 400 ml de agua destilada estéril, esta solución tiene pH 4,6. Aparte se disuelven 17,8 g de Na₂HPO₄ 2H₂O en 400 ml de agua destilada estéril. La segunda solución tiene un pH de 9,1. Posteriormente, a la solución de pH 4,6 se le agrega solución de pH 9,1 hasta alcanzar pH 6,5.

II.A.5I) PARA ENSAYOS DE PROTECCIÓN A RNASAS

Buffer de hibridación: PIPES pH 6,4 (40 mM), EDTA pH 8,0 (1 mM), NaCl (400 mM), formamida desionizada (80% v/v).

Buffer de digestión de RNasas: NaCl (300 mM), Tris-HCl pH 7,4 (10 mM), EDTA pH 7,5 (5 mM). Para la digestión se toma la muestra que está en un volumen de *buffer* de hibridación y se le agregan 10 volúmenes de *buffer* de digestión, 24 U de RNasa T1 y RNasa A a concentración final de 3,3 µg/ml.

Extracción de RNasas: SDS (0,5%), proteinasa K (0,3 mg/ml)

Fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1): se utiliza fenol pH 7,8 para evitar que el DNA pase a la fase orgánica.

Buffer de siembra: formamida desionizada (95% v/v), EDTA (20 mM), azul de bromofenol (0,05% p/v), azul de xilencianol (0,05% p/v).

II.A.5J) BUFFERS DE ENZIMAS

De transcriptasa reversa AMV¹ (5x): Tris-HCl pH 8,3 (250 mM), KCl (250 mM), MgCl₂ (50 mM), espermidina (2,5 mM), DTT (50 mM).

De *Taq* polimerasa¹ (10x): Tris-HCl pH 9,0 (100 mM), KCl (500 mM), Tritón X-100 (1%).

De *Klenow*¹ (10x): Tris-HCl pH 7,2 (500 mM), MgSO₄ (100 mM), DTT (1mM).

De T7 RNA polimerasa¹ (5x): Tris-HCl pH 7,9 (200 mM), MgCl₂ (30 mM), espermidina (10 mM), NaCl (50 mM).

De T4 DNA ligasa¹ (10x): Tris-HCl pH 7,8 (300 mM), MgCl₂ (100 mM), DTT (100 mM), ATP (10 mM).

Para digestión con *Kpn* I o *Sau*3A I²: *buffer* 10x, pH 7: Bis Tris propano-HCl (100 mM), MgCl₂ (100 mM), DTT (10 mM).

Para digestión con *Bam*H I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hind* III, *Mnl* I o *Xho* I²: *buffer* 10x, pH 7,9: Tris-HCl (100 mM), MgCl₂ (100 mM), NaCl (500 mM), DTT (10 mM).

Para digestión con *Dde* I²: *buffer* 10x, pH 7,9: Tris-HCl (500 mM), MgCl₂ (100 mM), NaCl (1000 mM), DTT (10 mM).

Para digestión con *Nco* I²: *buffer* 10x, pH 7,9: Tris-acetato (200 mM), acetato de magnesio (100 mM), acetato de potasio (500 mM), DTT (10 mM).

Para digestión con *Bgl* II³: *buffer* 10x, pH 8: Tris-HCl (500 mM), MgCl₂ (100 mM), NaCl (100 mM).

¹*buffers* y enzimas de Promega

²*buffers* y enzimas de New England Biolabs

³*buffer* y enzima de Gibco BRL

II.B) MÉTODOS

En la presente sección se realiza una descripción general de las técnicas utilizadas para la realización del trabajo de tesis. La puesta a punto de las condiciones de empleo de las mismas se describe en la sección que precede a los resultados de cada capítulo. Los reactivos empleados, salvo que se indique lo contrario, se expresan como concentraciones finales.

II.B.1) EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

II.B.1A) EXTRACCIÓN DE RNA DE DOBLE CADENA (dsRNA) (MORRIS *and* DODDS, 1979)

Durante la infección de las plantas con CTV se producen una serie de moléculas de RNA de cadena doble. Estos dsRNAs resultan tanto de la replicación del genoma (forma replicativa o dsRNA *full length*) como de los intermediarios para la expresión de las distintas proteínas codificadas por los genes virales (dsRNAs subgenómicos). Además se producen dsRNAs defectivos, que son formas incompletas del genoma viral. Cuando se desea trabajar con CTV existen dos fuentes para obtener el material de partida, se pueden purificar viriones y extraer de ellos el ssRNA genómico o se puede procesar la corteza de brotes jóvenes de cítricos infectados para obtener los dsRNAs intermediarios antes descritos. Usualmente se elige la segunda opción ya que se obtiene un buen rendimiento y la manipulación del dsRNA es más simple que la del ssRNA. La extracción de las moléculas de dsRNA presentes en los tejidos de cítricos infectados permite disponer del material de partida para las reacciones de RT-PCR y para la generación de sondas marcadas radiactivamente.

La corteza de brotes jóvenes de cítricos infectados se congela en N₂ líquido y se muele en mortero hasta reducirla a polvo. Posteriormente se resuspende en una solución de STE 2x (tres veces el peso de la corteza en volumen), SDS 1%, β-mercaptoetanol 0,5% y fenol (equilibrado con STE 2x)/cloroformo (dos volúmenes). La mezcla se agita durante 30 min y luego se centrifuga, extrayendo la fase acuosa. A esta última se le agrega etanol hasta alcanzar una concentración de 16,5% (v/v). Luego se le incorpora celulosa *Whatman* CF11, previamente lavada con una solución de STE 1x, con una concentración final de etanol de 16,5% y se incuba en hielo con agitación durante 30 min (en esas condiciones el dsRNA interacciona con la celulosa). Con la mezcla se prepara una columna en una jeringa de vidrio y se lava con una solución de STE 1x con etanol 16,5% (v/v). El dsRNA se eluye con *buffer* STE 1x sin etanol y se precipita a -20°C con NaAcO 0,3M y 2,5 volúmenes de etanol. Se centrifuga a 16270 x g, a 4°C, durante 40 min y el precipitado se disuelve en 400 μl de STE 1x. Posteriormente se realiza una segunda precipitación con acetato de sodio, se centrifuga y el *pellet* se lava con etanol 70%. Se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril o STE 1x.

II.B.1B) EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES DE CÍTRICOS

La extracción de ácidos nucleicos totales de cítricos sanos se emplea como material para realizar los controles de especificidad de las reacciones de cDNA, PCR e hibridación.

Las hojas de cítricos se muelen en *buffer* de extracción estéril (Tris-HCl, 50 mM; NaCl 700mM; EDTA pH8 10mM y CTAB 2%, p/v) y se incuban a 50°C durante 30 min. Las proteínas se extraen dos veces con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y la fase acuosa se precipita con un volumen de isopropanol. Luego se centrifuga a 34.400 x g 10 min, se elimina el sobrenadante y el *pellet* resultante se lava con etanol 70%. Se elimina el etanol, se seca el precipitado y se lo resuspende en agua bidestilada estéril.

II.B.1C) MINIPREPARACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

II.B.1C.1) MÉTODO DE LISIS ALCALINA (BIRNBOIM *and* DOLY, 1979)

Este método se utiliza para separar el DNA plasmídico de los componentes macromoleculares bacterianos (incluyendo el DNA cromosomal). Las condiciones de alta alcalinidad (pH 12,0 a 12,6) causan la desnaturalización del DNA cromosómico de la bacteria sin afectar al DNA plasmídico debido a que este último es circular y covalentemente cerrado. Con el agregado de una solución rica en sales (solución III) se baja el pH y se dan las condiciones para que se produzca la precipitación de los ácidos nucleicos y de las proteínas bacterianas.

La purificación se realiza a partir de un cultivo bacteriano saturado en medio LB con ampicilina. Para ello se centrifuga, a 34.400 x g durante 1 min, una alícuota

de 1 ml cultivo. Este procedimiento se repite tres veces. Posteriormente se resuspende el *pellet* obtenido en 200 μ l de solución I, se agregan 300 μ l de solución II (fresca) y se incuba en agua-hielo durante 5 min. Luego se neutraliza el pH por el agregado de 300 μ l de solución III y se incuba durante el mismo tiempo en agua-hielo. El DNA cromosómico, los restos celulares y las proteínas complejadas con el SDS se eliminan por centrifugación durante 15 min. Se toma el sobrenadante, que se extrae con un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) para eliminar proteínas, y se precipita el DNA plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado un volumen de isopropanol. Se centrifuga 20 min a 34.400 $\times g$ y el *pellet* resultante se lava con etanol 70%, se seca en microcentrífuga de vacío y se resuspende en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril.

II.B.1C.2) MÉTODO DE LISIS ALCALINA / PRECIPITACIÓN CON PEG (*Applied Biosystems*)

Las preparaciones de DNA plasmídico para secuenciación automática (utilizando el secuenciador modelo 373A de *Applied Biosystems*) se realizaron de acuerdo al método de lisis alcalina y precipitación con PEG descrito en el manual de instrucciones del equipo. Este método es semejante al de *Birnboim & Doly*, pero tiene algunas modificaciones.

Para obtener un mayor número de bacterias se las cultiva en medio *Terrific Broth*, que es un medio más nutritivo que el LB. Al sobrenadante obtenido tras precipitar el DNA cromosomal se le agrega RNasa A para eliminar el RNA bacteriano que interfiere en las reacciones de secuenciación. Una vez cumplida la etapa de incubación a 37°C, la enzima se extrae con medio volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (este procedimiento se repite dos veces). El DNA de la fase acuosa se precipita con un volumen de isopropanol 100 % y se centrifuga a 34.400 $\times g$ durante 10 min. El *pellet* se lava con etanol 70 %, se seca en microcentrífuga de vacío y se resuspende en agua bidestilada estéril. Se realiza una segunda precipitación del DNA plasmídico con NaCl (400 mM) y PEG₈₀₀₀ (6,5%). Tras incubar en hielo durante 20 min, se somete a centrifugación en frío a 34.400 $\times g$ durante 30 min y el precipitado resultante se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril.

II.B.2) ELECTROFORESIS (*SAMBROOK et al.*, 1989)

Las técnicas de electroforesis permiten separar los ácidos nucleicos según su peso molecular. La fricción que soportan las moléculas en su migración a través de la trama del gel es proporcional a su tamaño, por ende, las moléculas pequeñas migran a mayor velocidad que las grandes.

II.B.2A) ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La agarosa es un polímero lineal extraído de un alga que se disuelve en el *buffer* de electroforesis. Cuanto mayor es la concentración de la agarosa menor

es el poro de la matriz. Los fragmentos de gran tamaño se resuelven en geles con poros de mayor tamaño mientras que para resolver fragmentos pequeños se emplean geles de poros pequeños. A la preparación de agarosa se le agrega bromuro de etidio (0,5 µg/ml), un colorante fluorescente que contiene un grupo plano que se intercala entre las bases del DNA. Cuando el mismo se irradia con luz ultravioleta de 300-310 nm, la molécula se excita y emite energía a 590 nm lo cual permite la visualización de los ácidos nucleicos. Este colorante puede utilizarse tanto para detectar RNA como DNA en cadena simple o doble.

En el caso de verificar integridad y tamaño de sondas marcadas con [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP, los ácidos nucleicos se fijan, una vez resueltos, a la matriz del gel con ácido tricloroacético al 10%. Luego, el gel se seca y se expone sobre película radiográfica con pantalla amplificadora a -70°C , el tiempo necesario.

II.B.2B) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La acrilamida es un monómero que, en presencia de radicales libres (provistos por el persulfato de amonio) y de un agente estabilizante de los mismos (TEMED), se polimeriza formando largas cadenas lineales. Cuando se incorpora el agente bifuncional bisacrilamida se forman entrecruzamientos entre los polímeros lineales.

II.B.2B.1) GELES NO DESNATURALIZANTES (NATIVOS)

Los productos de las extracciones de dsRNA de CTV se resuelven en geles de acrilamida-bisacrilamida 6% (*stock* acrilamida:bisacrilamida 40:1), *buffer* TBE 1x, TEMED y persulfato de amonio. La separación se lleva a cabo en minigeles de poliacrilamida en una cuba *Mini-PROTEAN II* de Bio-Rad, a 60 V, durante seis h, en *buffer* TBE 1x. Este tipo de geles permite resolver el dsRNA *full-length* y los distintos RNAs subgenómicos. La observación de los mismos se realiza por tinción con bromuro de etidio o con nitrato de plata.

Para el análisis por SSCP se preparan geles nativos de la concentración adecuada (según el tamaño del fragmento a resolver), a partir de una solución *stock* 31% (acrilamida:bisacrilamida 30:0,8), *buffer* TBE 1x, TEMED y persulfato de amonio. Para la resolución se emplea una cuba electroforética *Mighty Small II* (Hoefer SE250/SE260) y la temperatura se mantiene constante durante el proceso por medio de la circulación de agua proveniente de un baño de temperatura regulada (modelo 9905 *PolyScience*). La electroforesis se realiza a 200 V durante 3 h en *buffer* TBE 1x. Las bandas presentes en el gel se visualizan por coloración con nitrato de plata.

II.B.2B.2) GELES DESNATURALIZANTES

Estos geles se polimerizan en presencia de un agente desnaturizante (urea o formamida) que suprime el apareamiento entre las bases de los ácidos

nucleicos. En este caso la migración de las moléculas sólo depende del tamaño y no de la composición en bases, secuencia o estructura.

Para el análisis de los productos generados por transcripción *run-off* y los resultantes de los ensayos de protección a RNAsas se utilizan geles desnaturizantes de poliacrilamida 4% (a partir de una solución *stock* 38:2), *buffer* TBE 1x, TEMED y persulfato de amonio con una concentración final de urea 7 M. La electroforesis se realiza a 120 V durante 30 min en *buffer* TBE 1x. Las bandas presentes en el gel se visualizan por tinción con bromuro de etidio, con nitrato de plata o autorradiografía.

II.B.3) PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

II.B.3A) PURIFICACIÓN DE RNA

Cuando se generan transcriptos marcados por el método de transcripción *run-off* es necesario separarlos del nucleótido no incorporado. La purificación se puede realizar luego de resolver los productos en un gel de agarosa o directamente a partir de la solución de síntesis.

II.B.3A.1) PURIFICACIÓN DE RNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA (RNAid, BIO 101, INC., VISTA, CA)

Los transcriptos se resuelven en un gel de agarosa 0,8%-TAE 1x. El gel se expone a placas autorradiográficas que, una vez reveladas, permiten determinar la región donde se encuentra la sonda. Se corta esta zona y se agregan 0,3 volúmenes de una solución salina (*RNA binding salt*). La mezcla se incuba a 50°C el tiempo necesario para disolver la agarosa y se incorpora 1 µl de una matriz de unión de RNA (*RNAid matrix*) por cada µg de RNA. Se incuba 5 min y se centrifuga durante 1 min a 34.400 x g. El *pellet* se lava tres veces con solución de lavado (*RNA wash solution*), se agregan 20 µl de agua bidestilada estéril y se incuba durante 5 min a 50°C para despegar el RNA de la matriz. Se centrifuga 5 min a 34.400 x g y se toma el sobrenadante.

II.B.3A.2) PURIFICACIÓN DE RNA EN SOLUCIÓN (RNAID KIT, BIO 101 INC., VISTA, CA)

Los transcriptos no se resuelven en gel de agarosa sino que a la mezcla de transcripción *in vitro* se le agregan directamente tres volúmenes de solución salina (*RNA binding salt*) y 2 µl de matriz de unión de RNA. El resto del procedimiento es similar al descrito en el párrafo anterior.

II.B.3A.3) PRECIPITACIÓN DE RNA CON ACETATO DE AMONIO

Tras la digestión del DNA molde de la transcripción con DNasa RQ 1, la enzima se extrae con fenol:cloroformo:isoamílico. El RNA, presente en la fase acuosa, se precipita con 0,2 volúmenes de acetato de amonio 5 M (concentración inicial) y 2,5 volúmenes de etanol frío. Se incuba 1 h a -80°C y se centrifuga a 34.400 x g durante 1 h a 4°C. El *pellet* obtenido se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril.

II.B.3A.4) PRECIPITACIÓN DE RNA CON tRNA DE LEVADURA

Los productos de los ensayos de protección a RNAsas se precipitan en presencia de un RNA portador (*carrier*). La inclusión de tRNA de levadura permite precipitar cantidades muy pequeñas de ácido nucleico. A cada tubo del experimento se le agregan 4 µg de este *carrier* y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se incuba durante 1 h a -20°C y se centrifuga a 34.400 x g, a 4°C, durante 1 h. El *pellet* obtenido se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en un volumen adecuado de *buffer* de siembra.

II.B.3B) PURIFICACIÓN DE DNA

II.B.3B.1) PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA (GENECLEAN II KIT, BIO 101, INC., VISTA, CA)

La sección del gel que contiene el DNA se disuelve con NaI. A la agarosa disuelta se le agrega polvo de vidrio (*glass milk*), se mezcla y se incuba en hielo durante 15 min para favorecer la unión del DNA. La suspensión se centrifuga y se lava tres veces con *New Wash* (NaCl, etanol y agua). El *pellet* de polvo de vidrio se seca bien para eliminar los restos de alcohol y se agrega agua bidestilada estéril. Por medio de una incubación de 5 min a 50°C, seguida de centrifugación, se libera el DNA adherido al polvo de vidrio. El sobrenadante contiene el DNA de interés en solución.

II.B.3B.2) PRECIPITACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR CON PEG₆₀₀₀

La precipitación con PEG₆₀₀₀ en presencia de sales permite separar los productos de PCR de los *primers* y nucleótidos no incorporados en la reacción. Para purificar los mismos se agregan 0,6 volúmenes de PEG₆₀₀₀ 20% (p/v)/NaCl 2,5 M y se realizan incubaciones de 10 y 30 min a 37°C y 4°C, respectivamente. A continuación se centrifuga durante 20 min a 34.400 x g y el *pellet* resultante se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril.

II.B.4) AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

II.B.4A) OBTENCIÓN DEL cDNA

Las DNA polimerasas termoestables empleadas en las reacciones de PCR son enzimas que utilizan DNA como molde de síntesis. Por ende, cuando el material de partida para la amplificación es RNA, es necesario realizar primero una reacción de transcripción reversa para generar moléculas de cDNA que se utilizan como molde en las reacciones siguientes.

En el caso de CTV el dsRNA se desnaturaliza por calor en presencia del o los *primer/s* de interés. Tras enfriar en hielo se incorpora hidróxido de metilmercurio (2,4 mM) para mantener a ambas hebras en estado monocatenario y se incuba 10 min a temperatura ambiente. Luego se agrega β-mercaptoetanol (34 mM), *buffer* de AMV (1x), dNTP's (0,2 mM de cada uno),

7,2 U de RNAsin y 5 U de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV). La mezcla se homogeneiza y se incuba a 42°C durante dos horas. El producto generado en la reacción de transcripción reversa se utiliza posteriormente como molde en las reacciones de PCR.

II.B.4B) REACCIÓN DE PCR (SAIKI *et al.*, 1988)

Esta técnica permite amplificar un DNA molde hasta 10^6 veces a partir de cantidades ínfimas de dicho material. Como se utilizan polimerasas termoestables, cada ciclo, que incluye las etapas de desnaturalización, *annealing* y extensión puede repetirse varias veces produciéndose, en cada uno de ellos, un incremento exponencial de la molécula deseada. Además, como en la reacción se utilizan *primers* de secuencia específica, se acota la longitud del producto de acuerdo a lo deseado.

Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador *1605 Air ThermoCycler (Idaho)* o en un ciclador *Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER)*. En el primero de los casos la transferencia de calor se produce en una cámara de aire que rodea a las muestras cargadas en capilares de vidrio. En el ciclador de PERKIN ELMER la transferencia de calor se realiza a través de la base donde se colocan los tubos en los que se lleva a cabo la reacción. La tapa de este equipo también está termostatazada por lo que no es necesario agregar aceite mineral a la muestra para prevenir la evaporación.

En la reacción se incluye: *buffer* de DNA polimerasa (1x); dNTP's (0,2 mM de cada uno); $MgCl_2$ (2 mM); *primers* directo y reverso (0,5 mM cada uno) y *Taq* DNA polimerasa (0,15 U). En las reacciones efectuadas en un ciclador *Idaho* debe agregarse BSA no acetilada (500 μ g/ml) para evitar la desnaturalización de la polimerasa en la superficie del capilar.

II.B.4B.1) AMPLIFICACIÓN DE GENES DE CTV

Las condiciones de amplificación (temperatura y tiempo de *annealing* y tiempo de extensión) deben ajustarse de acuerdo al equipo utilizado, a los *primers* empleados y al tamaño del fragmento a amplificar. Las reacciones se realizan en cualquiera de los dos cicladores térmicos mencionados ajustando las condiciones de ciclado. Como molde para las reacciones se utiliza una alícuota del producto generado en la reacción de cDNA.

II.B.4B.2) ANÁLISIS DE BACTERIAS TRANSFORMADAS

La verificación de la presencia y tamaño de los insertos se realiza por PCR, con los *primers* -20 directo y -24 reverso del fago M13 y con *primers* complementarios a las secuencias promotoras para las RNA polimerasas de T7 y SP6, presentes en los vectores de clonado utilizados. Para el análisis se emplea material de colonia o de estría. Una pequeña cantidad de cultivo bacteriano se deposita en la pared de un tubo *Eppendorf*, se resuspende en

agua bidestilada estéril, incuba a 100°C a baño María y se centrifuga a 34.400 x g durante 10 min. Una alícuota del sobrenadante se utiliza como molde de las reacciones de PCR. El análisis de colonias empleando *primers* de secuencia específica se efectúa de la misma manera. Las concentraciones de los reactivos son idénticas a las descritas en la sección anterior y las condiciones de ciclado se determinan para cada producto.

II.B.5) PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

II.B.5A) PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES POR EL MÉTODO QUÍMICO (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Para transformar bacterias de la especie *E. coli* es necesario procesarlas para obtener un estado de competencia que les permita adquirir DNA foráneo del medio circundante. La preparación de bacterias competentes se realizó de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989) según una variación del método de Cohen (1972).

Se cultiva la cepa de interés, DH5 α F', de *E. coli* durante toda la noche con agitación y a 37°C en medio LB. Posteriormente, se diluye el cultivo 1/100 en el mismo medio y las bacterias se crecen hasta lograr una DO₆₀₀ de alrededor de 0,6. Las bacterias se incuban durante 30 min en hielo, se centrifugan (todas las centrifugaciones se realizan a 4°C, durante 10 min y a 2600 x g) y se resuspenden en 100 ml de una solución de CaCl₂ 100mM (para el *pellet* resultante de 1 l de medio). Se incuban en agua-hielo durante 30 min, se centrifugan y se resuspenden en 2 ml de CaCl₂ 100mM, se fraccionan y congelan, conservándose a -135°C hasta su utilización.

II.B.5B) PREPARACIÓN DE BACTERIAS PARA ELECTROPORACIÓN (SLIVINSKI, 1990)

En bacterias a utilizar para electrotransformación no es necesario producir alteraciones en la pared por métodos químicos para inducir la competencia sino, simplemente, lavarlas con glicerol 10% para eliminar todas las sales que pudieran interferir en la conducción del impulso eléctrico.

A partir de un cultivo saturado se realiza una dilución 1/100 en medio LB sin NaCl y se cultiva a 37°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una OD de 0,5 a 600 nm. Las bacterias se centrifugan (a 4°C, durante 10 min y a 2600 x g) y se resuspenden en glicerol 10% (v/v). El proceso de resuspensión y centrifugación se repite tres veces, disminuyendo el volumen de glicerol utilizado en los lavados. Por último, las bacterias se resuspenden en un volumen adecuado de glicerol 10% (2 ml para un cultivo inicial de 1000 ml), se separan en alícuotas y se congelan rápidamente. Se conservan a -135°C hasta el momento de utilización.

II.B.6) MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

II.B.6A) TRANSFORMACIÓN POR *SHOCK* TÉRMICO (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Se mezclan las bacterias competentes obtenidas por el método químico con el producto de ligación y se incuban durante 30 min en agua-hielo. Luego se produce un *shock* térmico de no más de 2 min a 42°C y la mezcla se incuba nuevamente en agua-hielo durante 10 min. Tras este tratamiento las bacterias se crecen a 37°C, una hora, en medio LB sin antibiótico y se siembran en placas de LB con ampicilina (100 µg/ml). Para realizar la identificación fenotípica de las colonias transformadas con plásmidos recombinantes, en cada caja se plaquean, antes de la siembra de las bacterias, 30 µl de una solución de X-Gal de concentración 10 mg/ml y 2 µl de IPTG 1M.

II.B.6B) TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

En la electrotransformación las bacterias se someten a un campo eléctrico que crea poros transitorios en su pared, por los que se produce el ingreso de material externo al interior de la célula. Para realizar las electroporaciones se utilizó un electroporador Bio-Rad Gene Pulser™.

La mezcla de las bacterias descongeladas y de la alícuota de la reacción de ligación se realiza en hielo. Posteriormente dicha mezcla se coloca en una cubeta de electroporación fría, que se ubica en el electroporador. Una vez ajustadas las condiciones de la electroporación (2,2 V; 3 µF y 200 ohm) se somete a las bacterias al impulso eléctrico. Posteriormente se las resuspende en medio LB sin antibiótico, se las crece a 37°C durante 1 h y se las siembra en placas de LB conteniendo ampicilina, IPTG y X-Gal en las concentraciones antes descriptas.

Como se utilizaron vectores de clonado con capacidad de α -complementación, las bacterias transformadas, tanto por *shock* térmico como por electroporación, se seleccionaron por la ausencia de color en las placas con el inductor gratuito (IPTG) y el sustrato cromogénico (X-Gal).

II.B.7) MARCACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR MÉTODOS RADIATIVOS (SAMBROOK *et al.*, 1989).

II.B.7A) OBTENCIÓN DE SONDAS DE DNA POR *RANDOM-PRIMING*

La técnica de *random priming* permite la obtención de fragmentos marcados de longitud parcial utilizando como molde un ácido nucleico y como iniciadores de la reacción una mezcla de *primers* de longitud determinada (6 u 8 bases) de y secuencia al azar.

El DNA molde se libera por digestión de minipreparaciones de DNA plásmidico o se obtiene por PCR. En ambos casos se purifica a partir de geles de agarosa por *GeneClean*. Para las reacciones de marcación se usan entre 100 y 200 ng de DNA molde, una mezcla de dNTPs sin dATP (0,5 mM), *primers* pdN6

(0,2 mM), *buffer* de Klenow (1x), fragmento Klenow de la DNA polimerasa (5 U) y 40 μCi de 5' [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP (3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$). La mezcla se incuba a 37°C durante 2 horas y media y una vez concluida la reacción, la sonda se separa de *primers* y nucleótidos no incorporados por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50 (que retiene fragmentos de DNA menores de 20 pb).

II.B.7B) PRODUCCIÓN DE SONDAS DE cDNA POR *RANDOM-PRIMING*

Cuando el molde es RNA, para sintetizar fragmentos de cDNA marcado se utiliza transcriptasa reversa. La mezcla de molde y *primers* pdN6 se somete a ebullición para desnaturalizar ambas cadenas del dsRNA viral, se enfría en agua-hielo y se le agregan 50 U de inhibidor de RNAsas (RNAsin, Promega). Se incuba 7 min a temperatura ambiente y se incorporan: *buffer* de AMV (1x); espermidina (0,5 mM); DTT (10 mM); dNTPs sin dATP (1 mM); 5' [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP (50 μCi) y la transcriptasa reversa AMV (11,5 U). Posteriormente, la mezcla se incuba a 42°C durante 2 h y los fragmentos resultantes se purifican por pasaje a través de una columna de cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50.

II.B.7C) OBTENCIÓN DE SONDAS POR PCR

Esta técnica permite la síntesis de sondas de una región definida de un clon o del genoma empleando los *primers* de interés.

Las condiciones de reacción y los reactivos que se usan son iguales a los de una reacción de PCR convencional, con la excepción de la concentración de los dNTPs. Se utiliza una mezcla donde la concentración de dATP (0,02 mM final) es diez veces menor que la de los demás nucleótidos y se agregan 10 μCi de 5' [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP (3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) por reacción. Las sondas obtenidas se purifican por pasaje por una columna de cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50. La integridad y el tamaño de las mismas se verifican por separación en gel de agarosa 0,8%.

II.B.7D) SÍNTESIS DE RNAs MARCADOS POR *RUN-OFF TRANSCRIPTION*

La presencia de promotores para las RNA polimerasas DNA dependientes de los fagos SP6 y T7 en los vectores de clonado permite realizar la síntesis de transcriptos *in vitro*. Estas RNA polimerasas tienen elevada afinidad y especificidad por sus promotores por lo que se las usa para generar transcriptos *in vitro* de la polaridad deseada. Debido a su alta procesividad es necesario linealizar el DNA plasmídico molde por digestión con una enzima de restricción adecuada para generar transcriptos que terminen uniformemente en la posición deseada (*run-off*).

Una vez completada la digestión, las enzimas se extraen con fenol:cloroformo:isoamilico. El DNA molde se precipita con NaAcO (0,3 M) y 2,5

volúmenes de etanol absoluto y el sedimento obtenidos por centrifugación se seca y disuelve en agua bidestilada estéril. El molde para la reacción de transcripción equivale a 100 ng de plásmido recombinante. La síntesis se realiza en presencia de *buffer* de la RNA polimerasa (1x), DTT (10 mM), RNAsin (15 U), T7 RNA polimerasa (15 U), una mezcla de rNTPs fríos (a concentración final 500 μ M de cada uno con excepción del rATP que es 50 μ M) y 50 μ Ci de 5' [α ³²P]rATP (3000 μ Ci/mmol). La mezcla se incuba 1 h a 37°C. El mismo protocolo se emplea para la síntesis de transcritos no marcados, con la excepción de que la concentración final de los cuatro rNTPs es la misma (500 μ M de cada uno).

Para los ensayos de protección a RNasas el DNA molde se elimina por incubación de 10 min a 37°C con 0,8 U de DNasa RQ1 (PromegaTM). La enzima se extrae con fenol:cloroformo:isoamílico y los transcritos marcados, libres de DNA, se purifican por precipitación con NH₄AcO o por unión a una matriz (*RNAid kit* BIO101, Inc., Vista, CA).

II.B.7E) *FILL IN* CON EL FRAGMENTO *KLENOW* DE LA DNA POLIMERASA

Esta técnica permite incorporar nucleótidos a fragmentos de restricción que poseen extremos 5' extendidos. Por medio de esta metodología se pueden producir moléculas con extremos romos. El agregado de un nucleótido marcado permite disponer de marcadores de peso molecular en las electroforesis para verificación de integridad y de tamaño de sondas de DNA y en ensayos de *Southern blot*.

Para generar extremos romos en fragmentos de restricción 5' extendidos se usa 1 μ g del molde, dNTPs (0,1 mM de cada uno), 1 a 4 U del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa y el *buffer* de la enzima (1x). La mezcla se incuba a 37°C durante 15 min. Para eliminar la enzima se realiza una extracción fenólica seguida de precipitación alcohólica del DNA.

Para producir patrones de peso molecular marcados radiactivamente se utilizan entre 1 y 4 μ g de DNA digeridos con una enzima que deje extremos apropiados, 20 μ Ci de [α ³²P]dATP (3000 μ Ci/ mmol), una mezcla de dNTPs sin dATP (0,25 mM de cada uno), 1 a 4 U del fragmento *Klenow* y el *buffer* de la enzima (1x). La mezcla se homogeneiza por agitación y se incuba a 30°C durante 15 min. La reacción se detiene por el agregado de EDTA pH 8 a concentración 20 mM final.

II.B.8) HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Las sondas marcadas radiactivamente se usan para detectar secuencias específicas en ácidos nucleicos transferidos a una membrana o para realizar ensayos de hibridación en solución.

En los ensayos de hibridación en membrana se realiza una incubación previa de 1 h con solución de prehibridación, a la temperatura adecuada, para bloquear las regiones de la misma donde no se transfirió ácido nucleico y minimizar la posibilidad de hibridación inespecífica de la sonda. Luego se agrega la sonda, previamente desnaturalizada por calor, y se incuba a la misma temperatura durante 14 horas. Las membranas se lavan con soluciones que contienen 0,1% de SDS y concentraciones decrecientes de SSC para eliminar hibridaciones inespecíficas. Los filtros se exponen a placas radiográficas y los resultados se observan por revelado de las mismas.

II.B.8A) COLONY BLOT

Esta técnica permite analizar simultáneamente un gran número de colonias e identificar aquéllas que tienen plásmidos recombinantes con los insertos de interés.

En una primera etapa, a partir de las colonias seleccionadas por ausencia de color, se realizan estrías las que una vez crecidas se transfieren a un filtro de papel *Whatman* 541. La lisis de las bacterias se realiza sobre este filtro, por incubación con solución de desnaturalización, luego se disminuye el pH con solución de neutralización. Por medio de una doble incubación con SSC 2x se alcanza la condición salina adecuada para la precipitación del DNA plasmídico que se realiza con etanol 96%. Todas las incubaciones se realizan por duplicado durante 5 min cada una. Posteriormente, el filtro se seca y se guarda hasta el momento de realizar la hibridación.

II.B.8B) SOUTHERN BLOT

Esta técnica permite localizar, por hibridación, las secuencias de interés en una membrana a la que se transfirió el DNA en estudio.

El DNA de interés se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos resultantes se resuelven en geles de agarosa. Previamente a la transferencia se desnaturalizan los ácidos nucleicos en el gel, por medio de dos incubaciones, de 30 min cada una, en solución de desnaturalización, a temperatura ambiente. Posteriormente, se realiza una doble incubación, de 30 min cada vez, en solución de neutralización. El gel se lava con agua destilada estéril, se equilibra con *buffer* de transferencia durante 2 min y las muestras se transfieren, durante 16 h, por capilaridad, en presencia de *buffer* SSC 10x a una membrana *Zeta-Probe* (Bio-Rad), equilibrada con SSC 2x. Los ácidos nucleicos se fijan a la membrana por exposición a luz UV de 320 nm durante 2 min.

II.B.8C) NORTHERN BLOT

En esta técnica se transfiere RNA a una membrana y las secuencias de interés se detectan por hibridación con una sonda de RNA o DNA marcado.

Las moléculas de dsRNA viral se separan en un gel nativo de agarosa. Luego se desnaturalizan, por incubación del gel a 4°C durante 30 min con solución de desnaturalización. A continuación se disminuye el pH, por incubación durante 40 min en solución de neutralización. Este último paso se realiza a temperatura ambiente. Las muestras se transfieren durante 16 h, por capilaridad, a membrana *Zeta-Probe*, usando *buffer* fosfato 25 mM pH 6,5. Los ácidos nucleicos se fijan por exposición a UV (320 nm) durante 2 min.

II.B.8D) DOT BLOT

Los ácidos nucleicos desnaturalizados se aplican a una membrana *Zeta-Probe* (Bio-Rad). Para ello se utiliza un equipo de filtración que permite obtener puntos (*dots*) homogéneos y acelera el pasaje de soluciones a la membrana por medio de la aplicación de vacío (BIO-DOT™ Apparatus, Bio-Rad).

Al dsRNA viral se le agrega un volumen de formamida desionizada, se incuba a 100°C a baño María durante 2 min y se transfiere rápidamente a agua-hielo, donde se lo mantiene hasta el momento de la siembra. El dsRNA viral se fija a la membrana, previamente equilibrada con agua bidestilada estéril, por medio de la aplicación de vacío. Luego de la transferencia, los ácidos nucleicos se fijan por calor (80°C) durante 2 h.

II.B.9) REACCIONES DE LIGACIÓN (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Se llevan a cabo para unir un fragmento de DNA foráneo de interés a un vector adecuado. En los casos en que se ligan insertos con extremos extendidos o productos generados por PCR se usa una relación de tres moléculas de inserto por cada molécula de vector. En aquellos casos donde se ligan moléculas con extremos romos (*blunt*) la relación molar inserto a vector es de 5:1. En las reacciones se utilizan entre 0,5 y 1,5 unidades de T4 DNA ligasa y el *buffer* correspondiente a concentración final 1x. Cuando se llevan a cabo ligaciones en *blunt* se agrega PEG₈₀₀₀ (a concentración final 10%) para incrementar la eficiencia del proceso.

II.B.10) DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas de restricción reconocen secuencias específicas en el DNA y, en las condiciones adecuadas, producen cortes en el mismo.

Para realizar las reacciones de digestión se ajustan las condiciones de acuerdo a lo especificado por los proveedores. La cantidad de enzima que se incluye depende de la cantidad de DNA a digerir, de acuerdo a la definición de unidad enzimática (cantidad de enzima necesaria para digerir totalmente 1 µg de DNA, en un volumen de reacción de 50 µl, durante una hora, en las condiciones adecuadas). Las reacciones se incuban en presencia del *buffer* correspondiente (1x), a la temperatura adecuada y durante el tiempo indicado. Cuando se digieren grandes cantidades de DNA se considera la sobrevida de

las enzimas para reducir la cantidad de unidades enzimáticas, extendiendo el tiempo de incubación. Por análisis en gel, con los correspondientes marcadores de peso molecular y controles sin digerir se verifica si la digestión fue completa.

II.B.11) TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA CON NITRATO DE PLATA (CAETANO-ANOLLÉS *and* GRESSHOFF, 1994)

El gel se agita en solución de fijación durante un tiempo mínimo de 30 min. Posteriormente se realizan tres lavados de 2 min cada uno con agua bidestilada. Luego se agrega la solución de tinción, preparada fresca, y se incuba durante 30 min con agitación. Tras un lavado con agua bidestilada de no más de 30 s se incuba durante 30 min con solución de revelado. La reacción se detiene por el agregado de solución de *stop* (pag. 38). Los geles se conservan en esta solución, en heladera, hasta su secado.

II.B.12) MÉTODOS PARA ANALIZAR VARIABILIDAD DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

II.B.12A) ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS POR SINGLE STRAND CONFORMATIONAL POLYMORPHISM (SSCP) (ORITA *et al.* 1989)

Esta técnica fue descrita inicialmente por Orita y colaboradores (Orita *et al.*, 1988) y permite detectar cambios en las secuencias nucleotídicas de fragmentos de DNA de igual longitud (generalmente obtenidos por PCR). Estos fragmentos, tras ser desnaturalizados, se pliegan según su secuencia nucleotídica y las condiciones del ambiente en que se encuentran, formando estructuras que son estables en esas condiciones (confórmeros). La técnica de SSCP utiliza esta propiedad para detectar, por medio de cambios en la velocidad de migración durante la electroforesis, sustituciones nucleotídicas que alteran la estructura secundaria de un fragmento de DNA de cadena simple. Los patrones de migración se visualizan por medio de la tinción del gel con nitrato de plata o bromuro de etidio. El grado de separación de las cadenas depende de distintos parámetros tales como temperatura durante la electroforesis, concentración del *buffer*, de los agentes desnaturalizantes, del DNA y de poliacrilamida en el gel (Hongyo *et al.*, 1993; Oto *et al.*, 1993). Todas estas variables deben ajustarse hasta lograr las condiciones óptimas para la resolución de cada fragmento en particular.

Inicialmente, la detección se llevaba a cabo por medio del uso de *primers* o nucleótidos marcados radiactivamente (Orita *et al.*, 1988). Más tarde se diseñaron formas no radiactivas de visualización del polimorfismo, usando bromuro de etidio o tinción con nitrato de plata (Hongyo *et al.*, 1993, Oto *et al.*, 1993).

Esta técnica es extremadamente sensible ya que, a diferencia del análisis por RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), puede detectar mutaciones puntuales en cualquier posición del fragmento analizado. El empleo de este tipo de metodología permite disminuir considerablemente el número de muestras a

secuenciar cuando se desea hacer un análisis poblacional. Todas aquellas muestras que difieren entre sí en cuanto al patrón de migración son también distintas a nivel de secuencia nucleotídica. Por otra parte, se puede asumir que las muestras que exhiben el mismo patrón tienen, en principio, secuencias idénticas. La aplicación de este criterio permite realizar una buena selección previa de las muestras a analizar por secuenciación. El análisis por SSCP se aplica en la detección de mutaciones puntuales conocidas para el diagnóstico de enfermedades genéticas en humanos y en el estudio de variabilidad de genes o regiones génicas de interés en distintos organismos (Fujioka *et al.*, 1995; Koenig *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1996; Rubio *et al.*, 1996; Magome *et al.*, 1999, entre otros).

Los eventos críticos de reorganización de las dos hebras del DNA ocurren en la interfase del gel, ya que al abandonar el ambiente desnaturante las moléculas se pliegan rápidamente de acuerdo a la estabilidad térmica y a las regiones de complementaridad interna. Es crucial que durante la electroforesis haya un control estricto de la temperatura, que no debe variar durante el tiempo que dura la misma en más de medio grado centígrado. La variación de temperatura altera la estructura secundaria de las moléculas y, por ende, se produce toda una población de conformeros para cada hebra, resultando en una gran cantidad de bandas.

Una alícuota del producto de PCR se mezcla en un tubo *Eppendorf* con *buffer* de desnaturación, se incuba a 95°C durante 10 min e inmediatamente se coloca en agua-hielo. La electroforesis se realiza en un gel nativo de poli(acrilamida) de la concentración adecuada (según el tamaño del fragmento a resolver) y la temperatura se mantiene constante, durante la electroforesis, mediante un baño de circulación externa y temperatura regulada. La presencia de bandas en el gel se revela por tinción con nitrato de plata. Los geles se conservan en heladera hasta su secado.

II.B.12B) SECUENCIACIÓN (SANGER *et al.*, 1977)

Para la secuenciación se utilizó el método de Sanger. En este método la DNA polimerasa sintetiza hebras complementarias al DNA molde a partir de un *primer* iniciador. En la mezcla de reacción se incluyen ddNTPs, que una vez incorporados a una hebra de DNA detienen su síntesis, ya que la polimerasa necesita un OH⁻ en la posición 3' para poder incorporar un nuevo nucleótido. Debido a la interrupción de la síntesis se generan cadenas de distinta longitud. Los productos obtenidos se resuelven en geles desnaturantes de poli(acrilamida) que permiten la separación de hebras de ssDNA que difieran en un nucleótido.

En las reacciones para secuenciación automática se incorporan ddNTPs marcados con fluoróforos y se realiza una amplificación lineal del producto a secuenciar por medio de un programa de ciclado y el uso de una DNA

polimerasa termoestable. Se utilizan los oligonucleótidos directo y reverso de M13 (-20 directo y -24 reverso), los *primers* correspondientes a las secuencias promotoras de los fagos T7 y SP6 o *primers* de secuencia específica diseñados para tal fin. El molde de la reacción puede ser DNA plasmídico (350 ng de un plásmido recombinante de hasta 4 kpb) o productos de PCR (30 ng de un producto de un tamaño aproximado de 400 pb, previamente precipitado con PEG₆₀₀₀). En caso que los moldes sean de un tamaño mayor al citado es necesario ajustar la cantidad de moléculas incrementando la masa. Las reacciones se llevan a cabo en un volumen final de 20 μ l e incluyen: molde, *primer* (1 μ M), 8 μ l de la mezcla comercial de reacción y agua bidestilada estéril hasta alcanzar el volumen final deseado. Tras el ciclado la muestras se purifican por pasaje a través de una columna de exclusión molecular, se secan, se desnaturalizan por calor en presencia de formamida desionizada y se resuelven en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 6% (solución *stock* 19:1), urea 7 M. Los productos purificados se resuelven y analizan en un secuenciador automático (*Applied Biosystems Model 373A DNA Sequencing System*).

II.B.13) ENSAYO DE PROTECCIÓN A RNASAS (*RNASE PROTECTION ASSAY*) (GOLDRICK *et al.*, 1996)

La técnica de protección a RNAsas es muy sensible y permite la detección y cuantificación de los RNAs de interés, incluso dentro de mezclas complejas. Para llevar a cabo el ensayo se sintetizan sondas de RNA de cadena simple que son complementarias al RNA de interés. La sonda se hibrida con la preparación de RNA (mensajeros o totales) y luego, la mezcla se trata con RNAsas, para degradar la región de la sonda que no hibridó con el RNA usado como protector. La zona protegida de la sonda se recupera y se analiza en un gel desnaturalizante de poliacrilamida de alta resolución.

En una primera etapa se sintetizan *in vitro* los transcritos deseados, utilizando la RNA polimerasa del fago T7. Luego se desnaturalizan el transcrito marcado y el RNA *target* en presencia de *buffer* de hibridación y se los incuban a la temperatura adecuada. Tras la hibridación las reacciones se tratan con una mezcla de las RNAsas A y T1 para degradar las zonas del transcrito que no hibridan con el RNA complementario (zonas no protegidas). Las RNAsas se inactivan, posteriormente, por digestión con proteasas y extracción orgánica. Las regiones protegidas de los transcritos se recuperan por precipitación con alcohol en presencia de un RNA *carrier*. Posteriormente los fragmentos se desnaturalizan por calor en presencia de *buffer* de siembra y se analizan en gel desnaturalizante de poliacrilamida 4% (38:2), TBE 1x, urea 7 M.

II.B.14) PROGRAMAS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

El análisis y comparación de las secuencias generadas se realizó con una computadora *Sun UltraSparc II* utilizando lenguaje *Unix* (solaris 2.7). Se

utilizaron programas incluidos en el paquete *Wisconsin Package Version 9.0*, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, EE.UU. (Deveraux *et al.*, 1984; *Wisconsin Package Version 9.0*, 1996).

II.B14A) PROGRAMAS PARA EDICIÓN DE SECUENCIAS

Assemble: para construir secuencias nuevas a partir de secuencias preexistentes. Construye una secuencia nueva uniendo las especificadas y genera un nuevo archivo con la construcción.

Pretty: para ver alineamientos múltiples generados previamente por otro programa. Calcula la secuencia consenso del alineamiento.

SeqEd: para ingresar y modificar secuencias; también permite ensamblar secuencias preexistentes e introducir secuencias desde el teclado.

II.B.14B) PROGRAMAS PARA COMPARACIÓN DE SECUENCIAS

II.B.14B.1) PROGRAMAS PARA COMPARAR SECUENCIAS DE A PARES

BestFit: para crear un alineamiento óptimo del segmento de mayor similitud entre dos secuencias. Los alineamientos se generan insertando *gaps* para maximizar el número de coincidencias utilizando el algoritmo de Smith y Waterman (Smith *and* Waterman, 1981).

Gap: para encontrar el mejor alineamiento global entre dos secuencias, maximizando el número de coincidencias (*matches*) y minimizando el número de espacios (*gaps*). Este programa utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman *and* Wunsch, 1970).

II.B.14B.2) PROGRAMAS PARA COMPARAR MÚLTIPLES SECUENCIAS

PileUp: para generar alineamientos múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos de a pares.

Para producir alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas y aminoácidas deducidas también se utilizó el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

II.B.14C) PROGRAMAS PARA BÚSQUEDAS EN BASES DE DATOS

Fetch: para copiar secuencias de GCG o traerlas desde bases de datos hacia el directorio personal.

II.B.14D) PROGRAMAS PARA IMPORTAR Y EXPORTAR SECUENCIAS

ChopUp: para convertir una secuencia de formato diferente al GCG de una longitud de hasta 32000 caracteres a un archivo nuevo que contiene líneas de no más de 50 caracteres. Posteriormente, es necesario aplicar el programa *Reformat*.

Reformat: para convertir archivos de secuencias, de matrices de valores (*scoring matrix*) o de datos de enzimas a formato GCG.

FromFastA: para convertir secuencias de formato FastA a formato GCG.

ToFastA: para convertir secuencias de formato GCG a formato FastA.

II.B.14E) PROGRAMAS PARA REALIZAR MAPEO DE SECUENCIAS

Map: para realizar mapas teóricos de restricción de secuencias nucleotídicas. Permite ver ambas hebras del DNA con los puntos de corte de las enzimas de restricción seleccionadas y, además, ofrece la posibilidad de generar las secuencias aminoacídicas deducidas en los seis marcos posibles. También, se pueden producir mapas de secuencias aminoacídicas.

II.B.14F) PROGRAMAS PARA DISEÑAR PRIMERS

Prime: para diseñar *primers* tanto para amplificar por PCR como para secuenciar un determinado fragmento de DNA. Permite el diseño de *primers* individuales o de pares de los mismos.

En el diseño de *primers* también se utilizó el programa OLIGO (National Biosciences, Rychlik and Rhoads, 1989; Rychlik *et al.*, 1990).

II.B.14G) PROGRAMAS PARA OBTENER SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DEDUCIDAS

Reverse: para “invertir” una secuencia de DNA (de 3'→5' a 5'→3') o para generar, además de la secuencia inversa, la complementaria.

Translate: para generar una secuencia aminoacídica deducida a partir de una secuencia nucleotídica.

II.B.14H) PROGRAMAS PARA GENERAR SECUENCIAS CONTINUAS A PARTIR DE CLONES TOTAL O PARCIALMENTE SOLAPADOS

Se utiliza el GCG Fragment Assembly System (FAS), que contiene una serie de programas que permiten ensamblar secuencias que se solapan de modo tal de poder obtener una secuencia continua. Los programas descritos a continuación forman parte de dicho sistema.

- 1) *GelStart*: para crear un “proyecto” como un subdirectorio dentro del directorio corriente de trabajo.
- 2) *GelEnter*: para ingresar las secuencias que forman parte del proyecto de ensamble.
- 3) *GelMerge*: para crear un ensamble (*contig*) a partir de las secuencias iniciales no ensambladas. Cada *contig* es un alineamiento múltiple de las secuencias contiguas que se solapan. Genera para cada *contig* una secuencia consenso, esta secuencia se define como el nucleótido más frecuente para cada posición.
- 4) *GelAssemble*: para editar secuencias manualmente, mejorar el alineamiento o resolver inconsistencias en las regiones solapadas.
- 5) *GelDisassemble*: para desarmar *contigs* presentes en un proyecto de ensamble.
- 6) *GelView*: para ver la estructura de los *contigs*.

II.B.15) PROGRAMAS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS OBTENIDAS

Para realizar el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los distintos aislamientos de CTV analizados se utilizó la versión 4.0b6 beta del programa PAUP* [*Phylogenetic Analysis using Parsimony (*and other methods)*; Swofford, 1998]. Para la visualización de los árboles se empleó en programa TreeView (Win32) 1.6.1 (Page, 1996).

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE VARIABILIDAD INTER E INTRAPOBLACIONAL DEL GEN P27 EN AISLAMIENTOS DE CTV

CAPÍTULO III

SECCIÓN A: INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DEL GEN P27

III.A.1) CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES DE PROTEÍNA DE CUBIERTA EN VIRUS DE VEGETALES NO ICOSAÉDRICOS

El análisis computacional de las secuencias aminoacídicas deducidas correspondientes a los genes de proteínas de cubierta de virus de vegetales con genoma RNA de polaridad positiva y simetría helicoidal, permitió separarlos en dos grupos definidos que coincidieron con la morfología de la partícula viral. De acuerdo a los valores de identidad de dicha proteína se agruparon, por un lado los virus con forma de varilla rígida y por otro, los virus filamentosos con partículas más flexuosas (Dolja *et al.*, 1991). Estos datos permitieron postular que las proteínas de cubierta en ambos grupos de virus evolucionaron a partir de un antecesor común distinto para cada uno de los grupos (Dolja *et al.*, 1991).

Un detalle de importancia es que, pese a que las proteínas de cubierta de ambos grupos no están relacionadas evolutivamente y no muestran valores de identidad significativos entre sí, hay dos residuos que aparecen conservados en todas las secuencias analizadas (con una única excepción). Los residuos conservados son: un aminoácido cargado positivamente (arginina, R) y un aminoácido cargado negativamente, cercanos a la porción C terminal de la misma (ácido glutámico, E, en los virus con forma de varilla y ácido aspártico, D, en los virus flexuosos) (fig. III.A.1, modificada de Dolja *et al.*, 1991).

El elevado grado de conservación de ambos residuos dentro de cada grupo, y, su aparición en dos grupos distintos, indicaría su importancia en el plegamiento de las proteínas de cubierta de virus no icosaédricos. La función que se le atribuye es la participación en un puente salino (Dolja *et al.*, 1991).

III.A.2) CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES DE PROTEÍNA DE CUBIERTA EN CLOSTEROVIRUS

Un hecho que caracteriza a los closterovirus es la duplicación del gen de la proteína de cubierta. Es el único grupo de virus con partículas elongadas que presenta más de un gen que codifica para proteínas de cápside. Se demostró, que tanto en BYV como en CTV, el producto de la copia divergente del gen de la proteína de cubierta se expresa *in vivo* (Febres *et al.*, 1994; Agranovsky *et al.*, 1994). Además, por medio de inmunoelectromicroscopía, se comprobó que la proteína de cubierta minoritaria (CPm) forma parte de la partícula viral, confiriéndole la típica estructura de "víbora de cascabel" tanto en virus del género *Closterovirus* (Agranovsky *et al.*, 1995; Febres *et al.*, 1996) como del género *Crinivirus* (Tian *et al.*, 1999). También se demostró que, al menos en BYV, esta proteína encapsida el extremo 5' del RNA viral en las partículas

enteras (Zinovkin *et al.*, 1999). Utilizando anticuerpos contra la porción N terminal de la proteína P24 (CPm de BYV) se determinó que dicha región de la proteína se encuentra expuesta en la superficie del virión (Agranovsky *et al.*, 1995). Este dato concuerda con la orientación del extremo N terminal de la proteína de cubierta en otros géneros (*potyvirus* y *potexvirus*) (Koenig and Torrance, 1986; Shukla *et al.*, 1988).

NVMV	---TRFPDTMVRT	LYTRT---TIENKL
BNYVV	SPMTRFPQTLMTY	MWTRD---KFEDRF
BSMV	DVDRRFAGA-R--	VYTRK---TFEREL
RMV	APNQRFP-D-TGF	YMNRA---EFEAI-
SHMV	SPISRFPAE-PAY	VFNRT---SFESAS
CGMMV-W	DINSRFP-D-AGF	VYDRA---SFEAAF
TMV	QVTVRFP-D-SDF	SYNRS---SFESSS
TRV-PSG	SPYEQFPER-KVY	SYRR---NFEKNF
TRV-CAM	SAFKRFPDK-SLY	PTYRR---KFEKDM
TRV-TCM	DENTRFPSG-KVY	AVVQR---TFEKEY
PEBV	TRFKRFS DG-EEY	ALDQE---DFEETF
PEMV	KPTLRQIMAHFSD	SLARY---AFDFYE
SCMV	KPTLRQCMHFSD	SLARY---AFDFYE
TEV	QPTLRQIMTHFSD	SLSRY---AFDFYE
TVMV	NPSLRQIMKHFSN	NLAPF---AFDFFE
BaYMV	NGGLRRIMRNYSD	ANAKY---AFDFV
PVS	A-GLRKVCRLYAP	PEHKF--AAFDFN
LSV	A-GLRKVCRLYAP	PSAKF--AGDFDF
PVM	AETLRRVCRLYAP	EESKF--AGDFDF
PVX	CT-LRQFCMKYAP	DDCKF--AQDFDF
PMV	GTSLRKFCRYFAP	AEARF--AAFDFDF
WCIMV	HCTIRQFCMYFAN	WNARF--AAFDTFD
LVX	LP-LRQFCRYYAK	YNTRF--AAFDTFD
BYV	PNKLRFCRTFQK	AEDHY--LAADFIS
ACLSV	--TFRQVCEAFAP	--SKYPELMFDFNK

Figura III.A.1: Segmentos de las proteínas de cubierta de virus filamentosos y en forma de varilla.

Panel superior: virus con forma de varilla: *tobacco rattle virus* (TRV) y *pea early browning virus* (PEBV), género *Tobravirus*; *barley strip mosaic virus* (BSMV), género *Hordeivirus*; *tobacco mosaic virus* (TMV), *ribgrass mosaic virus* (RMV), *sunhemp mosaic virus* (SHMV), *cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) género *Tobamovirus*; *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), género *Furovirus*; *Nicotiana velutina mosaic virus* (NVMV), analizado como posible integrante del género *Furovirus* (actualmente no se encuentra incluido en ningún género definido).

Panel inferior: virus flexuosos: *pepper mottle virus* (PEMV), *sugar cane mosaic virus* (SCMV), *tobacco etch virus* (TEV), *tobacco vein mottling virus* (TVMV), familia *Potyvridae*, género *Potyvirus*; *barley yellow mosaic virus* (BaYMV), género *Bymovirus*; *potato virus M* (PVM), *potato virus S* (PVS), *lilia symptomless virus* (LSV), género *Carlavirus*; *potato virus X* (PVX), *papaya mosaic virus* (PMV), *white clover mosaic virus* (WCIMV), *lilia virus X* (LVX), *narcissus mosaic virus* (NMV), género *Potexvirus*; *apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), género *Trichovirus*; *beet yellows virus* (BYV), familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*.

En rojo y negrita se indican los aminoácidos involucrados en la formación de un puente salino, conservados en ambos grupos. Los datos de taxonomía viral están actualizados según el *International Committee on Taxonomy of Virus* (Virus Taxonomy, 2000).

En el caso de CTV, el gen p25 codifica la proteína de cubierta mayoritaria (CP) mientras que el gen p27, que es una copia divergente del primero, codifica la proteína de cubierta minoritaria (CPm). Entre ambas proteínas existe un 47% de similitud y hay cuatro regiones conservadas (fig. III.A.2). La región I contiene un residuo de fenilalanina (F) que es reconocido por el anticuerpo monoclonal MCA-13; las regiones II y III contienen los aminoácidos arginina (R) y ácido aspártico (D) respectivamente, que están conservados en virus filamentosos y forman un puente salino. La región IV se localiza en el extremo C terminal de la proteína (Febres *et al.*, 1994).

III.A.3) POSIBLES FUNCIONES DEL PRODUCTO PROTEICO CODIFICADO POR EL GEN P27 DE CTV

Considerando que esta proteína no solamente se expresa *in vivo* sino que también forma parte de la partícula viral y se acumula en la fracción correspondiente a la pared celular de células vegetales infectadas, se postula que podría cumplir un rol en el movimiento viral de célula a célula (Febres *et al.*, 1994). También se supone que las CPm's de los distintos closterovirus podrían estar involucradas en la transmisión no circulativa y semipersistente del virus por los insectos vectores (áfidos en el caso de CTV y BYV y mosca blanca, *Bemisia tabacci*, en el de LIYV) (Agranovsky, 1996). En BYV y LIVY se demostró que CPm es importante para la transmisión por insectos ya que la neutralización de los viriones con anticuerpos anti-CPm inhibió la transmisión del virus por este mecanismo. En estos experimentos se emplearon metodologías diferentes. En el caso de BYV los áfidos se colocaron sobre plantas infectadas para que adquirieran el virus, luego se alimentaron con savia con los anticuerpos y recién después se colocaron sobre las plantas sanas indicadoras (He *et al.*, 1998). Por otro lado, en el caso de LIYV, las moscas blancas se alimentaron con viriones previamente incubados con los anticuerpos neutralizantes (Tian *et al.*, 1999). De este modo, en el primer experimento, los anticuerpos anti-CPm disminuyeron la eficiencia de transmisión por áfidos virulíferos mientras que en el segundo caso los anticuerpos posiblemente afectaron no sólo la transmisión sino la adquisición del virus por los vectores. Sin embargo, independientemente del esquema experimental utilizado, el resultado fue el mismo: sólo se inhibe la transmisibilidad de los virus por sus vectores cuando en el tratamiento se utilizan anticuerpos anti-CPm. El tratamiento de los viriones con anticuerpos para otras proteínas, incluida CP, no afecta la transmisibilidad por vectores.

III.A.4) FUNDAMENTO DE LA ELECCIÓN DEL GEN P27 PARA UN ANÁLISIS POBLACIONAL DETALLADO

Una de las características de CTV es la variabilidad en el grado de virulencia de los distintos aislamientos virales. En una serie de trabajos realizados sobre este virus se han establecido relaciones entre las variaciones de las secuencias

de distintos genes y la sintomatología que inducen los diferentes aislamientos en las plantas infectadas. Los datos de secuenciación del gen p23, amplificado a partir de distintos aislamientos virales, establecieron la existencia de una relación directa entre secuencias aminoacídicas deducidas y propiedades biológicas de los mismos (Pappu *et al.*, 1997). Por otro lado, el estudio de la variabilidad molecular de la región 5' no codificante en distintos aislamientos permitió distribuirlos en tres grupos (López *et al.*, 1998). En este caso, los aislamientos más débiles solamente mostraron secuencias de tipo I, mientras que los aislamientos severos contenían secuencias de tipo I y/o II. Por medio del análisis del gen de la proteína de cubierta (p25), y empleando distintas metodologías (secuenciación, Pappu *et al.*, 1993a, Mawassi *et al.*, 1993; RFLP, Gillings *et al.*, 1993; análisis con anticuerpos, Pappu *et al.*, 1993b; SSCP, Rubio *et al.*, 1996) se pudieron establecer correlaciones entre las variaciones del gen y las características biológicas de los aislamientos analizados.

Tal como se ha descrito anteriormente, el producto codificado por el gen p27 cumple una importante función en los distintos integrantes de la familia *Closteroviridae*. Por ende es importante establecer si para este gen también existe algún tipo de correlación entre las variaciones de secuencia y la virulencia de los aislamientos. Otro aspecto a considerar es cómo afecta la variabilidad intrapoblacional a la sintomatología producida por los distintos aislamientos en las plantas hospedadoras. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones se decidió realizar un análisis exhaustivo de la variabilidad intra e interpoblacional del gen p27 en una serie de aislamientos de CTV.

En la elección de este gen también se consideraron los resultados de experimentos previos realizados en nuestro laboratorio. Los clones de una biblioteca genómica de un aislamiento argentino de campo (C268-2, de Concordia, Entre Ríos) se utilizaron en ensayos de hibridación con sondas derivadas de un aislamiento severo (T387, Japón) y de un aislamiento débil (T312, España). A partir de estos experimentos se encontraron varios clones que mostraron regiones de hibridación diferencial entre ambas sondas (Semorile *et al.*, 1993). Uno de los clones que mostró hibridación diferencial fue el clon pLT45, que contiene un fragmento que presenta señal sólo con la sonda severa. Los datos de secuenciación demostraron que esta región corresponde al extremo 5' del gen p27 (Acuña, tesina de graduación, 1996). Estos resultados sugerirían que la secuencia de este gen podría mostrar diferencias correlacionables con la virulencia del aislamiento de origen.

En las siguientes secciones se exponen los resultados obtenidos a partir del análisis detallado de la variabilidad inter e intrapoblacional del gen p27 en aislamientos virales de CTV originarios de distintas regiones geográficas y que producen sintomatología diferente en plantas indicadoras.

CAPÍTULO III

SECCIÓN B: MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DEL GEN P27

III.B.1) DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO DE VARIABILIDAD DEL GEN P27

El estudio de variabilidad inter e intrapoblacional del gen p27 se realizó en dos etapas, utilizando además dos grupos distintos de aislamientos virales. En una primera etapa se analizaron diez aislamientos de CTV de distinta procedencia geográfica (España, Brasil y Argentina) y correspondientes, además, a cada uno de los cinco biogrupos determinados por *indexing* en plantas indicadoras (Tabla I, Cap. II). Posteriormente, para estudiar las características de dicho gen en aislamientos de nuestro país, se seleccionaron once aislamientos de campo, originarios de distintas regiones productoras del país y provenientes de diferentes especies de cítricos infectados (Tabla II, Cap. II).

III.B.2) AISLAMIENTOS DE CTV SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO DE VARIABILIDAD DEL GEN P27

III.B.2A) AISLAMIENTOS DE DISTINTO ORIGEN GEOGRÁFICO

Para el estudio del gen p27 en esta etapa se eligieron dos aislamientos de cada biogrupo: T32 y T385 (biogrupo I), T300 y T312 (biogrupo II), C268-2 y Pera GS (biogrupo III), C269-6 y Baraõ B (biogrupo IV), T388 y Capaõ Bonito (biogrupo V). El dsRNA de estos aislamientos se obtuvo a partir del hospedante original (naranja dulce o pomelo) en el país de origen y fue gentilmente cedido por los Dres. Pedro Moreno (aislamientos de España, EE.UU. e Israel), Marcos Machado (aislamientos de Brasil) y Mercedes Peyrou (aislamiento de Uruguay). Los dos aislamientos argentinos utilizados se caracterizaron por *indexing* biológico en la estación experimental del INTA Concordia, Entre Ríos, Argentina (Costa, 1995). El dsRNA de estos últimos aislamientos se extrajo utilizando como material de partida corteza de brotes jóvenes de cítricos infectados.

III.B.2B) AISLAMIENTOS ARGENTINOS DE CAMPO

Para el estudio de la variabilidad inter e intrapoblacional del gen p27 de CTV en aislamientos argentinos se seleccionaron once aislamientos virales (Tabla II, Cap. II). La caracterización de dichos aislamientos se realizó por medio de *indexing* biológico en la Estación Experimental Concordia-INTA de Entre Ríos, Argentina (Costa, 1995). Los aislamientos se multiplicaron en plantas de la misma especie que el hospedador original para evitar las alteraciones que se producen en la composición de la población viral por cambio de hospedador (Dodds *et al.*, 1987). El dsRNA viral se extrajo a partir de corteza de brotes jóvenes de cítricos infectados, provista por la Ing. Agrónoma Norma Costa (E.E.A. INTA, Concordia, Entre Ríos).

III.B.3) ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE VARIABILIDAD DEL GEN P27

Para analizar la variabilidad de secuencia del gen p27 se utilizó la técnica de SSCP. Tal como se describió anteriormente su extrema sensibilidad permite detectar rápidamente mutaciones presentes en fragmentos de DNA del mismo tamaño. La presencia de mutaciones produce variaciones en los patrones de migración de los fragmentos desnaturalizados, resueltos en geles nativos de poliacrilamida. Para el estudio del gen en ambos grupos de aislamientos se utilizaron estrategias comunes con diferencias en la obtención de los fragmentos génicos a analizar por SSCP. En la figura III.B.1 se indica el esquema general de trabajo desarrollado para la detección de las variantes de secuencia del gen en el grupo constituido por los aislamientos de distinto origen geográfico, mientras que en la figura III.B.2 se representan los pasos seguidos en el análisis de los aislamientos argentinos de CTV de campo.

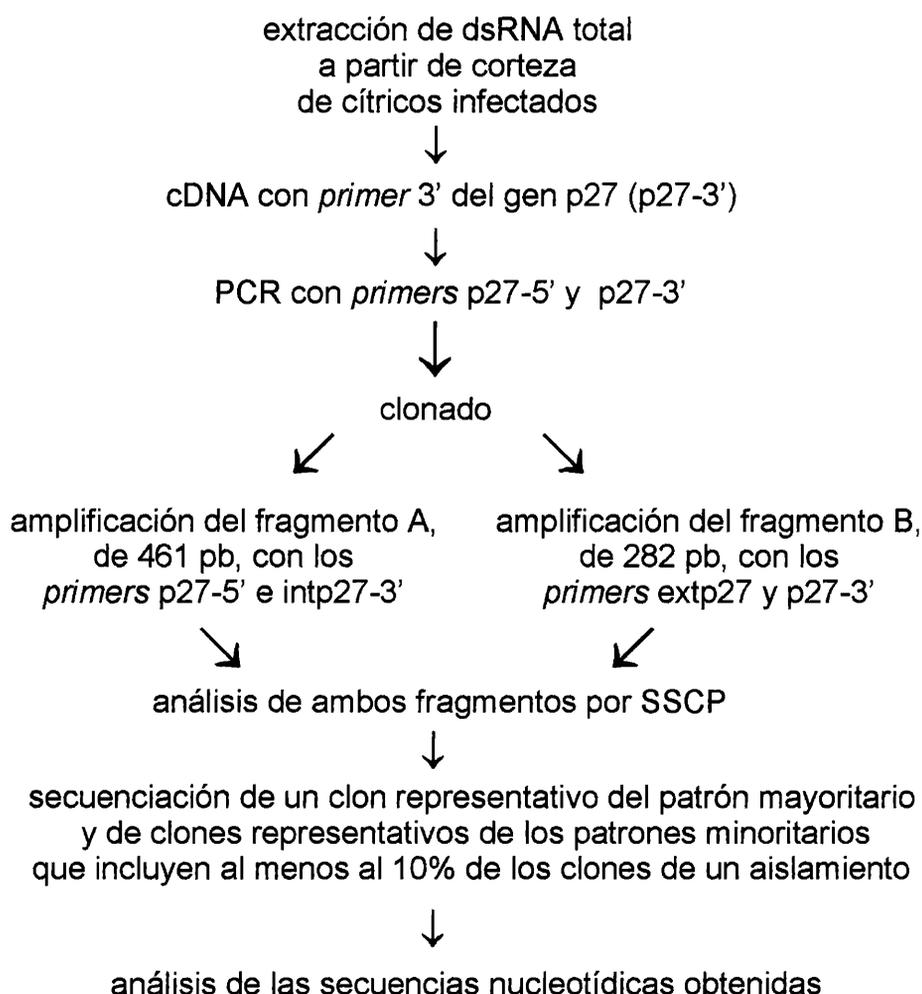


Figura III.B.1: Representación esquemática de la estrategia de trabajo utilizada para en análisis de variabilidad del gen p27 de CTV en aislamientos de distinto origen geográfico.

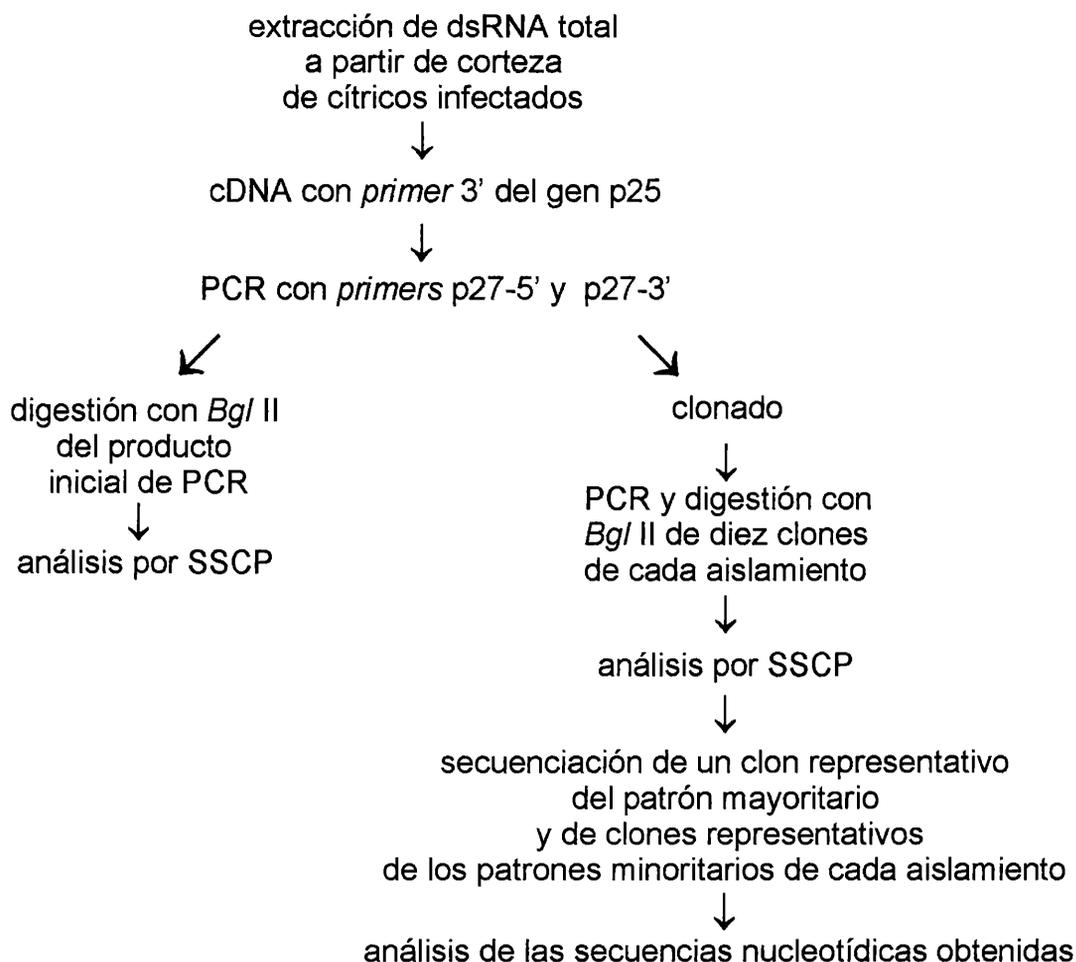


Figura III.B.2: Esquema representativo de la estrategia de estudio de variabilidad del gen p27 en aislamientos argentinos de CTV de campo.

III.B.4) REACCIONES DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA, AMPLIFICACIÓN Y CLONADO

El dsRNA, utilizado como material de partida se produce como consecuencia de la replicación del genoma viral y de la expresión de los genes que lo componen. En el caso de los aislamientos argentinos se purificó dsRNA a partir de corteza de brotes jóvenes de plantas infectadas. La integridad y composición de las preparaciones obtenidas de los distintos aislamientos se analizó por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida (fig. III.B.3).

Una alícuota del producto de la purificación se utilizó como molde en las reacciones de transcripción reversa que se realizaron en presencia de un único oligonucleótido (las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se encuentran en la sección A1 del Apéndice). En el caso de los aislamientos de distinto origen geográfico se utilizó el *primer* p27-3' (fig. III.B.6), que corresponde a uno de los cuatro dominios conservados entre las dos proteínas de cubierta virales (P25 y P27). Dada la conservación de estos dominios, la secuencia de p27-3'

se consideró apta para la amplificación del gen a partir de material de diversos aislamientos. En el caso de los aislamientos argentinos se utilizó el *primer* p25-3', correspondiente al extremo 3' del gen p25 (fig. III.B.8). Se eligió este *primer* para estudiar la variabilidad conjunta de ambos genes codificantes de las proteínas de cubierta virales de CTV (p27 y p25). Previamente se comparó su secuencia con las presentes en bancos de datos y se corroboró la existencia de conservación en esta región génica entre aislamientos.

La amplificación del gen completo en la totalidad de los aislamientos estudiados se efectuó con el par de *primers* p27-5' y p27-3' y una alícuota del cDNA obtenido previamente. Las reacciones se realizaron según lo descrito (Cap. II, Materiales y Métodos), en dos tipos de cicladores térmicos: *Air ThermoCycler* 1605 (Idaho Technologies) o *Gene Amp PCR System* 2400 (PERKIN ELMER). En el primer caso las condiciones de ciclado (para la amplificación en capilares de 10 μ l de capacidad) fueron: a) desnaturalización inicial: 94°C, 1 min; b) 35 ciclos que constan de: desnaturalización (94°C, 1 s), *annealing* (50°C, 3 s) y extensión (72°C, 50 s) y c) extensión final: 72°C, 3 min. Las condiciones de amplificación en el segundo ciclador son semejantes, para reacciones de 10 μ l, en cuanto a las temperaturas y número de ciclos utilizados pero difieren en los tiempos de reacción. La desnaturalización inicial es de 2 min y la extensión final de 5 min. Durante el ciclado los tiempos de desnaturalización, *annealing* y extensión son de 12 y 15 s y 1 min, respectivamente. En todos los casos se incluyeron reacciones control con una alícuota de cDNA realizado a partir de material de planta sana (especificidad) y reemplazando el molde por agua (ausencia de contaminación en los reactivos y pipetas utilizados).

Para la totalidad de aislamientos analizados se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado, 724 pb (fig. III.B.4). No se obtuvo producto de amplificación cuando se utilizó como molde cDNA obtenido a partir de planta sana ni en los tubos de control de los reactivos.

Previo al clonado, los productos de amplificación se purificaron por precipitación con PEG, se resuspendieron en agua bidestilada estéril, se cuantificaron en geles de agarosa y finalmente se ligaron al vector de clonado pGEM-T *Easy* (Promega). Con el producto de ligación se electrotransformaron bacterias competentes. Las colonias recombinantes se seleccionaron por resistencia al antibiótico (ampicilina) y por la ausencia de color en placas suplementadas con IPTG y X-Gal. La presencia del inserto de interés se corroboró analizando las colonias por PCR, con los *primers* específicos utilizados para amplificar el gen completo, p27-5' y p27-3' (fig. III.B.5a) o por *colony blot* (fig. III.B.5b). Esta última metodología se empleó para la identificación rápida de las colonias transformadas con plásmidos recombinantes en los once aislamientos argentinos.

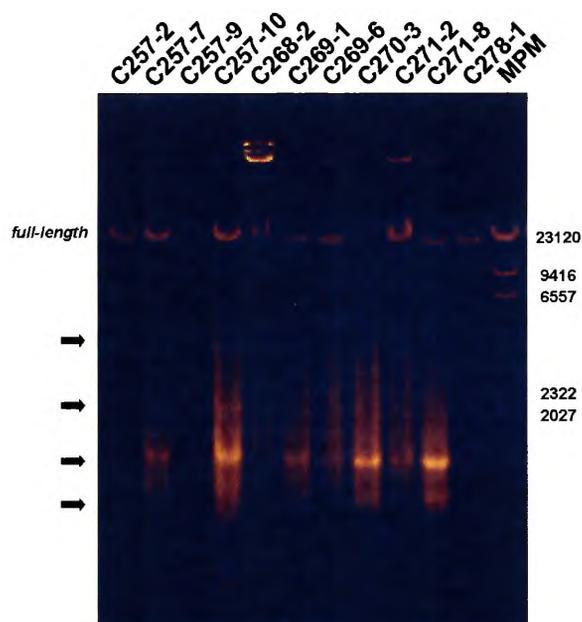


Figura III.B.3: Análisis de extracciones de dsRNA de aislamientos argentinos de CTV. Gel de poliacrilamida nativa 6%-TBE 1x. Se indica la posición del dsRNA *full-length*, correspondiente al genoma del virus. Con flechas se señalan las posiciones de RNAs subgenómicas (sgRNA). El marcador de PM es DNA del fago λ digerido con *Hind* III, se indican únicamente los tamaños de las bandas que se visualizan.

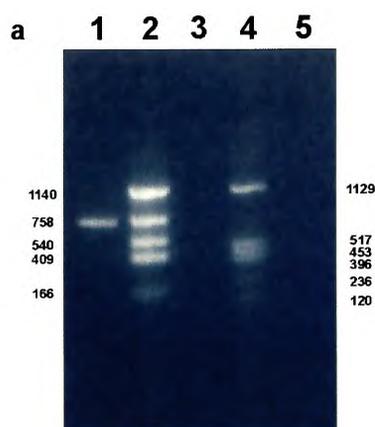


Figura III.B.4: Amplificación del gen p27 a partir de cDNA del aislamiento C268-2. Gel de agarosa 0,8%-TAE 1x. Calle 1: producto de amplificación; calle 3: control negativo de la reacción; calle 5: reacción de amplificación utilizando como molde una reacción de cDNA sobre planta sana. A la izquierda se indican los tamaños de las bandas del marcador de PM de la calle 2, plásmido pcDNA II/ *Dde* I/ *Xho* I; a la derecha los del marcador de PM de la calle 4, plásmido pcDNA II/ *Hinf* I/ *Hind* III.

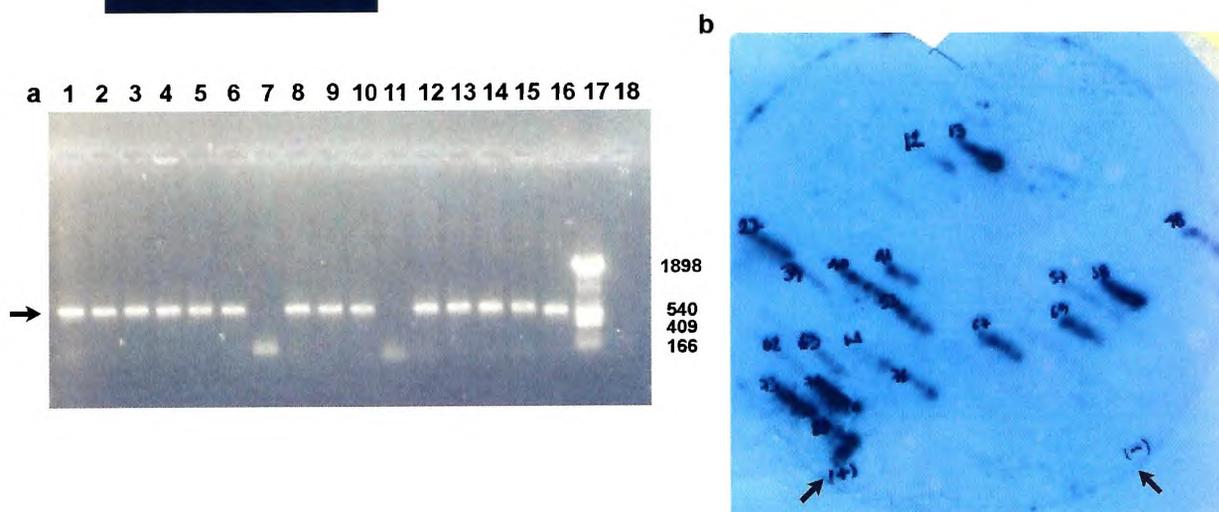


Figura III.B.5: Identificación de colonias transformadas con plásmidos recombinantes que portan el gen p27. **a:** gel de agarosa 0,8%-TAE 1x que muestra los productos de amplificación del gen p27, indicados con un flecha a partir de colonias del aislamiento C269-6. Calles 1 a 16, colonias analizadas (calles 1 a 6, 8 a 10 y 12 a 16, colonias positivas; calles 7 y 11, colonias negativas). Calle 17: marcador de PM, plásmido pcDNA II/ *Dde* I, se indica el tamaño de los distintos fragmentos. Calle 18: control negativo de la reacción. **b:** estrías positivas identificadas por hibridación. Las flechas señalan las estrías correspondientes a los controles positivo y negativo, que se realizaron en dirección contraria al resto.

En la hibridación se utilizó una sonda marcada radiactivamente. Como los aislamientos argentinos pertenecen a distintos biogrupos el molde empleado para la síntesis de la misma fue una mezcla de productos representativos de las distintas secuencias del gen p27. De esta manera se evitó la detección selectiva de algunas variantes de secuencia o la pérdida de otras. El DNA molde se liberó, por digestión con la enzima *EcoR* I, a partir de minipreparaciones de DNA plasmídico de clones identificados como representativos del patrón mayoritario de los aislamientos T312 (biogrupo II), C268-2 (biogrupo III), C269-6 (biogrupo IV) y T388 (biogrupo V). Se utilizó esta enzima de restricción porque no presenta sitios blanco dentro de la secuencia del inserto y reconoce sitios únicos presentes a ambos lados del *polylinker*. Los productos de digestión obtenidos se purificaron a partir del gel de agarosa y partes equimolares de los mismos se emplearon en la generación de la sonda por el método de *random priming*. Los filtros conteniendo las estrías a analizar se sometieron a hibridación durante 16 horas a 60°C. Luego se lavaron con concentraciones descendentes de sales a 60°C y se expusieron sobre placas autorradiográficas a -80°C, el tiempo necesario para detectar las señales positivas. Del total de estrías que mostraron señal positiva se seleccionaron diez de cada aislamiento para proseguir con el estudio.

III.B.5) OBTENCIÓN DEL MATERIAL PARA EL ANÁLISIS DE SSCP

La detección eficiente de todas las variantes de secuencia mediante la técnica de SSCP requiere que los fragmentos de PCR a ser analizados no excedan de las 500 pb. El producto de amplificación del gen p27 tiene 724 pb; debido a ello es necesario subdividirlo para su estudio. Para maximizar la identificación de las posibles variantes de secuencia del gen en los aislamientos estudiados se utilizaron dos estrategias experimentales: la amplificación de dos fragmentos de menor tamaño y la digestión del producto de amplificación del gen completo con una enzima de restricción.

III.B.5A) EN AISLAMIENTOS DE DISTINTO ORIGEN GEOGRÁFICO: AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS A Y B DEL GEN P27

En los aislamientos de diferente origen se amplificaron dos fragmentos del gen p27 a partir de las colonias positivas seleccionadas. Dichos fragmentos se denominaron A (461 pb) y B (282 pb) (fig. III.B.6). El fragmento A corresponde a la región donde se sitúa el dominio I mientras que el fragmento B incluye los restantes dominios conservados entre ambas proteínas de cubierta virales (II, III y IV). Los fragmentos se obtuvieron por PCR en los cicladores antes descritos. Para amplificar el fragmento A se utilizaron los *primers* p27-5' e intp27-3' mientras que para el B se usó el par extp27 y p27-3'. Los *primers* intp27-3' y extp27 se diseñaron específicamente para amplificar estos fragmentos. Las condiciones de reacción utilizadas en el ciclador PERKIN ELMER son las siguientes: a) desnaturalización inicial: 94°C, 2 min (para

ambos fragmentos); b) 35 ciclos que constan de: desnaturalización (94°C, 1 s), *annealing* (50°C, 15 s) y extensión (72°C, 40 s para el fragmento A y 30 s para el B) y c) extensión final: 72°C, 3 min. En todos los casos se obtuvo un único producto de amplificación del tamaño esperado, 461 pb para el fragmento A (fig. III.B.7a) y 282 pb para el B (fig. III.B.7b). Se incluyeron controles en los que se reemplazó el molde por agua.

III.B.5B) EN AISLAMIENTOS ARGENTINOS DE CAMPO: DIGESTIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN

En este caso, como se conocía la secuencia de los clones de los aislamientos de distinto origen geográfico, los fragmentos se obtuvieron por digestión del producto de PCR. Los mapas de digestión teóricos de las secuencias antes mencionadas (realizados con el programa Map), mostraron la presencia de un sitio para *Bgl* II, muy conservado. Este sitio aparece en todos los clones secuenciados y también en las secuencias de los aislamientos de CTV depositadas en el *GeneBank*. La digestión con esta enzima produce dos fragmentos de 265 y 459 pb, respectivamente (fig. III.B.8). El fragmento de 265 pb (denominado menor) contiene el extremo 5' del gen, mientras que el fragmento de 459 pb (denominado mayor) incluye la mitad y el extremo 3' del mismo. Ya que el tamaño de estos fragmentos es adecuado para una buena resolución, se decidió realizar una digestión del producto de PCR del gen p27 con *Bgl* II previa al análisis de SSCP.

Para obtener los fragmentos de digestión deseados se amplificó el gen p27 con los *primers* p27-5' y p27-3' a partir de material de las estrías elegidas en el ensayo de *colony blot*. Con una alícuota de los productos obtenidos se verificó el tamaño en gel de agarosa. En todos los casos se obtuvo un único producto de la longitud deseada, 724 pb (fig. III.B.9a). Los productos de PCR obtenidos se sometieron a digestión con la endonucleasa *Bgl* II (GIBCO BRL) y el tamaño de los fragmentos resultantes se controló por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida que se tiñeron con nitrato de plata (fig. III.B.9b). Este tipo de geles permite estimar si la masa sembrada es adecuada para el análisis por SSCP. En los ciento diez clones analizados se comprobó la existencia del sitio conservado para la enzima *Bgl* II.

III.B.6) DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS DE SSCP

La técnica de SSCP es muy sensible pero para lograr una buena discriminación de las variaciones de secuencia y una adecuada reproducibilidad de los experimentos es necesario considerar una serie de parámetros. Estos son: a) mantener la temperatura constante durante la electroforesis de los productos; b) determinar la temperatura ideal para el análisis por SSCP para cada fragmento de interés; c) diluir los productos de PCR a ser analizados para evitar renaturalizaciones debidas al exceso de masa; d) elegir el tipo y concentración del *buffer* utilizado durante la resolución de los productos;

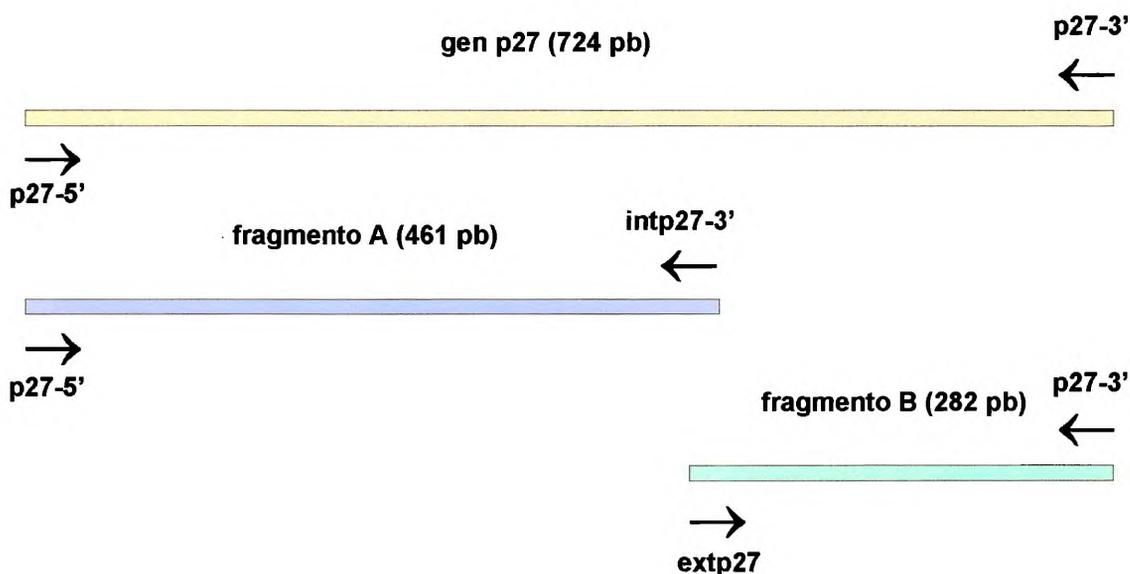


Figura III.B.6: Esquema representativo de los productos de amplificación obtenidos para el estudio de SSCP del gen p27 en aislamientos de distinto origen geográfico. Las flechas indican la posición de los *primers* utilizados para la amplificación de los fragmentos A y B.

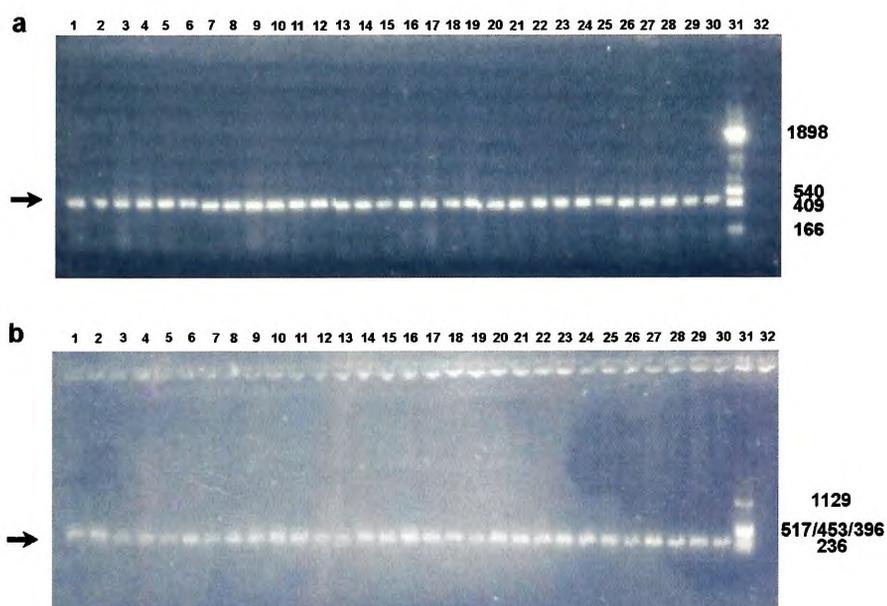


Figura III.B.7: Amplificación de los fragmentos A y B del gen p27. **a:** Amplificación del fragmento A a partir de colonias recombinantes del aislamiento T312. Calles 1 a 30: productos de amplificación (señalados con una flecha); calle 31: marcador de PM, plásmido pcDNA II/Dde I (los tamaños de los distintos fragmentos se indican en la figura); calle 32: control negativo de la reacción. **b:** Amplificación del fragmento B a partir de colonias recombinantes del aislamiento C268-2. calles 1 a 30: productos de amplificación (indicados con una flecha); calle 31: marcador de PM, plásmido pcDNA II/Hind III/Hinf I (en la figura se señalan los tamaños de las bandas que se visualizan en el gel); calle 32: control negativo de la reacción. El análisis de ambos fragmentos se realizó, por separado, en gels de agarosa 1%-TAE 1x.

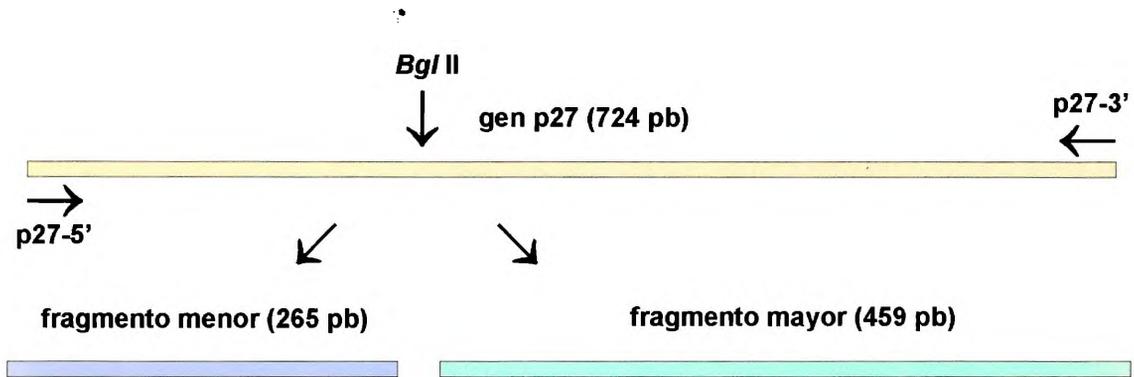


Figura III.B.8: Esquema representativo de los productos de restricción obtenidos por digestión con la endonucleasa *Bgl* II, utilizados para el análisis de SSCP del gen p27 en aislamientos argentinos de CTV. La flecha vertical señala la posición del sitio blanco de la enzima y se indican los tamaños de los fragmentos producidos.

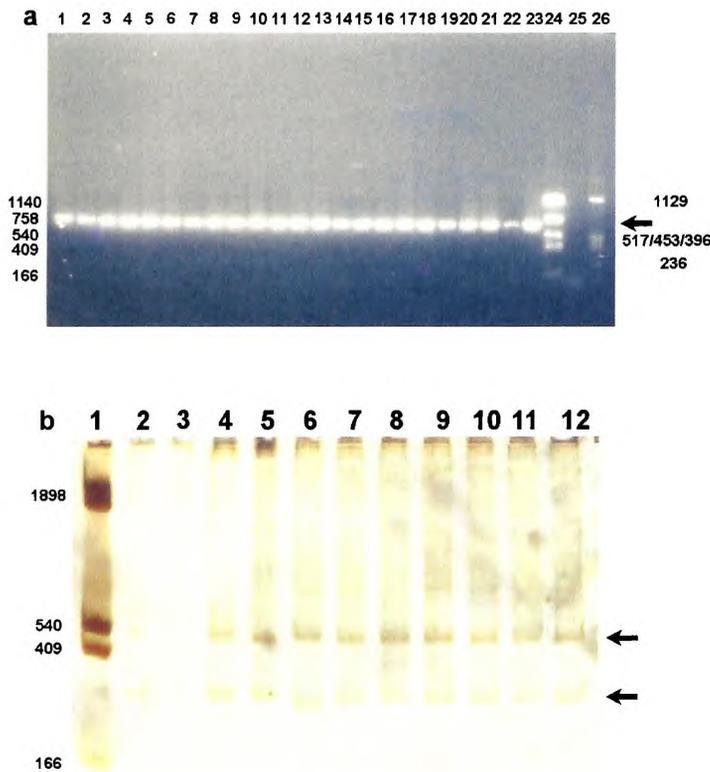


Figura III.B.9: Preparación de material para el análisis de SSCP en aislamientos argentinos de CTV. **a:** amplificación, por PCR, del gen completo sobre colonias recombinantes identificadas por hibridación en *colony blot*. Gel de agarosa 0,8%-TAE 1x. Calles 1 a 23: producto de amplificación (se señala con una flecha). Las calles 1 a 3 corresponden a colonias del aislamiento C257-2, las calles 4 a 8 al aislamiento C257-7, las calles 9 a 23, a colonias del aislamiento C257-9. Calle 25: control negativo de la reacción. Calles 24 y 26: marcadores de PM, plásmido pcDNA II digerido con *Dde* I/*Xho* I y con *Hinf* I/*Hind* III, respectivamente. A la izquierda se indican los tamaños de los fragmentos del marcador de PM de la calle 24 y a la derecha los tamaños de los fragmentos visibles del marcador de la calle 26. **b:** productos de digestión del gen p27 con la enzima *Bgl* II. Gel nativo de poliacrilamida 15%, TBE 1x, teñido con plata. Calles 2 a 12: digestiones correspondientes a distintos clones del aislamiento C257-2. Los productos de digestión se señalan con flechas. Calle 1: marcador de PM, plásmido pcDNA II/*Dde* I, los tamaños de los fragmentos se indican a la izquierda del gel.

e) seleccionar la concentración del gel de poliacrilamida nativa a utilizar en el análisis y f) incorporar agentes desnaturalizantes si se desea teñir los geles con bromuro de etidio, dado que el incremento de masa necesario para poder realizar la visualización con este colorante favorece la renaturalización entre las moléculas.

El primer punto es de crucial importancia, ya que la formación de puentes de hidrógeno intracatenarios, determinante de la conformación de cada hebra, depende estrictamente de la temperatura. Las variaciones de la misma durante la electroforesis tienen como consecuencia la aparición de distintas conformaciones observables como un múltiple patrón de bandas que interfiere en la correcta interpretación de los resultados. Este es el parámetro de mayor importancia para una aplicación exitosa de esta técnica. También es necesario determinar la masa adecuada de DNA, ya que un exceso produce cantidades significativas de dsDNA debido a la rápida cinética de las reacciones de renaturalización, tanto de carácter parcial como total. Para poder teñir los geles con bromuro de etidio es necesario sembrar mayor cantidad de DNA y para evitar las renaturalizaciones debidas a efectos de masa, se deben incorporar agentes desnaturalizantes tales como hidróxido de metilmercurio, hidróxido de sodio o urea. En cuanto al *buffer*, se utiliza TBE de concentraciones que cubren un rango entre 0,25 y 2x, aunque la más usada es 1x.

Los distintos eventos que afectan la movilidad de la hebras de ssDNA ejercen su acción sobre la separación de las mismas y ocurren en la interfase del gel. Cuando el DNA abandona el ambiente desnaturalizante, en la fosa del gel, adquiere rápidamente una conformación basada en la estabilidad térmica de las regiones de complementaridad intracatenaria. Ante condiciones constantes de temperatura y fuerza iónica, la conformación se mantiene y todas las moléculas con igual secuencia migran como una banda bien definida y acotada. En cambio, si las condiciones se alteran durante la electroforesis (principalmente si ocurren cambios en la temperatura) los confómeros cambian, los patrones de migración se alteran y, dado que esos eventos no ocurren simultáneamente en todas las moléculas, se obtienen bandas difusas no reproducibles.

Para determinar las condiciones óptimas de resolución de ambos fragmentos del gen p27 se realizaron varios ensayos. Inicialmente se resolvió el fragmento de 282 pb a diferentes temperaturas y se determinó que la óptima era 21°C. Se observó que la mejor resolución se obtenía con geles de poliacrilamida 15% con *buffer* TBE 1x. Estandarizados estos parámetros se procedió a establecer la cantidad de DNA que permitía la mejor definición de confómeros y para ello se resolvieron masas distintas del producto de PCR del fragmento B de un clon del aislamiento T312 en un gel nativo de poliacrilamida 15% (fig. III.B.10). Se halló que si la masa es elevada (calles 1 y 2), se producen múltiples bandas

debidas a la renaturalización parcial de las hebras de ssDNA. A medida que se diluyó el producto se observaron nítidamente las dos hebras perfectamente resueltas (calles 3 a 7 inclusive) hasta que a una dilución superior las mismas dejaron de visualizarse (calle 8). A partir de los datos obtenidos y, considerando que en reacciones estandarizadas de PCR en las que se amplifican productos clonados se obtienen alrededor de 250 nanogramos, se determinó que la cantidad óptima a ser sembrada oscila entre 2,5 y 25 ng.

En algunos aislamientos los fragmentos A y B del gen p27 se obtuvieron por PCR en un ciclador térmico que usa capilares de vidrio (Idaho Technologies). En este tipo de cicladores es necesario agregar BSA a la reacción para evitar la desnaturalización térmica de la *Taq* polimerasa en la interfase líquido-sólido. La presencia de BSA en las muestras interfirió la buena resolución de las dos hebras del producto, en el análisis por SSCP, aparentemente debido a la presencia de algún contaminante que se unía al DNA. Los productos debieron purificarse por extracción con fenol-cloroformo seguida de precipitación alcohólica. Para evitar este paso adicional las restantes reacciones se llevaron a cabo en un ciclador que utiliza tubos plásticos y no requiere la incorporación de BSA a la mezcla de reacción. Para comparar las muestras generadas con ambos equipos se realizaron ensayos que demostraron que la procedencia del producto de amplificación no incidía en su posterior comportamiento electroforético.

Las electroforesis se realizaron de acuerdo a los descrito en la sección de Materiales y Métodos. Para la resolución del fragmento A se utilizaron geles de poliacrilamida 12% y 20°C; mientras que para el fragmento B se usaron geles de 15% y 21°C de temperatura. Los fragmentos de digestión del gen p27 con *Bgl* II se resolvieron en geles 12% a 20°C. La temperatura se mantuvo constante durante toda la corrida por medio de un baño de circulación de agua.

III.B.7) DETERMINACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DE INSERCIÓN EN EL VECTOR DE CLONADO

En los casos donde un clon presentó variación en una única porción del gen, se determinó la orientación de la inserción para secuenciar sólo la región de interés. Para ello se utilizaron distintas estrategias:

1) digestión con *Dde* I: se incubó 1 µg de DNA plasmídico con 1,5 U de la enzima y el *buffer* adecuado durante 1 h a 37°C. Los productos se resolvieron en gel de agarosa 0,8%-TAE 1x y la orientación se determinó de acuerdo al tamaño y número de los fragmentos obtenidos (fig. III.B.11). Independientemente de la orientación de clonado se espera la aparición de bandas de 540, 409 y 166 pb, propias del vector. La observación de bandas de 1444, 809 y 358 pb indican que el inserto se ligó en la orientación "directa" (el extremo 5' del gen contiguo al promotor de T7), mientras que si lo hizo en orientación "inversa" (el extremo 3' del gen contiguo al promotor de T7) se esperan bandas de 1310 y 1299 pb.

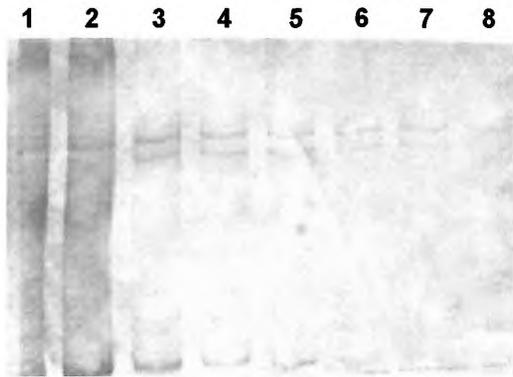


Figura III.B.10: Análisis de las masas de DNA adecuadas para el análisis de SSCP. Gel nativo de poliacrilamida 15%-TBE 1x, teñido con nitrato de plata. En cada calle se sembraron diferentes masas del producto de amplificación del fragmento B del gen p27 de un clon del aislamiento T312. Calles 1 y 2: 1 y 0,5 μ l del producto sin dilución; calles 3 a 8: 0,5 μ l de diluciones 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/30 y 1/50, respectivamente. Las flechas indican la posición de los conformeros correspondientes a las dos hebras del fragmento.



Figura III.B.11: Determinación de la dirección de inserción del gen p27. Gel de agarosa 1%-TAE 1x. Calles 1 a 7: patrones electroforéticos de siete clones digeridos con la enzima *Dde* I (los tamaños de los fragmentos resultantes se indican a la izquierda del gel). Con excepción de la colonia de la calle 2 los tamaños coinciden con los esperados de una inserción "directa" (5' del gen contiguo al promotor de T7) y la presencia de dos sitios para *Dde* I en la secuencia del gen. Calle 2: patrón esperado para un inserción "directa" y la presencia de un único sitio *Dde* I, con asteriscos se indica la banda de 1167 pb, producto de la suma de los fragmentos de 809 y 358 pb. Calle 8: marcador de PM, DNA del fago λ /*Hind* III/*Eco*R I (se indican los tamaños de los fragmentos que se visualizan en el gel). Los tamaños indicados corresponden a pb.

2) doble digestión: se incubó 1 µg de DNA plasmídico con 1 U de *Nco* I (sitio único de corte en el vector), 2,5 U de *Bgl* II (sin sitio de reconocimiento en el vector y con un único sitio en el inserto) y el *buffer* adecuado durante 1 h a 37°C. Los productos se resolvieron en gel de agarosa 0,8%-TAE 1x y la orientación se determinó de acuerdo a la longitud y al número de los fragmentos obtenidos. La aparición de un producto de 280 pb indica que el inserto se ligó en la orientación "directa", mientras que, si el producto liberado tiene 474 pb, la ligación ocurrió en orientación "inversa".

III.B.8) REACCIONES DE SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS

Las reacciones de secuenciación se ejecutaron de acuerdo a los descrito en la sección general de materiales y métodos. Como molde de las mismas se utilizaron minipreparaciones de DNA plasmídico de los clones seleccionados o amplificaciones por PCR (en el caso de la secuenciación directa). La secuenciación completa de cada clon se realizó con los *primers* universales T7 y SP6 y con *primers* específicos del gen p27 (intp27-3', intp27-5' y extp27). Las secuencias obtenidas se transfirieron al directorio de trabajo en la computadora SUN y se transformaron a lenguaje GCG por medio de los programas ChopUp y Reformat (GCG). Para el análisis de las mismas se utilizaron los programas Gap, BestFit, Reverse, Map y SeqEd entre otros. En todos los casos se emplearon los parámetros por *default* de los programas para la penalización de apertura (50) y extensión (3) de *gaps* en secuencias nucleotídicas. La secuencia completa de cada clon se realizó con el programa Assemble. Como control y para uniformar el análisis de las secuencias individuales, se comparó la totalidad de ellas con la secuencia del gen p27 del aislamiento T36 de Florida (Karasev *et al.*, 1995). La presencia de cambios con respecto a esta última se verificó por análisis individual de los cromatogramas correspondientes.

Para el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas se utilizó el programa PileUp (GCG). En este caso también se utilizaron los parámetros por *default* para las penalización de creación (12) y extensión (4) de *gaps*. Los alineamientos generados se visualizaron con los programas Pretty (GCG) y ClustalW que producen, además, una secuencia consenso. Las secuencias aminoacídicas deducidas se obtuvieron con el programa Translate y para la comparación de las mismas con el programa Gap se utilizaron los valores de penalización de apertura (12) y extensión (4) de *gaps* establecidos.

III.B.9) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS

Los postulados fundamentales de la sistemática filogenética son: a) la naturaleza tiene una estructura jerárquica; b) dicha estructura puede representarse por medio de diagramas ramificados (cladogramas); c) la estructura jerárquica que existe en la naturaleza puede rescatarse realizando un muestreo de caracteres; d) los grupos se forman en función de la posesión

de novedades evolutivas (sinapomorfias) y e) una vez construidas las hipótesis (cladogramas) se elige una de ellas. La elección de la hipótesis se realiza seleccionando la que presente el menor número de pasos evolutivos (parsimonia) o aquella con mayor probabilidad de obtener los datos observados, en base a un modelo propuesto y a la historia evolutiva hipotetizada (*maximum likelihood*).

La inferencia de una filogenia es un procedimiento para realizar la “mejor” estimación de una historia evolutiva de acuerdo a la información incompleta de los datos (Swofford *et al.*, 1996). Los métodos utilizados para la determinación de la filogenia que mejor explica los datos deberán ser capaces de seleccionar uno o más árboles entre todos los posibles. Pueden utilizarse dos caminos: 1) determinar una secuencia específica de pasos (un algoritmo) que lleva a la determinación de un árbol o, 2) definir un criterio de optimización para comparar filogenias alternativas y decidir cuál (o cuáles) es la mejor. En el primer grupo se encuentran varios métodos, entre ellos el *de neighbor-joining* (NJ), basado en distancias. Los métodos incluidos en el segundo grupo, entre los que se encuentran el de parsimonia (P) y el de *maximum likelihood* (ML), constan de dos pasos lógicos. Primero se define un criterio de optimización (descrito como una función objetiva) para evaluar un determinado árbol y luego se usan algoritmos específicos para utilizar el valor de optimización y encontrar los árboles que presenten los valores óptimos de acuerdo al criterio definido. En este caso, los supuestos evolutivos hechos en el primer paso se encuentran separados del evento computacional de la segunda etapa. Cuando se utilizan métodos puramente algorítmicos el algoritmo define el criterio de selección del árbol y es de fundamental importancia, mientras que en los métodos basados en criterio, el algoritmo es sólo una herramienta para evaluar la función objetiva y buscar los árboles que la optimicen (Swofford *et al.*, 1996).

El análisis filogenético tiende a inferir la historia más consistente con respecto a un determinado conjunto de datos. Bajo el criterio de parsimonia se elige la hipótesis más simple para explicar los datos y la inferencia de filogenias se realiza seleccionando el o los árboles que presentan el menor número de pasos evolutivos. Por otro lado, bajo el criterio de ML se concluye que la historia con mayor probabilidad de originar el estado actual de hechos es la hipótesis de elección frente a otra historia con menor probabilidad de producir ese mismo estado (Swofford *et al.*, 1996). Para utilizar el criterio de ML es necesario contar con un modelo concreto que permita la conversión de una secuencia en otra. Este modelo puede definirse previamente o puede contener una serie de parámetros que se obtienen a partir de los datos. Una aproximación a la inferencia filogenética del tipo ML permite evaluar la posibilidad que las secuencias observadas se hayan originado tomando un modelo evolutivo determinado. Dicho en otros términos, la probabilidad de obtener esos datos aplicando determinado modelo. La filogenia se infiere a

partir de los árboles que tengan los mejores valores de *likelihood* (probabilidad) (Swofford *et al.*, 1996).

III.B.9A) CONSIDERACIONES DEL ANÁLISIS SEGÚN EL CRITERIO DE *MAXIMUM LIKELIHOOD*

Para la búsqueda de árboles con el mejor valor de probabilidad se emplean modelos que tienen en cuenta parámetros de velocidad de cambio de las bases y de frecuencia (π) de las mismas. El parámetro velocidad está compuesto por: μ , que es la media instantánea de la velocidad de sustitución y por a, b, c, \dots, l , que son velocidades relativas de sustitución de un nucleótido por otro ($a = A \rightarrow C$, $b = A \rightarrow G$, $c = A \rightarrow T$, $d = C \rightarrow G$, $e = C \rightarrow T$, $f = G \rightarrow T$, $g = C \rightarrow A$, $h = G \rightarrow A$, $i = T \rightarrow A$, $j = G \rightarrow C$, $k = T \rightarrow C$, $l = T \rightarrow G$). Normalmente, se asume que la velocidad de cambio de la base $i \rightarrow j$ es la misma que la velocidad de cambio de $j \rightarrow i$. Estos modelos toman el nombre de “tiempo reversibles” (*time reversible*) y los parámetros de velocidad se simplifican, ya que $g = a$, $h = b$, $i = c$, $j = d$, $k = e$ e $l = f$. De este modo se reducen las sustituciones a: $a = A \leftrightarrow C$, $b = A \leftrightarrow G$, $c = A \leftrightarrow T$, $d = C \leftrightarrow G$, $e = C \leftrightarrow T$, $f = G \leftrightarrow T$. De acuerdo a estas consideraciones a, c, d y f incluyen a las transversiones mientras que b y e a las transiciones.

El análisis se puede realizar bajo las premisas de distintos modelos (Swofford *et al.*, 1996). El modelo de Jukes y Cantor (JC) propone que tanto las frecuencias de las bases como la velocidad de cambio de las mismas son iguales ($\pi = 0,25$ para cada base y $a = b = c = d = e = f$). Otros modelos postulan que la frecuencia de las bases es la misma ($\pi = 0,25$ para cada base) pero que varía la velocidad de cambio. Entre estos, Kimura *two parameter model* (K2P), donde se consideran dos tipos de sustituciones: transiciones ($b = e$) y transversiones ($a = c = d = f$) y Kimura *three-substitution-type model* (K3ST), en el que se consideran transiciones ($b = e$) y dos tipos de transversiones ($c = d$ y $a = f$). El modelo de Zharkikh (SYM) considera que la velocidad de cambio es distinta para todos los cambios posibles ($a \neq b \neq c \neq d \neq e \neq f$). También existen modelos que postulan que la frecuencia de las bases no es la misma ($\pi \neq 0,25$ para cada base). Dentro de esta consideración global se plantean distintas velocidades de cambio para tipos diferentes de sustituciones. El modelo de Felsenstein (F81), equivalente al modelo de Tajima *and* Nei de 1982, considera un solo tipo de sustituciones ($a = b = c = d = e = f$); el de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85) y un segundo modelo de Felsenstein (F84) toman en cuenta dos tipos de sustituciones distintas, transiciones ($b = e$) y transversiones ($a = c = d = f$) mientras que el de Tamura y Nei (TrN) considera tres tipos de sustituciones (transversiones, $a = c = d = f$, y dos tipos de transiciones, $b \neq e$). Por otra parte, el modelo *general-time-reversible* (GTR) plantea que las frecuencias son diferentes ($\pi \neq 0,25$ para cada base) y considera diferentes a cada una de las sustituciones posibles ($a \neq b \neq c \neq d \neq e \neq f$).

Los modelos descritos anteriormente asumen que todos los sitios de una secuencia evolucionan a la misma velocidad y la violación de este supuesto puede alterar los resultados. Por ello, la heterogeneidad en la velocidad de variación de los distintos sitios de una secuencia, es otro parámetro a considerar para mejorar el valor de probabilidad obtenido. La distribución continua más utilizada para representar la variación en velocidad de cambio es la distribución gamma (Γ). Esta distribución se compone de dos parámetros, α , que es la forma y β , que es la magnitud. A medida que α se incrementa, la distribución converge hacia un modelo con igual velocidad de cambio de todos los sitios, de modo que cuando $\alpha = \infty$ todos los sitios van a presentar la misma velocidad de cambio. Cuando α se aleja de ∞ se produce una distribución en la que la mayoría de los sitios cambian muy lentamente y unos pocos evolucionan de manera moderada a rápida. Los valores de α pueden ajustarse de modo tal de optimizar el análisis de los datos.

III.B.9B) PROCEDIMIENTO DE ESTIMACIÓN DEL SIGNIFICADO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS: ANÁLISIS DE *BOOTSTRAPPING*

Este método se utiliza para estimar el significado estadístico de las ramas individuales dentro de un árbol. El *bootstrapping* es un método de “muestreo con reemplazo”, donde cada columna del alineamiento puede utilizarse como “muestra” para generar un determinado número de alineamientos artificiales (usualmente 100). Como la selección de las columnas es al azar y con reemplazo, cada una de ellas puede utilizarse un número variable de veces (o ninguna) en la construcción de los alineamientos. A partir de cada uno estos se produce un árbol y se registra en cuántos de ellos se encuentran los mismos patrones de ramas. Si un determinado patrón se obtiene en un 70% de los árboles se dice que tiene un respaldo del 70%. Las ramas que tienen un valor de *bootstrapping* mayor al 70% tienen una probabilidad del 95% de ser correctas (Lake and Moore, 1998).

III.B.9C) EVALUACIÓN DE HIPÓTESIS: *LIKELIHOOD RATIO TEST*

Para la evaluación del árbol obtenido en la primera etapa se utilizaron los distintos modelos del método de *maximum likelihood*. Los valores de probabilidad (*likelihood*) obtenidos con los distintos modelos se evaluaron con el *likelihood ratio test*, que permite determinar si un modelo es significativamente mejor que otro para “explicar” los datos de secuencia encontrados. La fórmula utilizada es la siguiente:

$$\Delta = 2 [-\ln L_0 - (-\ln L_1)], \text{ donde:}$$

– $\ln L_0$ es el valor de probabilidad de la hipótesis nula

– $\ln L_1$ es el de la hipótesis alternativa

El valor de Δ se localiza en una tabla de χ^2 de acuerdo a los grados de libertad que se establecen determinando la diferencia entre el número de parámetros libres de cada modelo. Si la hipótesis alternativa no es significativamente mejor

que la hipótesis nula se conserva esta última, ya que siempre se trata de explicar los datos con el modelo más simple posible.

III.B.9D) PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

Para realizar el análisis filogenético de los datos se utilizó la versión 4.0b6 para Windows del programa PAUP* (Swofford, 1998). Este programa utiliza, como archivo de entrada un alineamiento múltiple. Los alineamientos se realizaron con el programa PileUp (GCG), sin modificar los parámetros por *default* del mismo. Los árboles se obtuvieron con el método *neighbor-joining* y también bajo los criterios de parsimonia y *maximum likelihood*. De este modo en la búsqueda de árboles se empleó uno de los métodos algorítmicos y dos de los que plantean la determinación de un criterio de optimización. Cuando se utilizó el criterio de *maximum likelihood* se evaluaron los árboles con los distintos modelos y los resultados obtenidos se analizaron con el *likelihood ratio test* de acuerdo a lo descrito. Con los datos empleados, el modelo GTR (*general-time-reversible*) mostró un valor significativamente mejor que el modelo HKY85 (Hasegawa-Kishino-Yano). Por otro lado, la incorporación de la distribución Γ al modelo también mejoró significativamente el valor de *likelihood*. Como consecuencia de ello, la totalidad de los árboles obtenidos bajo el criterio de ML, se analizaron con el modelo GTR con distribución Γ ($\alpha=0,5$).

Uno de los problemas básicos del análisis filogenético es la elección del grupo externo (*outgroup*). En este trabajo se utilizó como grupo externo el gen equivalente de BYV, p24. Los árboles se construyeron con y sin esta secuencia como *outgroup*. Dado que la secuencia de p24 es muy diferente a la de p27 su inclusión hace que las distancias entre las secuencias de este último gen se acorten aunque no modifica la topología del árbol (fig. III.B.12a y b). Cuando no se fija un grupo externo, el programa toma como referencia la primera secuencia del alineamiento múltiple de entrada. Todos los árboles que se construyeron en este trabajo son no enraizados. Este tipo de árboles permite visualizar las relaciones y distancias entre aislamientos sin definir el sentido de la evolución de los mismos (Lake and Moore, 1998).

En las búsquedas realizadas por el método de NJ se obtiene un único árbol como resultado del proceso. Por otro lado, cuando se utilizan los criterios de P o ML es posible que se logre más de un árbol con el mismo número de pasos o con el mismo valor (*score*), respectivamente. Cuando se obtuvieron resultados de este tipo se construyó un árbol consenso, de acuerdo a la regla del consenso de mayoría. En dicho árbol se visualiza la posición de los distintos grupos pero no es posible determinar las distancias existentes entre ellos. Con el fin de determinar el significado estadístico de las ramas de los árboles obtenidos, se determinaron los valores de *bootstrapping* con cien réplicas. Para visualizar los árboles se utilizó la versión 1.6.1 del programa TreeView (Win32) (Page, 1996).

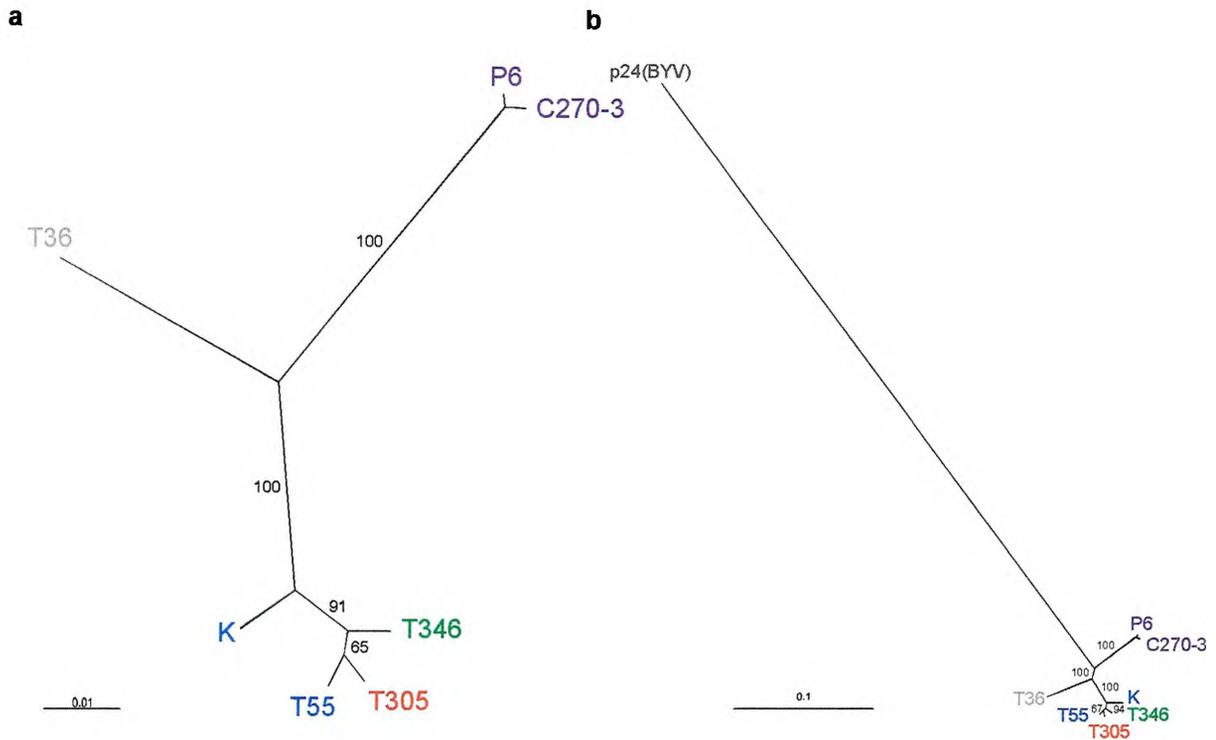


Figura III.B.12: Efecto de la inclusión del grupo externo en árboles filogenéticos no enraizados. **a:** árbol sin la inclusión de la secuencia de p24 (dCP de BYV) como grupo externo. **b:** árbol generado con los mismos datos pero con la inclusión de p24 como grupo externo. Los árboles se construyeron utilizando el método de *neighbor-joining*. Se indican los valores de *bootstrapping* de cada rama. En azul, verde, gris, lila y rojo se señalan los aislamientos correspondientes a los biogrupos I, II, III, IV y V, respectivamente.

III.B.10) SECUENCIACIÓN DIRECTA DE PRODUCTOS DE PCR

Con la finalidad de establecer la secuencia del gen p27 en los aislamientos de distinto origen geográfico no seleccionados para el análisis de SSCP (Tabla I, Cap. II) se amplificó dicho gen y se secuenció directamente, sin clonar. Las reacciones de síntesis de cDNA se realizaron con el *primer* p27-3' y dsRNA de los aislamientos T55, K, T346, 50, T36, VT, C270-3, P6 y T305, respectivamente. Para la amplificación del gen se utilizó el par de *primers* p27-5' y p27-3'. Los productos obtenidos se purificaron por precipitación con PEG₆₀₀₀ y sales, se cuantificaron en gel de agarosa y se utilizaron como molde en reacciones de secuenciación realizadas con *primers* específicos del gen p27.

III.B.10A) ANÁLISIS DE CROMATOGRAMAS DE SECUENCIAS DE PRODUCTOS DE PCR

Cuando se secuencian directamente productos de PCR, sin pasar por la etapa de clonado, la existencia de más de un pico definido y de buena altura en el cromatograma puede deberse a la presencia de polimorfismos poblacionales. Pero, debido a características del *kit* de secuenciación empleado, la asignación de picos dudosos a polimorfismos es complicada. El uso de *AmpliTaQ FS* y

dideoxinucleótidos marcados produce picos muy bajos de G luego de A (Ag) y bajos luego de C (Cg) y T (Tg), Además, los picos de A y T son altos cuando preceden a G (gA y gT) (*PE Applied Biosystem*, 1996). Estas consideraciones deben tenerse en cuenta cuando analizan las secuencias y dificultan juzgar la veracidad de la asignación de los picos (*base calling*) cuando se trata de productos que no provienen de un clon sino de una población viral. En la figura III.B.13 se observa el cromatograma correspondiente a la porción inicial de la secuencia del aislamiento T305 y los picos donde la asignación de bases resulta dudosa se indican con flechas. De acuerdo a las consideraciones mencionadas y teniendo en cuenta que en la mayor parte de los casos están involucrados nucleótidos G, se podría asegurar la presencia de dicha base si el producto proviniera de un clon.

Para solucionar el problema de asignación de bases dudosas se realizaron reacciones en presencia de $MnCl_2$ y citrato de sodio a una concentración final de 250 μM (Korch *and* Drabkin, 1999; fig. III.B.14). En estas condiciones la DNA polimerasa utilizada discrimina menos a los ddGTPs, especialmente a continuación de un dAMP no marcado, que si el *buffer* de reacción sólo contiene Mg^{2+} .

Esta modificación experimental permitió homologar la altura de los distintos picos correspondientes a los cuatro ddNTPs. Mediante el uso de este protocolo alternativo se logró establecer que el problema de asignación de bases en los picos en cuestión se debía a una situación propia del sistema de secuenciación utilizado y se pudo determinar con exactitud las secuencias de los productos de PCR sin clonar.

III.B.11) ENSAYO DE PROTECCIÓN A RNASAS

III.B.11A) PREPARACIÓN DE MOLDES DE TRANSCRIPCIÓN Y TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

Los pasos generales del ensayo de protección a RNasas se describen en la figura III.B.15. Los ensayos de transcripción *in vitro* se realizaron utilizando la RNA polimerasa del fago T7 y minipreparaciones de plásmidos recombinantes con insertos clonados en el vector pGEM-T *Easy* que posee el promotor reconocido por dicha enzima (fig. III.B.16). Para obtener transcritos de longitud uniforme y acotada se realizó un corte con una endonucleasa de restricción en la región donde se deseaba que finalice la transcripción (*run-off*).

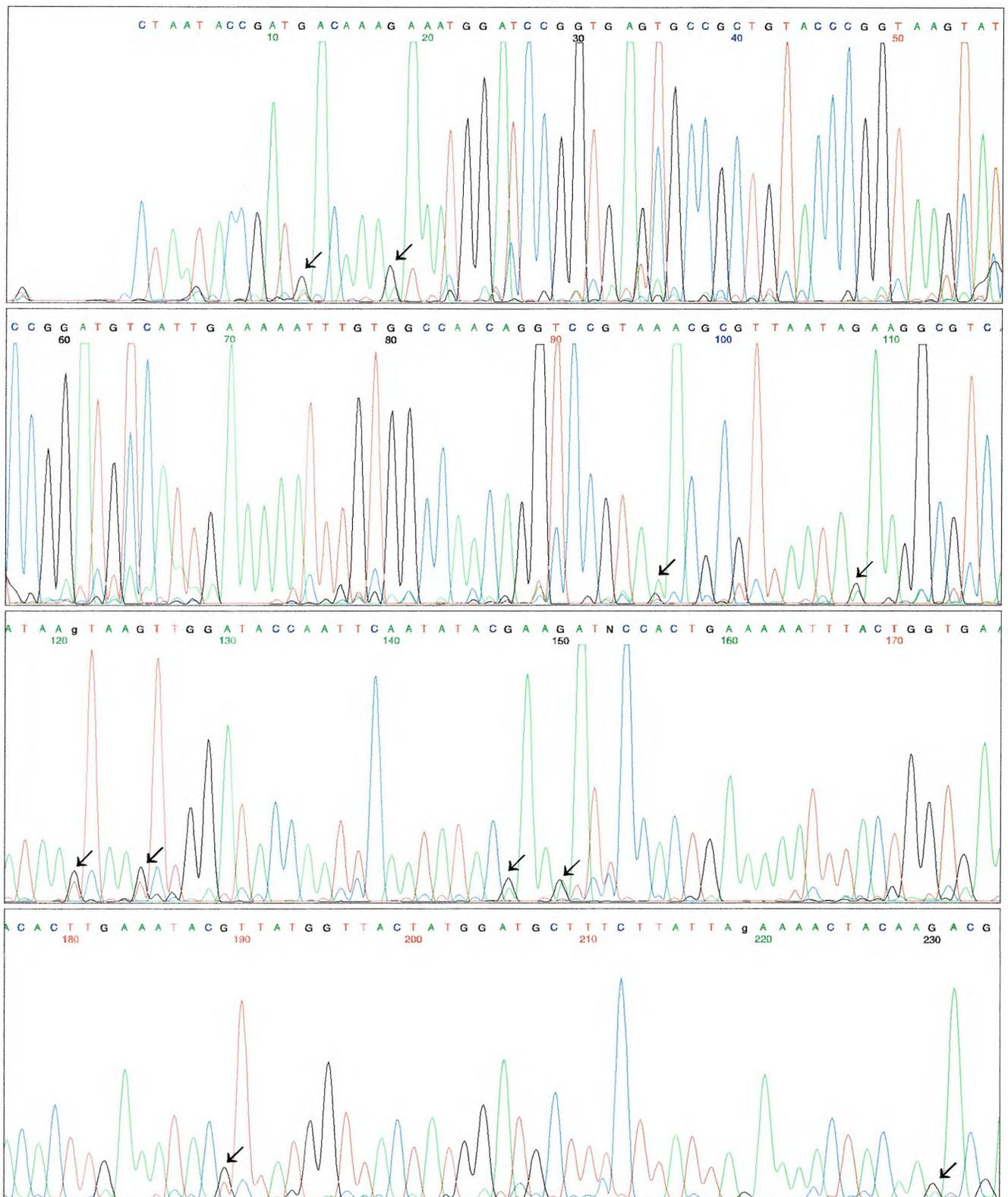


Figura III.B.13: Sección inicial del cromatograma correspondiente a la secuencia del gen p27 del aislamiento T305. Reacción llevada a cabo sobre los productos de la reacción de amplificación inicial. Las flechas indican los picos dudosos que podrían deberse a la presencia de polimorfismos poblacionales.

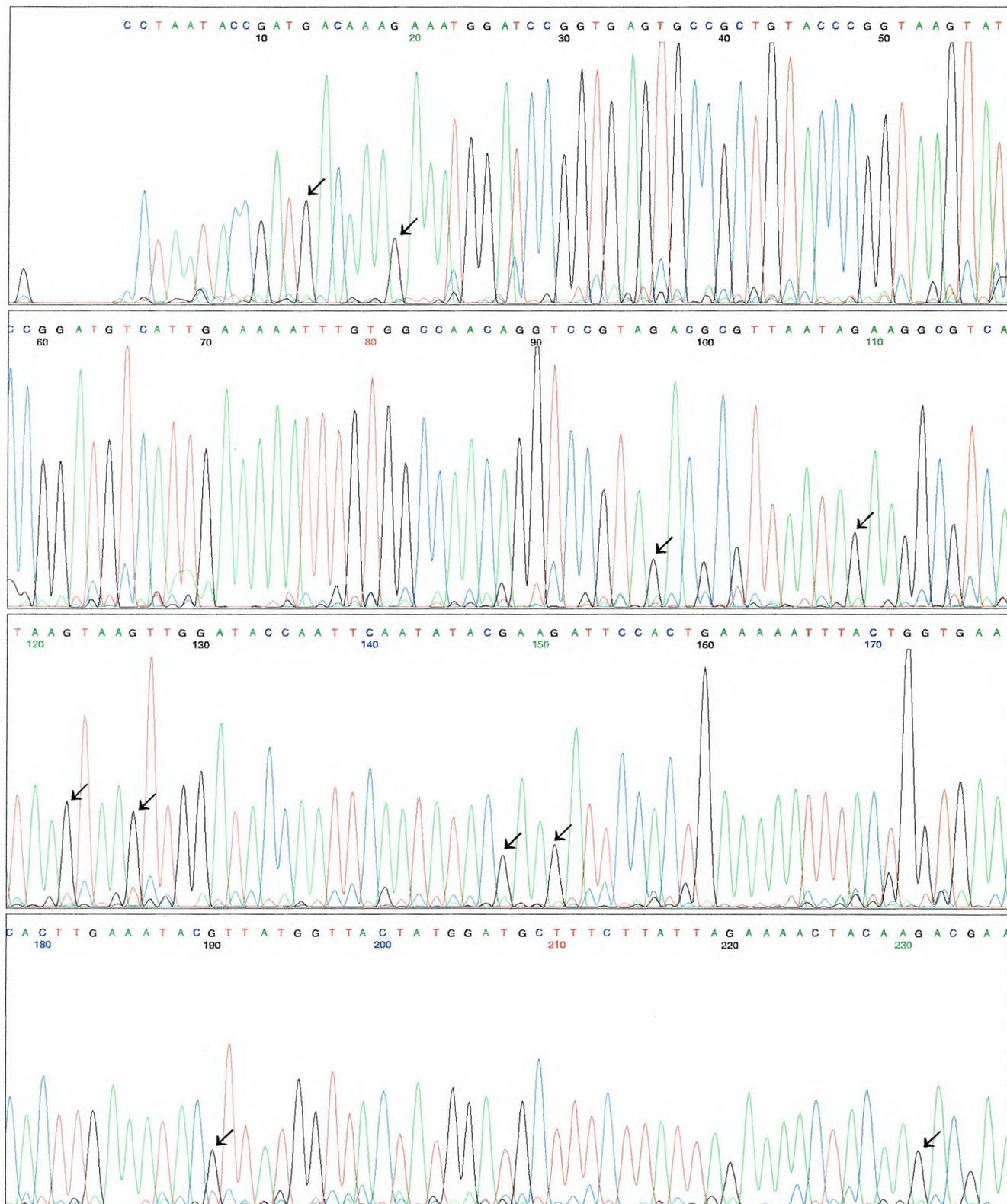


Figura III.B.14: Fragmento del cromatograma correspondiente a la secuencia del gen p27 en el aislamiento T305. La reacción se realizó en presencia de citrato de Na y $MnCl_2$. Las flechas indican las posiciones donde se sospechaba la existencia de polimorfismos poblacionales.

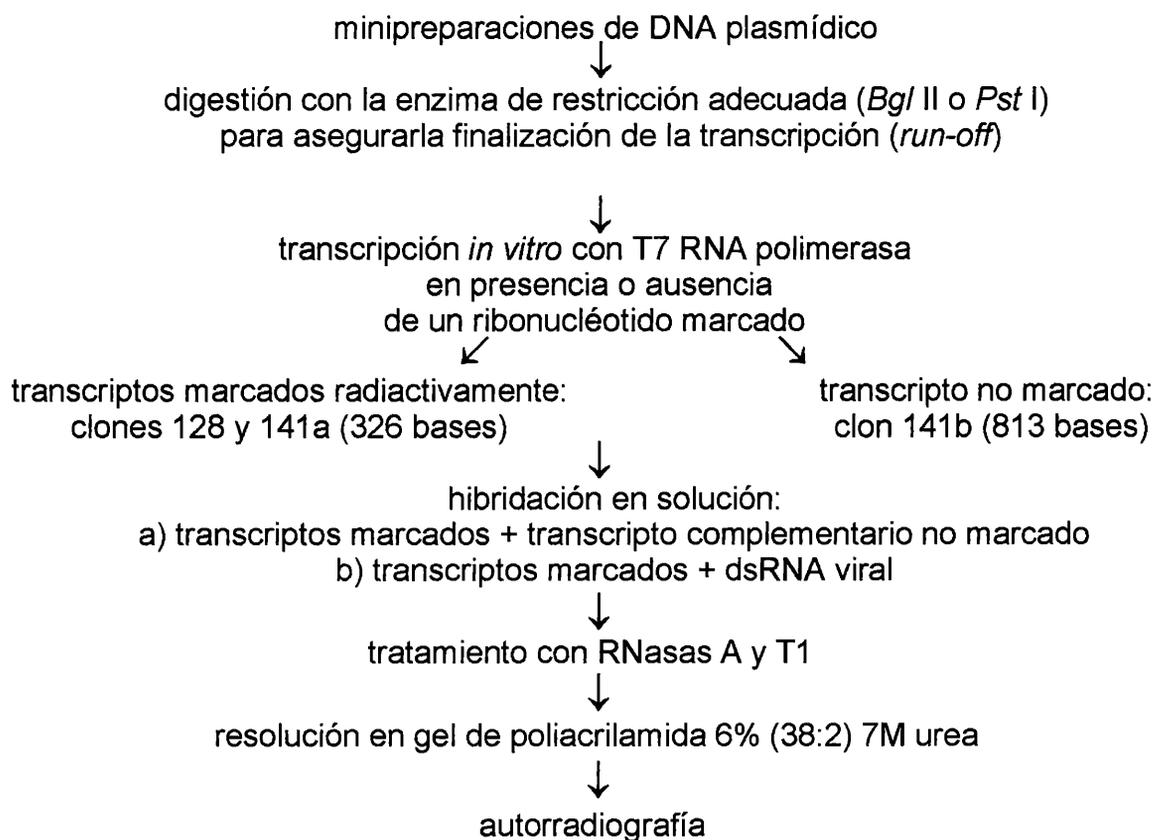


Figura III.B.15: Esquema representativo de las etapas seguidas en los ensayos de protección a RNAsas.

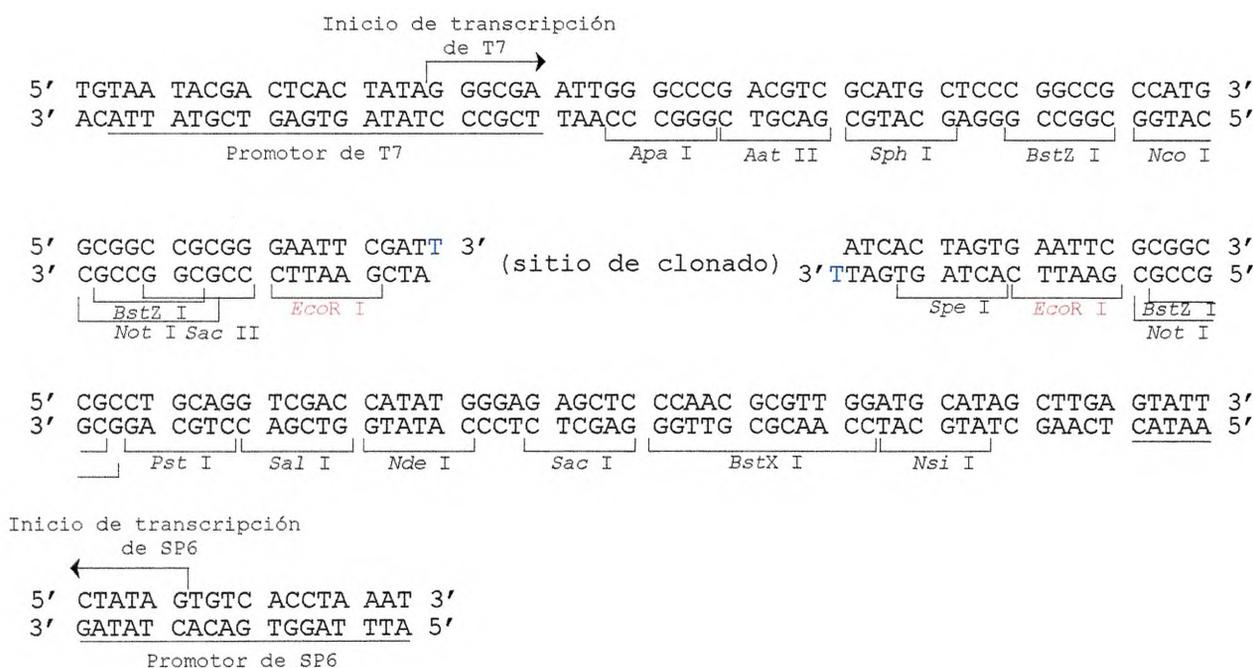


Figura III.B.16: Secuencia del sitio múltiple de clonado (*polylinker*) y de las regiones promotoras del vector pGEM-T Easy. La secuencia superior se corresponde con la de la hebra de RNA sintetizada por la RNA polimerasa de T7 y la inferior coincide con el transcripto generado por la RNA polimerasa de SP6. En azul se indican las Ts agregadas al sitio de corte de la enzima *EcoR V* para facilitar el clonado de productos de PCR producidos con *Taq* polimerasa. Los sitios *EcoR I* que flanquean al sitio de clonado se señalan en rojo.

En este ensayo se utilizaron los clones 128 y 141 del aislamiento C269-6. A partir de los datos de secuencia se estableció que el clon 128 se ligó en la orientación "directa" (extremo 5' de la secuencia codificante del gen p27 contiguo al promotor de T7) mientras que el clon 141 lo hizo en orientación "inversa" (extremo 5' de la hebra no codificante del gen p27 contiguo al promotor de T7). El molde de transcripción correspondiente al clon 128 se preparó digiriendo 4 µg del plásmido recombinante con *Bgl* II. Una alícuota del producto de digestión se sometió a electroforesis para verificar el éxito de la reacción mientras que, a la fracción restante, se le realizó una extracción fenólica para eliminar la enzima. El DNA linealizado se precipitó con acetato de sodio (0,3 M) y etanol. Luego de la centrifugación (34.400 x g, a 4°C durante 20 min) el *pellet* obtenido se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

Como el clon 141 se ligó en orientación "inversa" y no se contaba con la RNA polimerasa del fago SP6 se realizó un experimento adicional para obtener un transcripto de igual polaridad y tamaño a partir del clon 141. El inserto de dicho clon se liberó por digestión con *EcoR* I (que tiene un sitio de corte a cada lado del *polylinker* y ninguno en la secuencia del clon) y se lo volvió a ligar al mismo vector de donde se lo liberó previamente. Con la mezcla de ligación se electrotransformaron bacterias competentes. La selección de los clones que presentaron el inserto en la orientación buscada se llevó a cabo por PCR, utilizando los *primers* correspondientes al promotor de T7 (*primer sense*, con sitio de *annealing* en el vector) e intp27-3' (*antisense*, específico de p27) que amplifican un producto de 538 pb. En cuatro de las diez colonias analizadas se obtuvo el producto deseado. Se seleccionó una de ellas para continuar con los experimentos. Se utilizó una alícuota de una minipreparación de DNA plasmídico de dicha colonia para la síntesis de transcriptos, de acuerdo a lo descripto para el clon 128.

Una vez obtenidos los moldes y ajustadas las condiciones de síntesis de transcriptos, se realizó el mismo procedimiento en presencia de un ribonucleótido marcado (5'α[³²P]ATP). El tamaño e integridad de las ribosondas obtenidas se verificó por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida 4% (38:2), TBE 1x, 7 M urea (fig. III.B.17). Los marcadores de PM utilizados también se sintetizaron, a partir de distintos moldes, por transcripción *in vitro*.

Como control interno del ensayo de protección se sintetizó un transcripto complementario a los marcados radiactivamente. Para ello se utilizó el clon 141 en su orientación original (inversa). Se digirió una fracción de una minipreparación de DNA plasmídico de dicho clon con la enzima *Pst* I, que tiene un único sitio de reconocimiento en el *polylinker* del vector, del lado opuesto al del promotor de T7 (fig. III.B.16). Como *Pst* I genera extremos 3'

extendidos, el molde digerido se incubó con el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa, en ausencia de nucleótidos, para producir la remoción de los mismos por medio de su actividad como exonucleasa 3'→5'. Posteriormente se agregaron nucleótidos para incentivar la actividad de síntesis de la enzima de modo de obtener fragmentos del mismo tamaño. A continuación se realizó la transcripción *in vitro*, en ausencia de nucleótidos marcados, y se obtuvo un transcripto del tamaño esperado (813 bases). Este último es complementario a los marcados y exactamente homólogo al transcripto minoritario (141). Por otro lado, difiere de la secuencia del clon mayoritario (128) en treinta nucleótidos. Por consiguiente se espera que la protección que brinde a los transcriptos marcados sea diferente: total al 141 y parcial al 128.

III.B.11B) EXPERIMENTO DE PROTECCIÓN

Para el ensayo de protección se utilizaron 50000 cpm de transcripto marcado por tubo (equivalentes a 5 a 10 fmoles de RNA, según el decaimiento del radiactivo) y transcripto frío complementario o dsRNA total del aislamiento C269-6. En ambos casos se emplearon dos relaciones molares con respecto al marcado (1:1 y 2:1). Los transcriptos se desnaturalizaron por calor (10 min a hervor en baño María) y se incubaron en *buffer* de hibridación durante 14 h a 65°C. Posteriormente se realizó el tratamiento con RNAsas (A y T1), en el *buffer* de digestión de las mismas, durante 1 h a 30°C. Las RNAsas se inactivaron por incubación con SDS y se digirieron con proteinasa K, por medio de una incubación de 30 min a 37°C. Los productos de digestión se precipitaron con etanol, en presencia de tRNA "portador" (*carrier*) por incubación a -20°C durante 1 h y centrifugación a 34.400 x *g* durante 30 min a 4°C. Los *pellets* resultantes se lavaron con etanol 70% frío, se secaron y se resuspendieron en *buffer* de siembra.

Se incluyeron distintos controles no tratados con RNAsas: a) transcripto marcado solo, b) transcripto marcado con el agregado de transcripto no marcado complementario y c) transcripto marcado con la inclusión de dsRNA del aislamiento C269-6. Estos controles se procesaron de manera equivalente con la salvedad de la no inclusión de RNAsas en el *buffer* de digestión.

Las cpm de cada tubo se determinaron por medición en un contador de centelleo líquido. Cantidades equivalentes de producto radiactivo se desnaturalizaron por calor en presencia de *buffer* de siembra y se sembraron en un gel desnaturalizante, semejante a los anteriormente descriptos. Completada la electroforesis, los geles resultantes se expusieron a placas autoradiográficas, que se conservaron el tiempo necesario a -80°C.

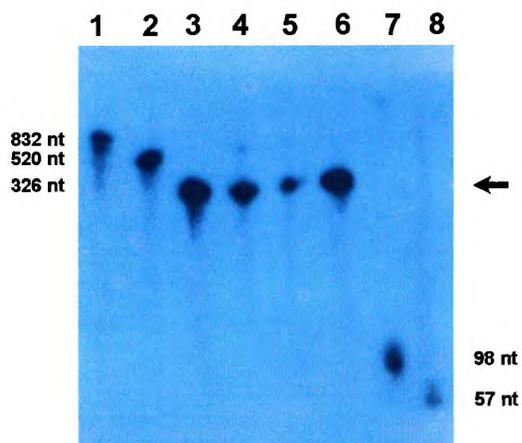


Figura III.B.17: Análisis del tamaño e integridad de las sondas utilizadas en el ensayo de protección a RNasas. Gel desnaturante de poliacrilamida 4% (38:2)-TBE1x-7M urea. Calles 1, 2, 3, 7 y 8, marcadores de PM, cuyos tamaños se indican en la figura. Calles 4, 5 y 6, transcritos correspondientes a la región 5' del gen p27 de los clones 141 (calles 4 y 5) y 128 (calle 6) del aislamiento C269-6. Todos los transcritos se sintetizaron *in vitro* con la RNA polimerasa de T7 en presencia de 5'α³²P]ATP.

CAPÍTULO III

SECCIÓN C: RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD INTER E INTRAPOBLACIONAL DEL GEN P27 EN AISLAMIENTOS DE CTV DE DISTINTO ORIGEN GEOGRÁFICO

III.C.1) ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN P27 POR ANÁLISIS DE SSCP

III.C.1A) ANÁLISIS DE SSCP DE LOS FRAGMENTOS A Y B DE LOS DISTINTOS CLONES SELECCIONADOS

Obtenidos los productos de PCR correspondientes a la amplificación de los fragmentos A y B de la totalidad de los clones seleccionados para el presente estudio, se definieron las condiciones de resolución de SSCP para cada uno de ellos. Para que el análisis fuera representativo de la población viral se estudiaron los patrones de SSCP de ambos fragmentos en 27 clones del aislamiento T385 y 30 clones de cada uno de los restantes aislamientos seleccionados. En las condiciones experimentales descritas se observaron, en la mayoría de los clones analizados, únicamente dos bandas discretas e intensas para ambos fragmentos (fig. III.C.1a y b y III.C.2a y b). Estas bandas corresponden al conformero mayoritario más estable para cada hebra de ssDNA. Este tipo de patrón de migración se encontró en la totalidad de los clones de los aislamientos T385, T312, T300 y C268-2 y en la mayor parte de los clones de los restantes aislamientos virales estudiados. Además se encontraron otros patrones de migración en algunos de los clones de los aislamientos T32, Pera GS, Barañ B, C269-6, Capañ Bonito y T388 (fig. III.C.3a y b). El análisis detallado de los patrones electroforéticos de ambos fragmentos, en cada uno de estos aislamientos se detalla a continuación:

T388: en uno de los clones analizados se observó una única banda de migración para el fragmento B. Este resultado indica que ambas hebras de ssDNA adoptan conformeros que migran de manera indistinguible;

T32: en todos los clones se obtuvo, para el fragmento B, el patrón de dos bandas esperado, mientras que, para el fragmento A, la mayor parte de los clones mostró una tenue banda adicional. Este último tipo de patrón de migración (dos bandas intensas y una suave) se debe a que una de las hebras de ssDNA puede adoptar, además de la conformación más probable, una segunda conformación alternativa que tiene prácticamente la misma estabilidad térmica que la primera;

C269-6: para el fragmento B, en un solo clon se visualizó un patrón de tres bandas (la tercera muy tenue), mientras que para el fragmento A, alrededor del 30% de los clones presentaron tres o más bandas de migración;

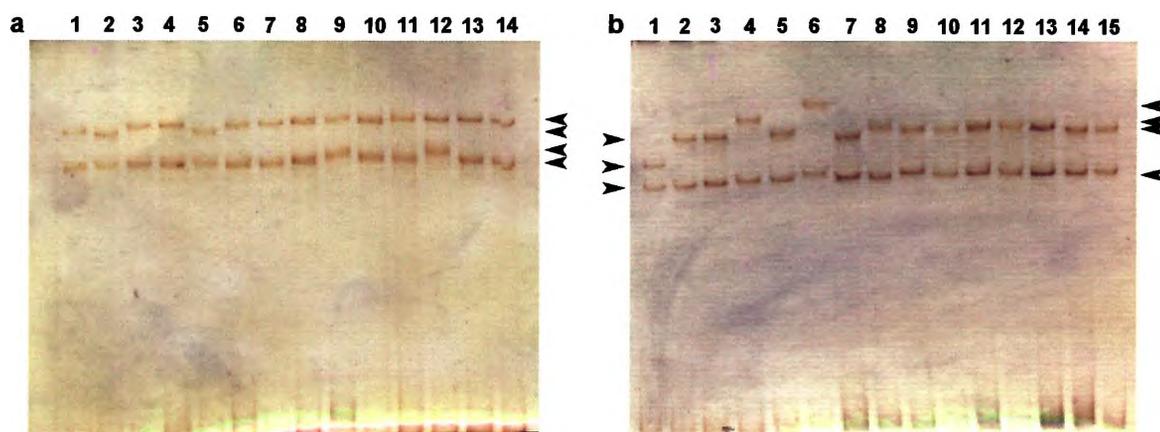


Figura III.C.1: Patrones de SSCP correspondientes al fragmento A del gen p27. La electroforesis se realizó en geles nativos de poliacrilamida 12%-TBE 1x, en las condiciones previamente descritas. Los geles se tiñeron con nitrato de plata. **a:** calles 1 a 14, patrones de SSCP de 14 clones del aislamiento T388. **b:** calles 1 a 15, patrones de migración de 15 clones del aislamiento T312. Las puntas de flecha indican los distintos conformémeros adoptados por cada hebra de ssDNA. La banda que se observa en el frente de corrida del gel corresponde a dsDNA renaturalizado.

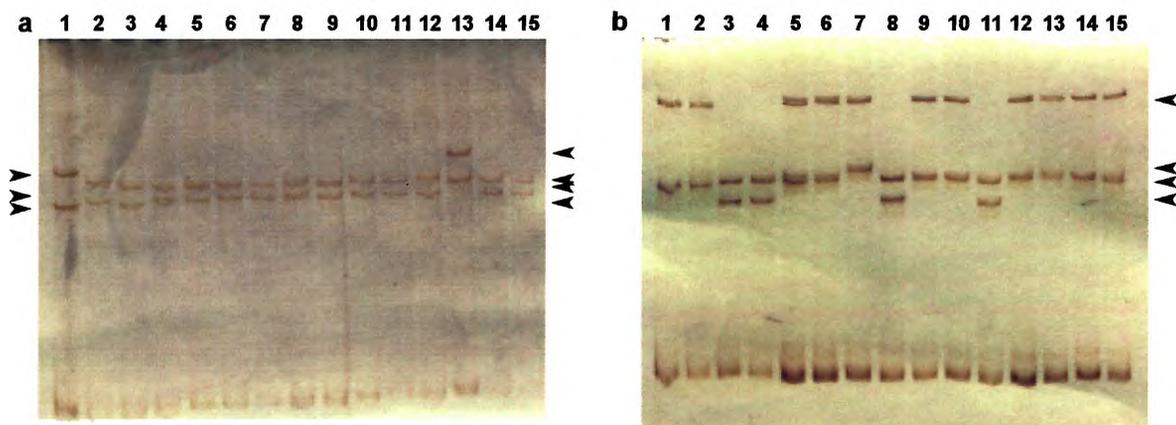


Figura III.C.2: Patrones de SSCP correspondientes al fragmento B del gen p27. La electroforesis se realizó en geles nativos de poliacrilamida 15%-TBE 1x, en las condiciones descritas. Los geles se tiñeron con nitrato de plata. **a:** calles 1 a 15, patrones de SSCP correspondientes a 15 clones del aislamiento C269-6. **b:** calles 1 a 15, patrones de migración de 15 clones del aislamiento C268-2. Las puntas de flecha indican los distintos conformémeros adoptados por cada hebra de ssDNA. La banda que se observa en el frente de corrida del gel corresponde a dsDNA renaturalizado.

Pera GS, Baraõ B y Capaõ Bonito: estos tres aislamientos, originarios de Brasil, se comportaron de manera particular en cuanto a los patrones de migración exhibidos. En el aislamiento Pera GS la mayor parte de los clones presentaron las dos bandas esperadas en ambos fragmentos. Por el contrario, en una elevada proporción de los clones de Baraõ B y Capaõ Bonito se observó un número de bandas mayor al esperado (tres, cuatro e incluso cinco, fig. III.C.3 a y b). Los resultados obtenidos en el caso de los aislamientos brasileños sugieren que, en las condiciones de análisis utilizadas (puestas a punto con clones de los aislamientos T312 y T388), existe más de una conformación probable para la secuencia del gen p27 presente en estos aislamientos. Es posible inferir, además, que las secuencias de estos dos aislamientos difieren significativamente de las de aquéllos utilizados en la puesta a punto de las condiciones de resolución de SSCP.

Los resultados del análisis de SSCP se resumen en las tablas III y IV. De la observación de las mismas se desprende que, para cada uno de los fragmentos del gen p27, existe un número variable de patrones y de clones incluidos en cada patrón (Tabla III).

Tabla III. Distribución de patrones de SSCP para los fragmentos A y B del gen p27 en diez aislamientos de CTV pertenecientes a biogrupos y orígenes distintos.

aislamiento	fragmento A			fragmento B		
	patrones observados ^z	distribución de clones en los patrones observados ^z	clon mayoritario ^y	patrones observados ^z	distribución de clones en los patrones observados ^z	clon mayoritario ^y
T32 (I)	6	(25,1,1,1,1,1)	83	8	(21,2,2,1,1,1,1,1)	70
T385 (I)	7	(17,3,2,2,1,1,1)	70	8	(18,3,1,1,1,1,1,1)	67
T300 (II)	7	(21,3,1,1,1,1,1,1)	70	10	(16,4,2,2,1,1,1,1,1,1)	47
T312 (II)	8	(21,2,2,1,1,1,1,1)	70	8	(18,4,2,2,1,1,1,1)	60
C268-2 (III)	6	(22,3,2,1,1,1)	73	3	(24,5,1)	80
Pera GS (III)	11	(12,8,2,1,1,1,1,1,1,1,1)	40	14	(12,5,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1)	40
C269-6 (IV)	8	(18,4,2,2,1,1,1,1)	60	8	(19,4,2,1,1,1,1,1)	63
Baraõ B (IV)	8	(17,4,2,2,1,1,1,1)	57	12	(16,3,2,1,1,1,1,1,1,1,1)	53
Capaõ Bonito (V)	4	(27,1,1,1)	90	6	(18,8,1,1,1,1)	60
T388 (V)	4	(23,4,2,1)	77	11	(15,3,2,2,2,1,1,1,1,1,1)	50

^zvalores expresados en cantidades

^yvalores expresados en porcentaje

Para el fragmento A se encontró que el número de patrones varía entre cuatro (aislamientos Capaõ Bonito y T388) y once (aislamiento Pera GS). Por otro lado, para el fragmento B se observó que el aislamiento C268-2 mostró el menor número de patrones (tres) mientras que el aislamiento Pera GS presentó la mayor cantidad de los mismos (catorce). Considerando el número de patrones, la mayor homogeneidad poblacional para el fragmento A se observó

en los aislamientos pertenecientes al biogrupo V (Capaõ Bonito y T388). Si se considera el gen completo, solamente el aislamiento brasileño mostró un número relativamente reducido de patrones en ambos fragmentos (Tabla III).

En general se observó un mayor número de patrones en el fragmento B; las excepciones a esta generalización son los aislamientos T312 y C269-6 que mostraron el mismo número de patrones para ambos fragmentos, y el aislamiento C268-2, que presentó más patrones en el fragmento A que en el B.

Para ambos fragmentos del gen p27 se encontró que, en todos los aislamientos estudiados, la mayoría de los clones que componen un aislamiento comparten el mismo patrón de migración (patrón mayoritario o haplotipo mayoritario). Este resultado es coincidente con uno de los patrones de distribución de clones observado cuando se analizaron los genes p18 y p20 de CTV (Ayllón *et al.*, 1999). Los restantes patrones están compuestos por un único clon o por un número reducido de ellos. Las excepciones son: el fragmento A del aislamiento Pera GS y el fragmento B del aislamiento Capaõ Bonito ya que, en estos casos, el segundo patrón en importancia incluye al 27% de los clones.

A partir de los datos obtenidos se realizó, además, el análisis de la variabilidad conjunta del gen p27. Para ello se determinó tanto el número de clones que muestran variación en uno o ambos fragmentos como el número de clones que no muestran variación (exhiben el patrón mayoritario de migración en ambos fragmentos). Los datos obtenidos se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Distribución de la variación de patrones de SSCP del gen p27 en los diez aislamientos de CTV analizados.

aislamiento	clones con variación únicamente en A ^z	clones con variación únicamente en B ^z	clones con variación en ambos fragmentos (A y B) ^z	clones sin variación (clon mayoritario) ^z	clon mayoritario (%)
T32 (I)	4	8	1	17	56,7
T385 (I)	6	5	4	12	44,4
T300 (II)	6	12	2	10	33,3
T312 (II)	4	7	5	14	46,7
C268-2 (III)	4	2	4	20	66,7
Pera GS (III)	6	6	12	6	20
C269-6 (IV)	6	6	5	13	43,3
Baraõ B (IV)	7	8	6	9	30
Capaõ Bonito (V)	1	10	2	17	56,7
T388 (V)	4	12	3	11	36,7

^zvalores expresados en cantidades

El número de clones que muestran variación en ambos fragmentos oscila entre uno (T32) y doce (Pera GS), representando el 3,33% y el 40% del total, respectivamente. Por otro lado se observó que la cantidad de clones sin

variación en ambos fragmentos se encuentra entre seis (Pera GS) y veinte (C268-2) representando el 20% y el 66,7% de la población analizada de ambos aislamientos, respectivamente. Si se considera únicamente el haplotipo mayoritario se encuentran aislamientos donde dicho haplotipo incluye a más del 50% de los clones (T32, C268-2 y Capaõ Bonito), a una cantidad comprendida entre el 40 y 50% de los clones (T385, T312 y C269-6) y a menos del 40% de los clones (T300, Pera GS, Baraõ B y T388). No es posible establecer una correlación entre el biogrupo y la abundancia relativa del haplotipo mayoritario, ya que en el primer grupo se encuentran aislamientos de los biogrupos I (T32), III (C268-2) y V (Capaõ Bonito) mientras que en el último se agrupan aislamientos de los biogrupos II (T300), III (PeraGS), IV (Baraõ B) y V (T388). Tampoco el origen geográfico se correlaciona con la abundancia del haplotipo mayoritario dentro de un aislamiento determinado. Los aislamientos que presentan un haplotipo que incluye a un alto porcentaje de clones son originarios de España, Argentina y Brasil, respectivamente, mientras que los que tienen un haplotipo mayoritario que involucra a menos del 40% de los clones provienen de España y Brasil.

III.C.1B) SSCP COMPARATIVO ENTRE CLONES REPRESENTATIVOS DE LOS PATRONES MAYORITARIOS DE CADA AISLAMIENTO

La finalidad de este análisis es comparar los patrones de SSCP de los haplotipos mayoritarios de los distintos aislamientos virales. Se analizaron los productos de amplificación de los fragmentos A y B correspondientes a los diez clones elegidos en las condiciones antes especificadas. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras III.C.4a y b. Para ambos fragmentos los aislamientos de los biogrupos débiles (I y II) mostraron patrones idénticos, con excepción del clon representativo del aislamiento T300, que exhibió un patrón levemente diferente en el fragmento A (fig. III.C.4a y b). En los restantes aislamientos se observaron patrones de migración diferentes para cada uno de ellos en ambos fragmentos. Los aislamientos del biogrupo III, Pera GS y C268-2, presentaron patrones semejantes para el fragmento A pero notoriamente diferentes para el B. Del mismo modo, los patrones de los dos aislamientos del biogrupo IV, Baraõ B y C269-6 son semejantes en el fragmento A y diferentes en el B (fig. III.C.4a y b). Del análisis de los geles se desprende que las secuencias de los clones representativos de los aislamientos débiles (biogrupos I y II) deben ser idénticas o al menos muy semejantes ya que los fragmentos exhiben los mismos patrones de migración. Por el contrario, es de esperar que las secuencias de los clones representativos de los haplotipos de los restantes aislamientos no sean idénticas ya que no se observaron patrones de migración semejantes.

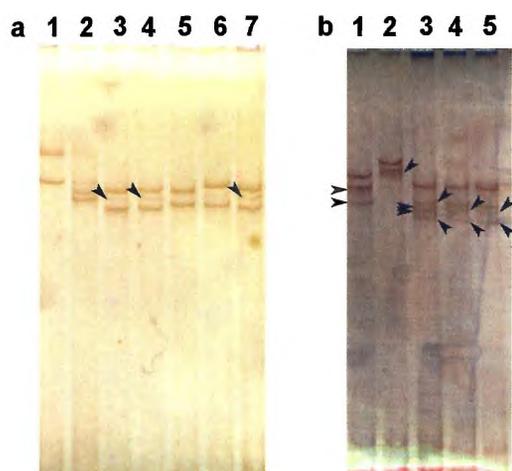


Figura III.C.3: Patrones de SSCP con conformeros adicionales. Geles nativos de poliacrilamida 15%-TBE 1x teñidos con nitrato de plata. **a:** calles 1 a 7, patrones de SSCP del fragmento B del gen p27 en siete clones (12, 13, 14, 16, 20, 22 y 23, respectivamente) del aislamiento Baraõ B. En las calles 3, 4 y 7 se observa la presencia de una banda adicional tenue. **b:** calles 1 a 5, patrones de SSCP del fragmento B correspondientes a cinco clones (21, 22, 25, 26 y 27, respectivamente) del aislamiento Capaõ Bonito. En las calles 1, 4 y 5 se observa la presencia de dos conformeros adicionales, más tenues. En la calle 2 se encuentra una banda adicional tenue mientras que en la muestra de la calle 3 una de las hebras de ssDNA adoptó cuatro conformeros diferentes e igualmente intensos. Con puntas de flechas se señalan los conformeros adicionales.

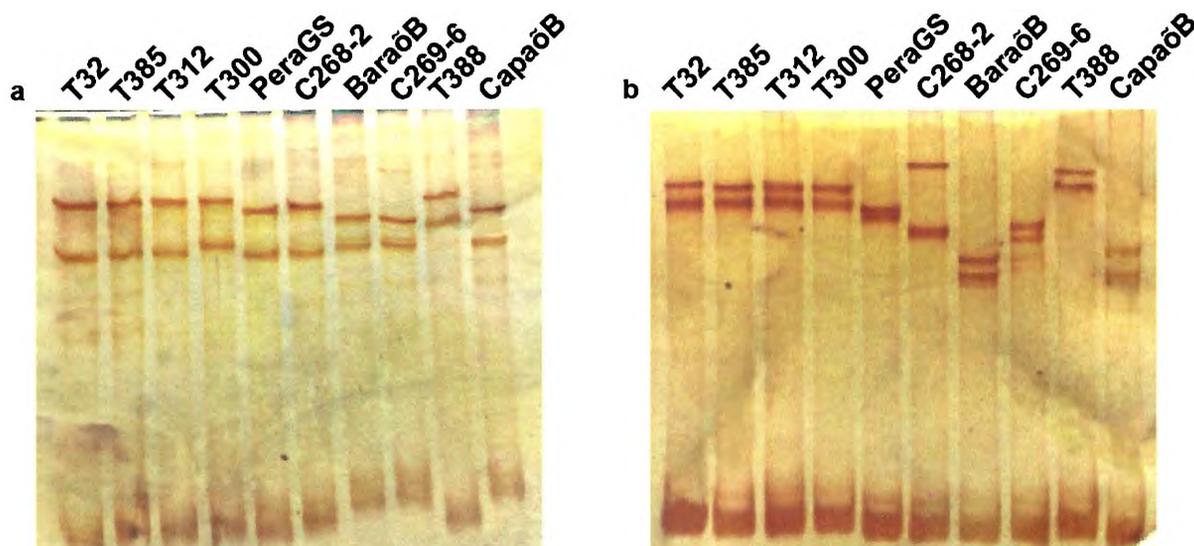


Figura III.C.4: Análisis comparativo de patrones mayoritarios de SSCP de aislamientos de distinto origen geográfico. **a:** fragmento A del gen p27 resuelto en gel nativo de poliacrilamida 12%-TBE 1x, teñido con nitrato de plata. **b:** fragmento B del gen p27 resuelto en gel de poliacrilamida nativa 15%-TBE 1x, teñido con nitrato de plata.

En **a** y **b** se sembró material correspondiente a los clones mayoritarios secuenciados: 7 (T32), 2 (T385), 1 (T312), 4 (T300), 1 (Pera GS), 6 (C268-2), 5 (C269-6), 9 (Baraõ B), 3 (T388) y 1 (Capaõ Bonito). La banda que se observa en el frente de corrida corresponde a dsDNA, producto de la renaturalización de las hebras de ssDNA.

III.C.2) ANÁLISIS DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS DEDUCIDAS DEL GEN P27 DE CLONES REPRESENTATIVOS DE LOS HAPLOTIPOS MAYORITARIOS

III.C.2A) SECUENCIACIÓN

Con el fin de profundizar el estudio de variabilidad del gen p27, se seleccionó y secuenció un clon representativo del haplotipo mayoritario de cada aislamiento (clones 7, 2, 4, 1, 1, 6, 9, 5, 4 y 1 de los aislamientos T32, T385, T300, T312, Pera GS, C268-2, Baraõ B, C269-6, T388 y Capaõ Bonito, respectivamente). La secuencia completa de cada clon se estableció por medio del uso de distintos programas del paquete GCG. Posteriormente se realizaron comparaciones de las secuencias entre sí y con la secuencia correspondiente del aislamiento T36 (Karasev *et al.*, 1995).

III.C.2B) ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

Con las secuencias nucleotídicas obtenidas se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa CLUSTAL W (fig. III.C.5). En dicho alineamiento se observa que las secuencias de tres de los aislamientos sudamericanos, C269-6, Baraõ B y Capaõ Bonito (biogrupos IV y V), son semejantes, ya que comparten la mayor parte de los cambios con respecto a la secuencia consenso generada. Los dos aislamientos del biogrupo III, C268-2 y Pera GS, también de origen sudamericano, muestran un comportamiento intermedio entre los aislamientos severos americanos y los débiles españoles. Presentan algunos cambios en común con los severos y tienen además diez cambios propios y compartidos. También muestran cambios individuales con respecto al consenso. En el aislamiento T388, derivado del aislamiento severo japonés T387 y multiplicado en España, se conservan seis de los cambios de los aislamientos severos latinoamericanos, cuatro de los cambios de los aislamientos débiles y aparecen once cambios propios. Las secuencias de los cuatro aislamientos débiles de origen español son muy semejantes entre sí, lo cual concuerda con los patrones de SSCP de los clones representativos del patrón mayoritario (fig. III.C.4a y b). La secuencia mayoritaria del aislamiento T300 presenta dos cambios en los primeros 461 nt, uno de ellos compartido con T312, por lo cual es lógico inferir que el no compartido es responsable de la diferencia de movilidad (fig. III.C.4a). Por otro lado para el fragmento A, los aislamientos T385 y T32 difieren de la secuencia de T300 y T312 en 1 y 2 nt, respectivamente. En el fragmento B, la secuencia de los aislamientos T312 y T300 es exactamente igual, mientras que la de T32 y T385 difiere en 1 nt de las restantes (y entre sí). Es interesante destacar que el cambio compartido por T300 y T312 en el fragmento A, así como los dos cambios de T32 y el único de T385 no se detectan en el análisis de SSCP. Del mismo modo las mutaciones puntuales presentes en T385 y T32 en el fragmento B, tampoco se discriminan. Si bien la técnica es muy sensible, es necesario que las mutaciones afecten a la estructura de los conformeros para ser detectadas.

	10	20	30	40	50																																														
T32	C	A	T	G	G	C	A	G	G	T	T	A	T	A	C	A	G	T	A	C	T	T	C	C	T	A	A	T	A	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	
T385	C	A	T	G	G	C	A	G	G	T	T	A	T	A	C	A	G	T	A	C	T	T	C	C	T	A	A	T	A	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	
T300	C	A	T	G	G	C	A	G	G	T	T	A	T	A	C	A	G	T	A	C	T	T	C	C	T	A	A	T	A	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	
T312	C	A	T	G	G	C	A	G	G	T	T	A	T	A	C	A	G	T	A	C	T	T	C	C	T	A	A	T	A	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	
T388	C	A	T	G	G	C	A	G	G	T	T	A	T	A	C	A	G	T	A	C	T	T	C	C	T	A	A	T	A	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	
C268-2	C	A	T	G	G	C	A	G	G	T	T	A	T	A	C	A	G	T	A	C	T	T	C	C	T	A	A	G	A	T	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C
Pera GS	C	A	T	G	G	C	A	G	G	T	T	A	T	A	C	A	G	T	A	C	T	T	C	C	T	A	A	G	A	T	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	
Barao B	C	A	T	G	G	C	A	G	G	T	T	A	T	A	C	A	G	T	A	C	T	T	C	C	T	A	A	G	A	C	T	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	
Capao Bonito	C	A	T	G	G	C	A	G	G	T	T	A	T	A	C	A	G	T	A	C	T	T	C	C	T	A	A	G	A	C	T	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	
C269-6	C	A	T	G	G	C	A	G	G	T	T	A	T	A	C	A	G	T	A	C	T	T	C	C	T	A	A	G	A	C	T	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	
Consenso	C A T G G C A G G T T A T A C A G T A C T T C C T A A - A C C G A T G A C A A A G A A A T G G A T C																																																		

	60	70	80	90	100																																													
T32	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	A	C	C	C	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	
T385	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	A	C	C	C	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	
T300	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	A	C	C	C	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	
T312	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	A	C	C	C	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	
T388	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	G	C	C	C	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	
C268-2	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	G	C	C	C	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	G	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	
Pera GS	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	G	C	C	C	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	G	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	
Barao B	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	G	C	C	C	G	G	T	A	A	G	T	G	C	C	C	G	G	A	T	G	T	T	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	
Capao Bonito	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	G	C	C	C	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	T	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	
C269-6	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	G	C	C	C	G	G	T	A	A	G	T	A	T	A	C	C	G	G	A	T	G	T	T	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T
Consenso	C G G T G A G T G C C G C T G T - C C C G G T A A G T A T C C G G A T G T C A T T G A A A A T T T																																																	

	110	120	130	140	150																																													
T32	G	T	G	G	C	A	A	C	A	G	G	T	C	C	G	T	A	G	A	C	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	C	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	
T385	G	T	G	G	C	A	A	C	A	G	G	T	C	C	G	T	A	G	A	C	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	C	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	
T300	G	T	G	G	C	A	A	C	A	G	G	T	C	C	G	T	A	G	A	C	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	C	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	
T312	G	T	G	G	C	A	A	C	A	G	G	T	C	C	G	T	A	G	A	C	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	C	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	
T388	G	T	G	A	C	C	A	A	T	A	G	G	T	C	C	G	T	A	G	A	C	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	T	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	C
C268-2	G	T	G	G	C	A	A	T	A	G	G	T	C	C	G	T	A	G	A	T	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	T	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	
Pera GS	G	T	G	G	C	A	A	T	A	G	G	T	C	C	G	T	A	G	A	T	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	T	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	
Barao B	G	T	G	G	C	A	A	T	A	G	G	T	C	T	G	T	A	G	A	T	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	T	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	
Capao Bonito	G	T	G	G	C	A	A	T	A	G	G	T	C	T	G	T	A	G	A	T	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	T	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	
C269-6	G	T	G	G	C	A	A	T	A	G	G	T	C	T	G	T	A	G	A	T	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	T	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	
Consenso	G T G G C C A A T A G G T C C G T A G A - G C G T T A A T A G A A G G C G T T A T A A G T A A G T T																																																	

	160	170	180	190	200																																											
T32	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	C
T385	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	C
T300	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	C
T312	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	C
T388	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	T
C268-2	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	T	A	T	A	C	G	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	T	
Pera GS	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	T	A	T	A	C	G	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	T	
Barao B	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	G	A	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	G	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	T
Capao Bonito	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	G	A	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	G	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	T
C269-6	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	G	A	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	G	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	T
Consenso	G G A T A C C A A T T C A A T A T A C G A A G A T T C C A C T G A A A A A T T T A C T G G T G A A C																																															

	210	220	230	240	250																																												
T32	A	C	T	T	G	A	A	A	T	A	C	G	T	T	A	T	G	G	T	T	A	C	T	A	T	G	G	A	T	G	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	C	T	A	C
T385	A	C	T	T	G	A	A	A	T	A	C	G	T	T	A	T	G	G	T	T	A	C	T	A	T	G	G	A	T	G	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	C	T	A	C
T300	A	C	T	T	G	A	A	A	T	A	C	G	T	T	A	T	G	G	T	T	A	C	T	A	T	G	G	A	T	G	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	C	T	A	C
T312	A	C	T	T	G	A	A	A	T	A	C	G	T	T	A	T	G	G																															

	260	270	280	290	300						
T32	AAGACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	GGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG
T385	AAGACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	GGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG
T300	AAGACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	GGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG
T312	AAGACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	GGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG
T388	AAGACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	GGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG
C268-2	AAGACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	GGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG
Pera GS	AAGACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	GGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG
Barao B	AAAACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	AGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG
Capao Bonito	AAAACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	AGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG
C269-6	AAAACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	AGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG
Consenso	AAGACG	AAAA	CGGAAG	ATCTGTT	GGTTT	CAC	TTAG	CTAT	GGTCC	AAAA	GAG

	310	320	330	340	350								
T32	GTTGTG	CAC	TAC	ATCC	ACG	AGCA	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT
T385	GTTGTG	CAC	TAC	ATCC	ACG	AGCA	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT
T300	GTTGTG	CAC	TAC	ATCC	ACG	AGCA	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT
T312	GTTGTG	CAC	TAC	ATCC	ACG	AGCA	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT
T388	GTTGTG	CAC	TAC	ATCC	ACG	AGCA	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT
C268-2	GTTGTG	CAC	TAC	ATCC	ACG	AGCA	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT
Pera GS	GTTGTG	CAC	TAC	ATCC	ACG	AGCA	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT
Barao B	GTTATG	TAC	CA	ATCC	ACG	AGT	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT
Capao Bonito	GTTATG	TAC	CA	ATCC	ACG	AGT	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT
C269-6	GTTATG	TAC	CA	ATCC	ACG	AGT	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT
Consenso	GTTGTG	CAC	TAC	ATCC	ACG	AGCA	CTAAA	CCAA	AGTT	CCGC	GAT	AAA	GGTT

	360	370	380	390	400												
T32	GTA	TAG	TAC	GTGC	AAAG	GGGG	TTC	GC	GAT	ACA	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	A
T385	GTA	TAG	TAC	GTGC	AAAG	GGGG	TTC	GC	GAT	ACA	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	A
T300	GTA	TAG	TAC	GTGC	AAAG	GGGG	TTC	GC	GAT	ACA	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	A
T312	GTA	TAG	TAC	GTGC	AAAG	GGGG	TTC	GC	GAT	ACA	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	A
T388	GTA	TAG	TAC	GTGC	AAAG	GGGG	TTC	GC	GAT	ACA	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	A
C268-2	GTA	TAG	TAC	GTGC	AAAG	GGGG	TTC	GC	GAT	ACA	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	A
Pera GS	GTA	TAG	TAC	GTGC	AAAG	GGGG	TTC	GC	GAT	ACA	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	A
Barao B	GTA	TAG	TAC	GTAC	AAAG	AGGG	TTC	AC	GAT	ACA	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	G
Capao Bonito	GTA	TAG	TAC	GTAC	AAAG	AGGG	TTC	AC	GAT	ACA	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	G
C269-6	GTA	TAG	TAC	GTAC	AAAG	AGGG	TTC	AC	GAT	ACA	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	G
Consenso	GTA	TAG	TAC	GTGC	AAAG	GGGG	TTC	GC	GAT	A	AGTT	AA	TGG	ATA	AA	GT	A

	410	420	430	440	450														
T32	GTTTTT	CC	TTTT	CAT	TAT	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AC	GC
T385	GTTTTT	CC	TTTT	CAT	TAT	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AC	GC
T300	GTTTTT	CC	TTTT	CAT	TAT	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AC	GC
T312	GTTTTT	CC	TTTT	CAT	TAT	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AC	GC
T388	GTTTTT	CC	TTTT	CAT	TAT	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AC	GC
C268-2	GTTTTT	CC	TTTT	CAT	TAT	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AC	GC
Pera GS	GTTTTT	CC	TTTT	CAT	TAT	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AC	GC
Barao B	GTTTTT	CC	TTTT	AT	TG	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AT	GC
Capao Bonito	GTTTTT	CC	TTTT	AT	TG	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AT	GC
C269-6	GTTTTT	CC	TTTT	AT	TG	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AT	GC
Consenso	GTTTTT	CC	TTTT	CAT	TAT	AT	TC	GAA	ATTT	ACC	GAC	AG	GG	AG	ACT	CC	GA	AC	GC

	460	470	480	490	500																			
T32	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A
T385	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A
T300	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A
T312	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A
T388	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A
C268-2	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A
Pera GS	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A
Barao B	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A
Capao Bonito	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A
C269-6	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A
Consenso	TCT	AC	GT	AA	GT	AT	GC	TT	GC	AC	TTT	CG	AG	GA	GT	TAC	ACT	TT	GT	GT	AT	GG	CT	A

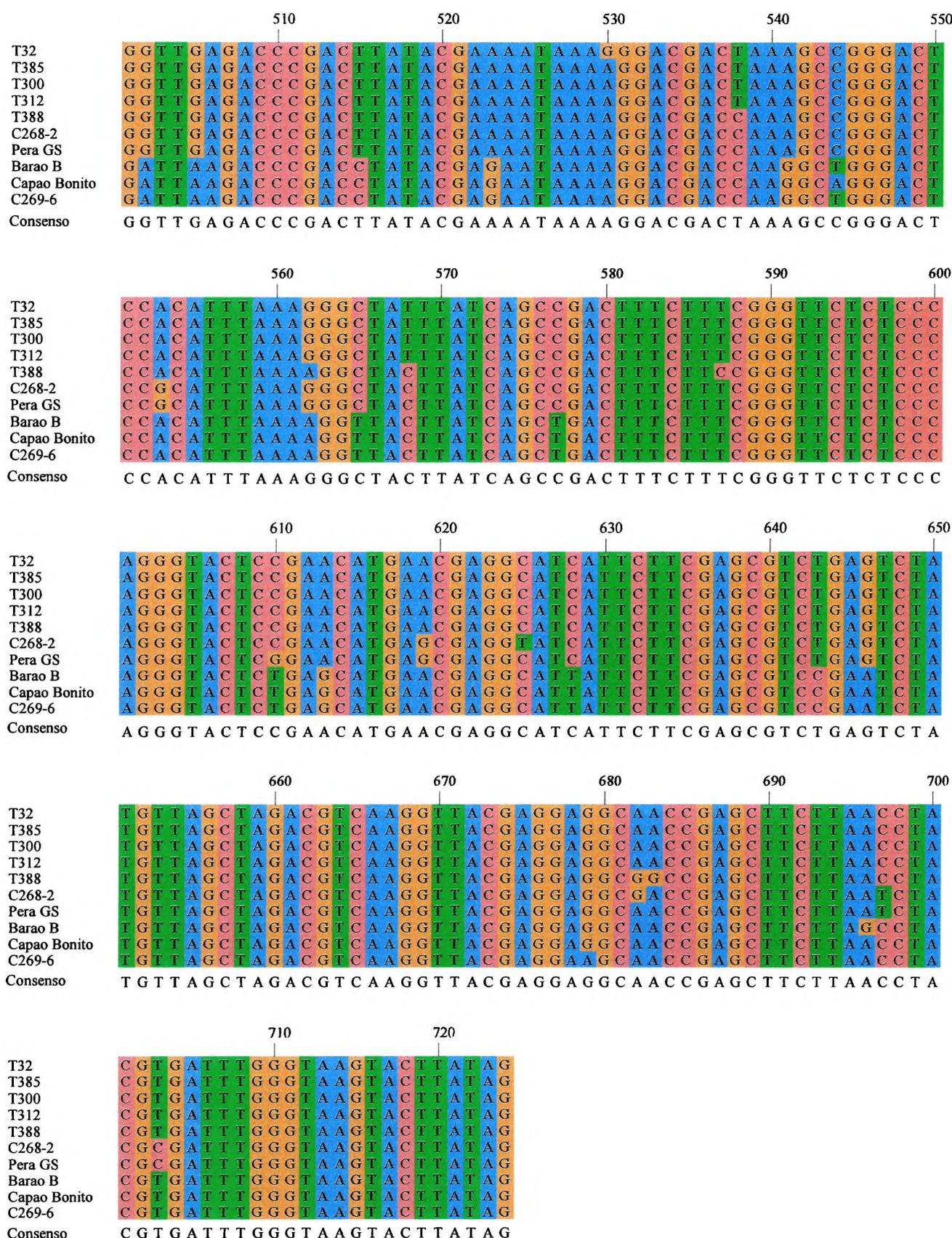


Figura III.C.5: Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas del gen p27 correspondientes a clones representativos de los haplotipos mayoritarios de los distintos aislamientos analizados. Se realizó con el programa CLUSTAL W.

III.C.2C) ANÁLISIS FILOGÉNÉTICO DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

Con el fin de establecer las relaciones existentes entre los aislamientos analizados se utilizó el alineamiento múltiple de la figura III.C.5 como archivo de entrada para la búsqueda de árboles filogenéticos con el programa PAUP*. La búsqueda de árboles filogenéticos se realizó tanto por el método de *neighbor-joining* (NJ) como bajo los criterios de parsimonia (P) y *maximum likelihood* (ML). En las búsquedas de acuerdo al criterio de ML se utilizaron los parámetros del modelo *general-times-reversible* (GTR), con inclusión de la distribución Γ con un $\alpha=0,5$. El análisis se realizó con y sin inclusión de la secuencia del gen p24 de BYV (dCP) como grupo externo (*outgroup*). Tal como se mencionó anteriormente, la inclusión del grupo externo comprime las distancias entre los aislamientos analizados pero la topología global del árbol se mantiene.

Los datos de secuencia de los haplotipos mayoritarios de los aislamientos analizados se utilizaron para realizar las búsquedas, empleando los métodos antes descritos. Con dichas secuencias se obtuvo, bajo ML, un único árbol con un *score* de 1509,57. Cuando se utilizó el criterio de parsimonia se obtuvieron tres árboles, en los cuales variaba la posición relativa de los aislamientos severos. Con dichos árboles se generó un consenso. El árbol que se observa en la figura III.C.6 corresponde a uno de los árboles obtenidos bajo parsimonia, topológicamente igual al de ML. Los valores que se muestran en la figura corresponden al *bootstrapping* de las ramas individuales. El árbol obtenido por NJ es topológicamente semejante a los restantes y la distribución de las ramas es la misma. La inclusión de la secuencia de p24 como grupo externo generó árboles con la misma distribución de las ramas internas.

En la figura III.C.6 se observa claramente que tres de los cuatro aislamientos de los biogrupos severos, C269-6, Baraõ B y Capaõ Bonito, forman un grupo bien definido que se encuentra muy separado de los demás. Un segundo grupo está formado por los aislamientos del biogrupo III, Pera GS y C268-2. Luego se encuentra el aislamiento T388 (V), los dos aislamientos del biogrupo II (T300 y T312) y ambos aislamientos del biogrupo I (T385 y T32). Es decir que los aislamientos se ordenan de acuerdo al biogrupo al que pertenecen, sugiriendo la existencia de una correlación entre secuencia del gen p27 y características biológicas del aislamiento. El único aislamiento que no responde directamente a este tipo de patrón es T388, ya que a pesar de corresponder al biogrupo V se agrupa más próximo a los aislamientos débiles que a los severos. Por otro lado, los dos aislamientos del biogrupo III forman un grupo definido a pesar de tener un origen geográfico diferente (Argentina y Brasil). El agrupamiento existente entre estos ambos aislamientos no se alteró a pesar de la inclusión de otros aislamientos de Argentina y Brasil. De igual manera, los aislamientos de los biogrupos débiles que comparten el mismo origen geográfico (España)

se ordenan de acuerdo al biogrupo al que pertenecen, T300 y T312, del biogrupo II, en una rama y T32 y T385, del biogrupo I en otra rama más interna. Estos datos apoyan la hipótesis de que el origen geográfico no estaría condicionando el agrupamiento.

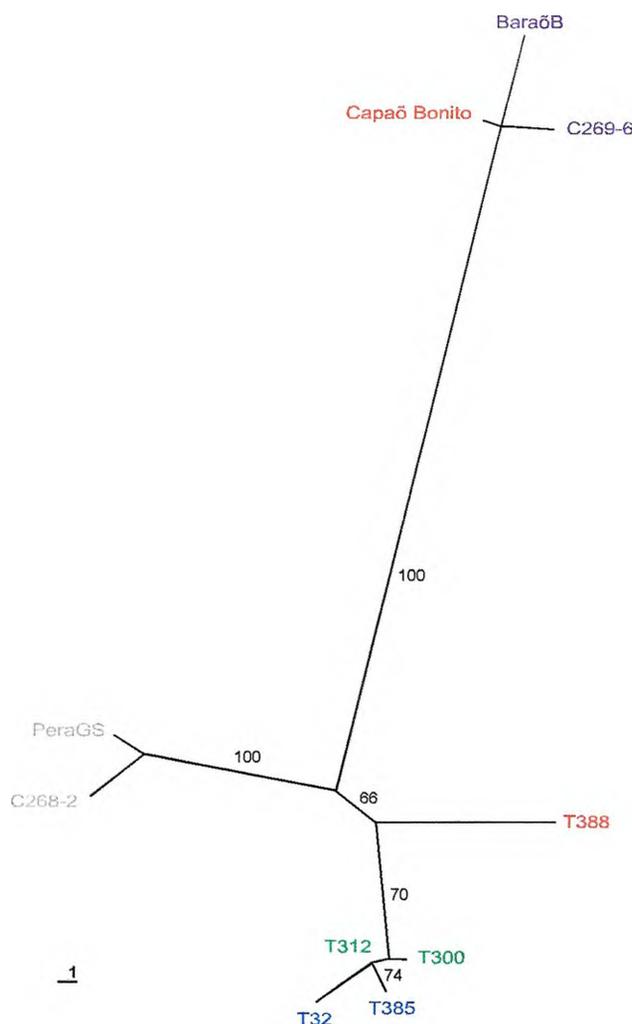


Figura III.C.6: Análisis filogenético de secuencias nucleotídicas de clones representativos de los patrones mayoritarios de SSCP de los distintos aislamientos analizados. El árbol no enraizado se realizó con el programa PAUP*. Los valores corresponden a un *bootstrapping* de 100 réplicas. En azul, verde, gris, lila y rojo se indican los aislamientos de los biogrupos I, II, III, IV y V, respectivamente.

III.C.2D) ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DEDUCIDAS

Con respecto a las secuencias aminoacídicas deducidas (fig. III.C.7) se observó también que los aislamientos débiles se agrupan entre sí y que los aislamientos moderados comparten dos de los cambios con respecto a la secuencia consenso generada. Por otro lado, los aislamientos que presentan más cambios respecto de dicha secuencia son Baraõ B y T388.

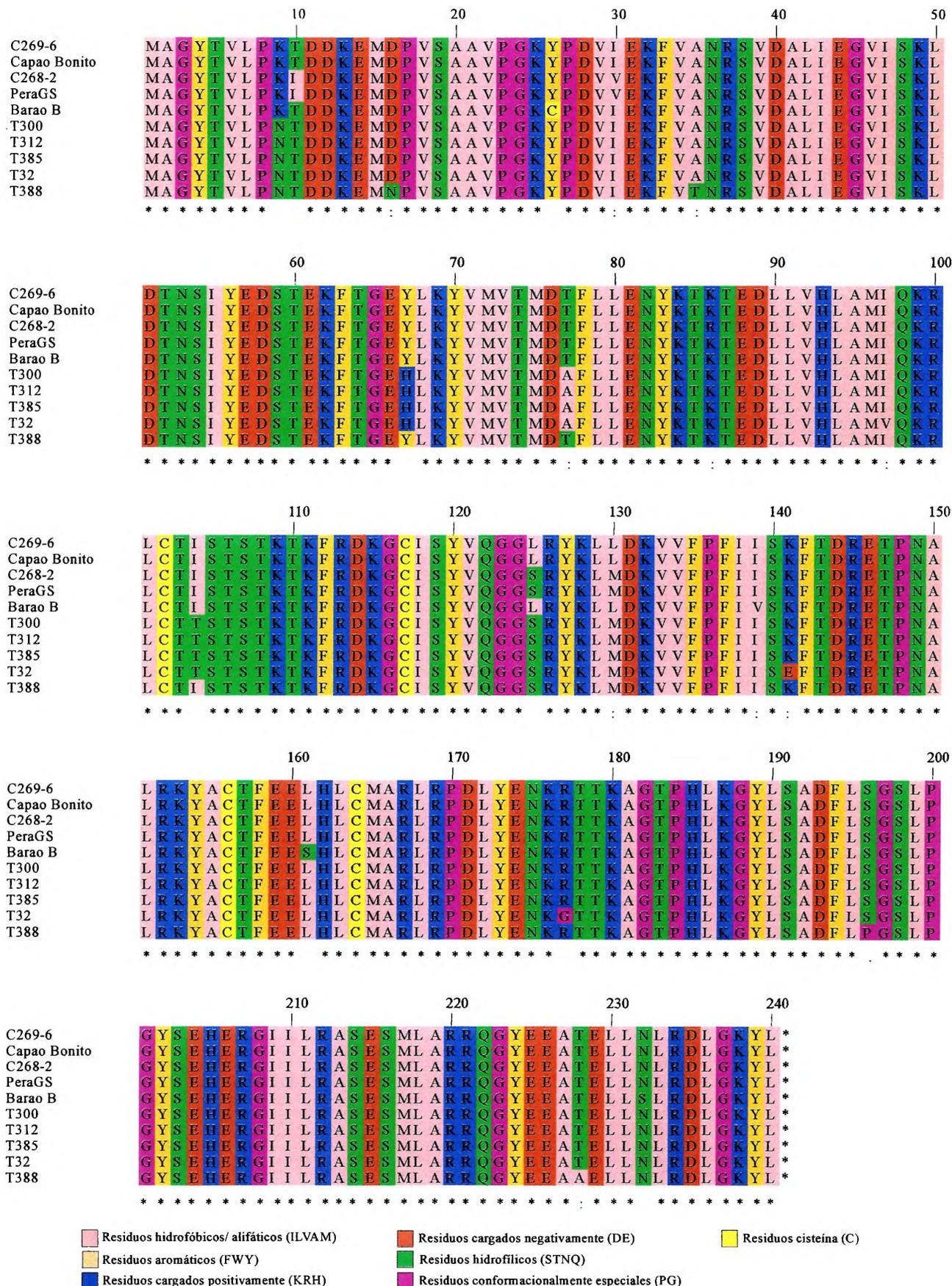


Figura III.C.7: Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas deducidas de los clones representativos de haplotipos mayoritarios en los aislamientos analizados. Los asteriscos indican identidad y los cambios conservativos se representan por uno o dos puntos, de acuerdo al grado de conservación. Se realizó con el programa CLUSTAL W y se visualizó con el programa Jalview. El esquema de colores corresponde a Zappo.

En los cuatro aislamientos débiles se observaron cuatro cambios conjuntos con respecto a la secuencia consenso, en las posiciones 9 (N→K), 67 (H→Y), 77 (A→T) y 104 (T→I) de la proteína P27. De los cambios mencionados sólo el segundo es conservativo mientras que los restantes no lo son. El aislamiento T32 mostró además tres cambios adicionales en las posiciones 97 (V→I), 141 (E→K) y 177 (G→R); los dos primeros son conservativos mientras que el restante no lo es. Para los aislamientos moderados se encontraron dos cambios comunes con respecto a la secuencia consenso en las posiciones 10 (I→T, no conservativo) y 30 (V→I, conservativo); además, el aislamiento C268-2 presenta un cambio conservativo adicional en la posición 86 (R→K). En el aislamiento Baraõ B se observó la aparición de cambios comunes con los aislamientos C269-6 y Capaõ Bonito y cambios adicionales en las posiciones 26 (C→Y), 139 (V→I), 161 (S→E) y 232 (S→N). De estos últimos, sólo los de las posiciones 139 y 232 son conservativos. Para el aislamiento T388 se encontró un cambio común con los aislamientos débiles con respecto a la secuencia consenso (posición 9) y cuatro cambios propios en las posiciones 16 (N→D, cambio conservativo), 35 (T→A), 196 (P→S) y 228 (A→T); los tres últimos son no conservativos. En los aislamientos C269-6, Capaõ Bonito y Baraõ B se observó aparición de dos cambios comunes adicionales al de la posición 9, uno de ellos es no conservativo (posición 125, L→S) mientras que el restante es conservativo (posición 130, L→M).

También se analizó la secuencia de las cuatro regiones conservadas entre ambas proteínas de cubierta virales. La región I consta de tres residuos (VVF) correspondientes a las posiciones 133 a 135. Las siguientes regiones conservadas (II y III) se extienden entre los aminoácidos 149 a 152 (NALR) y 192 a 198 (ADFLSGS) respectivamente. En estas secuencias se indican en negrita los residuos conservados en las proteínas de cubierta de todos los virus flexuosos. Como se describió anteriormente, el grado de conservación de estos residuos indicaría su importancia para el plegamiento de las proteínas de cubierta de virus no icosaédricos. En el extremo C-terminal se encuentra la región IV, que se extiende desde el residuo 232 hasta el anteúltimo aminoácido de la proteína (NLRDLGKY). En los diez aislamientos analizados se conserva la totalidad de estos residuos, con la única excepción de un cambio conservativo P por S, en la posición 196 del aislamiento T388. Estos datos indicarían que existe una fuerte presión sobre esta proteína, que impide la presencia de mutaciones que pudieran afectar la estructura o función de la misma.

III.C.2E) ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS DEDUCIDAS DE LOS CLONES MAYORITARIOS DE CADA AISLAMIENTO

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de los clones representativos de los haplotipos mayoritarios de cada aislamiento se

compararon entre sí, para establecer los valores de identidad nucleotídica y de identidad y similitud aminoacídica, respectivamente (Tabla V).

Los valores de identidad nucleotídica oscilan entre 91% (entre Baraõ B y C268-2) y 99,9% (entre los aislamientos T312 y T300). En tanto que los valores de similitud e identidad de secuencias aminoacídicas deducidas son superiores a 96,3 y 94,6%, respectivamente. Los cuatro aislamientos débiles (biogrupos I y II), muestran valores de identidad y similitud muy elevados. Los pocos cambios nucleotídicos encontrados entre las secuencias de clones representativos de los haplotipos mayoritarios de los aislamientos T385, T300 y T312 son, además, conservativos y los valores de identidad son del 100%. El carácter conservativo de los cambios nucleotídicos es aún más notorio en el caso de los aislamientos moderados y severos. Por ejemplo, al comparar las secuencias nucleotídicas de los clones mayoritarios de los aislamientos C269-6 (IV) y C268-2 (III) se obtienen valores de identidad nucleotídica del 91,7% mientras que, a nivel aminoacídico los valores de similitud e identidad son de 99,2 y 97,9%, respectivamente.

Tabla V. Valores de identidad de secuencias nucleotídicas y de similitud e identidad de secuencias aminoacídicas deducidas, de los clones representativos de los haplotipos mayoritarios en aislamientos de CTV.

	T32	T385	T300	T312	PeraGS	C268-2	C269-6	BaraõB	T388	CapaõB
T32		99,2 ^z	99,2	99,3	95,6	95,6	92	91,3	96,7	92,1
T385	99,2 ^y		99,4	99,6	96,1	95,9	92,1	91,6	97	92,4
	98,8									
T300	99,2	100		99,9	96,4	96,1	92,3	91,6	97,2	92,4
	98,8	100								
T312	99,2	100	100		96,5	96,3	92,4	91,7	97,4	92,5
	98,8	100	100							
PeraGS	97,5	98,3	98,3	98,3		99,2	92,1	91,4	96,4	92,3
	96,3	97,5	97,5	97,5						
C268-2	97,5	98,3	98,3	98,3	100		91,7	91	96,4	91,9
	96,3	97,1	97,1	97,1	99,6					
C269-6	97,5	98,3	98,3	98,3	99,2	99,2		98,7	92	99,5
	96,3	97,5	97,5	97,5	98,3	97,9				
BaraõB	96,3	97,1	97,1	97,1	97,9	97,9	98,8		91,8	99
	94,6	95,6	95,6	95,6	96,7	96,3	98,3			
T388	96,7	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	96,3		92,4
	95,8	97,1	97,1	97,1	97,1	97,1	97,1	95,4		
CapaõB	97,5	98,3	98,3	98,3	99,2	99,2	100	98,8	97,5	
	96,3	97,5	97,5	97,5	98,3	97,9	100	98,3	97,1	

^zpanel superior: valores de homología de secuencia nucleotídica expresados en porcentaje.

^ypanel inferior: valores de similitud (porción superior) y de identidad (porción inferior) de secuencias aminoacídicas deducidas. Los valores se expresan en porcentaje.

En intensidades crecientes de grises se representan valores crecientes de homología, similitud e identidad. En azul, verde, gris, lila y rojo se indican los aislamientos de los biogrupos I, II, III, IV y V, respectivamente.

En la figura III.C.8 se representan gráficamente las comparaciones entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los clones representativos de los aislamientos de CTV analizados y la secuencia consenso generada al realizar los alineamientos múltiples de las figuras III.C.5 y 7. Dicha secuencia se tomó como valor del 100% para realizar el gráfico. Para las secuencias nucleotídicas se usó el código de ambigüedad de nucleótidos en aquellas posiciones donde existe el mismo número de secuencias con bases distintas (28, k; 67, r; 121, y; 382, y; 490, r). En el caso de las secuencias aminoacídicas deducidas se introdujo una indefinición (X) en la posición 9, ya que cinco secuencias presentan N en esa posición y otras cinco presentan K.

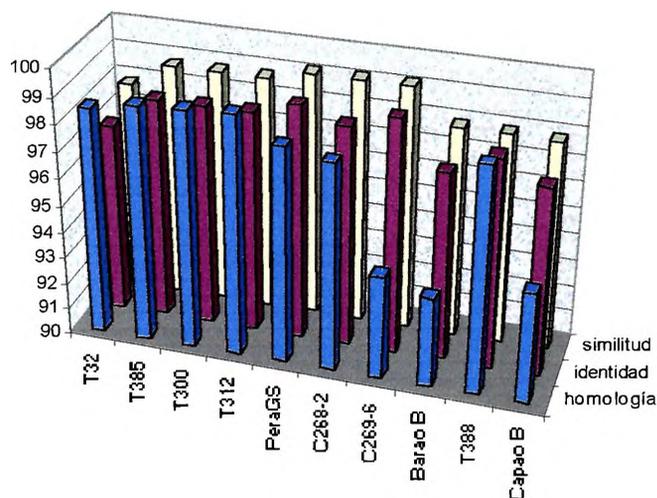


Figura III.C.8: Representación esquemática de la variabilidad poblacional del gen p27 entre aislamientos de CTV pertenecientes a distintos biogrupos y de diversos orígenes. Los aislamientos están ordenados por severidad creciente. Eje Y: valores de porcentaje comprendidos entre 90 y 100. Se indican valores de identidad de secuencias nucleotídicas (celeste) y de similitud (amarillo) e identidad (bordó) de secuencias aminoacídicas deducidas entre los clones mayoritarios y la secuencia consenso generada por el programa CLUSTAL W.

III.C.3) ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL DEL GEN P27

III.C.3A) SECUENCIACIÓN DE CLONES REPRESENTATIVOS DE LOS HAPLOTIPOS MINORITARIOS DE CADA AISLAMIENTO

Para estudiar la variabilidad intrapoblacional del gen p27 se secuenciaron clones representativos de los patrones minoritarios de SSCP de cada aislamiento. Se seleccionaron aquellos patrones minoritarios que comprendieran al menos el 10% de los clones del aislamiento. Este criterio se utilizó para el análisis de ambos fragmentos del gen por separado. Los clones elegidos se detallan en la tabla VI.

En algunos aislamientos ningún patrón minoritario incluyó, al menos, a tres clones (10%). Esta situación se encontró para el fragmento A en T312 y Capao Bonito y para ambos fragmentos en T32. En todos los aislamientos restantes se encontró un solo patrón que incluyó por lo menos un 10% de los clones. En

los aislamientos C268-2 y Baraõ B se seleccionó el mismo clon como representativo del patrón minoritario más importante para ambos fragmentos, mientras que en los aislamientos restantes los patrones minoritarios no involucraron a ambos fragmentos del gen.

Tabla VI. Clones representativos de los patrones minoritarios de los distintos aislamientos seleccionados para secuenciación.

Aislamiento	fragmento A	fragmento B
T32 (I)^z	ninguno	ninguno
T385 (I)	1 ^y (clon 24; 11,1%)	1 (clon 4; 11,1%)
T312 (II)	ninguno	1 (clon 20; 13,3%)
T300 (II)	1 (clon 1; 10%)	1 (clon 13; 13,3%)
C268-2 (III)	1 (clon 3; 10%)	1 (clon 3; 16,6%)
Pera GS (III)	1 (clon 36; 26,6%)	1 (clon 38; 16,6%)
C269-6 (IV)	1 (clon 43; 13,3%)	1 (clon 47; 13,3%)
Baraõ B (IV)	1 (clon 44; 13,3%)	1 (clon 44; 10%)
Capaõ Bonito (V)	ninguno	1 (clon 4; 26,6%)
T388 (V)	1 (clon 17; 13,3%)	1 (clon 10; 13,3%)

^zentre paréntesis se indica el biogrupo al que pertenece el aislamiento

^yse indica la cantidad de clones seleccionados y entre paréntesis el nombre del clon y la frecuencia del patrón que representa (expresada en porcentaje)

En la mayor parte de los aislamientos, el segundo patrón en importancia no incluye a un número superior al 17% de los clones. Las excepciones son: el fragmento A en el aislamiento Pera GS y el fragmento B en el aislamiento Capaõ Bonito, ya que en ambos casos el segundo patrón incluye al 26,6% de los clones.

III.C.3B) COMPARACIÓN DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS DEDUCIDAS DE CLONES REPRESENTATIVOS DE LOS PATRONES MINORITARIOS DE SSCP

La variabilidad intrapoblacional de cada aislamiento se determinó por medio de la comparación entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de los clones representativos de los patrones mayoritario y minoritario de SSCP de cada aislamiento. Para el estudio se analizaron ambos fragmentos del gen p27 por separado. De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de SSCP y a las condiciones que se impusieron para la secuenciación de clones minoritarios se encontraron tres tipos de situaciones: a) aislamientos sin variabilidad intrapoblacional, donde ningún patrón minoritario incluye al menos al 10% de los clones; b) aislamientos con variabilidad en un solo fragmento y c) aislamientos con variabilidad en ambos fragmentos. La primera situación descrita corresponde al aislamiento T32 (biogrupo I), mientras que en el segundo grupo se encuentran los aislamientos T312 (II) y Capaõ Bonito (V), que mostraron variación intrapoblacional únicamente en el fragmento B (Tabla VI). El resto de los aislamientos muestra variación en ambos fragmentos.

En las figuras III.C.9 y III.C.10 se representa gráficamente la variabilidad intrapoblacional existente para los fragmentos A y B del gen p27 en los aislamientos analizados en esta sección. Los valores corresponden a la comparación entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de los clones minoritario y mayoritario de cada aislamiento. El número situado debajo de cada columna indica la cantidad de cambios nucleotídicos que mostró la secuencia del clon minoritario con respecto a la del mayoritario.

En el aislamiento T385 (biogrupo I) se encontraron variantes poblacionales en ambos fragmentos. En los dos casos las variaciones son mínimas (2 bases) pero las mutaciones no son silenciosas ya que afectan a la secuencia proteica deducida (fig. III.C.9 y 10).

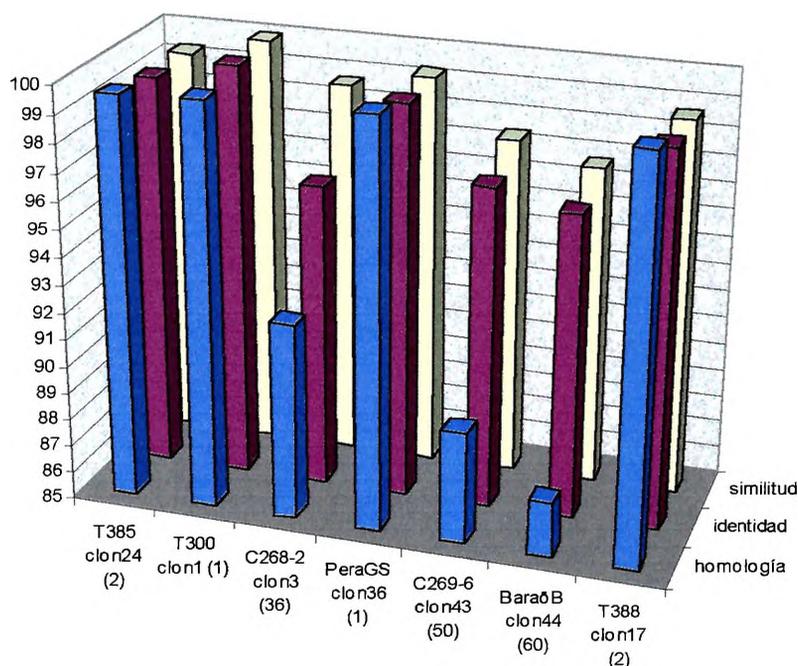


Figura III.C.9: Variabilidad intrapoblacional del fragmento A del gen p27 en los aislamientos analizados. Las columnas en celeste indican valores de identidad de secuencias nucleotídicas. Las columnas en amarillo y bordó muestran valores de similitud e identidad de secuencias aminoacídicas, respectivamente. Los valores surgen de la comparación entre los clones minoritario y mayoritario de cada aislamiento. En el eje Y se representan valores de porcentaje comprendidos entre 85 y 100. Entre paréntesis se indica el número de cambios de secuencia nucleotídica con respecto al clon mayoritario.

En el aislamiento T300 (biogrupo II) se observaron una serie de clones con patrón distinto al mayoritario. Tres clones se incluyeron dentro del patrón minoritario más importante (1, 9 y 18) en el fragmento A mientras que para el fragmento B el grupo minoritario principal se compuso de cuatro clones (13, 14, 20 y 24). Para el estudio de secuencia se eligieron los clones 1 y 13, que muestran cambios en un único fragmento. En ambos casos se encontró un único cambio (fig. III.C.9 y 10). La mutación presente en el clon 1 es silenciosa, ya que no altera a la secuencia proteica, en tanto que en el clon 13 se produce un cambio aminoacídico conservativo.

En los aislamientos del biogrupo III, Pera GS y C268-2, se encontraron variantes en ambos fragmentos del gen p27. El aislamiento Pera GS presentó la variabilidad intrapoblacional más elevada, ya que para los fragmentos A y B se encontraron patrones minoritarios que incluían a ocho (11, 12, 15, 22, 28, 36, 39 y 40) y cinco (3, 8, 16, 22 y 38) clones, respectivamente. Se secuenciaron los clones 36 y 38. Como se observa en las figuras III.C.9 y 10, en este aislamiento existen dos tipos de situaciones: para el fragmento A, el clon representativo del haplotipo minoritario principal sólo presentó un cambio, que afecta a la secuencia aminoacídica deducida. Para el fragmento B, el clon 38 presentó diecinueve cambios, pero todos son silenciosos. Por los resultados antes expuestos y considerando que ambos clones presentan variación en ambos fragmentos, se obtuvo la secuencia completa de los mismos. El clon 36 presentó solamente dos cambios en su secuencia, con 99,6% de identidad de secuencia nucleotídica y 98,8% de similitud e identidad aminoacídica con el clon 1, representativo del patrón mayoritario del aislamiento. Como una particularidad de la secuencia de este clon, uno de los dos cambios puntuales produce la aparición de un codón de terminación dos residuos antes de lo previsto. En la secuencia del clon 38 se detectaron cincuenta y siete cambios puntuales. La mayor parte de estas mutaciones son silenciosas y los valores de similitud e identidad de secuencias aminoacídicas deducidas siguen siendo elevadas, 98,8 y 97,9%, respectivamente.

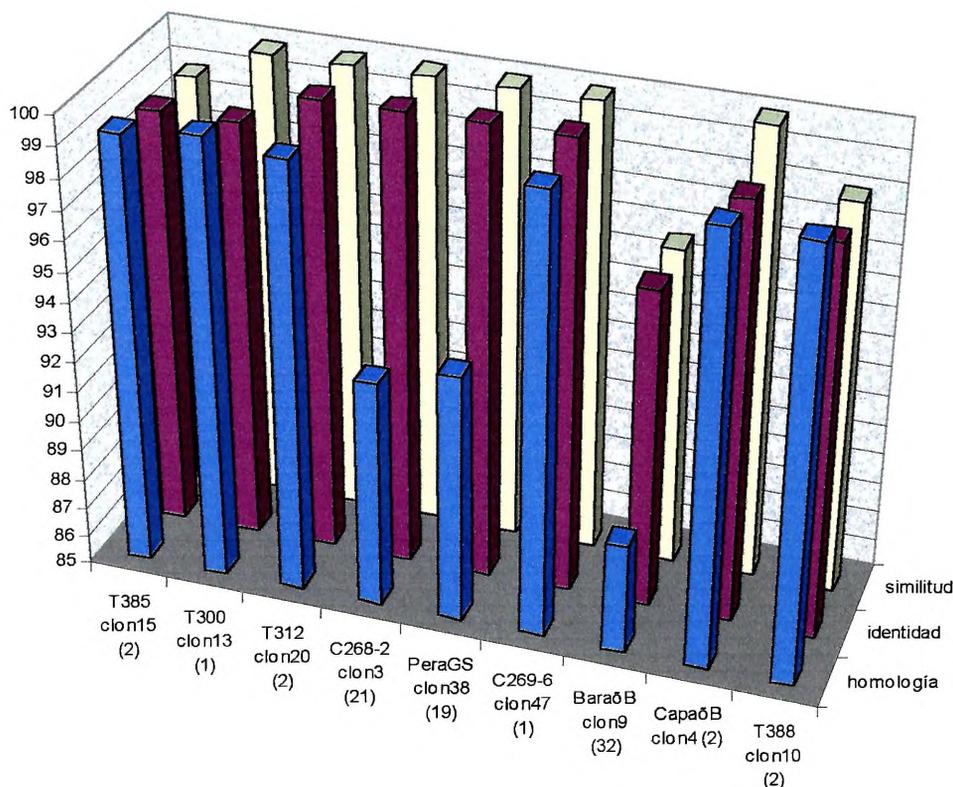


Figura III.C.10: Variabilidad intrapoblacional del fragmento B del gen p17 en los aislamientos analizados. Se expresan valores de identidad de secuencias nucleotídicas (barras en celeste) y de similitud e identidad de secuencias aminoacídicas deducidas (barras en amarillo y bordó, respectivamente). Los valores representados se originan en la comparación entre los clones mayoritario y minoritario de cada aislamiento. Eje Y: valores de porcentaje comprendidos entre 85 y 100. Entre paréntesis se indica el número de cambios de secuencia nucleotídica con respecto al clon mayoritario.

Los patrones minoritarios principales del aislamiento C268-2 están compuestos de tres (3, 4 y 7) y cinco (3, 4, 8, 11 y 29) clones respectivamente. Las figuras III.C.9 y 10 muestran los resultados obtenidos al comparar las secuencias de los clones mayoritario (6) y minoritario (3). Se encontró que el clon 3 presenta un gran número de cambios (36 en el fragmento A y 21 en el fragmento B) con respecto al mayoritario, aunque, la mayoría de ellos no incide en la secuencia aminoacídica.

En el aislamiento C269-6 el patrón minoritario más importante comprende cuatro clones en cada uno de los fragmentos (1, 18, 24 y 43, frag. A y 4, 16, 19 y 47, frag. B). Para analizar la variabilidad intrapoblacional de dicho aislamiento se secuenciaron los clones 43 y 47. Nuevamente se encontraron datos aparentemente contradictorios ya que para el fragmento A se halló un gran número de cambios, mientras que en el B sólo hubo uno. Como el clon 43 también presentó variación en la migración del fragmento B, se completó su secuencia y se observó una elevada frecuencia de cambios también en esa porción del gen. Globalmente, el clon 43 presentó setenta y ocho cambios, con valores de identidad nucleotídica del 89,2% y de similitud e identidad del 97,5 y 97,1% respectivamente. En este caso también se mantuvo la tendencia de que la mayoría de las mutaciones "permitidas" en la población viral son silenciosas. El otro aislamiento del biogrupo IV, Barañ B, mostró que los patrones minoritarios más importantes de ambos fragmentos están compuestos por cuatro (5, 12, 32 y 44) y tres (5, 12 y 44) clones, respectivamente. Con la finalidad de analizar la variabilidad intrapoblacional del mismo se secuenció completamente el clon 44, que presentó variación en su patrón de migración en ambos fragmentos. En este caso se encontró una gran cantidad de cambios, la mayoría silenciosos (fig. III.C.8 y 9).

En el aislamiento T388 (V) los patrones minoritarios con mayor representación poblacional para ambos fragmentos incluyen cuatro clones (12, 17, 38 y 55, para A y 9, 10, 17 y 19 para B). Se secuenciaron los clones 17 (frag. A) y 10 (frag. B) (fig. III.C.9 y 10) y se encontró que ambos presentaron cambios mínimos con respecto al clon mayoritario, que afectaron a la secuencia aminoacídica deducida, produciéndose un cambio conservativo y uno no conservativo en el clon 17 y dos cambios no conservativos en el clon 10.

Tal como se describió anteriormente, los aislamientos T312 (biogrupo II) y Capañ Bonito (biogrupo V) sólo presentaron variabilidad intrapoblacional en el fragmento B. Para el aislamiento T312, en el patrón minoritario principal de dicho fragmento se encontraron cuatro clones (13, 14, 20 y 24), uno de los cuales se secuenció (clon 20, fig. III.C.10). El clon presentó dos mutaciones silenciosas en el fragmento B y mostró variación en la migración del fragmento A. En el aislamiento Capañ Bonito se observó una gran homogeneidad en el fragmento A (sólo tres clones con migración diferente al mayoritario y distintos

entre sí) mientras que el patrón minoritario principal del fragmento B incluyó ocho clones (4, 10, 17, 25, 30, 33, 39 y 40), que además no presentaron variación en el fragmento restante. Para analizar la variabilidad intrapoblacional en este aislamiento, se secuenció el fragmento B del clon 4. Tal como se observa en la figura III.C.10 este clon sólo presentó dos cambios nucleotídicos con respecto al clon mayoritario del aislamiento. En resultados obtenidos en paralelo con aislamientos virales de campo (sección D de resultados) se encontró que estos últimos suelen contener variantes muy diferentes respecto de la secuencia predominante del aislamiento. Por ello se secuenciaron los dos clones minoritarios del aislamiento Capaño Bonito que mostraron variación en ambos fragmentos (clones 21 y 22). Estas secuencias se compararon con la secuencia mayoritaria (clon 1). El clon 21 mostró una elevada identidad de secuencia nucleotídica con respecto a la secuencia del clon 1 (99,6%), con sólo tres cambios en 724 pb. Por otro lado, el clon 22 presentó cincuenta y cinco cambios con respecto al mayoritario (92,4% de identidad nucleotídica) pero la mayoría fueron mutaciones silenciosas ya que a nivel peptídico los valores de similitud e identidad alcanzaron el 98,8%.

III.C.4) ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD CONJUNTA DEL GEN P27: CLONES MAYORITARIOS Y MINORITARIOS.

III.C.4A) ALINEAMIENTOS MÚLTIPLES DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

Con el propósito de comparar la variabilidad del gen p27, en la totalidad de los clones analizados, se realizó un alineamiento múltiple con todas las secuencias generadas en el presente estudio. La comparación se llevó a cabo para ambos fragmentos del gen p27 por separado y los alineamientos resultantes se muestran en las figuras C.1A y B del Apéndice. De la observación de los mismos se desprende que los aislamientos débiles (biogrupos I y II) son muy similares entre sí, tanto si se consideran los clones mayoritarios como los minoritarios. Por otro lado se encuentran los clones del aislamiento T388, que comparten algunos cambios con respecto a la secuencia consenso con los aislamientos del biogrupo III y otros con los aislamientos de los biogrupos débiles.

Un tercer grupo es el formado por los clones representativos del patrón mayoritario de los aislamientos C268-2 y Pera GS, que forman un bloque distinto a los demás. Para el fragmento A el clon minoritario del aislamiento PeraGS comparte el grupo. El clon minoritario del aislamiento C268-2 (clon 3) se agrupa con los aislamientos de los biogrupos IV y V, siendo más parecido a ellos que al clon mayoritario del aislamiento de origen. También se encuentra en este grupo el clon minoritario del aislamiento PeraGS del fragmento B.

Los aislamientos severos (biogrupos IV y V) argentinos y brasileños forman otro bloque que incluye, tal como se citó anteriormente, a clones minoritarios de los aislamientos del biogrupo III (C268-2 y PeraGS). Todas estas secuencias

son muy similares entre sí y forman un grupo bien definido y conservado. En dos de los aislamientos severos se encontró, además, un tipo de secuencia que difiere de todas las restantes en un 11%. Se trata de los clones 44 del aislamiento BaraõB y 43 del aislamiento C269-6, que son muy semejantes entre sí en el fragmento A (97,4% de identidad de secuencia nucleotídica). En el fragmento B, el clon 43 (C269-6), que fue secuenciado aunque no involucra al 10% de los clones, mostró el mismo resultado cuando se comparó con el clon 44 (97,5% de identidad nucleotídica). Es interesante resaltar que este tipo de secuencia se encuentra únicamente en estos dos aislamientos (al menos en los clones analizados en el presente estudio) que provienen de regiones geográficas distintas y de hospedadores diferentes (naranja de Brasil, BaraõB; pomelo del NOA, Argentina, C269-6).

III.C.4B) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS DATOS

Los alineamientos múltiples se utilizaron como archivos de entrada para la búsqueda de árboles filogenéticos con el programa PAUP*. Las búsquedas se realizaron con el método de NJ y bajo los criterios de P y ML.

Para el fragmento A se obtuvo un único árbol bajo el criterio de P (fig. III.C.11) y dicho árbol es topológicamente igual al de NJ. Bajo el criterio de ML se obtuvo un árbol semejante, con un cambio en la posición relativa de una de las ramas. Este último árbol tiene un *score* de 1241,85. En el árbol de la figura III.C.11 se observa la formación de cinco grupos definidos. En uno de ellos se agrupan los aislamientos débiles, con dos subgrupos, uno que comprende a los del biogrupo I y otro que incluye a los del II. En dichos subgrupos están incluidas tanto las secuencias de los haplotipos mayoritarios como minoritarios. En un segundo grupo se encuentran los haplotipos mayoritario y minoritario del aislamiento T388. Un tercer grupo está constituido por las secuencias de los clones mayoritarios de los aislamientos del biogrupo III, C268-2 y Pera GS, y uno de los clones minoritarios de este último aislamiento. El cuarto grupo contiene los haplotipos mayoritarios de los aislamientos C269-6 (IV), Baraõ B (IV) y Capaõ Bonito (V) y el clon correspondiente al haplotipo minoritario presente en el aislamiento C268-2 (III). Por último, el quinto grupo reúne a los haplotipos minoritarios presentes en los aislamientos del biogrupo IV, C269-6 y Baraõ B (clones 44 y 43, respectivamente). La figura muestra, también, que la mayor parte de las ramas tienen valores de *bootstrapping* elevados (superiores al 70%), indicando que la posibilidad de ser correctas es superior al 95% (Lake and Moore, 1998).

Para el fragmento B, cuando se realizó la búsqueda correspondiente con las secuencias de clones representativos de los haplotipos mayoritarios y minoritarios, se obtuvo un árbol con un *score* de 737,24 bajo el criterio de ML. Bajo el criterio de P se obtuvieron 10 árboles, uno de los cuales es topológicamente igual al de ML. El árbol obtenido por el método de NJ difiere

de los restantes en la posición relativa de una de las ramas.

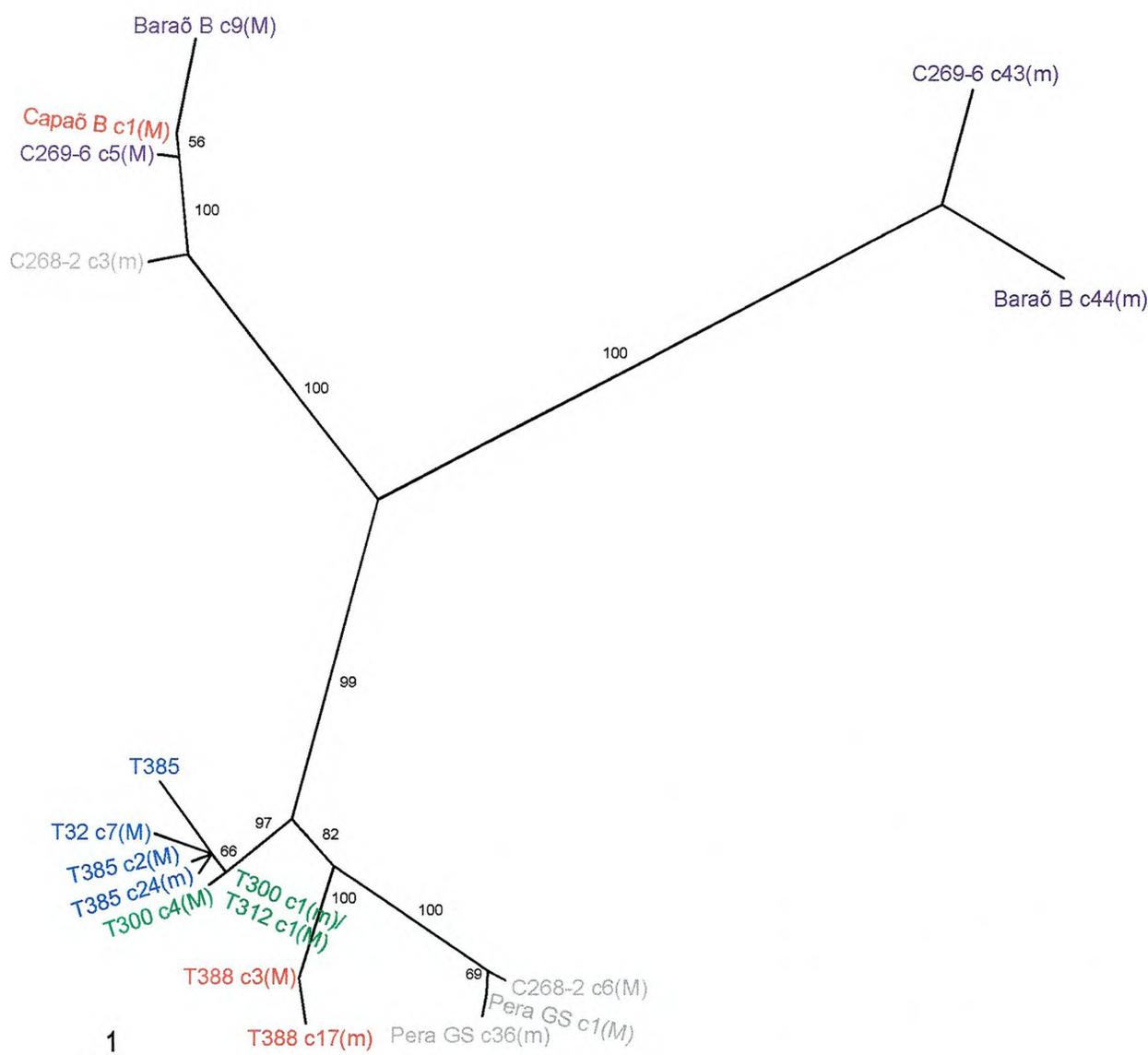


Figura III.C.11: Árbol no enraizado correspondiente a las secuencias nucleotídicas del fragmento A del gen p27. Se indican los valores de *bootstrapping*. En color azul, verde, gris, lila y rojo se señalan los aislamientos de los biogrupos I, II, III, IV y V, respectivamente. Se indican clones representativos de los haplotipos mayoritarios (M) y de los minoritarios (m).

En la figura III.C.12 se observa que también para el fragmento B de p27 existen grupos definidos. Los aislamientos débiles (biogrupos I y II) forman un grupo, que incluye tanto a las secuencias de los haplotipos mayoritarios como a las de los minoritarios. En un segundo grupo se encuentran las secuencias representativas de los haplotipos mayoritarios de los aislamientos del biogrupo III, C268-2 y Pera GS. El tercer grupo está constituido por las secuencias de los haplotipos mayoritario y minoritario del aislamiento T388. Formando un grupo separado y distante con respecto a los restantes aislamientos, se ubica la

secuencia del haplotipo minoritario del aislamiento Baraõ B. El grupo restante comprende a los haplotipos mayoritarios y minoritarios de los aislamientos severos sudamericanos y a clones representativos de los haplotipos minoritarios presentes en los aislamientos del biogrupo III.

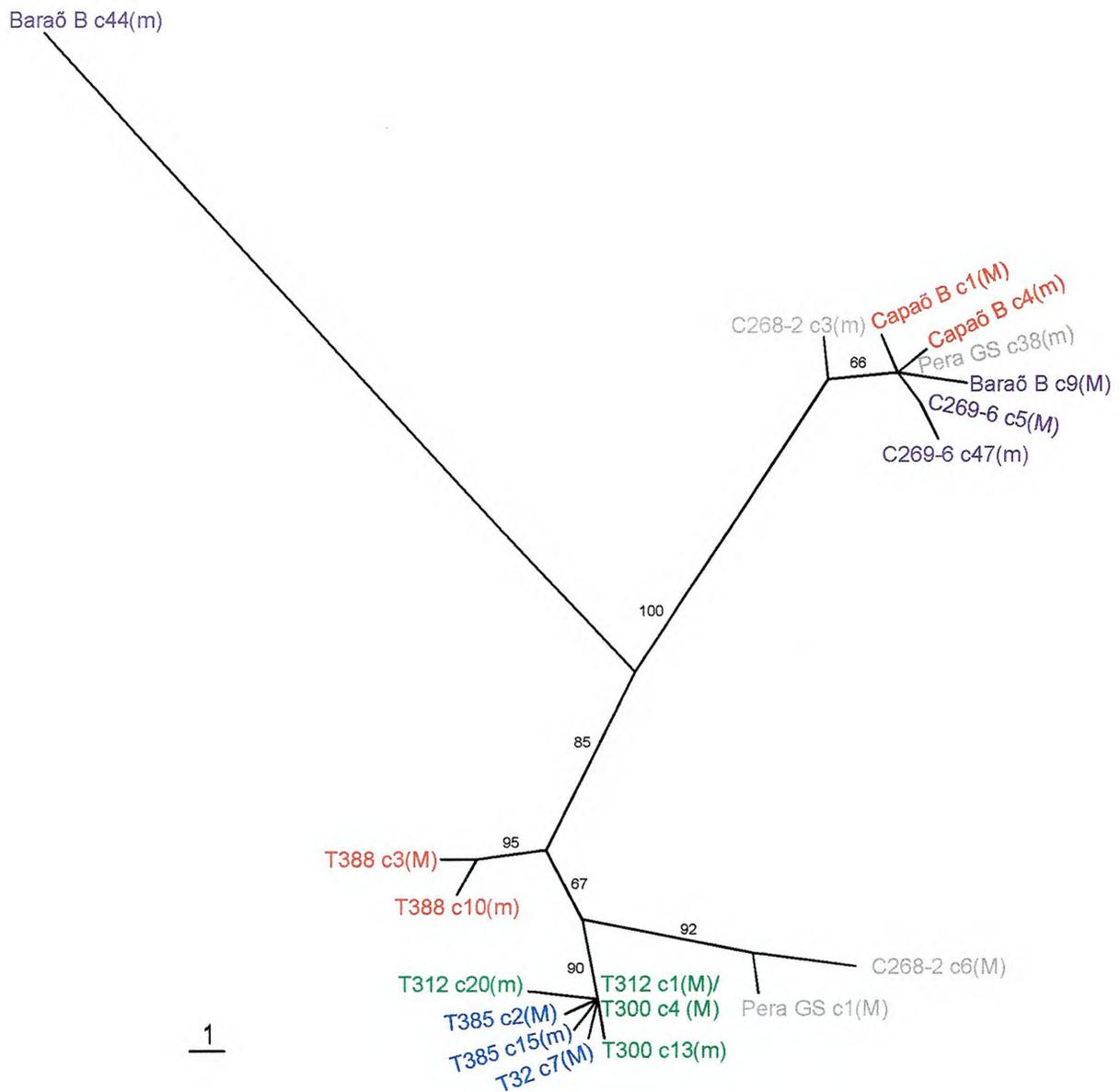


Figura III.C.12: Árbol no enraizado correspondiente a las secuencias del fragmento B del gen p27. Se indican los valores de *bootstrapping* de las ramas. En azul, verde, gris, lila y rojo se señalan los aislamientos de los biogrupos I, II, III, IV y V, respectivamente. Los clones representativos de los haplotipos mayoritarios se indican con M y los de los minoritarios con m.

III.C.5) ANÁLISIS DE OTROS AISLAMIENTOS VIRALES

III.C.5A) SECUENCIACIÓN DIRECTA DE PRODUCTOS DE PCR

El análisis de SSCP permitió establecer que, en la mayor parte de los aislamientos, existe un patrón mayoritario que incluye a una gran cantidad de clones. De acuerdo con estos resultados se decidió amplificar y secuenciar el gen p27 en los restantes aislamientos listados en la Tabla I, evitando la etapa de clonado. Las reacciones de cDNA se llevaron a cabo con el *primer* p27-3'. Una alícuota del producto se utilizó como molde de las reacciones de PCR, en presencia del par de *primers* p27-5' y p27-3'. Con la excepción de los aislamientos lima 50 y VT, se obtuvo un único producto de amplificación del tamaño esperado, que se utilizó como molde en reacciones de secuenciación con *primers* específicos del gen p27.

Con el fin de confirmar la presencia o ausencia de polimorfismos poblacionales las reacciones se realizaron con la inclusión de MnCl₂ y citrato de sodio a concentración final de 250 μM (Korch *and* Drabkin, 1999). Como los *primers* utilizados no estaban marcados, el tamaño de las secuencias osciló entre 680 y 684 pares de bases (desde el nucleótido 19 hasta el nucleótido 702 del gen p27). Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTAL W (fig. III.C.13). En dicho alineamiento se observó la organización de las mismas en tres grupos netamente diferenciados. Uno de ellos incluye a T305, T55, T346 y K, el segundo a T36 y el tercero a C270-3 y P6. Estas dos últimas secuencias son muy semejantes entre sí ya que presentan únicamente dos diferencias en 680 pb.

III.C.5B) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS

El alineamiento de secuencias nucleotídicas se utilizó para realizar una búsqueda de árboles filogenéticos. Bajo el criterio de ML se obtuvo un árbol con un *score* de 1422,05 mientras que bajo P se obtuvieron dos árboles. Uno de éstos tiene la misma topología que el de ML y que el obtenido por el método de NJ (fig. III.C.14). Los aislamientos de los biogrupos I y II forman uno de los grupos de dicho árbol, junto con el aislamiento T305 del biogrupo V, que deriva de T385 (I). Los restantes grupos están formados por el aislamiento T36 (III) y por los aislamientos C270-3 y P6 (IV), respectivamente.

		10		20		30		40																																							
T305	C	T	A	A	T	A	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	A	C	C	C
T55	C	T	A	A	T	A	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	A	C	C	C
T346	C	T	A	A	T	A	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	A	C	C	C
K	C	T	A	A	T	A	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	A	C	C	C
T36	C	T	A	A	A	A	C	C	G	A	T	G	A	T	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	C	T	G	T	G	A	G	T	G	C	T	G	C	C	G	T	G	C	C	C
C270-3	C	T	A	A	G	A	C	T	G	A	T	G	A	T	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	A	C	C	C
P6	C	T	A	A	G	A	C	T	G	A	T	G	A	T	A	A	A	G	A	A	A	T	G	G	A	T	C	C	G	G	T	G	A	G	T	G	C	C	G	C	T	G	T	A	C	C	C

		50		60		70		80		90																																				
T305	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	G	T	G	G	C	C	A	A	C	A	G	G	T	C	C	G	T
T55	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	G	T	G	G	C	C	A	A	C	A	G	G	T	C	C	G	T
T346	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	G	T	G	G	C	C	A	A	C	A	G	G	T	C	C	G	T
K	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	G	T	G	G	C	C	A	A	T	A	G	G	T	C	C	G	T
T36	G	G	T	A	A	G	T	A	T	C	C	G	G	A	T	G	T	C	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	C	G	T	G	G	C	C	A	A	T	A	G	G	T	C	C	G	T
C270-3	G	G	T	A	A	G	T	A	C	C	G	G	A	T	G	T	T	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	G	T	G	G	C	A	A	A	T	A	G	G	T	C	T	G	T	
P6	G	G	T	A	A	G	T	A	C	C	G	G	A	T	G	T	T	A	T	T	G	A	A	A	A	T	T	T	G	T	G	G	C	A	A	A	T	A	G	G	T	C	T	G	T	

		100		110		120		130		140																																						
T305	A	G	A	C	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	C	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	
T55	A	G	A	C	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	C	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	
T346	A	G	A	C	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	C	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	
K	A	G	A	C	G	C	G	T	T	G	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	T	A	T	A	A	G	T	A	A	G	T	T	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	
T36	A	G	A	T	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	T	A	T	A	A	G	T	A	A	A	T	T	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	A	A	
C270-3	A	G	A	T	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	T	A	T	A	A	G	T	A	A	A	G	T	T	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	G	A
P6	A	G	A	T	G	C	G	T	T	A	A	T	A	G	A	A	G	G	C	G	T	T	A	T	A	A	G	T	A	A	A	G	T	T	G	G	A	T	A	C	C	A	A	T	T	C	G	A

		150		160		170		180																																							
T305	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	C	A	C	T	T	G	A	A	T	A	C	
T55	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	C	A	C	T	T	G	A	A	T	A	C	
T346	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	C	A	C	T	T	G	A	A	T	A	C	
K	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	A	T	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	C	A	C	T	T	G	A	A	T	A	C	
T36	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	G	T	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	A	C	A	C	T	T	G	A	A	T	A	C	
C270-3	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	G	T	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	G	T	A	C	T	T	A	A	A	G	T	A	C
P6	T	A	T	A	C	G	A	A	G	A	T	T	C	C	A	C	T	G	A	A	A	A	G	T	T	T	A	C	T	G	G	T	G	A	G	T	A	C	T	T	A	A	A	G	T	A	C

		190		200		210		220		230																																						
T305	G	T	T	A	T	G	G	T	T	A	C	T	A	T	G	G	A	T	G	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	C	T	A	C	A	A	G	A	C	G	A	A	
T55	G	T	T	A	T	G	G	T	T	A	C	T	A	T	G	G	A	T	G	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	C	T	A	C	A	A	G	A	C	G	A	A	
T346	G	T	T	A	T	G	G	T	T	A	C	T	A	T	G	G	A	T	G	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	C	T	A	C	A	A	G	A	C	G	A	A	
K	G	T	T	A	T	G	G	T	T	A	C	T	A	T	G	G	A	T	G	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	C	T	A	C	A	A	A	G	A	C	G	A	A
T36	G	T	T	A	T	G	G	T	T	A	C	T	A	T	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	C	T	A	C	A	A	A	G	A	C	G	A	A
C270-3	G	T	T	A	T	G	G	T	T	A	C	T	A	T	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	
P6	G	T	T	A	T	G	G	T	T	A	C	T	A	T	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	

		240		250		260		270		280																																					
T305	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T	G	T	T	G	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	G	T
T55	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T	G	T	T	G	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	G	T
T346	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T	G	T	T	G	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	G	T
K	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T	G	T	T	G	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	G	T
T36	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T	G	T	T	G	G	T	T	C	A	C	T	T	A	A	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T
C270-3	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	A	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T
P6	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	A	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T

		290		300		310		320																																							
T305	G	C	A	C	T	A	C	A	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A	C	T	A	A	A	C	C	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	A	G	G	T	T	G	T	
T55	A	C	A	C	T	A	C	A	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A	C	T	A	A	A	C	C	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	A	G	G	T	T	G	T	
T346	G	C	A	C	T	A	C	A	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A	C	T	A	A	A	C	C	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	A	G	G	T	T	G	T	
K	G	C	A	C	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A	C	T	A	A	A	C	C	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	A	G	G	T	T	G	T	
T36	A	C	A	C	T	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	G	C	A	C	T	A	A	A	C	C	A	A	G	T	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	A	G	G	T	T	G	T
C270-3	G	C	A	C	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	A	G	G	T	T	G	T		
P6	G	C	A	C	A	T	A	T	C	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	A	G	G	T	T	G	T		

	330		340		350		360		370																																					
T305	A	T	T	A	G	T	T	A	C	G	T	G	C	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	A	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T
T55	A	T	T	A	G	T	T	A	C	G	T	G	C	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	A	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T
T346	A	T	T	A	G	T	T	A	C	G	T	G	C	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	A	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T
K	A	T	T	A	G	T	T	A	C	G	T	G	C	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	C	G	A	T	A	A	A	G	T	T	A	A	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	
T36	A	T	T	A	G	T	T	A	C	G	T	A	C	A	A	G	G	G	G	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	G	T	T	G	G	A	C	A	A	A	G	T	
C270-3	A	T	T	A	G	T	T	A	C	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T
P6	A	T	T	A	G	T	T	A	C	G	T	A	C	A	A	G	A	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	

	380		390		400		410		420																																					
T305	A	G	T	T	T	T	C	C	T	T	T	C	A	T	T	A	T	A	T	C	G	A	A	A	T	T	T	A	C	C	G	A	C	A	G	G	G	A	G	A	C	T	C	C	G	A
T55	A	G	T	T	T	T	C	C	T	T	T	C	A	T	T	A	T	A	T	C	G	A	A	A	T	T	T	A	C	C	G	A	C	A	G	G	G	A	G	A	C	T	C	C	G	A
T346	A	G	T	T	T	T	C	C	T	T	T	C	A	T	T	A	T	A	T	C	G	A	A	A	T	T	T	A	C	C	G	A	T	A	G	G	G	A	G	A	C	T	C	C	G	A
K	A	G	T	T	T	T	C	C	T	T	T	C	A	T	T	A	T	A	T	C	G	A	A	A	T	T	T	A	C	C	G	A	T	A	G	G	G	A	G	A	C	T	C	C	G	A
T36	A	G	T	T	T	T	C	C	T	T	T	C	A	T	T	A	T	A	T	C	G	A	A	A	T	T	T	A	C	C	G	A	C	A	G	G	G	A	G	A	C	T	C	C	A	A
C270-3	G	G	T	T	T	T	C	C	T	T	T	A	T	T	A	T	A	T	A	T	C	G	A	A	T	T	T	A	C	C	G	A	C	A	G	G	A	G	A	C	T	C	C	G	A	
P6	G	G	T	T	T	T	C	C	T	T	T	A	T	T	A	T	A	T	A	T	C	G	A	A	T	T	T	A	C	C	G	A	C	A	G	G	G	A	G	A	C	T	C	C	G	A

	430		440		450		460		470																																						
T305	A	C	G	C	T	C	T	A	C	G	T	A	A	G	T	A	T	G	C	T	T	G	C	A	C	T	T	T	C	G	A	G	G	A	G	T	T	A	C	A	C	T	T	G	T	G	T
T55	A	C	G	C	T	C	T	A	C	G	T	A	A	G	T	A	T	G	C	T	T	G	C	A	C	T	T	T	C	G	A	G	G	A	G	T	T	A	C	A	C	T	T	G	T	G	T
T346	A	C	G	C	T	C	T	A	C	G	T	A	A	G	T	A	T	G	C	T	T	G	C	A	C	T	T	T	C	G	A	G	G	A	G	T	T	A	C	A	C	T	T	G	T	G	T
K	A	C	G	C	T	C	T	A	C	G	T	A	A	G	T	A	T	G	C	T	T	G	C	A	C	T	T	T	C	G	A	G	G	A	G	T	T	A	C	A	C	T	T	G	T	G	T
T36	A	C	G	C	T	C	T	A	C	G	T	A	A	G	T	T	T	G	C	T	T	G	C	A	C	T	T	T	C	G	A	G	G	A	G	T	T	A	C	A	C	T	T	G	T	G	T
C270-3	A	T	G	C	T	C	T	A	C	G	T	A	A	G	T	A	T	G	C	T	T	G	C	A	C	T	T	T	C	G	A	G	G	A	G	T	T	A	C	A	C	T	T	A	T	G	T
P6	A	T	G	C	T	C	T	A	C	G	T	A	A	G	T	A	T	G	C	T	T	G	C	A	C	T	T	T	C	G	A	G	G	A	G	T	T	A	C	A	C	T	T	A	T	G	T

	480		490		500		510																																						
T305	A	T	G	G	C	T	A	G	G	T	T	G	A	G	A	C	C	C	G	A	C	T	T	A	T	A	C	G	A	A	A	T	A	A	A	G	G	A	C	G	A	C	T	A	A
T55	A	T	G	G	C	T	A	G	G	T	T	G	A	G	A	C	C	C	G	A	C	T	T	A	T	A	C	G	A	A	A	T	A	A	A	G	G	A	C	G	A	C	T	A	A
T346	A	T	G	G	C	T	A	G	G	T	T	G	A	G	A	C	C	C	G	A	C	T	T	A	T	A	C	G	A	A	A	T	A	A	A	G	G	A	C	G	A	C	T	A	A
K	A	T	G	G	C	T	A	G	G	T	T	G	A	G	A	C	C	C	G	A	C	T	T	A	T	A	C	G	A	A	A	T	A	A	A	G	G	A	C	G	A	C	T	A	A
T36	A	T	G	G	C	T	A	G	G	T	T	A	A	G	A	C	C	C	G	A	C	T	T	A	T	A	C	G	A	A	A	T	A	A	A	G	G	A	C	G	A	C	C	A	G
C270-3	A	T	G	G	C	T	A	G	A	T	T	A	A	G	A	C	C	C	G	A	C	C	T	A	T	A	C	G	A	G	A	T	A	A	A	G	G	A	C	G	A	C	C	A	A
P6	A	T	G	G	C	T	A	G	A	T	T	A	A	G	A	C	C	C	G	A	C	C	T	A	T	A	C	G	A	G	A	T	A	A	A	G	G	A	C	G	A	C	C	A	A

	520		530		540		550		560																																				
T305	A	G	C	C	G	G	G	A	C	T	C	C	A	C	A	T	T	T	A	A	A	G	G	C	T	A	T	T	A	T	C	A	G	C	C	G	A	C	T	T	T	C	T	T	T
T55	A	G	C	C	G	G	G	A	C	T	C	C	A	C	A	T	T	T	A	A	A	G	G	C	T	A	T	T	A	T	C	A	G	C	C	G	A	C	T	T	T	C	T	T	T
T346	A	G	C	C	G	G	A	C	T	C	C	A	C	A	T	T	T	A	A	A	G	G	C	T	A	C	T	T	A	T	C	A	G	C	C	G	A	C	T	T	T	C	T	T	T
K	A	G	C	C	G	G	A	C	T	C	C	A	C	A	T	T	T	A	A	A	G	G	C	T	A	C	T	T	A	T	C	A	G	C	C	G	A	C	T	T	T	C	T	T	T
T36	G	G	C	T	G	G	A	C	T	C	C	A	C	A	T	T	T	A	A	A	G	G	C	T	A	C	T	A	T	C	A	G	C	T	G	A	C	T	T	T	C	T	C	T	T
C270-3	G	G	C	T	G	G	A	C	T	C	C	A	C	A	T	T	T	A	A	A	G	G	T	T	A	C	T	T	A	T	C	A	G	C	T	G	A	C	T	T	T	C	T	T	T
P6	G	G	C	T	G	G	A	C	T	C	C	G	C	A	T	T	T	A	A	A	G	G	T	T	A	C	T	T	A	T	C	A	G	C	T	G	A	C	T	T	T	C	T	T	T

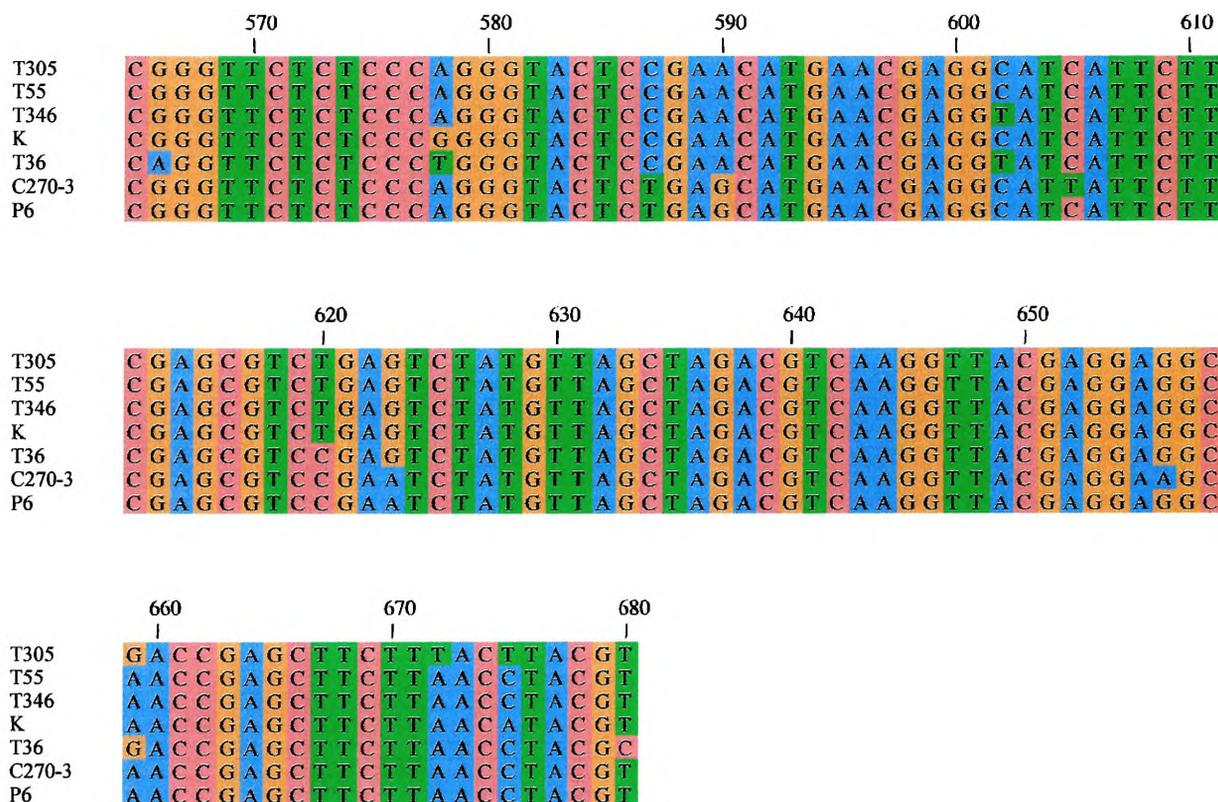


Figura III.C.13: Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas del gen p27 realizadas sobre productos de RT-PCR sin donar. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL W y se visualizó con el programa Jalview.

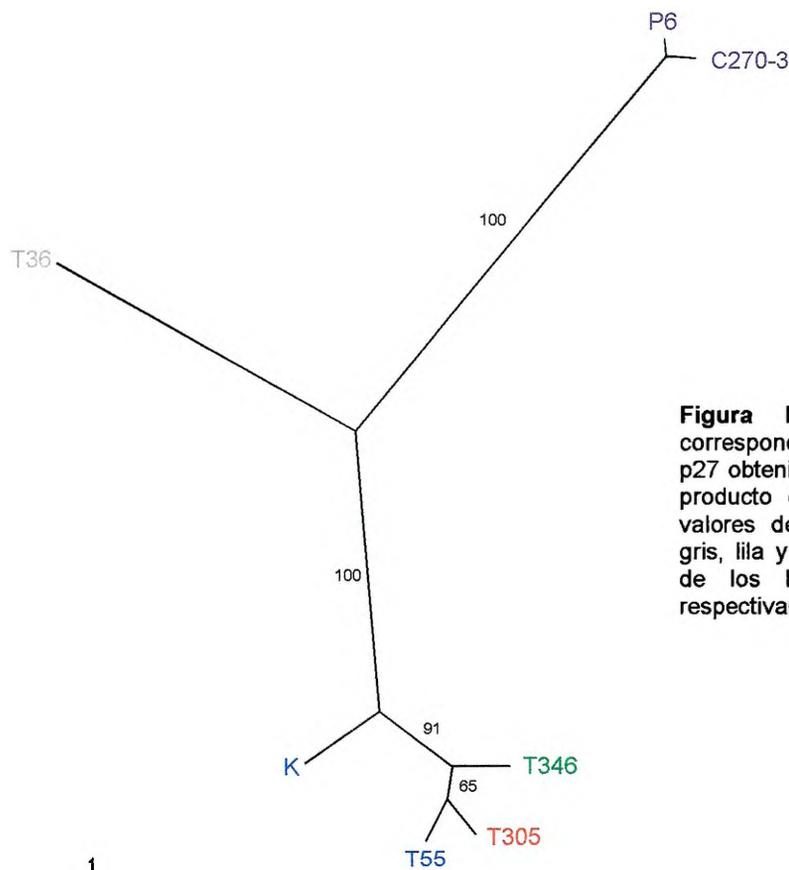


Figura III.C.14: Árbol no enraizado correspondiente a las secuencias del gen p27 obtenidas por secuenciación directa del producto de amplificación. Se indican los valores de *bootstrapping*. En azul, verde, gris, lila y rojo se señalan los aislamientos de los biogrupos I, II, III, IV y V, respectivamente.

III.C.5C) ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DEDUCIDAS

Las secuencias aminoacídicas deducidas se generaron por medio del programa Translate. Con las mismas se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa CLUSTAL W (fig. III.C.15).

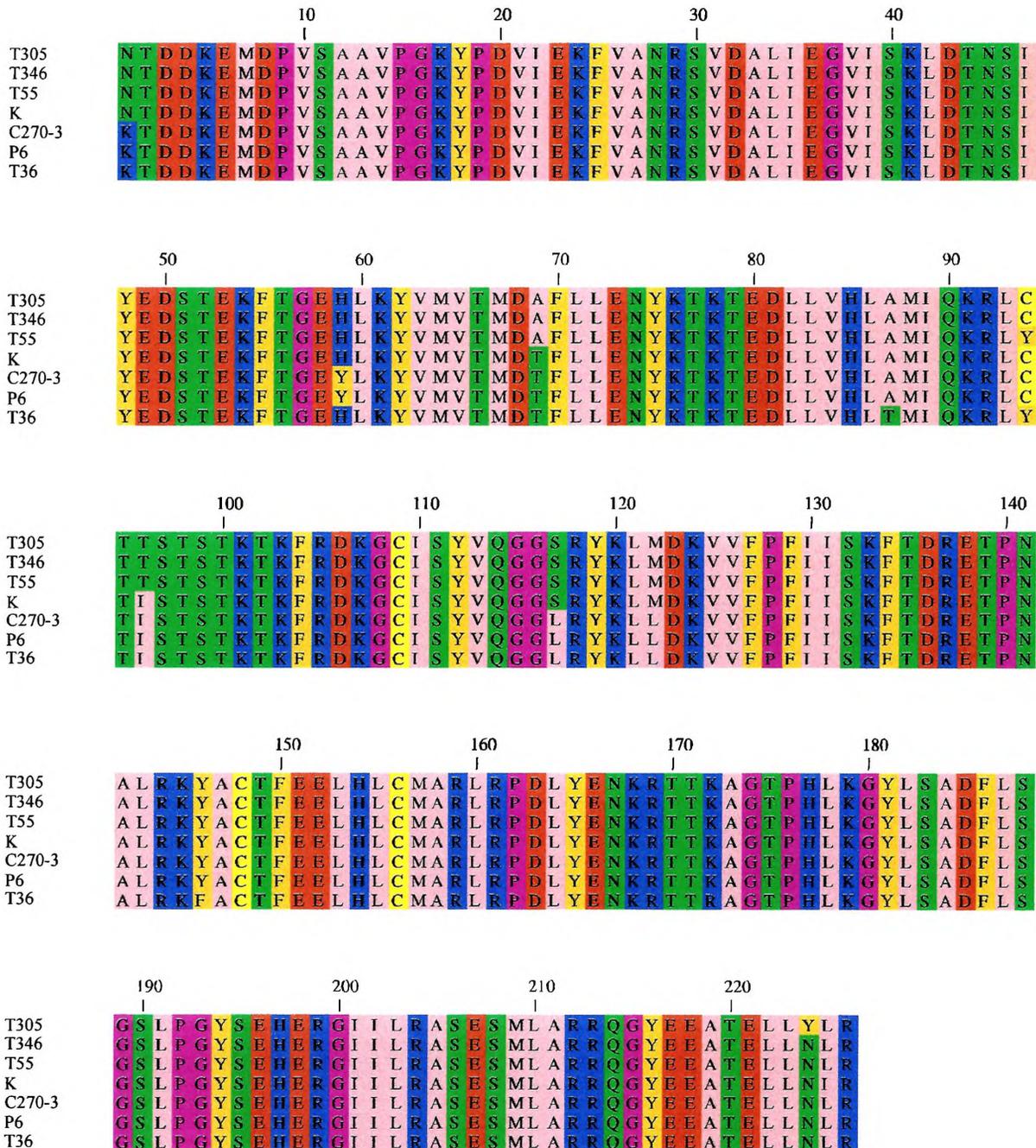


Figura III.C.15: Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas deducidas del gen p27 obtenidas por secuenciación directa de productos de PCR. Se realizó con el programa CLUSTAL W y se visualizó con el programa Jalview. Los aminoácidos se indican de acuerdo al esquema de colores de Zappo.

De acuerdo a lo observado anteriormente se distinguen tres grupos, uno constituido por T36, otro formado por los aislamientos C270-3 y P6 y un tercer grupo que incluye a los restantes aislamientos. Cuando se comparan estos resultados con los mostrados en la figura III.C.6 se encuentra que los aislamientos C270-3 y P6 comparten la mayor parte de los cambios que mostraron los aislamientos severos argentinos y brasileños con respecto a los restantes aislamientos estudiados, lo cual se corresponde con el comportamiento biológico de los mismos. Del mismo modo, los aislamientos T55, T346 y T305 presentan la mayoría parte de los residuos conservados en los aislamientos de los biogrupos I y II estudiados previamente. El mismo patrón, aunque en un menor número de posiciones, es el que exhibe el aislamiento K. T36 presenta algunos cambios compartidos con los demás aislamientos, en particular con los de biogrupos severos, y un cambio propio.

CAPÍTULO III

SECCIÓN D: RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD INTER E INTRAPOBLACIONAL DEL GEN P27 EN AISLAMIENTOS ARGENTINOS DE CTV

III.D.1) ANÁLISIS DE SSCP DE LOS FRAGMENTOS DE DIGESTIÓN DEL GEN P27

III.D.1A) SSCP DE LOS CLONES DE CADA AISLAMIENTO

Una vez obtenidos los productos de digestión con *Bgl* II del gen p27, amplificado a partir de los ciento diez clones seleccionados, se determinaron las condiciones experimentales óptimas para la resolución de los mismos. Los patrones de SSCP mostraron, en la mayoría de los casos, cuatro bandas, correspondientes a ambas hebras de los fragmentos de digestión. Como controles de migración se incluyeron alícuotas de los fragmentos menor y mayor de dos clones del aislamiento C257-9 (clones 51 y 53), purificados individualmente a partir de geles de agarosa.

El patrón de cuatro bandas discretas e intensas se observó en todos los clones de los aislamientos C278-1 y C269-1 (fig. III.D.1a y b) y en la mayor parte de los clones de los demás aislamientos.

Por otro lado, para el fragmento menor se observó una tercera banda adicional tenue, indicadora de un confórmero alternativo, en todos los clones del aislamiento C257-2, en la mayoría de los del aislamiento C257-10 y en algunos de los correspondientes a los aislamientos C257-7 y C257-9 (fig. III.D.1d). Por otra parte, en dos clones de los aislamientos C268-2 y C269-6 (calles 5 y 2 de las fig. III.D.1e y f, respectivamente) se visualizó una única banda de migración para el fragmento menor, señalando que ambas hebras de ssDNA adoptan confórmeros que migran de manera indistinguible.

Para el fragmento mayor se encontró que la totalidad de los clones de los aislamientos C257-2, C268-2, C278-1 y la mayor parte de los pertenecientes a los aislamientos C257-7 y C269-1 mostraron el patrón esperado de dos bandas nítidas y únicas (fig. III.D.1a, b, y e). Por el contrario, todos los clones de los aislamientos C269-6, C270-3 y C271-8 mostraron cuatro bandas, dos de buena intensidad y dos tenues, indicando la existencia de un confórmero adicional estable para cada hebra de ssDNA (fig. III.D.1f). En el caso de los clones de los aislamientos C257-9, C257-10 y C271-2 también se observó la presencia de una o dos bandas adicionales, muy tenues (fig. III.D.1c y d). Únicamente en dos de los ciento diez clones analizados, pertenecientes a los aislamientos C257-7 y C271-2, respectivamente, se halló una única banda de migración (fig. III.D.1c), por lo que se asume que ambas hebras adoptan confórmeros indistinguibles en las condiciones de resolución utilizadas.

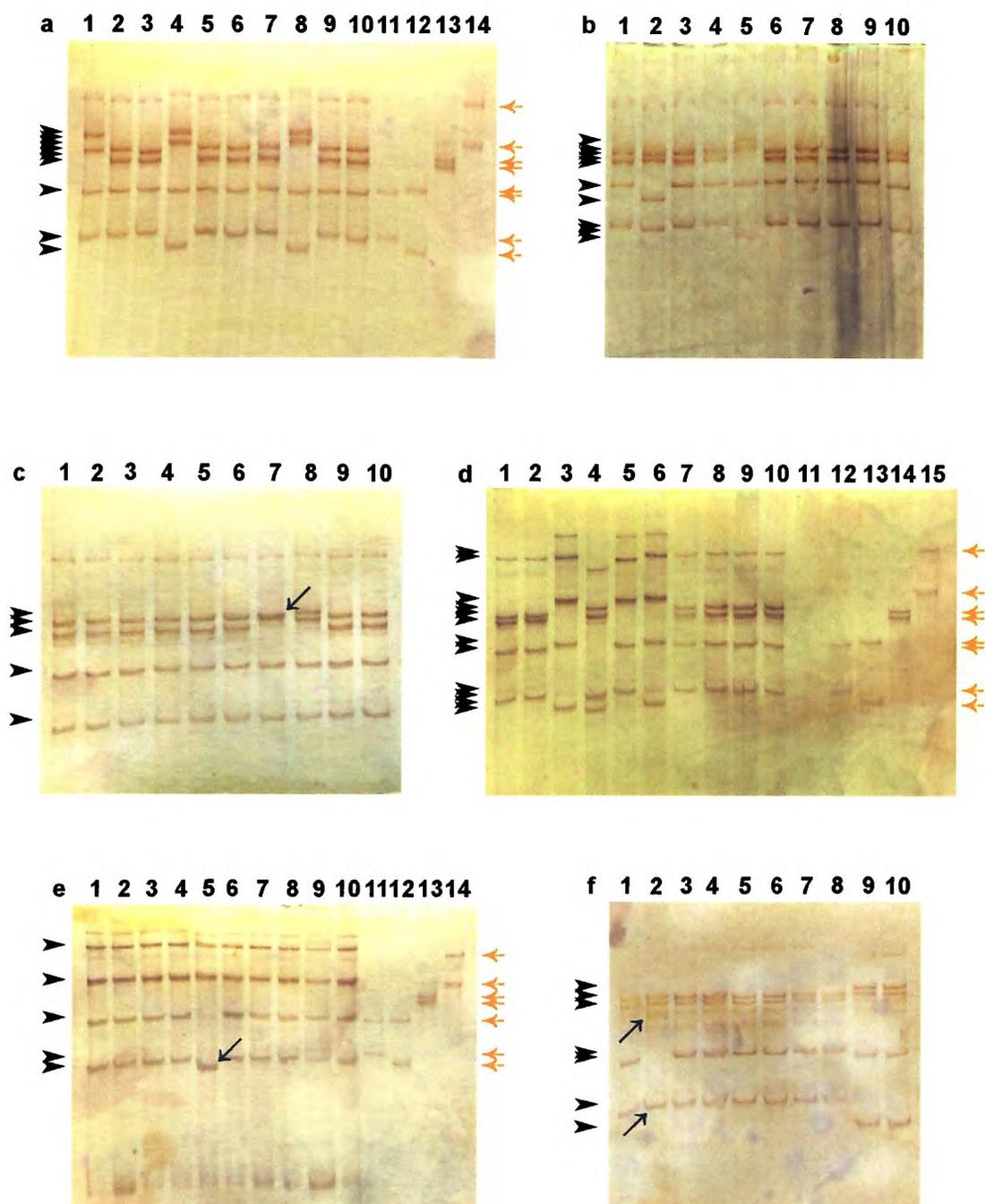


Figura III.D.1: Patrones de SSCP de fragmentos de restricción del gen p27 con *Bgl* II en aislamientos argentinos de CTV. Geles nativos de poliacrilamida 12%-TBE 1x, teñidos con nitrato de plata. Las electroforesis se realizaron en las condiciones descriptas. **a:** calles 1 a 10, clones del aislamiento C278-1. **b:** calles 1 a 10, clones correspondientes al aislamiento C269-1. **c:** calles 1 a 10, clones del aislamiento C271-2. Con una flecha se señala la presencia de una única banda para el fragmento mayor en el clon de la calle 7. **d:** calles 1 a 10, clones del aislamiento C257-9. **e:** calles 1 a 10, clones del aislamiento C268-2. Se indica con una flecha la banda única para ambas hebras de ssDNA del fragmento menor en el clon de la calle 5. **f:** calles 1 a 10, clones del aislamiento C269-6. Con flechas se señalan la banda única del fragmento menor del clon de calle 2 y la presencia de conformeros adicionales tenues para el fragmento mayor. Controles de migración: clon 51, fragmento menor: calles 11 (figuras a y e) y 12 (figura d), fragmento mayor: calles 13 (figuras a y e) y 14 (figura d); clon 53, fragmento menor: calles 12 (figuras a y e) y 13 (figura d), fragmento mayor: calles 14 (figuras a y e) y 15 (figura d). Las flechas de color naranja indican la posición de los conformeros de los controles.

Los resultados del análisis por SSCP de la totalidad de los clones estudiados se resumen en las tablas VII y VIII. Para ambos fragmentos del gen p27 existe un número variable de patrones o haplotipos y de clones incluidos en cada uno de ellos (Tabla VI). El número de haplotipos para el fragmento menor oscila entre uno (C270-3 y C271-2) y cuatro (C257-2 y C269-1), mientras que para el fragmento mayor varía entre uno (C268-2, C270-3 y C271-8) y cinco (C269-1 y C278-1).

Tabla VII. Distribución de patrones de SSCP para los fragmentos mayor y menor del gen p27 en once aislamientos argentinos de CTV.

aislamiento	fragmento menor			fragmento mayor		
	patrones observados ^z	distribución de clones ^z	clon mayoritario ^y	patrones observados ^z	distribución de clones ^z	clon mayoritario ^y
C257-2	4	(6,2,1,1)	60	3	(8,1,1)	80
C257-7	2	(5,5)	50	4	(7,1,1,1)	70
C257-9	3	(7,2,1)	70	4	(5,2,2,1)	50
C257-10	2	(9,1)	90	3	(8,1,1)	80
C268-2	2	(9,1)	90	1	(10)	100
C269-1	4	(7,1,1,1)	70	5	(5,1,1,1,1,1)	50
C269-6	3	(7,2,1)	70	2	(8,2)	80
C270-3	1	(10)	100	1	(10)	100
C271-2	1	(10)	100	3	(8,1,1)	80
C271-8	3	(8,1,1)	80	1	(10)	100
C278-1	2	(8,2)	80	5	(6,1,1,1,1)	60

^zvalores expresados en cantidades

^yvalores expresados en porcentaje

Considerando el número de patrones se observó, en el aislamiento C270-3 (biogrupo IV), la mayor homogeneidad intrapoblacional para ambos fragmentos del gen p27. Todos los clones de este aislamiento presentaron el mismo patrón de migración en las condiciones utilizadas. Los demás aislamientos mostraron distinto grado de variación en cuanto al número de patrones.

Para el fragmento menor se encontró que el aislamiento más homogéneo es C271-2 (biogrupo II). Por otro lado, para el fragmento mayor, la totalidad de los clones de dos aislamientos pertenecientes a los biogrupos II y III (C271-8 y C268-2, respectivamente) mostraron el mismo patrón de migración de SSCP.

La mayor variabilidad en el número de patrones se encontró en el aislamiento C269-1 (biogrupo IV), que mostró cuatro patrones diferentes para el fragmento menor y cinco para el mayor. También los aislamientos C257-2 (biogrupo II) y C257-9 (biogrupo III) mostraron variabilidad en sus patrones de migración. El análisis del número de haplotipos en los distintos aislamientos estudiados no permitió correlacionar, para el gen p27, dicho número con el biogrupo de pertenencia de los aislamientos. Prueba de esto es que tanto el aislamiento

más homogéneo (C270-3) como el más heterogéneo (C269-1) pertenecen al mismo biogrupo (IV). En cuatro aislamientos se encontró mayor variación en el fragmento menor (C257-2, C268-2, C269-6 y C271-8) mientras que en otros seis (C257-7, C257-9, C257-10, C269-1, C271-2 y C278-1) el mayor número de patrones correspondió al fragmento mayor. Estos resultados indicarían que ambas regiones del gen pueden experimentar cambios con frecuencias semejantes.

Para ambos fragmentos del gen y en todos los aislamientos estudiados, se encontró un haplotipo mayoritario. Los restantes haplotipos están representados por un único clon o por un número reducido de ellos, que no superan al 20% de los clones analizados. La única excepción es el fragmento menor del aislamiento C257-7; en este caso se encontraron dos patrones de migración, compuestos por cinco clones respectivamente.

A partir de los resultados para ambos fragmentos, se analizó la variabilidad del gen p27 completo. Para cada aislamiento se determinó el número de clones que mostraron variación (en uno o ambos fragmentos) y el número de clones sin variación (Tabla VIII).

Tabla VIII. Distribución de la variación de patrones de SSCP del gen p27 en los once aislamientos argentinos de CTV analizados.

aislamiento	clones con variación en el frag. menor ^z	clones con variación en el frag. mayor ^z	clones con variación en ambos fragmentos	clones sin variación	clon mayoritario
C257-2	3	1	1	5	50
C257-7	3	1	2	4	40
C257-9	1	3	2	4	40
C257-10	1	2	ninguno	7	70
C268-2	1	ninguno	ninguno	9	90
C269-1	ninguno	2	3	5	50
C269-6	1	ninguno	2	7	70
C270-3	ninguno	ninguno	ninguno	10	100
C271-2	ninguno	2	ninguno	8	80
C271-8	2	ninguno	ninguno	8	80
C278-1	ninguno	2	2	6	60

^zvalores expresados en cantidades

^yvalores expresados en porcentaje

Se definió como clones "mayoritarios" a aquéllos que no exhibieron cambios en su patrón de migración para ninguno de los fragmentos. Cinco aislamientos virales, C257-10, C268-2, C270-3, C271-2 y C278-1, no presentaron clones con variación en ambos fragmentos. El número de clones con cambios en los dos fragmentos osciló entre uno (aislamiento C257-2) y tres (aislamiento C269-1), representando el 10% y 30% del total, respectivamente. En el aislamiento C270-3 se encontró un solo haplotipo mientras que las poblaciones

más heterogéneas correspondieron a los aislamientos C257-7 y C257-9, donde el clon mayoritario representa el 40% de la población.

III.D.1B) SSCP COMPARATIVO ENTRE CLONES REPRESENTATIVOS DE LOS HAPLOTIPOS MAYORITARIOS DE CADA AISLAMIENTO

Una de las finalidades de este estudio es comparar la variabilidad poblacional para el gen p27 entre los aislamientos argentinos elegidos. Para esto, se seleccionó un clon representativo del haplotipo mayoritario de cada aislamiento y se compararon los patrones de SSCP. El ensayo se realizó en las condiciones antes especificadas y los clones se agruparon de acuerdo a las semejanzas mostradas en sus patrones de migración.

La figura III.D.2 muestra los patrones de SSCP obtenidos. Los aislamientos C269-6, C270-3 y C271-8 exhiben igual patrón de migración, sugiriendo que la secuencia del haplotipo predominante en dichos aislamientos es idéntica o muy semejante. Los aislamientos C269-6 y C270-3 provienen de pomelo, pertenecen al biogrupo IV, son de orígenes diferentes (el primero es de Entre Ríos y el segundo de Salta), y son agresivos para el hospedador de origen. El aislamiento C271-8 es originario de una planta de mandarina injertada sobre naranjo agrio, que proviene de Catamarca y pertenece al biogrupo II.

También se observó un patrón idéntico de SSCP, para ambos fragmentos, entre los clones de los aislamientos C269-1 y C278-1 (ambos de pomelo, de Tucumán y pertenecientes al biogrupo IV) por un lado y entre los de los aislamientos C257-9, C257-10 y C271-2 por otro. Estos últimos provienen de plantas de naranjo dulce, pero pertenecen a biogrupos distintos, los dos primeros al biogrupo III y el restante al biogrupo II. Además son originarios de regiones geográficas diferentes, el aislamiento C271-2 es de Catamarca y los aislamientos C257-9 y C257-10 de Entre Ríos.

Ocho aislamientos, C257-9, C257-10, C269-1, C269-6, C270-3, C271-2, C271-8 y C278-1, comparten un mismo patrón de SSCP para el fragmento menor aunque no todos presentan en mismo patrón para el fragmento mayor. Los aislamientos con patrones diferentes a los demás fueron C257-2 (naranjo dulce, biogrupo II, Entre Ríos), C257-7 (pomelo, biogrupo V, Salta) y C268-2 (naranjo, biogrupo III, Entre Ríos). El aislamiento C257-7 muestra diferencias en el fragmento menor mientras que el patrón de migración del mayor se asemeja al de los aislamientos C269-1 y C278-1. Los aislamientos C257-2 y C268-2 exhiben diferencias en ambos fragmentos.

III.D.1C) SSCP COMPARATIVO ENTRE PRODUCTOS INICIALES DE AMPLIFICACIÓN Y CLONES MAYORITARIOS

El análisis de SSCP del producto de amplificación inicial del gen p27 permite verificar que durante el proceso de clonado no se seleccionaron algunas de las variantes presentes en la población viral. Por esta razón se realizó un ensayo

donde se incluyeron los productos iniciales de PCR de cada aislamiento, digeridos con la enzima *Bgl* II, y clones representativos de los haplotipos mayoritarios. Los productos se resolvieron en las condiciones experimentales antes descritas. De acuerdo a lo esperado, en todos los casos se encontró una estrecha concordancia entre el patrón de SSCP exhibido por el producto inicial digerido y el haplotipo mayoritario identificado a partir del análisis de los clones. Esto indica que en el proceso de clonado no ocurrió selección y que los clones que componen el haplotipo mayoritario constituyen la forma poblacional predominante en cada uno de los aislamientos virales estudiados. En el caso del aislamiento C257-7, que exhibe dos patrones igualmente frecuentes para el fragmento menor (cinco clones cada uno), ambas formas están presentes en el producto inicial de amplificación (fig. III.D.3).

III.D.2) ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL GEN P27

III.D.2A) SECUENCIACIÓN DE CLONES REPRESENTATIVOS DE LOS HAPLOTIPOS MAYORITARIOS

Una vez analizada la variabilidad del gen p27 mediante SSCP se iniciaron los estudios de secuencias nucleotídicas. Para ello se seleccionaron uno o dos clones representativos del haplotipo mayoritario de cada aislamiento. La secuenciación completa de cada clon se realizó con los *primers* universales T7 y SP6 y con *primers* específicos del gen p27 (intp27-3, intp27-5 y extp27). Para establecer la secuencia completa y realizar las comparaciones de las mismas, se utilizaron diversos programas del paquete GCG.

La secuenciación completa de dos clones del patrón de migración mayoritario se realizó en los aislamientos C257-2 (clones 1 y 2), C257-7 (clones 37 y 38), C257-9 (clones 59 y 60), C268-2 (clones 101 y 102), C269-9 (clones 126 y 128), C270-3 (clones 153 y 154), C271-2 (clones 177 y 179) y C271-8 (clones 201 y 204). En la mayor parte de los casos se observó que los dos clones con igual patrón de migración tenían secuencias 100% idénticas. Las excepciones fueron los clones de los aislamientos C257-7 (37 y 38) y C271-2 (201 y 204), que a pesar de presentar el mismo patrón de migración difieren en una base y tienen una identidad nucleotídica del 99,99%. En el análisis de SSCP se supone que los productos que presentan diferencias en la migración, difieren en secuencia nucleotídica. Además se asume que, en principio, a patrones iguales corresponden secuencias idénticas o con diferencias no detectables porque las mutaciones puntuales que presentan no afectan la estabilidad del confórmero. Considerando que en la mayoría de los pares de clones elegidos las secuencias resultaron idénticas o exhibieron un único cambio no detectado, en los restantes aislamientos (C257-10, C269-1 y C278-1) se secuenció un único clon representativo del patrón mayoritario (clones 76, 250 y 236, respectivamente).

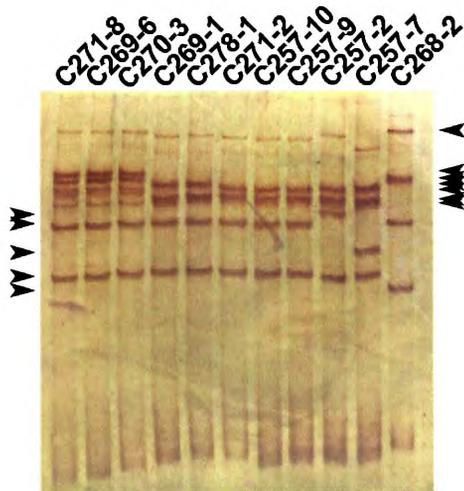


Figura III.D.2: Análisis de SSCP de clones representativos de los haplotipos mayoritarios de aislamientos argentinos de CTV. Gel nativo de poliacrilamida 12%-TBE 1x, teñido con nitrato de plata. Calles 1 a 11: clones 201 (C271-8), 126 (C269-6), 153 (C270-3), 250 (C269-1), 236 (C278-1), 177 (C271-2), 76 (C257-10), 56 (C257-9), 1 (C257-2), 37 (C257-7) y 101 (C268-2). Los conforméros correspondientes a los fragmentos mayor y menor se indican con puntas de flecha a derecha e izquierda, respectivamente.

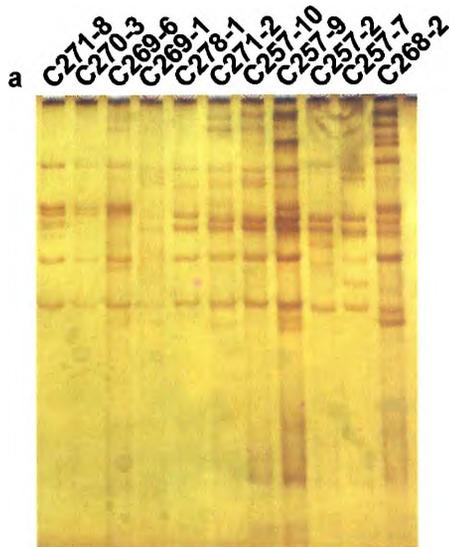
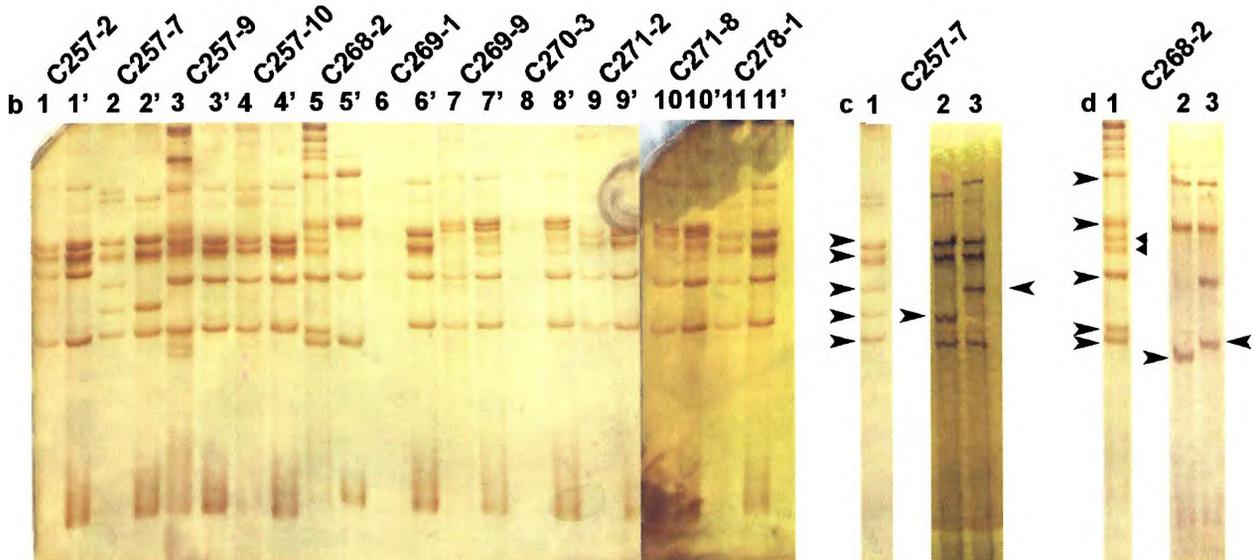


Figura III.D.3: Análisis de SSCP de los productos iniciales de amplificación en los aislamientos argentinos de CTV. Geles nativos de poliacrilamida 12%-TBE 1x teñidos con nitrato de plata. **a:** patrones de migración de los productos iniciales de amplificación. **b:** análisis comparativo entre los productos iniciales de amplificación (calles 1 a 11) y los clones representativos de los haplotipos mayoritarios de cada aislamiento (calles 1' a 11'). **c:** aislamiento C257-7, restricción del producto inicial de PCR (calle 1) y patrones de los dos haplotipos igualmente frecuentes para el fragmento menor (calles 2 y 3). Los distintos conforméros son señalados con puntas de flecha. **d:** aislamiento C268-2, digestión del producto inicial de PCR (calle 1) y de dos clones representativos de los haplotipos mayoritarios (calles 2 y 3). Con puntas de flechas se indican los distintos conforméros. Con triángulos se señalan los conforméros presentes en el producto inicial que no se detectaron en los clones analizados.



III.D.2B) ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DEL GEN P27

Con las secuencias completas de los clones representativos de los haplotipos mayoritarios se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTAL W (fig. III.D.4). En este análisis se incluyó la secuencia de los *primers* utilizados en la amplificación del gen. El alineamiento obtenido mostró una elevada conservación de secuencias nucleotídicas entre los clones mayoritarios de los distintos aislamientos. Los únicos aislamientos que presentan diferencias notorias con respecto a los demás son C257-2 y C268-2. Al analizar el alineamiento se encontraron ochenta transiciones y una sola transversión con respecto a la secuencia consenso generada.

III.D.2C) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DEL GEN P27

Para establecer las relaciones entre los aislamientos argentinos de CTV estudiados, se realizó un análisis filogenético de las secuencias de los haplotipos mayoritarios de cada uno de ellos. Se utilizó el programa PAUP* y la búsqueda de árboles se realizó por el método de *neighbor-joining* (NJ) y también bajo los criterios de parsimonia (P) y *maximum likelihood* (ML). En las búsquedas de acuerdo al criterio de ML se utilizaron los parámetros del modelo *general-times-reversible* (GTR) con inclusión de la distribución Γ con un $\alpha=0,5$. El análisis se realizó con y sin inclusión de la secuencia del gen p24 de BYV (dCP) como grupo externo (*outgroup*).

Como archivo de entrada de la búsqueda sin inclusión de *outgroup* se utilizó el alineamiento múltiple de la figura III.D.4. Con dichas secuencias se obtuvo, bajo ML, un único árbol con un *score* de 1353,87 y bajo parsimonia tres árboles. De la observación del árbol se desprende que los aislamientos se disponen formando cuatro grupos. Uno de los grupos está formado por los aislamientos C257-2 y C268-2, que son los más distantes con respecto a los demás. El segundo grupo está constituido por los aislamientos C269-1, C257-7 y C278-1. Los grupos restantes constan de los aislamientos C257-9, C257-10 y C271-2 por un lado y C271-8, C270-3 y C269-6 por el otro. Los valores que se muestran en la figura corresponden al *bootstrapping* de las ramas individuales. En este caso y, probablemente a causa del elevado nivel de identidad de secuencia nucleotídica existente entre los aislamientos, los valores son relativamente bajos.

En el árbol de la figura III.D.5 se observa que los aislamientos argentinos no se agrupan de acuerdo al biogrupo al que pertenecen, sino que los grupos están formados por aislamientos de características biológicas diferentes.

	230	240	250	260	270																																									
C271-2	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T	
C257-10	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T
C257-9	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T
C269-6	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T
C270-3	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T
C271-8	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T
C269-1	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T
C257-7	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T
C278-1	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T
C257-2	G	G	A	C	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	G	A	A	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T
C268-2	G	G	A	T	A	C	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	G	A	A	A	A	A	C	T	A	C	A	A	G	A	C	G	A	G	A	A	C	G	G	A	A	G	A	T	C	T

Consenso G G A C A C T T T C T T A T T A G A A A A C T A T A A A A C G A A A A C G G A A G A T C T

	280	290	300	310																																									
C271-2	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T	G	C	A	C	C	A	T	A	T	C
C257-10	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T	G	C	A	C	C	A	T	A	T	C
C257-9	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T	G	C	A	C	C	A	T	A	T	C
C269-6	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T	G	C	A	C	C	A	T	A	T	C
C270-3	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T	G	C	A	C	C	A	T	A	T	C
C271-8	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T	G	C	A	C	C	A	T	A	T	C
C269-1	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T	G	C	A	C	C	A	T	A	T	C
C257-7	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T	G	C	A	C	C	A	T	A	T	C
C278-1	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T	G	C	A	C	C	A	T	A	T	C
C257-2	G	T	T	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	A	T	G	C	A	C	C	A	T	A	T	C
C268-2	G	T	T	G	T	T	C	A	C	T	T	A	G	C	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	A	A	G	A	G	G	T	T	G	T	G	C	A	C	T	A	T	A	T	C	

Consenso G T T A G T T C A C T T A G C T A T G A T C C A A A A G A G G T T A T G C A C C A T A T C

	320	330	340	350	360																																										
C271-2	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	G	T	T	G	T	A	T	T	A	G	T	T	A			
C257-10	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	G	T	T	G	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A	
C257-9	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	G	T	T	G	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A	
C269-6	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	G	T	T	G	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A	
C270-3	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	G	T	T	G	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A	
C271-8	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	G	T	T	G	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A	
C269-1	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	A	A	T	T	G	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A
C257-7	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	G	T	T	G	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A	
C278-1	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	G	T	T	G	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A	
C257-2	C	A	C	G	A	G	T	A	C	T	A	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	G	T	T	G	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A	
C268-2	C	A	C	G	A	G	C	A	C	T	A	A	A	A	A	C	T	A	A	G	T	T	C	C	G	C	G	A	T	A	A	G	G	T	T	G	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A	

Consenso C A C G A G T A C T A A A A C T A A G T T C C G C G A T A A G G G T T G T A T T A G T T A

	370	380	390	400																																									
C271-2	C	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	G	T	T	T	T	
C257-10	C	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	G	T	T	T	T	
C257-9	C	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	G	T	T	T	T	
C269-6	C	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	G	T	T	T	T	
C270-3	C	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	G	T	T	T	T	
C271-8	C	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	G	T	T	T	T	
C269-1	C	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	G	T	T	T	T	
C257-7	C	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	G	T	T	T	T	
C278-1	C	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	G	T	T	T	T	
C257-2	T	G	T	A	C	A	A	G	G	A	G	G	T	T	T	A	C	G	A	T	A	C	A	A	G	T	T	A	T	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	G	T	T	T	T	
C268-2	C	G	T	G	C	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	G	T	A	A	G	T	T	A	A	G	T	T	A	A	T	G	G	A	T	A	A	A	G	T	A	G	T	T	T	T

Consenso C G T A C A A G G A G G T T T A C G A T A C A A G T T A T T G G A T A A A G T G G T T T T

	410	420	430	440	450																																							
C271-2	T	C	C	T	T	T	A	T	T	A	T	A	T	C	G	A	A	A	T	T	T	A	C	C	G	A	C	A	G	G	G	A	G	A	C	T	C	C	G	A	A	T	G	C
C257-10	T	C	C	T	T	T	A	T	T	A	T	A	T	C	G	A	A	A	T	T	T	A	C	C	G	A	C	A	G	G	G	A	G	A	C	T	C	C	G	A	A	T	G	C
C257-9	T	C	C	T	T	T	A	T	T	A	T	A	T	C	G	A	A																											

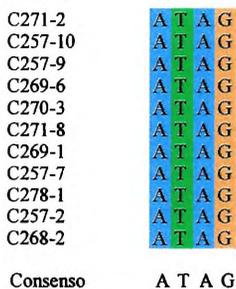
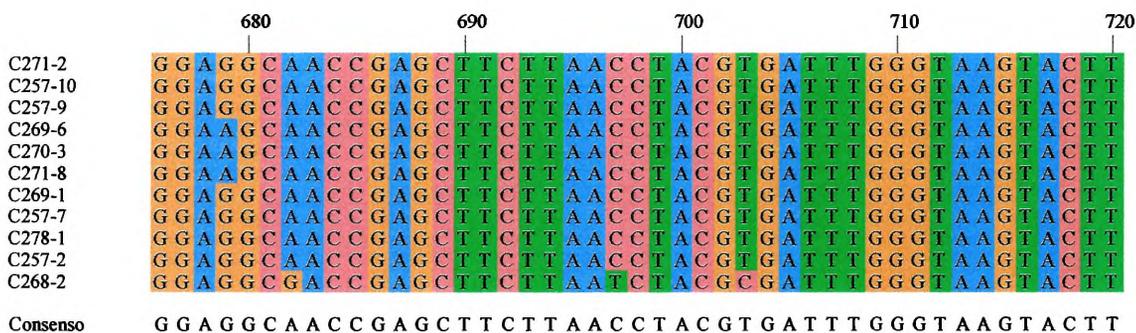


Figura III.D.4: Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas correspondientes a los clones representativos del haplotipo mayoritario del gen p27 en aislamientos argentinos de CTV. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL W.

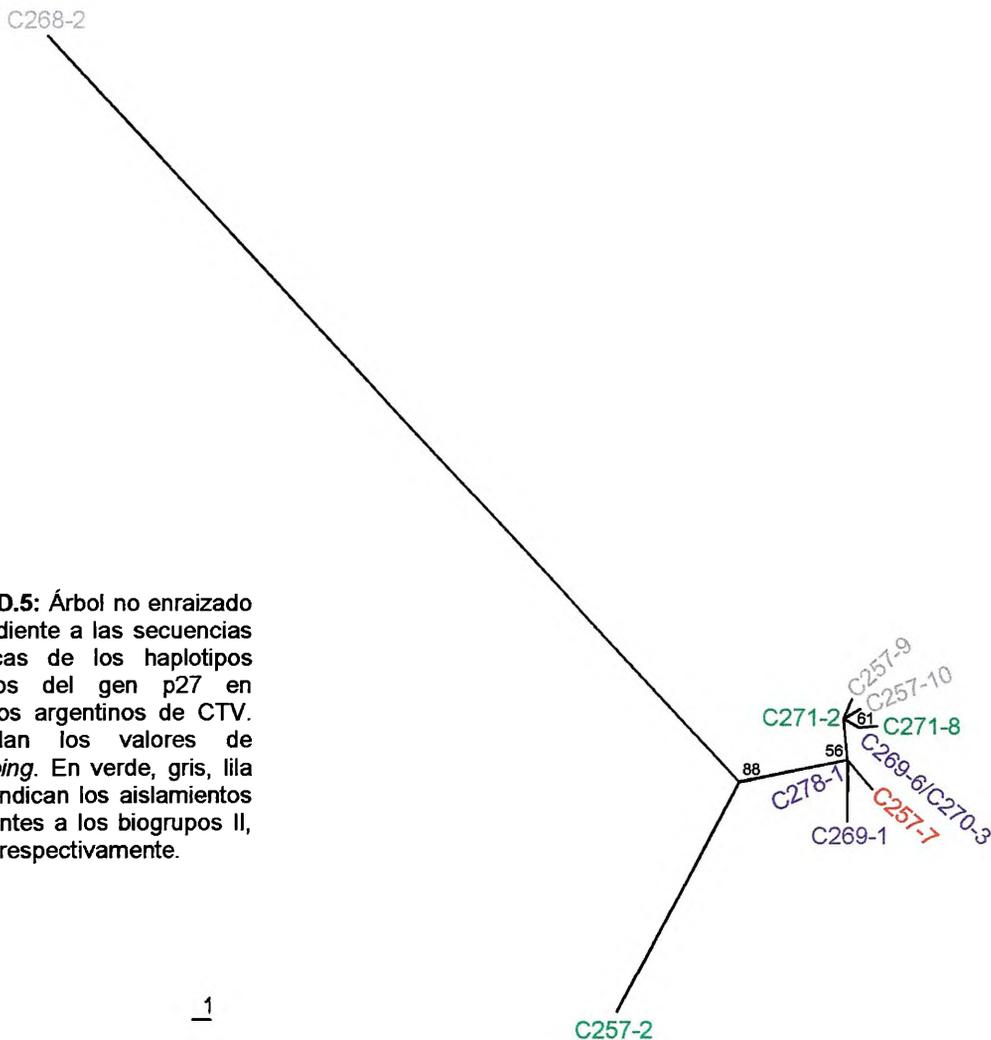


Figura III.D.5: Árbol no enraizado correspondiente a las secuencias nucleotídicas de los haplotipos mayoritarios del gen p27 en aislamientos argentinos de CTV. Se señalan los valores de *bootstrapping*. En verde, gris, lila y rojo se indican los aislamientos pertenecientes a los biogrupos II, III, IV y V, respectivamente.

III.D.2D) ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DEDUCIDAS

Las secuencias nucleotídicas se tradujeron por medio del programa Translate y con las secuencias aminoacídicas obtenidas se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTAL W (fig. III.D.6). Este alineamiento mostró que las secuencias aminoacídicas están muy conservadas y que los pocos cambios presentes se sitúan en la región correspondiente a la mitad N terminal de la proteína P27. Se observó, además, identidad de la secuencia aminoacídica desde el residuo 131 hasta el final de la proteína (aa 240) en todos los aislamientos estudiados. De estos datos se desprende que las cuatro regiones conservadas entre ambas proteínas de cubierta de CTV son idénticas en todos los clones representativos de los haplotipos mayoritarios. En cuanto a los cambios observados, la mayoría corresponden al aislamiento C268-2, con cinco residuos diferentes al consenso. De dichos cambios los que se encuentran en las posiciones 30 (I→V), 86 (K→R) y 130 (L→M) son conservativos, mientras que los que ocurren en las posiciones 10 (T→I) y 125 (L→S) no lo son. En el aislamiento C257-2 se encontraron tres cambios con respecto al consenso, en las posiciones 16 (D→N), 53 (N→D) y 67 (Y→H); estos tres cambios son conservativos. Los restantes cambios se hallaron en los aislamientos C269-1 (posición 116, G→N) y C257-9 (posición 119, S→N) y son conservativos.

III.D.2E) COMPARACIÓN DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS DE LOS HAPLOTIPOS MAYORITARIOS

En la tabla IX se muestran los valores obtenidos al realizar la comparación de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas correspondientes a los clones representativos de los haplotipos mayoritarios de los aislamientos estudiados. En el panel superior de la misma se indican los valores de identidad de secuencia nucleotídica y en el inferior los de similitud e identidad de secuencias aminoacídicas deducidas. Los aislamientos se ordenaron en la tabla de acuerdo al biogrupo al que pertenecen. Del análisis de la tabla se desprende que, en general, existe una elevada identidad entre las secuencias nucleotídicas de los distintos aislamientos estudiados. Los dos aislamientos con mayores diferencias son C268-2 (biogrupo III) y C257-2 (biogrupo II), ambos originarios de plantas de naranjo de Entre Ríos.

No se observó correlación entre biogrupo y secuencia nucleotídica ya que, con la excepción de los aislamientos antes citados, el resto muestra valores de homología que oscilan entre 99 y 100%.

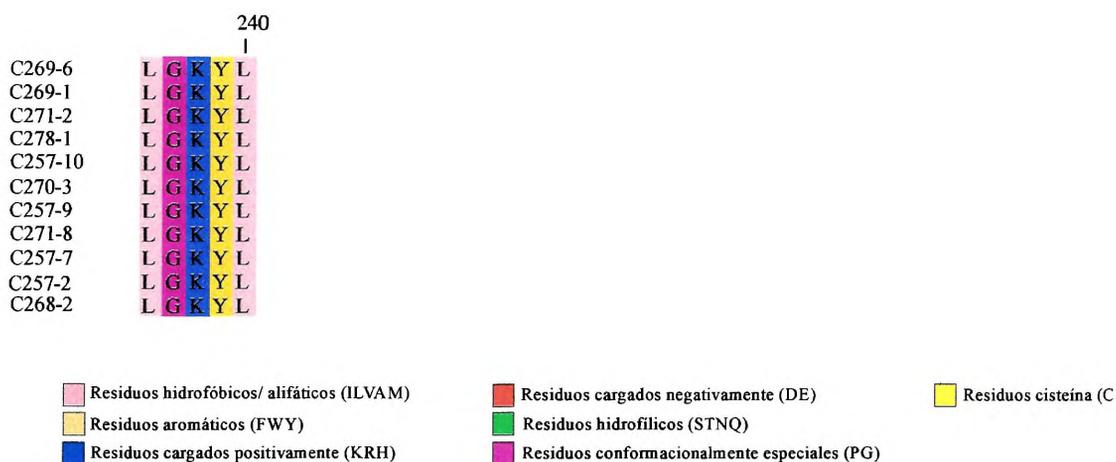


Fig. III.D.6: Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas deducidas de los clones representativos de haplotipos mayoritarios de p27 en aislamientos argentinos de CTV. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL W. En la sección inferior se representa el esquema de colores utilizados (esquema de Zappo).

El análisis de secuencias aminoacídicas deducidas mostró que la mayoría de los cambios nucleotídicos se producen en la tercera base del codón y por ende son mutaciones silenciosas. Cuando se consideraron similitud e identidad de secuencias aminoacídicas deducidas, los aislamientos C268-2 y C257-2 mostraron los valores más distantes con respecto a los demás. En cuanto a similitud los valores son de 98,3 y 99,2%, respectivamente y los de identidad de 96,7 y 98,8%, respectivamente. Estos valores demuestran que, incluso en estos aislamientos, la mayoría de los cambios no afectan a la composición de aminoácidos de la proteína, indicando que debe existir una fuerte presión de selección sobre la misma y, por ende, sobre la secuencia que la codifica. Para los restantes aislamientos se encontraron valores de similitud e identidad superiores al 99,2%.

Siete aislamientos virales resultan iguales si se considera la secuencia aminoacídica de P27. Estos aislamientos son: C271-2 (naranja, biogrupo II, Catamarca), C271-8 (mandarino, II, Catamarca), C257-10 (naranja, III, Corrientes), C269-6 (pomelo, IV, Salta), C270-3, (pomelo, IV, Entre Ríos), C278-1 (pomelo, IV, Tucumán) y C257-7 (pomelo, V, Salta). Las secuencias nucleotídicas de los dos primeros son idénticas.

Tabla IX. Comparación de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de clones representativos de los haplotipos mayoritarios de p27 de aislamientos argentinos de CTV.

	C257-2	C271-2	C271-8	C257-9	C257-10	C268-2	C269-1	C269-6	C270-3	C278-1	C257-7
C257-2		97,8 ^z	97,5	97,6	97,6	91	97,1	97,6	97,6	97,5	97,4
C271-2	99,2 ^y		99,7	99,9	99,9	91,7	99,3	99,9	99,9	99,7	99,6
	98,8										
C271-8	99,2	100		99,6	99,6	91,4	99	99,9	99,9	99,4	99,3
	98,8	100									
C257-9	98,8	99,6	99,2		99,7	91,6	99,2	99,7	99,7	99,6	99,5
	98,3	99,6	99,2								
C257-10	99,2	100	99,6	99,6		91,6	99,2	99,7	99,7	99,6	99,5
	98,7	100	99,6	99,6							
C268-2	98,3	99,2	98,8	98,8	99,2		91,6	91,6	91,6	92	91,9
	96,7	97,9	97,5	97,5	97,9						
C269-1	98,8	99,6	99,2	99,2	99,6	98,6		99,2	99,2	99,6	99,5
	98,3	99,6	99,2	99,2	99,6	97,5					
C269-6	99,2	100	99,6	99,6	100	99,2	99,6		100	99,6	99,5
	98,8	100	99,6	99,6	100	97,9	99,6				
C270-3	99,2	100	99,6	99,6	100	99,2	99,6	100		99,6	99,5
	98,3	100	99,6	99,6	100	97,9	99,6	100			
C278-1	99,2	100	99,6	99,6	100	99,2	99,6	100	100		99,9
	98,8	100	99,6	99,6	100	97,9	99,6	100	100		
C257-7	99,2	100	99,6	99,6	100	99,2	99,6	100	100	100	
	98,8	100	99,6	99,6	100	97,9	99,6	100	100	100	

^zpanel superior: valores de homología de secuencia nucleotídica expresados en porcentaje.

^ypanel inferior: valores de similitud (porción superior) y de identidad (porción inferior) de secuencias aminoacídicas deducidas. Los valores se expresan en porcentaje.

En verde, gris, violeta y rojo aislamientos de los biogrupos II, III, IV y V respectivamente.

En tonalidades crecientes de gris se representan valores crecientes de homología o similitud e identidad.

La figura III.D.6 muestra la elevada conservación de secuencias aminoacídicas existente entre aislamientos, donde los únicos que difieren notoriamente de los demás son C268-2 y C257-2. En las figuras III.D.7 y 8 se representan gráficamente los valores obtenidos en la comparación de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de clones representativos de los haplotipos mayoritarios de los distintos aislamientos analizados. Debido a la conservación de secuencias aminoacídicas, la escala utilizada para representar estos valores es diferente de la usada en el gráfico de secuencias nucleotídicas (96 a 100% comparada con 90 a 100%).

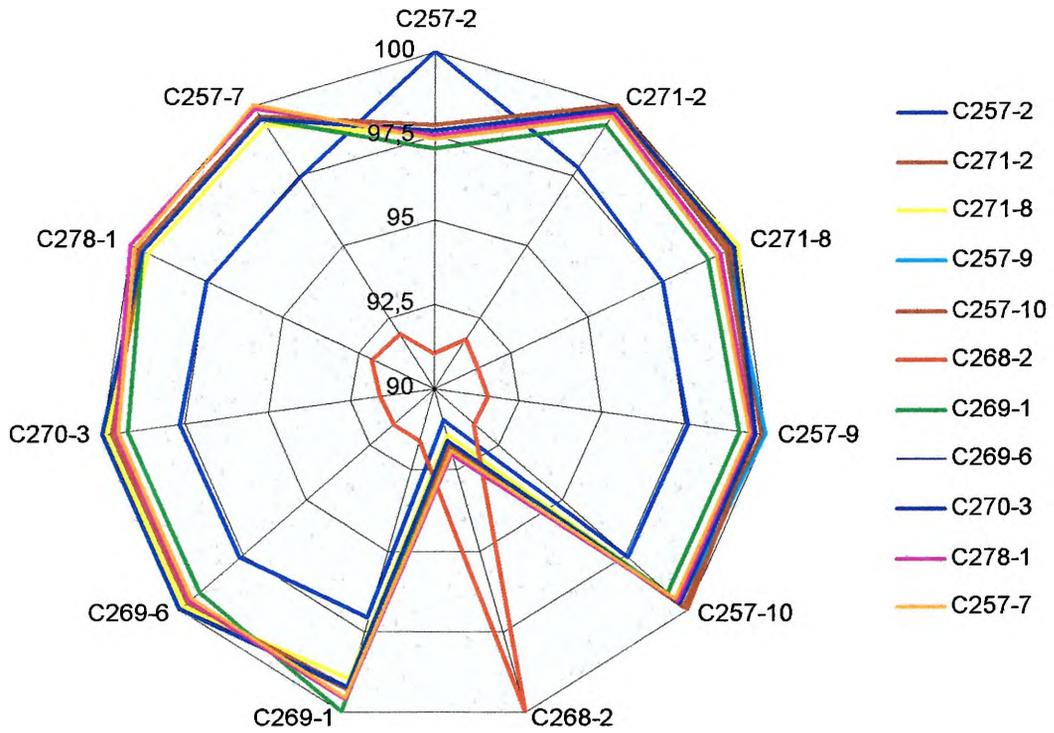


Figura III.D.7: Variabilidad interpoblacional del gen p27 en aislamientos argentinos de CTV. Se representan valores de identidad de secuencias nucleotídicas de los haplotipos mayoritarios, en una escala comprendida entre 90 v 100%.

a

b

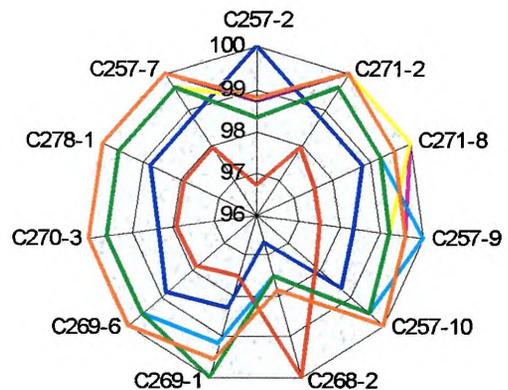
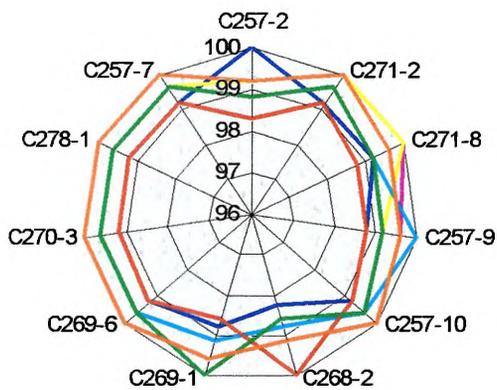


Figura III.D.8: Representación gráfica de variabilidad de secuencias aminoacídicas deducidas de los haplotipos mayoritarios de aislamientos argentinos de CTV. **a:** similitud. **b:** identidad. En azul, C257-2; en rojo, C268-2; en amarillo, C271-8; en verde, C269-1; en violeta, C271-2; en verde claro, C257-9; en naranja, C269-6, C270-3, C278-1, C257-7 y C257-10. Los valores oscilan entre 96 y 100%.

III.D.3) ESTUDIO DE VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL EN AISLAMIENTOS ARGENTINOS DE CTV

III.D.3A) SECUENCIACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS MINORITARIOS

En esta etapa del estudio se secuenciaron todos los clones que mostraron un patrón de SSCP distinto al del haplotipo mayoritario de cada aislamiento. Los clones que presentaron variaciones en ambos fragmentos se secuenciaron por completo y en los demás, se estableció la orientación de inserción para secuenciar sólo la región deseada. Cuando más de un clon presentó igual patrón de migración, se seleccionó uno de ellos para la secuenciación. Para determinar las distintas secuencias se utilizaron los *primers* universales y los específicos de p27, antes citados; todos los cambios se verificaron por el análisis de los cromatogramas obtenidos.

III.D.3B) ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL: COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE HAPLOTIPOS MAYORITARIOS Y MINORITARIOS

La variabilidad intrapoblacional de cada aislamiento se determinó por comparación entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de clones representativos de los haplotipos mayoritario y minoritarios. Se analizó la variación presente en ambos fragmentos, menor y mayor, por separado; el primero corresponde a la región comprendida entre las bases 1 a 265 del gen p27 y el segundo se extiende entre las bases 266 y 724.

Los resultados del análisis de SSCP mostraron distintas situaciones: aislamientos sin variabilidad intrapoblacional, donde todos los clones exhiben el mismo patrón de migración; aislamientos con variabilidad en un solo fragmento del gen y aislamientos con variabilidad en ambos fragmentos del mismo. Desde el punto de vista poblacional, el aislamiento C270-3 es el más homogéneo, ya que en los diez clones analizados se observó el mismo patrón de migración. Como parte del estudio se determinó la secuencia completa de dos de dichos clones, 153 y 154, y se encontró que la identidad nucleotídica entre ambos es del 100%. Este resultado concuerda con el del análisis de SSCP. Los aislamientos C268-2, C271-8 y C271-2 mostraron variación en un único fragmento del gen. En los dos primeros, el fragmento menor mostró variantes diferentes al patrón mayoritario, mientras que en el restante esta situación se detectó en el fragmento mayor. En los restantes aislamientos se encontraron clones que mostraron variación en uno o ambos fragmentos.

Los valores de comparación se representan gráficamente en las figuras III.D.9 y III.D.10. En la primera figura se muestran los valores correspondientes al fragmento menor del gen p27. Los clones se encuentran ordenados de acuerdo al biogrupo de pertenencia del aislamiento correspondiente, en orden creciente de severidad. Dos de los aislamientos del biogrupo II mostraron variación en el fragmento menor, C257-2 y C271-8. Además, en el aislamiento C257-2 cuatro

clones mostraron un patrón distinto al mayoritario para el fragmento menor (clones 7, 17, 19 y 21). Los clones 19 y 21 comparten el mismo patrón entre sí, por lo cual se secuenció sólo uno de ellos y el clon 17 presentó variación en ambos fragmentos del gen. De la observación del gráfico se deduce que, si bien existe variabilidad intrapoblacional se encontraron muy pocos cambios con respecto al clon mayoritario (3 y 5). Por su parte, dos clones del aislamiento C271-8 (202 y 211), mostraron variación en el fragmento menor. Para ambos clones los cambios son pocos, 1 y 4 respectivamente, pero no son silenciosos (fig. III.D.9).

En cuanto a los aislamientos del biogrupo III, C268-2 presentó un único clon diferente (107). Los datos de secuenciación de dicho clon demostraron la presencia de un único cambio nucleotídico en las 265 pb del mismo. La mutación detectada es silenciosa ya que la secuencia aminoacídica deducida tiene un 100% de identidad con la del clon mayoritario (fig. III.D.9). En el aislamiento C257-9 se encontraron tres clones (53, 54 y 57) con migración diferente para el fragmento menor. Los clones 53 y 57 varían en ambos fragmentos y comparten el mismo patrón de SSCP, por ello se estableció la secuencia completa de sólo uno de ellos. A pesar del número relativamente elevado de cambios presentes en el clon 53 (20 en el fragmento menor), la mayor parte de los mismos son silenciosos (fig. III.D.9). En el aislamiento C257-10 se encontró un único clon (85), diferente al mayoritario para el fragmento menor. Este clon presentó sólo dos cambios no silenciosos con respecto a la secuencia del clon mayoritario (fig. III.D.9).

En los aislamientos del biogrupo IV se encontraron varios clones que mostraron variación en el fragmento menor. El aislamiento C269-6 presentó tres clones diferentes al mayoritario en el fragmento menor, 127, 141 y 143. Los dos últimos son iguales entre sí y difieren también en el fragmento mayor respecto del mayoritario. Como los clones 141 y 143 presentaron el mismo patrón para ambos fragmentos, se estableció la secuencia completa de uno de ellos (141). Las diferencias de secuencia nucleotídica con el clon mayoritario son de un 11,4% en el fragmento menor, pero la mayoría de estas mutaciones son silenciosas

(fig. III.D.9). Por otro lado, el clon 127 presentó cinco mutaciones silenciosas para el mismo fragmento. Dos de los clones del aislamiento C278-1 mostraron diferencias con respecto al patrón mayoritario en el fragmento menor. A su vez, ambos (238 y 242) presentan igual patrón para el fragmento menor pero difieren en el mayor. La secuencia del clon 238 mostró 21 cambios con respecto a la del clon mayoritario en el fragmento menor. Como se desprende de la observación de la figura III.D.9, la mayoría de estos cambios son silenciosos y, como consecuencia de ello, los valores de similitud e identidad son superiores a los de homología nucleotídica. El aislamiento C269-1 presentó la mayor variabilidad intrapoblacional con respecto al número de patrones de

SSCP diferentes al mayoritario. Tres clones, 251, 256 y 263, presentaron variación en ambos fragmentos mientras que otros dos, 258 y 259, mostraron variación únicamente en el fragmento mayor del gen. Para el fragmento menor el número de cambios oscila entre dos (clon 251) y tres (clones 256 y 263) y, con la excepción de las del clon 256, no son silenciosos (fig. III.D.9).

En el caso del aislamiento C257-7, representante del biogrupo V, para el fragmento menor del gen p27 se observaron dos patrones diferentes, cada uno de los cuales incluyó a cinco clones. De acuerdo al patrón de ambos fragmentos se estableció que los clones 27, 32, 36, 42 y 45 constituyen el haplotipo minoritario de este aislamiento. Para realizar la secuenciación se seleccionó al clon 36, como representativo de dicho patrón. Este clon presentó dos cambios con respecto a la secuencia del clon mayoritario, ambos silenciosos.

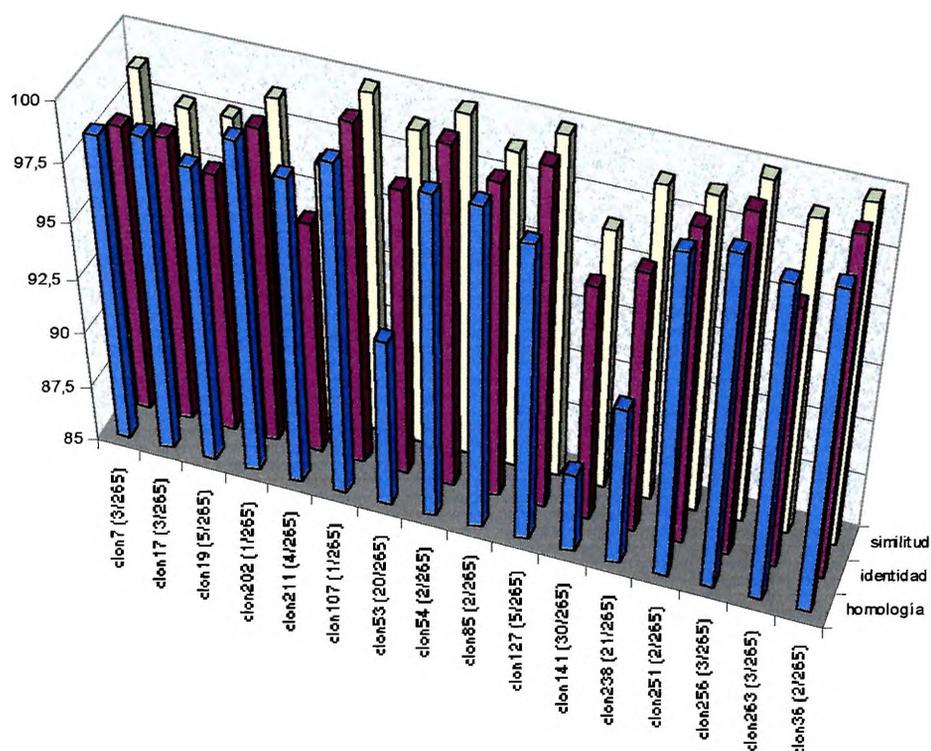


Figura III.D.9: Variabilidad intrapoblacional del fragmento menor del gen p27 en aislamientos argentinos de CTV. En el eje Y se grafican valores de porcentaje de 85 a 100. Las columnas en celeste indican identidad de secuencia nucleotídica mientras que las de color amarillo y bordó representan valores de similitud e identidad de secuencias aminoacídicas deducidas, respectivamente. Clones representativos de los haplotipos minoritarios de los distintos biogrupos: biogrupo II: 7, 17 y 19 (C257-2), 202 y 211 (C271-8); biogrupo III: 107 (C268-2), 53 y 54 (C257-9), 85 (C257-10); biogrupo IV: 127 y 141 (C269-6), 238 (C278-1), 251, 256 y 263, (C269-1) y biogrupo V: 36 (C257-7). Entre paréntesis se indica el número de cambios de secuencia nucleotídica con respecto al haplotipo mayoritario.

El mismo análisis se realizó con las variantes minoritarias del fragmento mayor presentes en los distintos aislamientos estudiados (fig. III.D.10). En cuanto a los aislamientos del biogrupo II, tanto C257-2 como C271-2 presentaron dos

clones con migración diferente para el fragmento mayor. Los clones 8 y 17 (C257-2) mostraron uno y cinco cambios, respectivamente, cuando se los compara con la secuencia del clon mayoritario. En el primer caso el cambio es silencioso pero en el segundo se producen cambios a nivel aminoacídico. Con los clones del aislamiento C271-2 ocurre algo similar, si bien los dos presentan un único cambio de secuencia nucleotídica; en el caso del clon 184 la mutación es silenciosa mientras que en el clon 185 el cambio se refleja en la secuencia aminoacídica (fig. III.D.10).

Si se consideran los aislamientos del biogrupo III se observa, en primer lugar, que ningún clon del aislamiento C268-2 presentó variación en el fragmento mayor, mientras que se encontraron patrones diferentes al mayoritario en los dos aislamientos restantes, C257-9 y C257-10. En cinco clones del aislamiento C257-9 (51, 52, 53, 55 y 57) el fragmento mayor mostró un patrón de migración diferente. Los clones 53 y 57 presentaron igual patrón de migración, con variación en ambos fragmentos. Se estableció la secuencia completa del primero de ellos y se encontró que presentaba un número elevado de cambios en ambos fragmentos. De las 58 sustituciones observadas, 38 corresponden al fragmento mayor. El clon 55 exhibió 20 mutaciones, todas en el fragmento mayor. Nuevamente se observó que la mayoría de ellas son silenciosas, ya que los valores de similitud e identidad de las secuencias aminoacídicas deducidas son superiores a los de identidad nucleotídica (fig. III.D.10). Los clones 51 y 52 muestran el mismo patrón de SSCP y difieren sólo en el fragmento mayor. Se estableció la secuencia de dicho fragmento en el primero de ellos y se encontraron solamente 3 cambios con respecto al mayoritario, que se reflejan en cambios a nivel aminoacídico. Dos clones del aislamiento C257-10, 86 y 87, mostraron un patrón de migración diferente al del haplotipo mayoritario. Estos clones presentaron 4 y 2 cambios de secuencia nucleotídica, respectivamente. En el primer caso las mutaciones son silenciosas mientras que en el segundo no lo son (fig. III.D.10).

Con excepción de C270-3, todos los aislamientos del biogrupo IV presentaron variación intrapoblacional en el fragmento mayor del gen p27. El clon 141 del aislamiento C269-6 mostró un elevado número de cambios, alcanzando un 9,8% de diferencia cuando se comparó su secuencia con la del clon representativo del haplotipo mayoritario. La mayor parte de estas mutaciones son silenciosas (fig. III.D.10). El aislamiento C278-1 presentó cuatro clones con patrón diferente en el fragmento mayor. Dos de ellos, 238 y 242, comparten además el patrón de migración del fragmento menor. Los clones 228 y 237 presentaron solamente dos cambios con respecto a la secuencia del clon mayoritario; en 237 las mutaciones son silenciosas pero en 238 no (fig. III.C.10). Por otro lado, los clones 238 y 242 mostraron 27 y 28 cambios respectivamente con respecto del clon mayoritario. La mayoría de los mismos son silenciosos y los valores de similitud e identidad superan a los de identidad

nucleotídica. (fig. III.D.10). El aislamiento C269-1 presentó cinco clones con variación en el fragmento menor (251, 256, 258, 259 y 263); tres de ellos (251, 256 y 263) también difieren del mayoritario en la migración del fragmento menor. Los cambios en los clones oscilan entre 2 y 4 nt, aunque con la excepción del clon 263, se trata de mutaciones no silenciosas (fig. III.D.10).

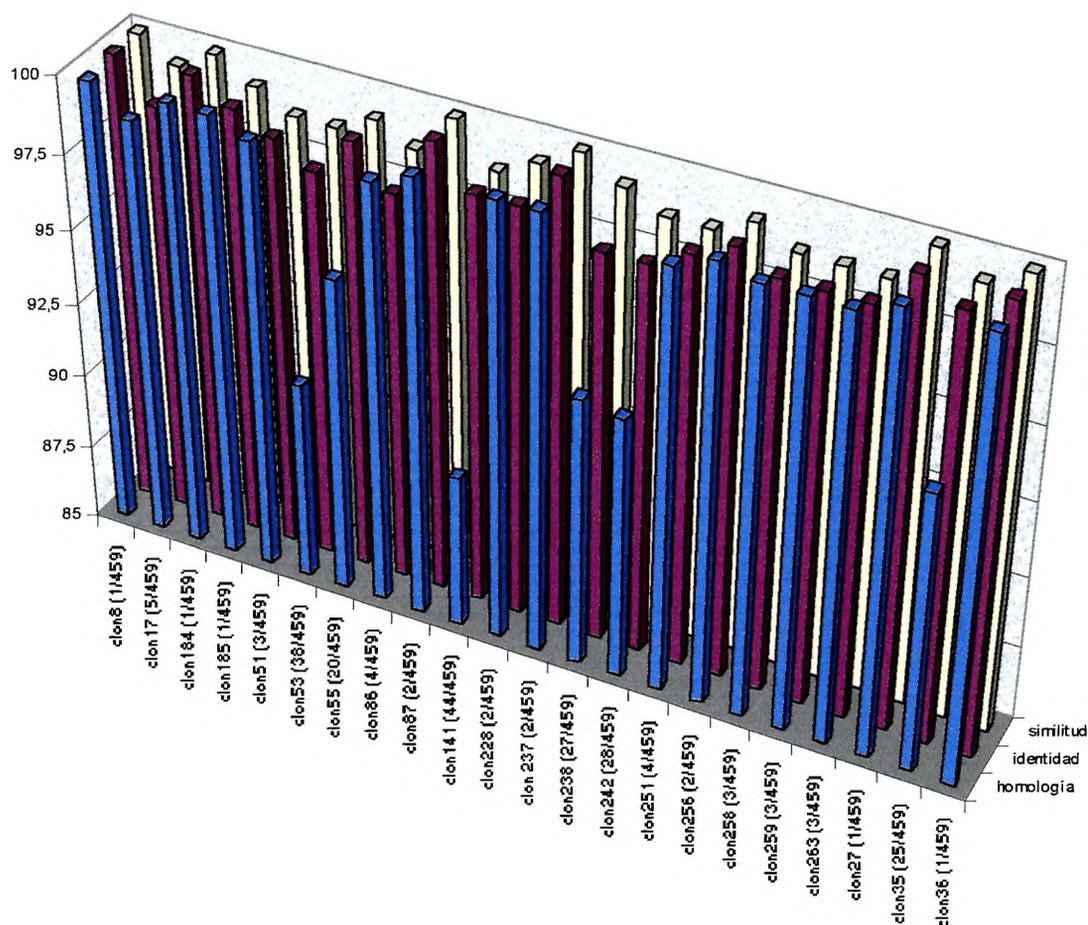


Figura III.D.10: Variabilidad intrapoblacional del fragmento mayor del gen p27. En el eje Y se grafican valores de porcentaje de 85 a 100. Las columnas en celeste indican identidad de secuencia nucleotídica mientras que las de color amarillo y bordó representan valores de similitud e identidad de secuencias aminoacídicas deducidas, respectivamente. Clones representativos de los haplotipos minoritarios de los distintos biogrupos: biogrupo II: 8 y 17 (C257-2), 184 y 185, (C271-2); biogrupo III: 51, 53 y 55 (C257-9); 86 y 87 (C257-10); biogrupo IV: 141 (C269-6); 228, 237, 238 y 242 (C278-1), 251, 256, 258 y 263 (C269-1) y biogrupo V: 27, 35 y 36 (C257-7). Entre paréntesis se indica el número de cambios de secuencia nucleotídica con respecto al haplotipo mayoritario.

En el aislamiento C257-7 (V) se encontraron diferencias en los patrones de migración del fragmento mayor en los clones 27, 35 y 36. El clon 35 mostró un elevado número de cambios en dicho fragmento; por otro lado, no exhibió diferencias con respecto al haplotipo mayoritario para el fragmento menor. Por esta razón se decidió secuenciarlo por completo. La comparación de su secuencia con la del clon mayoritario evidenció que el primer cambio ocurre en la posición 421 del gen p27. Posiblemente este clon se haya generado por

recombinación entre un RNA representativo de la secuencia mayoritaria y otro muy diferente a ella. También es sorprendente que la mayoría de las mutaciones sean silenciosas (valores de similitud e identidad de 99,3%). Los clones 27 y 36 mostraron variación en ambos fragmentos del gen y presentaron, en el fragmento mayor, una única mutación silenciosa (fig. III.C.10).

III.D.4A) ALINEAMIENTOS MÚLTIPLES DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

Para comparar la variabilidad conjunta del gen p27 en los aislamientos estudiados se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas en la presente sección. La comparación se llevó a cabo para ambos fragmentos por separado, utilizando los programas PileUp y Pretty (GCG). Los alineamientos resultantes se muestran en las figuras C.2A y B del Apéndice.

Del análisis de los alineamientos se desprende que la mayoría de los clones, representativos de los haplotipos mayoritarios y minoritarios, comparten una misma secuencia tipo con ligeras variaciones. En un bloque distinto se agruparon las secuencias del aislamiento C268-2 (clones 101 y 107) y algunos clones minoritarios de los aislamientos C257-9 (clon 53) y C278-1 (clones 238 y 242). El aislamiento C268-2 es muy homogéneo pero su secuencia difiere marcadamente de las de los demás aislamientos. La secuencia del haplotipo mayoritario se encuentra también, aunque como haplotipo minoritario, en los aislamientos

C257-9 (naranja de Corrientes, biogrupo III) y C278-1 (pomelo de Tucumán, biogrupo IV). La presencia de esta variante de secuencia en los aislamientos descriptos parece ser más "lógica" en C257-9, ya que no sólo pertenece al mismo biogrupo que C268-2 (III) sino que también se obtuvo a partir de un hospedante de la misma especie que se encontró en una región geográfica cercana (Corrientes). En cambio resulta más difícil explicar la aparición de esta secuencia poco frecuente en un aislamiento de pomelo, originario de Tucumán.

III.D.4B) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

Para establecer las relaciones entre los haplotipos mayoritarios y minoritarios de los aislamientos argentinos analizados, se realizaron árboles filogenéticos utilizando el programa PAUP*. Se empleó el método de *neighbor-joining* (NJ) y también los criterios de parsimonia (P) y *maximum likelihood* (ML), de acuerdo a lo descripto anteriormente.

Se establecieron las relaciones entre aislamientos analizados para ambos fragmentos por separado, utilizando como archivos de entrada los alineamientos múltiples de las figuras C.2A y B. Para el fragmento menor se obtuvo, bajo ML, un único árbol con un score de 746,48, idéntico a uno de los ocho árboles generados bajo el criterio de parsimonia. En la figura III.D.11 se muestra dicho árbol, donde se indican los valores de *bootstrapping* y los

aislamientos analizados. Se distinguen cuatro grupos bien definidos. En uno de ellos se incluyen los haplotipos mayoritario y minoritario de C268-2 y los minoritarios de los aislamientos C257-9 y C278-1. El segundo grupo está constituido por uno de los haplotipos minoritarios de C269-6 mientras que el tercero está formado por el haplotipo mayoritario y la totalidad de los minoritarios del aislamiento C257-2. En el cuarto grupo se ubican los haplotipos mayoritarios y minoritarios de los restantes aislamientos.

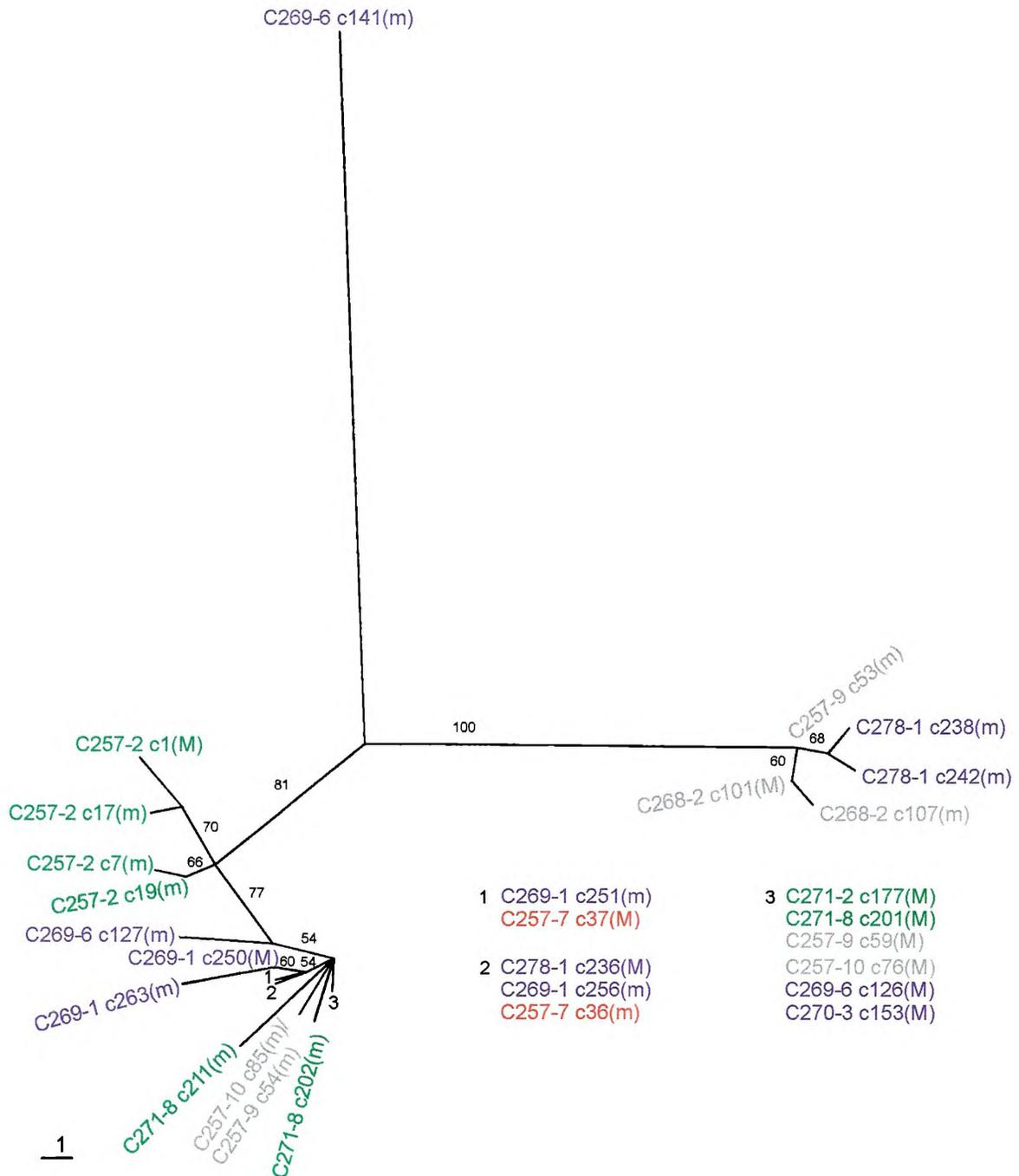


Figura III.D.11: Árbol no enraizado obtenido con las secuencias correspondiente al fragmento menor del gen p27 en aislamientos argentinos de CTV. Se señalan los valores de bootstrapping. En verde, gris, lila y rojo se indican los biogrupos II, III, IV y V, respectivamente. Los haplotipos mayoritarios y minoritarios se indican con M y m, respectivamente.

El análisis de las secuencias nucleotídicas del fragmento mayor del gen p27 permitió obtener un único árbol bajo el criterio de ML, con un score de 1296,60 y sesenta y cuatro árboles bajo el criterio de P. La totalidad de los árboles obtenidos bajo P se utilizaron para generar un árbol consenso, que se muestra en la figura III.D.12. Como se indicó anteriormente, en estos árboles se puede visualizar la posición de las distintas ramas pero no la distancia existente entre ellas.

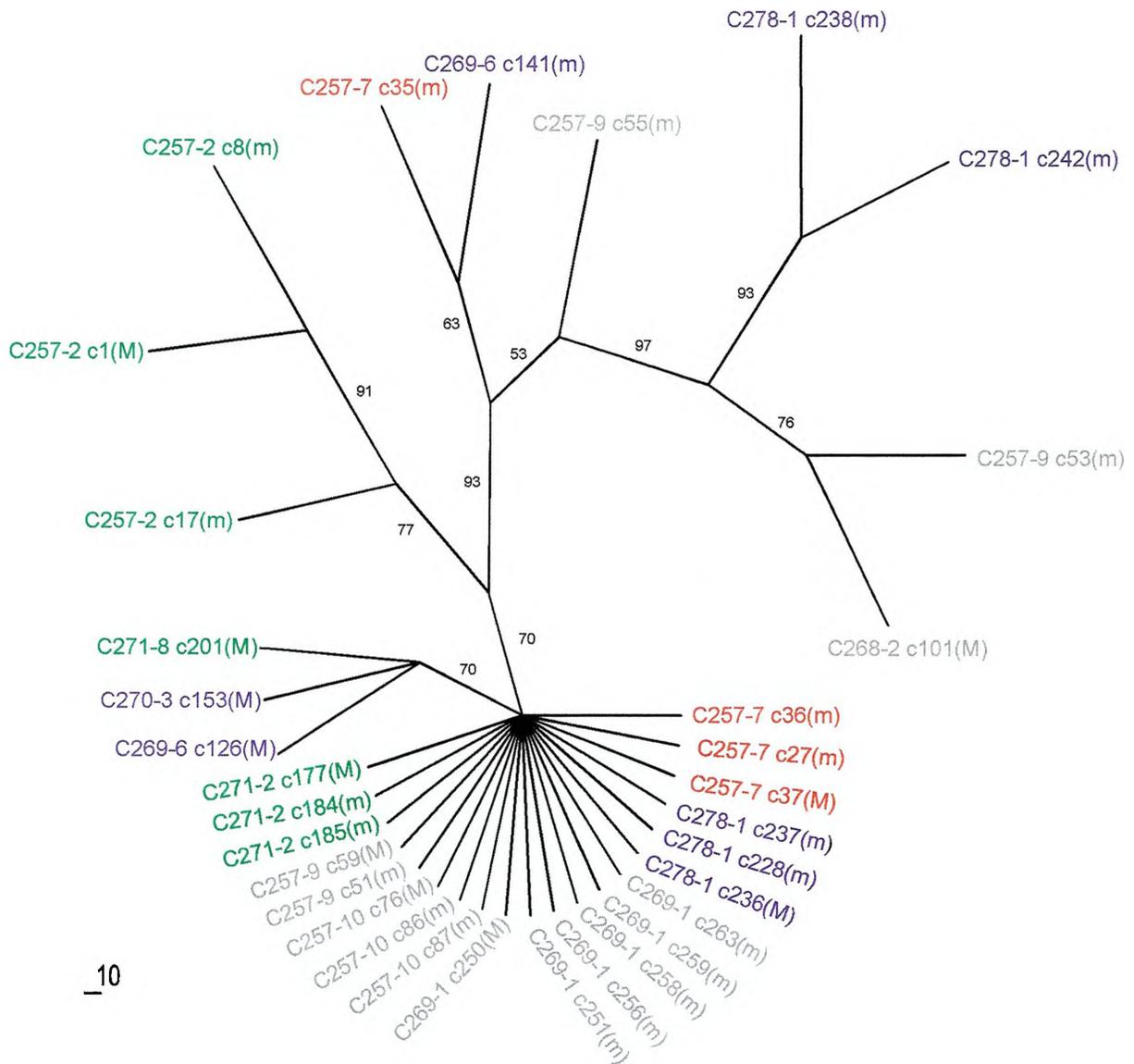


Figura III.D.12: Árbol no enraizado correspondiente a las secuencias del fragmento mayor del gen p27 en aislamientos argentinos de CTV. La figura corresponde a un árbol consenso. Se indican los valores de *bootstrapping* de las distintas ramas. En verde, gris, lila y rojo se señalan los aislamientos de los biogrupos II, III, IV y V, respectivamente.

El orden en el que se agruparon los distintos clones es semejante al obtenido con el fragmento menor. La mayoría de ellos forma un grupo que incluye a los aislamientos C278-1, C269-1, C257-7, C271-2, C257-9 y C257-10. Por otro lado se encuentran agrupadas las secuencias de los haplotipos mayoritarios de los aislamientos C269-6, C270-3 y C271-8. Otro grupo está formado exclusivamente por los haplotipos mayoritario y minoritario del aislamiento C257-2. Un tercer grupo incluye los haplotipos minoritarios de los aislamientos C269-6 y C257-7. El clon 55 del aislamiento C257-9 se encuentra en un cuarto grupo. Los grupos restantes contienen haplotipos minoritarios del aislamiento C278-1 por un lado y el haplotipo mayoritario de C268-2 y el minoritario de C257-9 por otro.

Es destacable que en varios aislamientos argentinos los haplotipos minoritarios difieren notoriamente de los mayoritarios. Así en C257-7, C257-9, C269-6 y C278-1 algunos o todos los haplotipos minoritarios se encuentran en un grupo diferente al del haplotipo mayoritario. Por el contrario, en los aislamientos C257-2, C269-1, C271-2, C268-2 tanto el haplotipo mayoritario como el o los minoritarios forman parte de un mismo grupo. El aislamiento C257-2 forma un grupo separado que incluye a todos sus haplotipos y no incluye a ningún clon de otro aislamiento.

III.D.6) VALIDACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS: ENSAYO DE PROTECCIÓN A RNASAS (*RNASE PROTECTION ASSAY*).

Una crítica al análisis de variabilidad poblacional por SSCP, es que los *primers* elegidos para la PCR permitan la amplificación selectiva de variantes poblacionales. Como consecuencia de esta selección, las secuencias observadas pueden no ser, necesariamente, representativas del aislamiento. Para evitar este problema, en el diseño de los *primers* se consideraron todas las secuencias disponibles en ese momento (T36, VT y las secuencias de los clones del aislamiento C268-2). Además, a medida que se publicaron secuencias de otros aislamientos virales se compararon con ellas. En todos los casos los *primers* utilizados son potencialmente capaces de amplificar un único producto del tamaño esperado. Experimentalmente se verificó lo previsto y se amplificó el gen p27 en todos los aislamientos estudiados, indicando la funcionalidad y especificidad de los *primers* sobre los distintos moldes empleados.

A pesar de ello y para verificar la ausencia de selección en el proceso de amplificación, se realizó un ensayo de protección a RNAsas. Este tipo de experimento permite confirmar que las proporciones de distintas secuencias obtenidas para un aislamiento se encuentran en la misma relación en la población viral.

Para el ensayo se utilizó el aislamiento C269-6, ya que en el mismo se identificaron las secuencias más disímiles entre sí. Los clones 128 y 141

representan a los patrones mayoritario (siete clones) y minoritario (dos clones), respectivamente, y presentan un 89,6% de homología nucleotídica entre sí. El clon restante presentó una única diferencia con respecto a la secuencia del clon 128, por lo que se puede considerar que los clones utilizados en el ensayo representan al 80 y 20% de la población viral respectivamente. Los transcritos generados *in vitro*, correspondientes a la secuencia de los clones citados, serán "protegidos" de manera diferente por el dsRNA viral frente a la digestión con RNasas, siempre que no se esté seleccionando un componente determinado de la población viral. En principio se espera que el transcripto correspondiente al clon 128 (secuencia mayoritaria) sea protegido en mayor proporción que el transcripto correspondiente al clon 141 (secuencia minoritaria).

Los resultados del ensayo se muestran en la figura III.D.14, donde se observan las autorradiografías obtenidas luego de distintos tiempos de exposición del gel. Con tiempos cortos de exposición (fig. III.D.14a) se observa que el transcripto mayoritario es protegido por el dsRNA viral (calles 8 y 9) mientras que el transcripto correspondiente a la secuencia del haplotipo minoritario no lo es (calles 15 y 16). Con períodos de exposición mayores, (fig. III.D.14b), se observó protección de productos de tamaño parcial en las calles correspondientes al transcripto minoritario (calles 15 y 16) y se encontró que parte del transcripto mayoritario es protegido parcialmente (calles 15 y 16). Estos resultados indican que la secuencia mayoritaria es predominante en el aislamiento estudiado aunque existen otras variantes poblacionales. Esto se deduce de la protección menos efectiva del transcripto minoritario y también de la digestión de parte del transcripto mayoritario. Por otro lado, los controles sin RNasas indican que ni en los transcritos marcados (calles 2 y 10 para 128 y 141, respectivamente), ni en el complementario frío (calles 4 y 12 para 128 y 141, respectivamente), ni en el dsRNA (calles 7 y 14 para 128 y 141, respectivamente) existe actividad de RNasa inespecífica que pueda afectar los resultados del experimento. El transcripto complementario frío protegió adecuadamente a la secuencia homóloga 141 (calle 13) mientras que en la secuencia no homóloga, 128, se obtuvo el patrón de digestión esperado (calles 5 y 6). Estos resultados, conjuntamente con los de las reacciones de los transcritos sin protección (calles 3 y 11), indican que las RNasas funcionan efectivamente. La diferencia de tamaño entre los transcritos sin tratamiento y los protegidos corresponde a la secuencia de 61 b del vector, que se extiende desde el sitio de inicio de transcripción hasta el sitio de clonado (calles 8, 9 y 13).

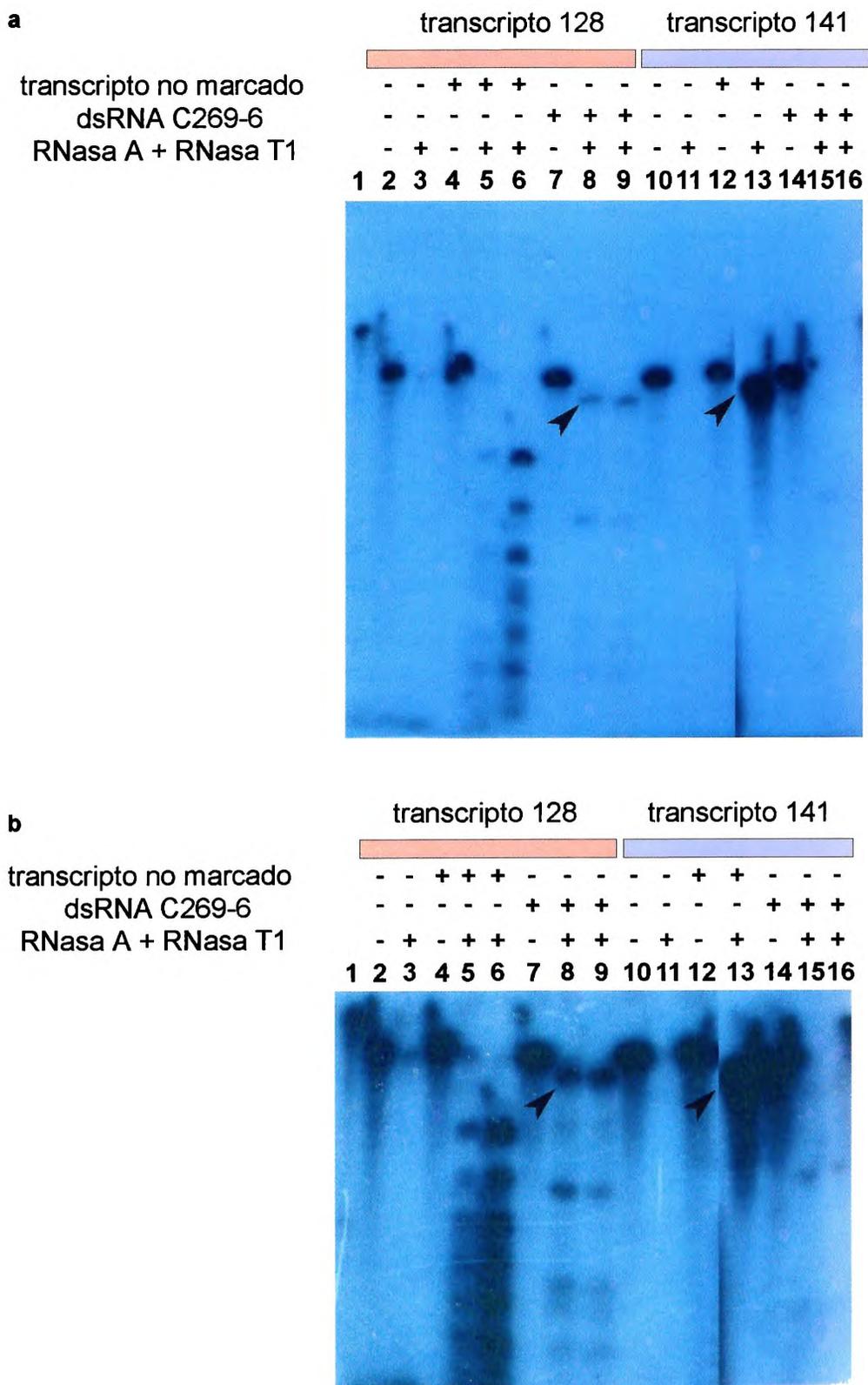


Figura III.D.14: Ensayo de protección a RNasas. La electroforesis de los productos se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 4%-TBE 1x-urea 7M, en las condiciones descritas. **a:** figura correspondiente a una autorradiografía con 5 días de exposición. **b:** reexposición de 26 días. Las puntas de flechas señalan la posición del transcripto sin secuencias del vector. Calle 1: marcador de PM, transcripto de 520 bases.

Este resultado experimental, confirmado en tres ensayos más, apoya la hipótesis de no selección con los *primers* utilizados en el estudio de SSCP. Indica que las proporciones relativas de los componentes de la población viral, evidenciados por el análisis de SSCP, se corresponden con la situación real en el aislamiento viral.

El transcrito correspondiente al clon 128 se utilizó en ensayos de protección con dsRNA de distintos aislamientos virales argentinos. La finalidad de este ensayo fue evaluar la dispersión de esta secuencia, mayoritaria en el aislamiento C269-6, en los restantes aislamientos. El ensayo se realizó con dsRNA de los aislamientos C257-2, C268-2, C269-6, C270-3 y C271-2. De acuerdo a los datos del análisis de SSCP y a los clones secuenciados en dichos aislamientos, se espera protección del transcrito 128 con los tres últimos y protección parcial, en cuanto al número de moléculas protegidas, en los dos primeros, debido a que las secuencias de los clones mayoritarios de estos aislamientos difieren de la del clon 128. Los resultados del ensayo se observan en la figura III.D.15a y b, donde se muestran las autorradiografías correspondientes a distintos tiempos de exposición del gel.

En las calles 6, 8 y 10, correspondientes a los aislamientos C269-6, C270-3 y C271-2, respectivamente, se observa la presencia de una única banda protegida, que tiene el tamaño esperado del transcrito sin la secuencia del vector. Incluso con tiempos de exposición prolongados (figura III.D.15b) se observa esa única banda protegida. Este resultado indica que la secuencia correspondiente al clon 128 es predominante en dichos aislamientos, lo cual coincide con los resultados del análisis de SSCP. Cuando se utilizaron los aislamientos C257-2 y C268-2 en la protección, incluso con tiempos de exposición cortos, se observan bandas adicionales de menor tamaño (calles 2 y 4, respectivamente), que indican que el transcrito no fue protegido íntegramente. Estos productos de digestión se observan con mayor intensidad con tiempos de exposición mayores (fig. III.D.15b). Los resultados indican que la secuencia del clon 128 está presente en ambos aislamientos virales, aunque no es mayoritaria en los mismos y debido a ello una parte del transcrito es digerida. Confirman, además, que las proporciones relativas de los componentes de la población viral, evidenciados por el análisis de SSCP, se corresponden con la situación real en los aislamientos virales analizados.

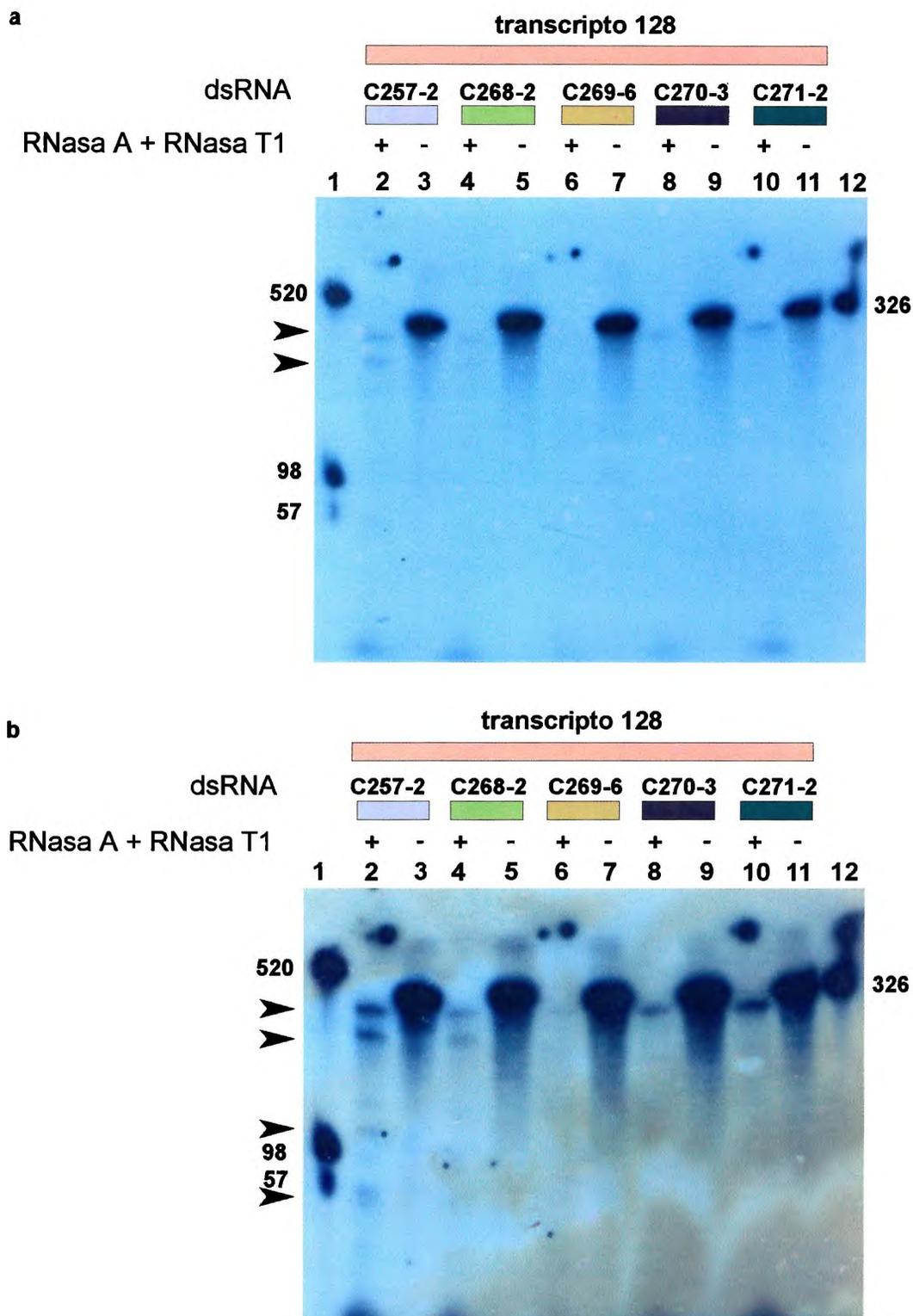


Figura III.D.15: Ensayo de protección a RNasas con aislamientos argentinos de CTV. La electroforesis se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 4%-TBE 1x-7M urea, en las condiciones antes descritas. En todos los casos se utilizó el transcripto 128 (mayoritario del aislamiento C269-6) y dsRNA correspondiente a los distintos aislamientos virales indicados. Se señalan los tamaños, en bases, de los transcritos utilizados como marcadores de PM. Las puntas de flechas señalan la posición del transcripto protegido y de los distintos fragmentos de digestión generados. **a:** autorradiografía correspondiente a 36 hs de exposición. **b:** autorradiografía correspondiente a 4 días de exposición.

CAPÍTULO III

SECCIÓN E: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS AL REALIZAR EL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD DEL GEN P27 EN AISLAMIENTOS DE CTV

Como se describió en secciones precedentes, el gen p27 de CTV codifica para la proteína de cubierta minoritaria del virión, que se encuentra en uno de los extremos de la partícula viral. Teniendo en cuenta, por un lado, el rol que cumple la proteína en la transmisión del virus por insectos vectores y por otro, los diferentes grados de patogenicidad de los aislamientos de CTV, resultó de interés analizar las distintas variantes de secuencia de p27 presentes en diferentes aislamientos virales.

III.E.1) VARIABILIDAD POBLACIONAL DE AISLAMIENTOS DE CTV

Una de las técnicas más sensibles para la detección de polimorfismos de secuencias nucleotídicas es el análisis de SSCP y por ello se lo utilizó en la primera etapa del estudio de variabilidad del gen p27. En la mayoría de los aislamientos estudiados, el análisis de SSCP mostró un patrón de migración que era compartido por la mayor parte de los clones, indicando la existencia de un haplotipo mayoritario. De acuerdo a una publicación reciente, el haplotipo predominante en un aislamiento sería el determinante primario de los síntomas causada por el mismo en plantas infectadas, mientras que la contribución de los genotipos minoritarios sería prácticamente nula (Satyanarayana *et al.*, 2001).

El análisis de SSCP de los distintos clones estudiados permitió la identificación rápida y confiable de los distintos haplotipos virales presentes en cada aislamiento. La comparación de los patrones de migración de los haplotipos mayoritarios, identificados en este análisis, con los productos de digestión de las amplificaciones iniciales demostró que los primeros son representativos del componente mayoritario presente en la población viral analizada. Este resultado indica que, en las condiciones del presente estudio no se realizó un clonado selectivo de determinadas variantes poblacionales. La secuenciación de clones o productos iniciales de PCR, correspondientes a aislamientos de secuencia conocida mostró resultados semejantes o idénticos a los depositados en el *GeneBank*. De esto último se infiere que los *primers* utilizados en este trabajo, diseñados sobre regiones conservadas del gen, son aptos para amplificar el mismo a partir de distintos aislamientos. La identificación de haplotipos diferentes dentro de cada aislamiento indica que se amplificaron las distintas variantes de secuencia presentes en los mismos. De igual manera, los resultados de los ensayos de protección a RNasas permitieron afirmar que no ocurrió amplificación selectiva de determinados haplotipos en las etapas de transcripción reversa y PCR. El haplotipo mayoritario del aislamiento elegido para el ensayo fue protegido eficazmente

por el dsRNA viral, mientras que el haplotipo minoritario sólo lo fue parcialmente. De este hecho se desprende que los resultados del análisis de SSCP reflejan la distribución real de haplotipos en la población viral.

La secuenciación de clones representativos de los haplotipos mayoritarios y minoritarios de los distintos aislamientos virales, permitió concluir que los mismos están constituidos por más de una secuencia y que, en todos ellos, existe una secuencia predominante (*master*). Estos resultados son consistentes con la idea de que los virus existen en la naturaleza como poblaciones formadas por *quasiespecies*. El concepto de *quasiespecie* se utiliza para describir una población de virus que tiene un origen común pero que presenta diferencias en sus secuencias como consecuencia de mutaciones, de fenómenos de deriva génica y de la presión de selección (Smith *et al.*, 1997). De manera análoga se las puede definir como distribuciones dinámicas de replicones relacionados pero no idénticos, generados principalmente por los errores cometidos por las RNA polimerasas RNA dependientes durante la replicación del genoma viral (Domingo *and* Holland, 1997).

El análisis de variabilidad intrapoblacional de los aislamientos descritos en la sección C demostró que en los aislamientos multiplicados en condiciones óptimas o estables y sin vectores en el ambiente, los haplotipos minoritarios presentan muy pocos cambios con respecto a la secuencia *master*. Este resultado coincide con el modelo que sugiere que, en un ambiente sin cambios, la secuencia con mayor valor adaptativo (*fitness*) ocupa el pico adaptativo y las demás secuencias se disponen en las laderas de ese pico. En organismos complejos el *fitness* se utiliza como una medida para describir la adaptabilidad al ambiente en que se encuentra. Para las poblaciones virales se define como la capacidad de producir una progenie estable e infectiva en un ambiente dado (Domingo *and* Holland, 1997). En la mayor parte de los aislamientos de campo (C269-2, C268-2, Capaño Bonito, Baraño B y Pera GS, de la sección C y aislamientos argentinos de la sección D) la situación es distinta. Estos aislamientos no solamente están expuestos a las variaciones ambientales sino que las plantas hospedadoras están a merced de sucesivas reinfecciones con distintos aislamientos virales debido a la acción de los áfidos vectores. Estas condiciones se reflejan en la composición de los aislamientos donde además de la secuencia que ocupa el pico adaptativo más alto, rodeada de su cohorte de variantes minoritarias, suelen encontrarse una o más secuencias adicionales que pueden ocupar otros picos adaptativos menores, alrededor de las cuales también puede existir una nube de variantes. Es interesante señalar que dentro de estos últimos aislamientos existen variantes minoritarias que difieren de la secuencia *master* en más del 10%.

III.E.2) CORRELACIÓN ENTRE SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS AISLAMIENTOS

En trabajos previos varios autores describieron la existencia de correlación entre secuencias nucleotídicas de genes de CTV y las características biológicas de los aislamientos analizados. El primer gen estudiado en detalle para determinar la existencia de tal relación fue p25, el gen que codifica para la proteína de cubierta mayoritaria del virus (Pappu *et al.*, 1993). Cuando se analizaron, en varios aislamientos las secuencias peptídicas deducidas de este gen, se encontró que presentaban una elevada similitud y que las secuencias podían agruparse de acuerdo a la patogenicidad del aislamiento. Estudios similares con secuencias del gen p23, que codifica para una proteína que tiene dominios de unión a RNA, mostró resultados semejantes (Pappu *et al.*, 1997). El análisis de la región 5' UTR viral demostró la existencia de tres tipos de secuencias que permitieron un agrupamiento de los aislamientos virales (López *et al.*, 1998). Recientemente se ha utilizado esta región genómica para caracterizar aislamientos de CTV de distintos orígenes geográficos y características biológicas (Ayllón *et al.*, 2001). Todos los aislamientos presentan secuencias de tipo III, pero algunos de ellos tienen además secuencias de tipo I o II o ambas. Los aislamientos débiles presentan solamente el primer tipo de secuencias mientras que los demás tienen mezclas de los distintos tipos identificados (López *et al.*, 1998; Ayllón *et al.*, 2001).

III.E.2A) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS DE AISLAMIENTOS DE DISTINTO ORIGEN GEOGRÁFICO

El análisis filogenético de las secuencias de los haplotipos mayoritarios de los aislamientos estudiados en la sección C mostró resultados coincidentes con los de los trabajos anteriormente citados. Los aislamientos de biogrupos débiles formaron un grupo estrechamente relacionado. Del mismo modo, los aislamientos del biogrupo III constituyeron un grupo definido a pesar de que uno de ellos era originario de Brasil y otro de Argentina. Los aislamientos de biogrupos severos formaron un grupo muy distante de los demás. T388, en cambio, no se comportó como el resto de los aislamientos virales que se agruparon de acuerdo a sus características biológicas. Constituyó un grupo aparte, diferente del que incluye a los aislamientos severos sudamericanos. Cuando se incluyeron las secuencias de los productos iniciales de PCR se obtuvo un resultado semejante, los aislamientos débiles se agrupan entre sí, el aislamiento T36 (biogrupo III) tiene una posición intermedia y los aislamientos severos sudamericanos se disponen en un grupo alejado de los demás. En este caso, otro aislamiento severo analizado, T305, se encontró incluido en el grupo de los aislamientos débiles. Este resultado aparentemente contradictorio podría explicarse por el hecho de que T305 deriva de un aislamiento débil (T385) y en la patogenicidad podrían estar involucrados más de un gen o

región génica. El análisis de variabilidad intrapoblacional en los aislamientos de la sección C demostró la existencia de secuencias muy diferentes de las del haplotipo mayoritario únicamente en los aislamientos de campo. Este hecho puede adjudicarse tanto a los factores climáticos no controlados como a la posibilidad de reinoculaciones con otros aislamientos virales a que están sometidas las plantas que se encuentran a campo.

III.E.2B) ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS DE AISLAMIENTOS ARGENTINOS

Los aislamientos argentinos de CTV exhibieron un comportamiento particular, ya que la mayor parte de ellos mostró haplotipos mayoritarios con secuencias muy semejantes. La presencia de una secuencia mayoritaria compartida puede deberse a estabilidad genética, que surge como consecuencia de una presión de selección fuerte y competición entre los mutantes que se producen durante la replicación. Debido a ello se crea un equilibrio en la distribución de quasiespecies (Albiach-Martí *et al.*, 2000a).

Cuando se analizan los árboles filogenéticos se encuentra que en Argentina las secuencias del gen p27 caen dentro de cuatro grupos definidos. La mayor parte de los aislamientos exhibe un mismo tipo de secuencia, semejante a la del haplotipo mayoritario de los aislamientos severos brasileños. Los aislamientos C269-1, C271-2 y C271-8, muestran únicamente este tipo de secuencias con una dispersión de tipo quasiespecie alrededor del haplotipo mayoritario. El aislamiento C270-3 también presenta este tipo de secuencia y es un caso extremo de homogeneidad intrapoblacional, ya que los 10 clones analizados compartieron el mismo patrón de SSCP. La secuencia de amplificación inicial de este aislamiento mostró una identidad del 100% con la de los clones analizados. El aislamiento C270-3 proviene de una planta libre de virus traída al país desde Florida en el año 1990 (Costa, comunicación personal). La adquisición de la variante poblacional más extendida en el país parece confirmar que esta secuencia es actualmente la más "activa", al menos en cuanto a su dispersión en esta región geográfica. Una situación similar a la anterior es la del aislamiento P6 de Uruguay, que fue purificado de una planta de pomelo, ingresada a ese país entre los años 1981 y 1983 como libre de virus, proveniente de California (Peyrou, comunicación personal). La secuenciación del producto de amplificación inicial del gen p27 en dicho aislamiento demostró la presencia de la misma secuencia que se encontró en la mayor parte de los aislamientos argentinos de CTV. Un segundo tipo de secuencias es el que se encuentra en el aislamiento C257-2. Los haplotipos minoritarios presentes muestran pequeñas variantes con respecto al mayoritario y ninguna de las secuencias es semejante a la de los demás aislamientos virales estudiados. El tercer tipo de secuencias está representado por el haplotipo mayoritario de C268-2 y el cuarto por los haplotipos minoritarios de los aislamientos C269-6 y C257-7. Como se mencionó

anteriormente todos los demás aislamientos, incluyendo estos dos últimos, son heterogéneos y presentan más de un tipo de secuencia viral.

De acuerdo a resultados recientes, la secuencia *master* de cada aislamiento sería responsable de la sintomatología producida (Satyanarayana *et al.*, 2001). En líneas generales, en dicho trabajo se infectaron protoplastos con transcritos correspondientes a un clon de longitud total del aislamiento T36 de Florida. Se obtuvieron viriones que se utilizaron para infectar plantas de cítricos. Las infecciones fueron exitosas y los viriones recombinantes obtenidos causaron síntomas idénticos al aislamiento de origen. Es importante destacar que este aislamiento es más uniforme en composición que la mayor parte de los aislamientos de CTV, ya que solo presenta la secuencia mayoritaria y cantidades mínimas de una secuencia similar a T30 (débil) (Satyanarayana *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta el criterio de que la secuencia mayoritaria es la responsable del fenotipo, la totalidad de los aislamientos argentinos, con excepción de C257-2 y C268-2 serían virulentos. Aunque la mayor parte de ellos producen sintomatología moderada a severa en sus hospedantes originales, existen aislamientos muy virulentos que también presentan el mismo haplotipo mayoritario. Estos últimos aislamientos comparten una secuencia minoritaria semejante. En Barañ B (naranja, Brasil) y en C269-6 (pomelo, Argentina), del biogrupo IV, esta secuencia, que difiere de la del haplotipo mayoritario en más del 12% a nivel nucleotídico, comprende al 10% de los clones. El aislamiento brasileño Capañ Bonito, que es extremadamente severo, también presenta un clon que exhibe una elevada identidad nucleotídica (96%) con la secuencia minoritaria de los aislamientos antes citados. C257-7, el único aislamiento argentino del biogrupo V, no comparte esta variante pero también presenta una secuencia minoritaria que difiere notoriamente de la del haplotipo mayoritario. Si se considera que quizás las secuencias minoritarias también pueden cumplir un rol en la patogenicidad viral, sobre todo a campo, su presencia podría ser indicativa de extremada virulencia.

El análisis filogenético de los haplotipos mayoritarios analizados en conjunto con las secuencias presentes en banco de datos demostró que los aislamientos severos argentinos, brasileños y uruguayos forman un grupo bien definido y que la secuencia del gen p27 de dichos aislamientos es diferente a la hallada en otros aislamientos secuenciados. Dos de los aislamientos sudamericanos del biogrupo III se agrupan distantes de los restantes indicando que, al menos en este caso el origen geográfico no incide en el agrupamiento de los aislamientos. De esta manera, en la mayor parte de los casos se encontró una correlación entre la secuencia del gen p27 y las características biológicas de los aislamientos estudiados, indicando la posible relación de este gen con el grado de patogenicidad viral.

CAPÍTULO IV

SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DE cDNA DEL AISLAMIENTO C268-2

CAPÍTULO IV

SECCIÓN A: INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DE CDNA DEL AISLAMIENTO C268-2

IV.A.1) CARACTERÍSTICAS DE LOS GENOMAS DE CTV SECUENCIADOS

Uno de los objetivos principales en el estudio de CTV es la búsqueda e identificación de las regiones génicas que pudieran ser responsables de los distintos grados de patogenicidad que muestran los aislamientos virales. Entre las estrategias aplicadas para este análisis está la secuenciación de la totalidad del genoma de aislamientos provenientes de distintas regiones geográficas, que inducen sintomatologías diferentes en los indicadores utilizados.

El primer genoma de CTV completamente secuenciado corresponde al aislamiento T36, originario de un naranjo de Florida, que produce declinamiento rápido en las plantas infectadas (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995). Estos trabajos dilucidaron la organización genómica del virus. Se determinó la presencia de distintos motivos conservados entre los closterovirus por comparación con el genoma de BYV, que había sido secuenciado previamente (Agranovsky *et al.*, 1991; Agranovsky *et al.*, 1994). Posteriormente se secuenció el aislamiento VT de Israel (Mawassi *et al.*, 1996), que también proviene de naranjo y produce declinamiento. La comparación de las secuencias de ambos aislamientos demostró que la organización genómica se correspondía con la descrita para T36. Las secuencias nucleotídicas de ambos genomas tiene una identidad global de alrededor del 72%. La mitad 3' está muy conservada (84,7% de identidad), mientras que en la región 5' los valores son menores (70,7%) (Mawassi *et al.*, 1996). La asimetría en la conservación es aún más notoria cuando se comparan las regiones 5' y 3' no codificantes, que muestran un 60% y un 97% de identidad nucleotídica respectivamente. A pesar de que estos aislamientos tienen orígenes geográficos diferentes, ambos pertenecen al mismo biogrupo (III) de acuerdo a la sintomatología que inducen en plantas indicadoras.

Para ampliar el análisis se secuenció otro aislamiento severo, proveniente de un naranjo dulce de California (SY568) (Yang *et al.*, 1999). El genoma de SY568 muestra valores de identidad nucleotídica global de 81 y 87% cuando se lo compara con T36 y VT respectivamente. Nuevamente se observó que la región 3' está más conservada (90% con respecto a T36) que la 5' (56% con el mismo aislamiento). Datos semejantes se obtuvieron cuando se comparó la secuencia completa de un aislamiento débil español (T385, biogrupo I) (Vives *et al.*, 1999) con las de los restantes aislamientos. T385 mostró valores globales de identidad nucleotídica de 81,3; 89,3 y 94% con T36, VT y SY568, respectivamente. Cuando se comparó la región 5' UTR se obtuvieron valores de 67% con VT, de 66,3% con SY568 y de 42,5% con T36.

La comparación entre T385 y otro aislamiento débil, T30, originario de Florida, demostró que existe una identidad nucleotídica casi absoluta entre ambos aislamientos (99,3%) (Albiach-Martí *et al.*, 2000a). Las secuencias 5' y 3' no codificantes tienen una identidad de 96,3 y 99,6% respectivamente.

Asimismo se secuenciaron cuatro regiones "hipervariables" en otros tres aislamientos débiles, B252 de Taiwan, B272 de Colombia y B354 de California. Estas cuatro regiones genómicas corresponden a: 1) la región 5' no codificante; 2) los primeros 234 nucleótidos del ORF 1a; 3) una porción del dominio de metiltransferasa y 4) una porción del dominio de helicasa. En todos los casos se encontraron valores de identidad nucleotídica elevados (mayores al 97,2%) entre los aislamientos débiles, incluidos T30 y T385 (Albiach-Martí *et al.*, 2000a). Una de las explicaciones de este hallazgo es el posible origen común de estos aislamientos a partir de un antecesor, probablemente asiático.

IV.A.2) OBTENCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE cDNA A PARTIR DE UN AISLAMIENTO ARGENTINO DE CAMPO DE CTV

Hasta el presente no se cuenta con secuencias completas de genomas de aislamientos de CTV de origen Sudamericano. Ya que en la Argentina la tristeza es endémica y la aparición de aislamientos extremadamente virulentos constituye un problema grave para la industria citrícola, resultó de interés producir una biblioteca de cDNA de un aislamiento local, C268-2 de Concordia, Entre Ríos. Este aislamiento de campo es originario de una planta de naranjo *Valencia frost* y, de acuerdo a la sintomatología que produce en plantas indicadoras, se lo clasificó como perteneciente al biogrupo III (Costa, 1995). Además, en ensayos de ELISA reacciona positivamente con el anticuerpo monoclonal MCA13, que reconoce un epítipo presente en la proteína de cubierta mayoritaria de aislamientos severos. Para obtener la biblioteca se utilizó dsRNA del aislamiento y un *kit* de clonado (*Librarian II cloning kit, Invitrogen Corp.*, USA) que incluye la transcriptasa reversa AMV. Para la síntesis de cDNA se utilizaron oligonucleótidos de seis bases de secuencia al azar con el fin de evitar la selección de componentes de la población viral. El molde de la reacción fue dsRNA de longitud total (dsRNA *full-length*), correspondiente al intermediario de replicación del genoma. Se utilizó el plásmido pcDNAII como vector de clonado y para la transformación se emplearon bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α F' cuyo estado de competencia se estableció por métodos químicos (Semorile *et al.*, 1993).

A partir de la secuenciación de los clones obtenidos se pudo establecer la secuencia parcial del aislamiento C268-2, realizar comparaciones con aislamientos de otras regiones geográficas y tener una visión general del tipo de secuencias presentes en el país, corroborando la existencia de variabilidad intrapoblacional en los aislamientos de campo no purificados. Los clones de la biblioteca también se utilizaron en la búsqueda de regiones genómicas que

permitieran caracterizar aislamientos de CTV (Semorile *et al.*, 1993), por lo cual la secuenciación de los mismos posibilitó situarlas en el contexto del genoma viral e identificar las zonas que están potencialmente involucradas en la patogenicidad viral. Las variantes de secuencia de dichas regiones pueden relacionarse con los diferentes grados de patogenicidad que exhiben los distintos aislamientos virales.

En las siguientes secciones se exponen los resultados obtenidos a partir de la secuenciación y análisis de la totalidad de los clones de la biblioteca del aislamiento C268-2.

CAPÍTULO IV

SECCIÓN B: MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DE cDNA DEL AISLAMIENTO C268-2

IV.B.1) PREPARACIÓN DE CLONES PARA SECUENCIACIÓN

Se realizaron minipreparaciones de DNA plasmídico de todos los clones de la biblioteca. Una alícuota del DNA plasmídico se digirió con enzimas de corte único en el *polylinker* (*Xho* I y *Bam*H I) y los fragmentos obtenidos se resolvieron en geles de agarosa 0,8%-TAE 1x para determinar su tamaño. En algunos casos no se contaba con cultivos congelados, por lo cual fue necesario transformar previamente a bacterias competentes con una fracción de DNA plasmídico. A partir de las bacterias transformadas se realizaron cultivos líquidos con la finalidad de congelar una fracción y obtener DNA plasmídico para las reacciones de secuenciación.

IV.B.2) SECUENCIACIÓN DE CLONES DE LA BIBLIOTECA

Las reacciones de secuencia se realizaron con los *primers* M13 directo, M13 reverso, T7 y SP6. La lectura de las mismas se realizó en un secuenciador automático PERKIN ELMER 373. Para la comparación de las secuencias se utilizaron, entre otros, los programas Gap y BestFit del GCG.

Para completar la secuencia de ambas hebras de clones de tamaño mayor a la capacidad de resolución del equipo empleado, se utilizaron dos estrategias: corte con enzimas de restricción para producir subclones y diseño de *primers* específicos.

IV.B.2A) SUBCLONADO POR DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE CORTE ÚNICO

Las secuencias parciales de los clones se analizaron con el programa Map para identificar enzimas de corte único en el vector y con, al menos, un sitio blanco en el inserto. Los plásmidos recombinantes se digirieron con las enzimas *Xho* I, *Bam*H I, *Sac* I, *Kpn* I o *Hind* III. Los insertos liberados, que comprenden una porción del *polylinker* del vector (desde el sitio de corte en el vector hasta el sitio de clonado) y una región del clon, se purificaron a partir de un gel de agarosa y se ligaron a preparaciones del vector pcDNA II digerido con la misma enzima. Por otro lado se religó el plásmido que conserva unido el fragmento restante del clon. Con ambas construcciones se transformaron bacterias competentes y los subclones resultantes se secuenciaron con los *primers* universales tras verificar, por PCR, que su tamaño coincidía con el esperado.

IV.B.2B) SUBCLONADO POR DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE CORTE MÚLTIPLE

En una serie de clones las enzimas de sitio de corte único en el vector no presentaron sitios de reconocimiento dentro de la secuencia del inserto. En

estos casos se realizaron dos etapas de digestión para poder subclonar. Primero se digirieron los plásmidos recombinantes con las enzimas *BamH I* y *Xho I* (con sitios únicos de corte en el *polylinker*) y los insertos liberados se purificaron a partir de geles de agarosa 0,8%-TAE 1x. Este DNA purificado se sometió a una segunda digestión con enzimas que producen extremos romos, elegidas por presentar sitios de corte en los insertos (*Hae III*, *Mnl I*, *Mbo I*, etc.). Los fragmentos resultantes se separaron en geles de agarosa-TAE 1x de mayor concentración (entre 1 y 2%) para obtener una buena resolución y realizar la selección correcta de las de las bandas de interés, que se purificaron posteriormente. Los fragmentos resultantes de estos eventos de doble digestión pueden ser de dos tipos: tener ambos extremos romos o presentar un extremo romo y otro cohesivo. Este último tipo de extremo es producido por la enzima utilizada en el primer evento de digestión. Los fragmentos que presentaron extremos romos se ligaron al vector pcDNA II digerido con la enzima *EcoR V*. Los fragmentos restantes, con un extremo cohesivo producido por *Xho I* o *BamH I*, se ligaron a preparaciones del vector pcDNAII digerido con las siguientes combinaciones enzimáticas: *EcoR V/Xho I* o *EcoR V/BamH I*. En este segundo caso la eficiencia de ligación es mayor ya que se cuenta con un extremo cohesivo.

Los clones que no presentaron sitios blanco de enzimas que producen extremos romos se digirieron con una de las dos combinaciones de enzimas de digestión utilizadas en los ensayos de *Southern blot* (*BamH I/Dde I/Xho I* o *BamH I/Hinf I/Xho I*). Los fragmentos resultantes se resolvieron en geles de agarosa 2%-TAE 1x y se seleccionaron las bandas de interés (figura IV.B.1). El DNA se purificó a partir del gel y, dado que estas enzimas producen extremos 5' extendidos de cadena simple, se sintetizó la cadena complementaria con el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa. Los fragmentos obtenidos se ligaron al vector pcDNAII digerido con la enzima *EcoR V* (que genera extremos romos).

En todos los casos, con los productos de ligación se electrotransformaron bacterias *E. coli* DH5 α F'. Las colonias se seleccionaron por resistencia al antibiótico y ausencia de color en placas con IPTG y X-gal. La presencia y tamaño de los insertos subclonados se confirmó por PCR (figura IV.B.2). A partir de las colonias recombinantes se obtuvo DNA plasmídico que se utilizó en las reacciones de secuenciación.

IV.B.2C) SECUENCIACIÓN CON *PRIMERS* ESPECÍFICOS

En algunos casos la estrategia anterior no permitió completar la secuencia de un clon y se necesitó utilizar *primers* específicos para lograr dicho propósito. Como moldes de las reacciones de secuenciación se utilizaron minipreparaciones de DNA plasmídico de los clones de interés o amplificaciones de los insertos realizadas con los *primers* universales de M13.

En este último caso se agregó una etapa experimental (precipitación con PEG₆₀₀₀) para eliminar los *primers* no incorporados en la amplificación. Como *primers* específicos se utilizaron oligonucleótidos provistos por el Dr. W.O. Dawson (Lake Alfred, Florida, EEUU) o diseñados en base a las secuencias parciales de los clones utilizando los programas Prime (GCG) y OLIGO (National Biosciences). Previo a su empleo en secuenciación, se realizaron amplificaciones con cada *primer* y el complementario de M13, utilizando como molde material plasmídico de los clones a secuenciar, con el fin de corroborar el buen funcionamiento de los mismos.

Los *primers* C131 y C78 (sección A3 del Apéndice, cedidos por el Dr. Dawson) se utilizaron para completar la secuencia de los clones pLT48 y pLT10, respectivamente. Los *primers* diseñados con el programa Prime (sección A3 del Apéndice) se usaron para completar las secuencias de los clones pLT49, pLT56, pLT66, pMT59, pDGT27 y pDGT87. Con el empleo de estos oligonucleótidos específicos se completó la secuenciación de todos los clones de la biblioteca de cDNA del aislamiento C268-2 de CTV.

IV.B.3) AMPLIFICACIÓN DEL GEN P6 DEL AISLAMIENTO C268-2

Para obtener la secuencia del aislamiento C268-2 a partir de la región correspondiente al triple bloque génico, se amplificó el gen p6, ya que en los clones de la biblioteca sólo se obtuvo la porción 3' del mismo. Para ello se diseñaron *primers* correspondientes a los extremos del gen (sección A4 del Apéndice) con el programa Prime. En el diseño de los *primers* se utilizaron las secuencias de los clones pLT48 y pLT57, y del aislamiento T36, única disponible en el GenBank en ese momento. Como molde de la reacción de transcripción reversa, realizada con AMV-RT, se utilizó dsRNA del aislamiento C268-2 y el *primer* p6D. A partir de este cDNA se realizó la amplificación en la que se incluyeron ambos *primers*, directo y reverso (p6R). Una fracción del producto obtenido se resolvió en gel de agarosa, para confirmar su tamaño (figura IV.B.3) mientras que la porción restante se precipitó con PEG₆₀₀₀, se resuspendió en agua bidestilada estéril y se ligó al vector pGEM-T. Con la mezcla de ligación se electrotransformaron bacterias competentes. Las colonias recombinantes se seleccionaron por resistencia al antibiótico ampicilina y por ausencia de color en presencia de IPTG y X-Gal. La presencia de los insertos de interés se confirmó por PCR con los *primers* específicos sobre las colonias elegidas. Se seleccionaron dos colonias, a partir de las cuales se realizaron cultivos líquidos y minipreparaciones de DNA plasmídico que se usaron como molde en reacciones de secuenciación con *primers* universales. Una vez establecida la secuencia completa de ambos clones se las comparó entre sí con el programa Gap y se encontró que eran idénticas. Además, presentaron valores de identidad nucleotídica de 88,4 y 87%, con los clones pLT48 y pLT57, respectivamente.

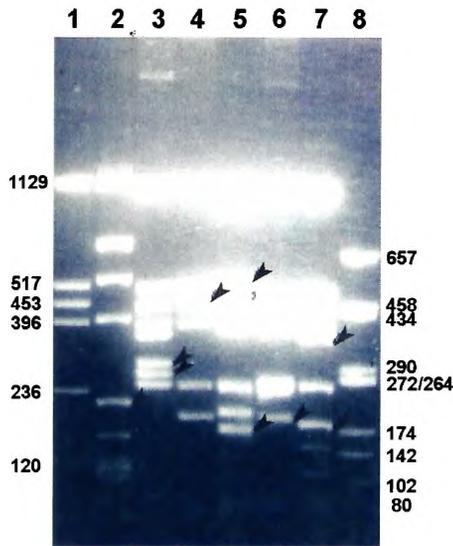


Figura IV.B.1: Selección de fragmentos de digestión para el subclonado. Gel de agarosa 2%-TAE 1x. Calles 1 y 8: marcadores de PM, plásmido pcDNA II digerido con las enzimas *Hinf I*/*Hind III* o *Hae III*, respectivamente. En la figura se indican, en pb, los tamaños de las bandas que se visualizan. Calle 2: clon pLT48 digerido con las enzimas *BamH I*/*Dde I*/*Xho I*. Calles 3 a 7: clones pLT49, pLT53, pLT56, pLT66 y pMT26 respectivamente, todos ellos digeridos con la siguiente combinación de enzimas: *BamH I*/*Hinf I*/*Xho I*. Con puntas de flechas se indican las bandas de interés, que se recuperaron del gel.



Figura IV.B.2: Identificación de subclones por PCR. Gel de agarosa 1,5%-TAE 1x. Se utilizaron los *primers* universales de M13, que amplifican un fragmento de 220 pb del vector. Calles 1 a 4: subclonado de un fragmento de 170 pb del clon pDGT27. Calles 6 a 15: colonias correspondientes al subclonado de un fragmento de 180 pb del mismo clon. Calles 17 a 24: colonias correspondientes al subclonado de un fragmento de 276 pb del clon pLT49. Calle 25: control negativo de la reacción. Calle 26: control positivo de la reacción, sobre una colonia azul. Calles 5 y 16: marcadores de PM, plásmido pcDNA II digerido con las enzimas *Hinf I* y *Dde I*, respectivamente. Los tamaños de los fragmentos visualizados en el gel se indican en la figura y se expresan en pb. Calles 1 a 4, 6 a 12, 14, 15 y 22: clones positivos. Calles 13, 17 a 21 y 24: clones negativos, se observa el producto de amplificación correspondiente a la sección del plásmido comprendida entre los sitios de *annealing* de los *primers*. Calle 23: fragmento de tamaño mayor al esperado.

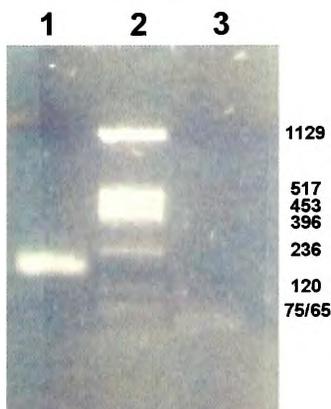


Figura IV.B.3: Amplificación del gen p6. Análisis en gel de agarosa 1%-TAE 1x. Calle 1: producto de amplificación del tamaño esperado (175 pb, de las cuales 155 corresponden al gen p6 y las restantes a secuencias de los *primers* empleados). Calle 2: marcador de PM, plásmido pcDNA II/*Hinf I*/*Hind III*; los tamaños de los fragmentos visualizados en el gel se indican en la figura. Calle 3: control negativo de la reacción.

IV.B.4) OBTENCIÓN DE UNA SECUENCIA CONTINUA CON LOS CLONES DE LA REGIÓN 3' DE LA BIBLIOTECA DE cDNA

Se realizó un alineamiento múltiple con los clones que se extienden desde la mitad del gen p6 hasta el extremo 3' del genoma viral. Para ello se utilizaron los programas del *Fragment Assembly System* (FAS) del GCG. Para obtener los *contigs* el programa GelMerge busca las secuencias con mayor solapamiento y forma un *contig* inicial al cual va agregando, en el caso que cumplan los requisitos, las secuencias restantes. El programa utiliza los parámetros *word size=7*, *fraction of the words in an overlap must match=0.8* y *minimum overlap length=14*. Esto significa que para armar los *contigs* entre secuencias, el programa busca bloques con una de identidad de secuencia de 7 nt dentro de los cuales no inserta *gaps* (aunque sí los puede colocar entre bloques). Por otro lado, las secuencias deben presentar al menos una región de identidad de 14 nt en el solapamiento, requisito que excluye la probabilidad de solapamientos triviales. Luego de encontrar todos los alineamientos posibles entre *contigs*, el programa "cuenta" el número exacto de bases coincidentes (*matches*) en el mejor alineamiento (considerando mejor alineamiento al que tiene la mayor cantidad de *matches*). Si el número de identidades es mayor o igual al 80% de la longitud del solapamiento, lo guarda. De esta manera se generan uno o más *contigs* con las secuencias analizadas.

Con el programa GelStart se creó el proyecto de trabajo en el directorio personal de computadora *Sun UltraSparc II*. Las secuencias se incorporaron con el programa GelEnter y se crearon *contigs* con el programa GelMerge. La visualización de los *contigs* obtenidos con el programa GelAssemble mostró que, utilizando los parámetros por *default* del programa GelMerge, se producían 10 *contigs* con los distintos clones de la región 3' del aislamiento. De acuerdo a los datos de comparación de las secuencias de los distintos clones con el aislamiento T36, se sabía que se podía construir un alineamiento continuo desde el clon pLT48 (3' del gen p6) hasta el clon pLT53 (mitad de la región 3' UTR), pero ello no resultaba posible utilizando los parámetros por *default* del programa. El alineamiento de todos los clones se logró cambiando el parámetro de longitud de palabra a 6, con lo cual automáticamente cambia a 12 la longitud de la identidad de solapamiento. El parámetro de coincidencias dentro del solapamiento se conservó en 80%. Con estas modificaciones se generó un único *contig* que incluye a las secuencias de todos los clones de la región 3' del genoma de C268-2.

CAPÍTULO IV

SECCIÓN C: RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DE CDNA DEL AISLAMIENTO C268-2

IV.C.1) DETERMINACIÓN DE SECUENCIAS DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA Y LOCALIZACIÓN CON RESPECTO AL GENOMA DE CTV

La secuencia de los extremos de los insertos, clonados en el vector pcDNA II, se obtuvo empleando los *primers* universales M13 directo, M13 reverso, T7 o SP6. Como resultado de la comparación de dichas secuencias con las del aislamiento T36 se ubicó a los clones en el contexto del genoma viral (fig. IV.C.1). A partir de estos datos se confirmó que treinta de los clones de la biblioteca eran de origen viral y que cuatro de los mismos existían por duplicado (en estos casos se seleccionó uno de los miembros de cada par). Si bien para la construcción de la biblioteca se utilizó sólo el dsRNA *full length*, la misma se encuentra enriquecida en clones de la mitad 3'. En la región 5' del genoma (las primeras 10 kb) sólo hay siete clones. Estos clones no cubren la totalidad de dicha región, ya que no se encontró ninguno de ellos en la zona de la RNA polimerasa viral y del gen p33.

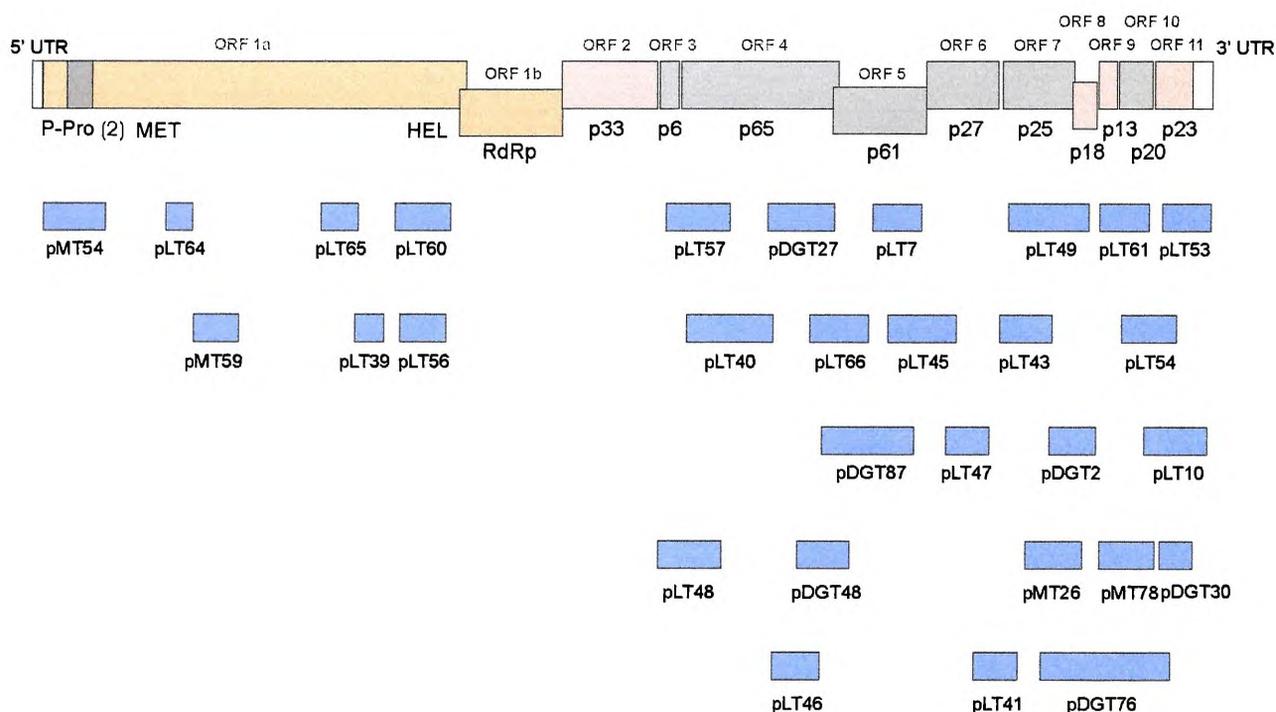


Figura IV.C.1: Representación esquemática de los clones de la biblioteca del aislamiento C268-2. En la porción superior se grafica la organización genómica de CTV. El genoma y los clones se encuentran representados a escala. Los colores de los distintos ORF's del genoma corresponden a lo descrito en la Introducción general.

En la mitad 3' (a partir del gen p6), se encontraron veintidós clones, de los cuales nueve pertenecen a la región de los genes p6, p65 y p61; seis a la zona que incluye los dos genes de proteína de cubierta virales y otros seis a la región que involucra a los genes p18, p13, p30 y p23. También existen clones que comparten algunas de las regiones mencionadas. Tal es el caso de pLT45 (3' de p61 y 5' de p27) y de pDGT76 (genes p25, p18, p13, p20 y p23).

En el caso de clones de tamaño pequeño, como pDGT30, pDGT48, pLT7, pLT47, pLT54 y pLT61, se obtuvo la secuencia completa a partir de reacciones realizadas con los *primers* universales. Para completar la secuencia de clones de mayor longitud se emplearon otras estrategias, ya que el secuenciador utilizado permite leer 350 a 400 nt, de los cuales entre 70 y 100 corresponden al vector de clonado. Para secuenciar ambas hebras de cada clon, se subclonaron los fragmentos de interés o se realizaron reacciones de secuencia con *primers* específicos diseñados con tal fin. El subclonado permitió completar la secuencia de los clones pLT46, pLT53, pMT26, pMT54 y pMT78 y el uso de oligonucleótidos específicos posibilitó la obtención de la secuencia de los clones pDGT27, pDGT87, pLT10, pLT48, pLT49, pLT56, pLT66 y pMT59. Con el empleo de ambas alternativas se logró establecer la secuencia del resto de los clones de la biblioteca de cDNA del aislamiento C268-2 de CTV. Los datos de secuenciación se procesaron con los programas Gap, BestFit, Reverse, PileUp, Assemble y SeqEd, entre otros. Con las secuencias de obtenidas para cada clon, se realizó un alineamiento múltiple y se obtuvo la secuencia consenso con el programa Pretty.

Los datos de tamaño de los clones y su ubicación exacta con respecto al genoma del aislamiento T36, se obtuvieron con el programa Gap (Tabla XI de la sección B del Apéndice).

IV.C.2) COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS DEDUCIDAS DE CLONES DEL AISLAMIENTO C268-2 Y DE OTROS AISLAMIENTOS VIRALES

Para determinar la identidad de secuencia nucleotídica de los clones del aislamiento C268-2 con otros aislamientos de CTV secuenciados, se los comparó con las secuencias presentes en el GenBank (T385, Vives *et al.*, 1999; T30, Albiach-Martí *et al.*, 2000a; T36, Karasev *et al.*, 1995; VT, Mawassi *et al.*, 1996; SY568, Yang *et al.*, 1999 y NUagA, Suastika *et al.*, 2000). Los resultados de estas comparaciones se muestran en la tabla XII (sección B del Apéndice) y se representan, de manera gráfica, en las figuras IV.C.2b (clones situados en la mitad 5' del genoma viral) y IV.C.3b (clones de la región 3').

La obtención de las secuencias aminoacídicas deducidas se realizó con los programas Map y Translate. Dichas secuencias se compararon con los marcos de lectura abiertos de los correspondientes genes en los cinco genomas virales secuenciados (tabla XIII de la sección B del Apéndice). En todos los casos, los

clones presentaron marcos correctos para la región génica a la que correspondían y no se hallaron codones de terminación de traducción prematuros, que pudieran afectar la longitud propuesta de las proteínas deducidas. Como la mayoría de los cambios nucleotídicos son conservativos, los valores de similitud e identidad aminoacídicos resultaron mayores que los de identidad nucleotídica (tablas XI y XII de la sección B del Apéndice). Los resultados mostrados en la tabla XIII del Apéndice se representaron gráficamente para facilitar su observación y se muestran en las figuras IV.C.2c y IV.C.3c, d y e para los clones situados en las regiones 5' y 3' del genoma, respectivamente.

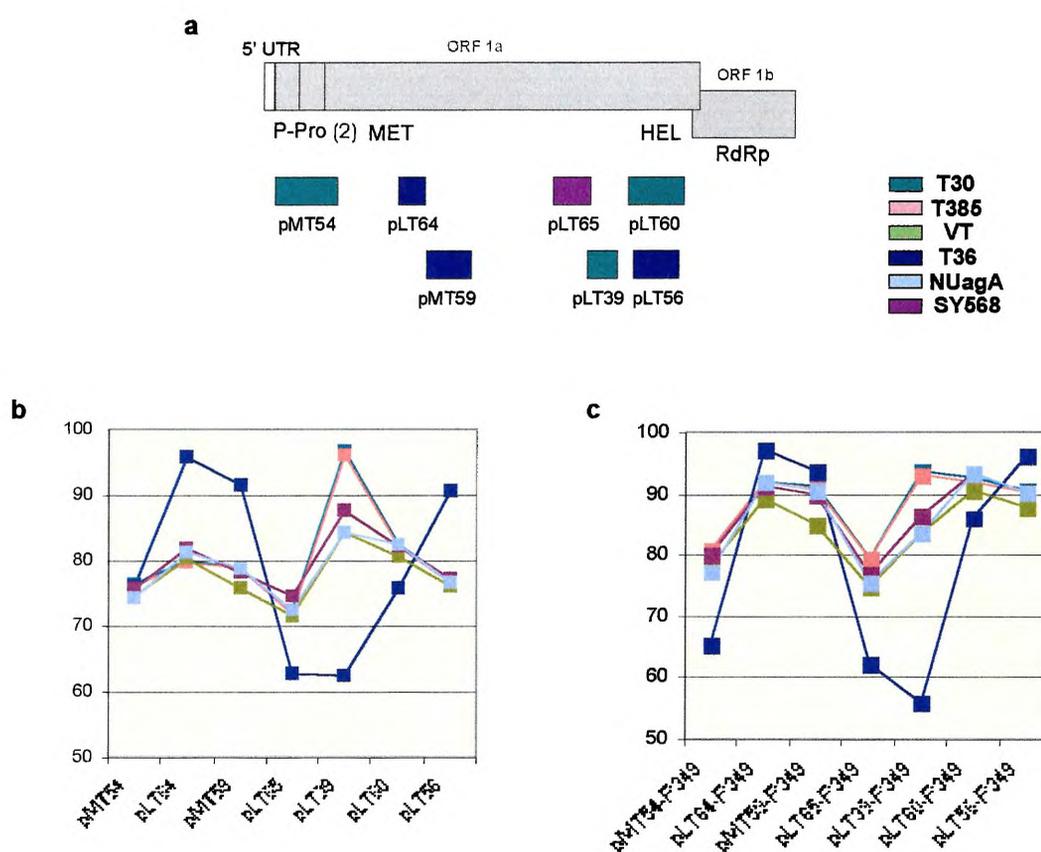


Figura IV.C.2: Comparación de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de los clones de la biblioteca de cDNA de C268-2 situados en la mitad 5' del genoma viral. **a:** ubicación de los clones. **b:** valores de identidad nucleotídica. **c:** valores de similitud aminoacídica. En el eje Y de los gráficos b y c se representan porcentajes de identidad nucleotídica y similitud aminoacídica, respectivamente (50 a 100%). En el eje X de ambos gráficos se indica los clones analizados. El código de colores de los distintos aislamientos se indica en la figura. Como T30 y T385 son prácticamente idénticos los colores que los representan se encuentran solapados.

Del análisis de la Tabla XII y de la figura IV.C.2b se desprende que, para los clones situados en la región de la poliproteína viral, se pueden señalar dos situaciones distintas. Una de ellas la ejemplifica pMT54, que muestra valores

similares con todos los aislamientos. Por el contrario, los clones correspondientes a la región interdominios (pLT65 y pLT39), presentan valores elevados de identidad nucleotídica sólo con los aislamientos débiles T30 y T385, mientras que los clones situados en la región que corresponde al dominio de metiltransferasa (pLT64 y pMT59) son muy similares a T36 y diferentes a los aislamientos débiles. Cuando se analizan las secuencias aminoacídicas deducidas se encuentra una situación semejante. También se observa que la mayor parte de los cambios son conservativos, ya que los valores de similitud aminoacídica son mayores que los de identidad nucleotídica (fig. IV.C.2c). La excepción a este hecho se encuentra cuando se comparan las secuencias aminoacídicas deducidas de los clones pMT54 y pLT39 con la región correspondiente de T36 (fig. IV.C.2c). La disminución en los valores de similitud se deben a la existencia de deleciones puntuales que producen cambios en el marco de lectura. La comparación con las secuencias de los restantes aislamientos permitió establecer que las mismas están presentes en la secuencia de T36 y no en la de los clones del aislamiento C268-2.

En la región del gen p65 todos los clones (pLT48, pLT57, pLT40, pDGT27, pLT46 y pLT66) presentaron una identidad elevada (mayor o igual al 90%) con los aislamientos VT y NUagA (fig. IV.C.3a y b). La situación es distinta con los clones correspondientes al gen p61. En este caso se observó que el clon pDGT87 es semejante a T30 mientras que el clon pLT7 presentó mayor identidad nucleotídica con T36 (fig. IV.C.3a y b). La mayoría de los clones situados en la región del triple bloque génico muestran valores de similitud de secuencias aminoacídicas deducidas superiores al 90%. En la figura IV.C.3c se observa claramente que todos los aislamientos son muy similares en esta región genómica, evidenciando una elevada conservación de secuencia aminoacídica.

En los clones correspondientes al gen p27 se encontraron dos situaciones, pLT45 tiene una elevada identidad con NUagA mientras que la secuencia de pLT47 es semejante a la de SY568. El clon pLT41, que cubre la región intergénica p27-p25, es semejante a T30 (fig. IV.C.3a y b). El gen que codifica para la proteína de cubierta mayoritaria (p25), tiene una secuencia muy conservada en los distintos aislamientos comparados y los clones del aislamiento C268-2, presentes en esa región, muestran una elevada identidad nucleotídica con NUagA (fig. IV.C.3a y b). La región de las proteínas de cubierta virales es la más conservada entre aislamientos. En la figura IV.C.3d se observa el elevado grado de similitud existente, tanto entre los aislamientos comparados como entre los clones de C268-2. Los menores valores de similitud corresponden a P27, la proteína de cubierta minoritaria, donde se observa variación aún entre los clones del aislamiento C268-2.

En la región situada río arriba de los genes que codifican para las proteínas de cubierta, se encontró que los clones correspondientes a los genes p13 y p20 (pLT61 y pMT78) son semejantes a SY568 (fig. IV.C.3a y b). De los clones correspondientes a los genes p20 y p23, tres son muy similares a T385 (pLT54, pDGT30 y pLT53) mientras que el restante, pLT10, muestra mayores valores de identidad con T36 (fig. IV.C.3a y b). En la figura IV.C.3d se muestran los valores de similitud aminoacídica obtenidos al comparar los productos peptídicos potenciales de clones situados en la región 3' viral y los distintos aislamientos de CTV analizados. Se observa que las regiones más conservadas entre aislamientos correspondieron a los péptidos P18 y P20, mientras que la variación es mayor en P13 y P23. En la región correspondiente a P18, los mayores valores de similitud se obtuvieron con el aislamiento NUagA, mientras que los menores se encontraron al realizar la comparación con VT. Todos los clones analizados mostraron el mismo patrón general de similitud con los aislamientos utilizados en la comparación. En el caso de P13, los productos de dos clones, pLT61 y pMT78, muestran elevada similitud con NUagA y valores mucho menores (un 10% menos) con T385 y T30, mientras que el producto codificado por el clon pDGT76 exhibe elevada similitud con T30 y T385 y menor similitud con NUagA. De este modo, al menos potencialmente, en el aislamiento C268-2 podrían coexpresarse productos peptídicos diferentes para P13. La región genómica con mayor heterogeneidad es la correspondiente al gen p23. Al comparar los productos peptídicos deducidos de los clones con las de los distintos aislamientos virales, se observan situaciones distintas. Uno de los clones, pDGT76, codifica un producto semejante al de NUagA, mientras que los restantes codifican una proteína semejante a la presente en los aislamientos débiles T30 y T385 (clones pLT54, pDGT30 y pLT53) o a la del aislamiento severo T36 (pLT10). La región N terminal, que antecede al *zinc finger* de esta proteína de unión a RNA, es la que más difiere entre clones del aislamiento C268-2. De los datos obtenidos se deduce que, en C268-2, podrían expresarse dos variantes de la proteína P23, con diferencias en la región N terminal de las mismas.

Los resultados del análisis de los clones de la biblioteca evidencian que el aislamiento C268-2 contiene secuencias semejantes a las de los aislamientos débiles (T30 y T385) y a las de los causantes de *seedling yellows* (NUagA), declinamiento rápido (T36) y *stem pitting* (SY568). La coexistencia de secuencias semejantes a aislamientos virales de diferentes características biológicas puede ser el resultado de la reinoculación con distintas variantes del virus, por acción de los áfidos vectores endémicos, ya que se trata de un aislamiento de campo.

IV.C.3) ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD POBLACIONAL INTERNA ENTRE CLONES DE LA BIBLIOTECA DEL AISLAMIENTO C268-2

Los resultados descritos en la sección anterior demuestran que el aislamiento C268-2 está compuesto por más de una variante de secuencia y que algunas regiones genómicas están más conservadas que otras. Con el fin de analizar la variabilidad interna de las secuencias nucleotídicas presentes en este aislamiento viral, se realizó la comparación de secuencias entre clones situados en una misma región genómica.

Los clones de la región 5' se compararon utilizando los programas Gap y BestFit. pLT65 y pLT39, situados en la región interdominios de metiltransferasa y helicasa, mostraron una identidad de secuencia nucleotídica de 73,6% en 87 nt de solapamiento. Por otro lado, pLT60 y pLT56, que se sitúan en el dominio de helicasa, exhibieron una identidad de 76,9% en los 786 nt de solapamiento. Los valores hallados demuestran que, en esta región genómica, la identidad nucleotídica es baja, aún entre clones del mismo aislamiento.

Para analizar los clones correspondientes a la región 3' del genoma se utilizaron los programas del bloque FAS (*Fragment Assembly System*) del GCG. Por medio de estos programas se obtuvo un alineamiento de los clones de la región, que se extiende desde la mitad del gen p6 (clones pLT48 y pLT57) hasta la porción terminal de la 3' UTR (clon pLT53) del aislamiento C268-2. En la figura IV.C.3 se muestra una representación esquemática de los clones incluidos en la construcción del alineamiento múltiple (fig. C3 del Apéndice). La finalidad de este análisis es comparar fácilmente la secuencia de todos los clones de la porción 3' del genoma de C268-2. La generación de una secuencia consenso permite establecer en qué posiciones las bases se encuentran conservadas y en cuáles no lo están. En este caso, el consenso no se utiliza como sinónimo de la secuencia tipo del aislamiento sino que demuestra la variabilidad interna del mismo y evidencia a las distintas secuencias presentes. Es importante señalar que existen regiones representadas por un único clon y que en estos casos no es posible analizar la variabilidad interna.

Al analizar el alineamiento múltiple se observa, como se indicó anteriormente, que existen clones con secuencias casi idénticas. Tal es el caso de los clones pLT40 y pLT57 (bases 348 a 832 de la secuencia consenso, mitad 5' del gen p65). En la misma región, el clon pLT48 difiere de las anteriores. En la mitad 3' del mismo gen, se encontró una elevada similitud entre los clones pLT46 y pDGT27 (bases 1137 a 1636 del consenso), mientras que el clon pLT40 es diferente a ambos. La misma situación se encontró en la región genómica correspondiente a las bases 1687 a 2215 del consenso (región 3' del gen p65 e inicio del gen p61), donde los clones pLT66 y pDGT48 tienen una elevada identidad nucleotídica mientras que la de los clones pDGT27 y pDGT87 es menor.

En la región del gen p61 los clones difieren notoriamente en secuencia nucleotídica. Tal es el caso entre los clones pDGT87 y pLT7 y entre este último y pLT45.

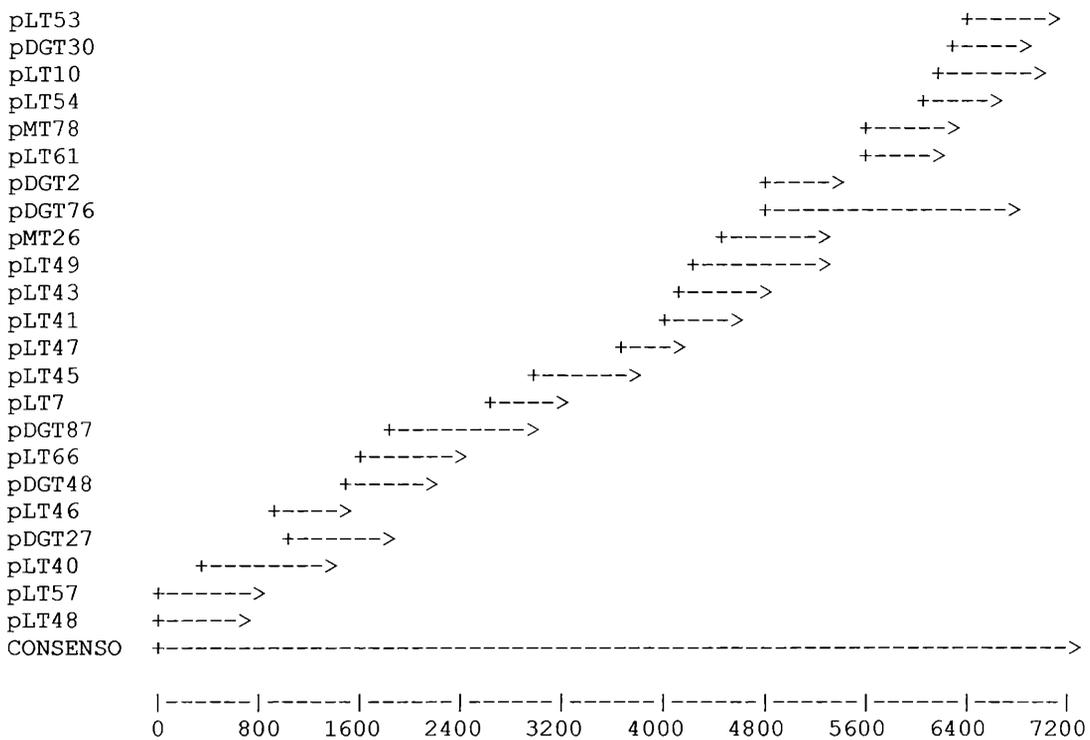


Figura IV.C.3: Esquema representativo del alineamiento de los clones de la región 3' de la biblioteca del aislamiento C268-2. En la porción inferior se indica la escala, con intervalos de 800 pb. Los clones se encuentran representados a escala.

En el sector correspondiente al gen p27 se encontraron dos situaciones distintas. La secuencia de los clones que corresponden a la porción 5', pLT45 y pLT47, es diferente; mientras que la de los clones pLT47 y pLT41, situados en la mitad 3' del gen, es muy semejante (bases 4058 a 4210 de la secuencia consenso). En la región intergénica entre p27 y p25, bases 4152 a 4240 del consenso, se hallaron diferencias en el número de bases de los clones que se solapan. Como esta región es no codificante, las deleciones presentes no afectaron a ningún producto proteico.

La región del gen p25 es la más conservada dentro del genoma viral y los clones pLT49 y pLT43 son muy semejantes entre sí (bases 4184 a 4852 del consenso). Sin embargo, en la región 3' de dicho gen se encontró un clon, pMT26, que es diferente a los anteriores. Dicha condición se mantiene en la región 5' del gen p18 (bases 4853 a 5265 del consenso), donde los clones se agruparon de a pares en cuanto a identidad de secuencia nucleotídica, pLT49 y pDGT2 por un lado y pDGT76 y pMT26 por el otro.

En la sección correspondiente a los genes p13 y p20 se hallaron dos clones, pLT61 y pMT78, prácticamente idénticos, mientras que el tercero, pDGT76, difiere con respecto a ambos (bases 5633 a 6251 del consenso).

En la región 3' de p20 y en el gen p23 se observó también un agrupamiento de a pares. En la primera región son semejantes los clones pLT10 y pDGT76, por un lado y pDGT30 y pLT54, por otro. En la segunda zona, el parecido se encuentra entre los clones pDGT30 y pDGT76, en un grupo y pLT10 y pLT53, en otro. Los últimos clones son muy semejantes entre sí, compartiendo prácticamente todos los cambios con respecto al consenso. En la región intergénica entre p20 y p23 (bases 6395 y 6479 del consenso) se observó que los clones que se solapan presentan diferente número de bases.

Del análisis de estos resultados, y en base a lo expuesto anteriormente, puede inferirse que en el aislamiento C268-2 coexisten, al menos, dos tipos de secuencias. Este aislamiento proviene de plantas de campo, expuestas a sucesivas inoculaciones por áfidos vectores y sometidas a las variaciones derivadas de un ambiente no controlado. Si bien los clones analizados provienen de tres eventos de clonado diferentes (clones con denominación pDGT, pMT y pLT respectivamente) existen semejanzas entre clones originados en tiempos distintos. En diversas regiones del genoma se encontró que dos clones de denominación distinta presentaron mayor identidad entre sí que dos clones con la misma denominación (por ej. pLT46 y pDGT27 en la región 3' de p65 son muy semejantes, mientras que pLT40 es diferente; o los grupos que se forman en la región de p23). Estos datos indicarían no sólo la coexistencia de diferentes secuencias virales dentro del aislamiento sino también su permanencia a lo largo del tiempo.

Para el estudio de variabilidad de secuencias aminoacídicas deducidas entre clones de esta biblioteca, se realizaron alineamientos múltiples de las mismas con el programa CLUSTAL W. Los alineamientos realizados corresponden a los péptidos P6, P65, P61, P27, P25, P18, P13, P20 y P23 y se muestran en la sección C del Apéndice (fig. C4 a 12).

Ninguno de los clones de la biblioteca de cDNA incluyó la secuencia de la región 5' del gen p6. Para poder realizar el análisis completo de la zona del triple bloque génico, se diseñaron *primers* específicos que permitieron su amplificación y clonado. Este gen codifica para una proteína hidrofóbica pequeña que presenta similitud con las del triple bloque génico de potex y carlavirus (Agranovsky *et al.*, 1991). En el aislamiento C268-2 existe una elevada conservación de dicha proteína ya que, tanto los clones obtenidos con *primers* de secuencia al azar (pLT48 y pLT57) como aquéllos amplificados con *primers* específicos, tienen un gran identidad aminoacídica. Existe un único cambio no conservativo en la secuencia correspondiente al clon pLT57 (fig. C4, sección C, Apéndice).

El gen p65 codifica para una proteína de 65kDa, homóloga a las chaperonas celulares de la familia HSP70, que contiene los ocho motivos conservados de la familia (fig. C5, Apéndice). Entre los clones del aislamiento C268-2 se observa un elevado grado de identidad de secuencias aminoacídicas deducidas para este gen. Se encontraron sólo dos cambios en los 593 aa de la proteína, en las posiciones 68 (N en pLT48 y C en pLT57) y 349 (G en los clones pLT40 y pDGT27 y R en el clon pLT46). Si bien se encontraron variaciones a nivel de secuencia nucleotídica entre los clones correspondientes a este gen (fig. C3, Apéndice), son mutaciones silenciosas, indicando una fuerte presión de selección sobre esta región del genoma. Para la restante chaperona codificada por el genoma viral (P61), la situación parece ser ligeramente diferente. Si bien existe una elevada identidad entre las secuencias aminoacídicas deducidas de los distintos clones presentes en dicha región, se encontró un número mayor de cambios. La mayoría de ellos son no conservativos (posiciones 80, 91, 156, 169, 171, 316, 357, 389, 391, 395, 458 y 461) aunque también existen algunos cambios conservativos (92, 97, 123, 154, 283, 361, 409 y 455). La región C-terminal del péptido es la que presenta el mayor número de cambios (fig. C6, Apéndice).

Se supone que los genes que codifican las dos proteínas de cubierta virales en CTV se originaron a partir de la duplicación de un gen único, ocurrida en un antecesor ancestral de la familia *Closteroviridae*. El gen p27 codifica la proteína de cubierta minoritaria (mCP) y p25 la mayoritaria (CP). Las secuencias de ambas proteínas tienen sólo un 42% de similitud (Febres *et al.*, 1994) aunque presentan cuatro regiones muy conservadas que incluyen los dos residuos hallados en todas las proteínas de cubierta de virus de vegetales con morfología flexuosa (R y D). Del alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de los clones de esta región genómica se desprende que la conservación es prácticamente absoluta para P27, ya que existe un único cambio en la posición 130 (fig. C7, Apéndice). En el caso de P25 también se observó un solo cambio aminoacídico (posición 204 de la proteína en el clon pDGT76). Los cuatro motivos presentes en proteínas de cubierta de CTV están perfectamente conservados. El aislamiento C268-2 da señal positiva en ensayos de ELISA con el anticuerpo monoclonal MCA13, que detecta con eficiencia aislamientos que no pertenecen a biogrupos débiles. El análisis de las secuencias aminoacídicas de todos los clones permitió corroborar la presencia del motivo I que contiene el epítipo (VVF) reconocido por dicho anticuerpo.

Los genes p18 y p13 codifican productos peptídicos que no presentan homología con proteínas de otros *Closterovirus*, ni con otras proteínas presentes en bancos de datos. Se desconoce la función que cumplen dichas proteínas en la infección y proliferación viral. En ambos casos se observaron cambios a nivel aminoacídico (fig. C9 y 10, Apéndice).

El gen p20 de CTV es homólogo al gen p21 de BYV y codifica una proteína de 20 kDa. Recientemente se demostró que las moléculas de esta proteína tienen alta afinidad entre sí y tienden a agruparse. Son responsables de la formación de los cuerpos de inclusión amorfos o “vesículas de tipo BYV” (Gowda *et al.*, 2000), característicos de las infecciones con *Closterovirus*. El alineamiento de secuencias aminoacídicas deducidas de estos clones demostró que existe una elevada conservación y que los clones pDGT76 y pLT54 son los que presentan mayor variación respecto de los demás (fig. C11, Apéndice).

El gen p23 codifica un producto peptídico de 23 kDa que no presenta homología con ninguna proteína de otros *Closterovirus*. El análisis de la secuencia aminoacídica deducida, evidenció la presencia de motivos ricos en cisteínas y residuos básicos, característicos de proteínas con capacidad de unión a ácidos nucleicos. Estos aminoácidos están conservados en distintos aislamientos analizados (Pappu *et al.*, 1997; López *et al.*, 1998). La proteína expresada en *E. coli* es capaz de unirse, de manera cooperativa y no específica de secuencia, a ssRNA y dsRNA *in vitro* (López *et al.*, 2000). Los residuos involucrados en la unión a RNA están conservados en todos los clones del aislamiento C268-2 (fig. C12, Apéndice), aunque se encontraron varios cambios en la región que los precede. En dicha región genómica las secuencias aminoacídicas deducidas forman dos grupos, por un lado los clones pLT54 y pDGT30 (similares a los aislamientos débiles) y por otro pDGT76 y pLT10 (similares a los aislamientos severos).

A pesar de la existencia de una amplia variación de secuencias nucleotídicas, es notorio que la mayoría de los cambios hallados corresponden a mutaciones silenciosas que no afectan a los potenciales productos peptídicos. Las regiones más conservadas del genoma son las correspondientes a los genes de proteína de cubierta viral y al gen que codifica para P65, indicando que sobre ellos existe una fuerte presión de selección.

CAPÍTULO IV

SECCIÓN D: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DE cDNA DEL AISLAMIENTO C268-2

La secuenciación de la totalidad de los clones de la biblioteca de CTV tuvo por objetivos, determinar cuáles eran las regiones del genoma involucradas en los patrones de hibridación diferencial observados y establecer la secuencia de un aislamiento de CTV de campo de Argentina. Es interesante destacar que hasta el momento no se ha publicado la secuencia completa de ningún aislamiento sudamericano de dicho virus.

IV.D.1) ANÁLISIS DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DEL AISLAMIENTO C268-2

En la mayor parte de los trabajos de secuenciación de genomas de CTV publicados hasta la actualidad los autores no detectaron variación en las secuencias nucleotídicas de clones generados de manera independiente (Karasev *et al.*, 1995; Mawassi *et al.* 1996; Vives *et al.*, 1999; Albiach-Martí *et al.*, 2000a). En el caso del aislamiento T385, las secuencia de regiones solapantes eran prácticamente idénticas, con diferencias menores al 0,5% (Vives *et al.*, 1999). La primera publicación que cita la ocurrencia de variabilidad entre secuencias de los clones analizados pertenece a Yang *et al.*, (1999). Dicho trabajo reporta la identificación de 198 variaciones distribuidas a lo largo de los 19249 nt del genoma del aislamiento severo de California, SY568. Las mismas se encuentran en la región de la poliproteína viral, en el gen que codifica para la RNA polimerasa viral dependiente de RNA y en el gen p27 (Yang *et al.*, 1999). Estas variantes permiten suponer que la población del aislamiento SY568 está constituido por una mezcla de genomas diferentes.

En el caso del aislamiento C268-2 la variabilidad de secuencia nucleotídica entre los distintos clones es muy elevada. Las mayores diferencias se encuentran en la región 5' donde existe alrededor del 55% de identidad nucleotídica entre clones que se solapan parcialmente. De este dato se desprende que la variabilidad interna del aislamiento, en esta región, es equiparable a la que existe entre distintos aislamientos virales, ya que al comparar las secuencias de la región 5' UTR de los aislamientos T36 y SY568, por ejemplo, se obtienen valores de identidad nucleotídica del 56%.

De acuerdo a los resultados del análisis de variabilidad poblacional del gen p27 (Cap. III), en el aislamiento C268-2 coexisten secuencias que difieren en más de un 10%, incluso en una región conservada del genoma como la de este gen. Datos semejantes se encontraron al comparar las secuencias de los clones de la biblioteca de cDNA. Analizados estos resultados en conjunto, se puede

considerar que el aislamiento C268-2 estaría formado, al menos, por dos tipos de secuencias virales. Además, según la región genómica y los clones considerados, la identidad nucleotídica es superior cuando la comparación se hace con aislamientos virales presentes en banco de datos que entre clones de C268-2.

IV.D.2) ANÁLISIS DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DEDUCIDAS DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DEL AISLAMIENTO C268-2

La comparación de secuencias aminoacídicas deducidas demostró que existen distintos grados de conservación de las mismas de acuerdo a la región genómica estudiada. La región 5' del genoma viral es la que muestra mayor variación, mientras que la más conservada es la correspondiente a las proteínas de cubierta virales, donde los polimorfismos nucleotídicos observados se deben a mutaciones silenciosas, indicando que la presión de selección sobre dichos genes es muy fuerte. De acuerdo a uno de los postulados del concepto de quasiespecies virales, toda la "nube" de secuencias presentes en un aislamiento es la unidad de selección (Domingo *and* Holland, 1997). De manera coincidente con lo observado en el caso del aislamiento SY568, la mayor parte de las mutaciones detectadas son silenciosas. Por ende, las variantes poblacionales son toleradas siempre y cuando no produzcan cambios que se manifiesten alterando la estructura o funcionalidad de los productos peptídicos.

Las secuencias aminoacídicas más conservadas corresponden a P65 y a las proteínas de cubierta virales. P65 es una proteína con alta homología con las chaperonas celulares de la familia HSP70, que contiene los ocho motivos conservados de la familia, necesaria y suficiente para el transporte del virus célula a célula.

Por otro lado, se encontró mayor variabilidad en el caso de los productos peptídicos deducidos a partir de las secuencias de los clones correspondientes a la región *downstream* del gen p25. Esta situación es particularmente notoria cuando se analiza los productos deducidos correspondientes a P23. Esta proteína tiene motivos ricos en cisteínas conservados en los distintos aislamientos analizados y es capaz de unirse, de manera cooperativa y no específica de secuencia, a ssRNA y dsRNA *in vitro* (López *et al.*, 2000). Del análisis de las secuencias deducidas de los clones de la biblioteca se desprende que, en este aislamiento se expresan, al menos potencialmente, dos péptidos que difieren en el extremo N terminal. De todos modos, en ambos se encuentran conservados los residuos cargados positivamente que están involucrados en la interacción con RNA y los residuos cisteína e histidina que forman el potencial *zinc-finger*.

CAPÍTULO V

IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL DE CLONES DEL AISLAMIENTO C268-2 Y APLICACIÓN A LA CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CTV

CAPÍTULO V

SECCIÓN A: INTRODUCCIÓN A LA IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL DE CLONES DEL AISLAMIENTO C268-2 Y APLICACIÓN EN LA CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CTV

V.A.1) MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CTV

Una de las finalidades básicas del estudio de CTV consiste en la identificación de las regiones génicas responsables de las diferencias de comportamiento de los distintos aislamientos virales en plantas infectadas. Este conocimiento redundará en la disponibilidad de métodos que permitan diferenciar aislamientos que exhiban distinto grado de virulencia. En países donde la tristeza es endémica y está presente el vector más eficiente del virus, *T. citricida*, es necesario disponer de métodos adecuados de identificación de los aislamientos virales severos para erradicar los árboles a los que infectan y así evitar su dispersión. Tal es el caso de Argentina, donde a pesar del uso de portainjertos tolerantes han aparecido aislamientos extremadamente virulentos en distintas regiones del país. También es de fundamental importancia el conocimiento de la estructura, relaciones y dinámica poblacional de los aislamientos de CTV de campo, para entender la complejidad del problema y poder diseñar estrategias para el control de la enfermedad. En particular, la utilización de aislamientos virales en protección cruzada requiere del conocimiento exhaustivo de la estructura poblacional del material a emplear en la misma, especialmente en lo referente a la ausencia de variantes severas del virus.

Tal como se describió en la sección inicial, en la caracterización de aislamientos de CTV se han aplicado distintos métodos. Uno de los más utilizados es el *indexing* biológico en plantas indicadoras, pero es un método costoso y los resultados se obtienen en un plazo relativamente prolongado. Además, no resulta adecuado para el análisis de rutina de un número elevado de plantas o en el caso de aislamientos que causan declinamiento rápido. Los análisis por PCR son extremadamente sensibles pero en el caso de virus con genoma de RNA es necesario realizar la síntesis del cDNA previo a la amplificación. Esta dificultad puede resolverse mediante técnicas que permiten unificar ambas reacciones, pero un problema adicional puede ser la sensibilidad de la técnica cuando se requiere hacer análisis de rutina en laboratorios de campo. En estos casos donde se procesa una gran cantidad de muestras, las contaminaciones son frecuentes. Otra alternativa es la técnica de inmunoensayo sobre improntas de tejido (DTBIA, Garnsey, *et al.*, 1993). El antígeno viral, unido a membranas nitrocelulosa se detecta, directa o indirectamente, con anticuerpos. Utilizando membranas con elevada afinidad por ácidos nucleicos, la detección se realiza por medio de sondas marcadas

por métodos radiactivos o no radiactivos. Ambos variantes son de elección debido a que no requieren tratamiento previo de la muestra para realizar la "impronta" y permiten la manipulación de gran cantidad de muestras a campo. La recolección de muestras y el análisis, por métodos inmunológicos o por hibridación, pueden practicarse a distintos tiempos e incluso permite conservar las muestras en la membrana por tiempos prolongados. La separación temporal entre los procesos de toma de las muestras y análisis de las mismas es una de las mayores ventajas de estos métodos. poder

V.A.2) IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE CLONES DE LA BIBLIOTECA DE C268-2 QUE PERMITAN CARACTERIZAR AISLAMIENTOS DE CTV

La aparición de aislamientos muy severos en plantaciones de pomelos rojos y rosados, tanto en el NOA como recientemente en Entre Ríos, constituye un problema grave para la industria citrícola de Argentina. Debido a ello es de sumo interés disponer de metodologías que permitan la detección rápida de aislamientos virulentos y la erradicación de los árboles infectados con ellos. Por otra parte, la identificación de regiones genómicas marcadoras que permitan la diferenciación de aislamientos de CTV de acuerdo a sus características biológicas es uno de los fines de la investigación en este tema. Una alternativa es la síntesis de sondas de cDNA, a partir de dsRNA de distintos aislamientos virales. Estas sondas se emplean en ensayos de hibridación y se determina el grado de homología existente entre distintos aislamientos virales. Distintos investigadores emplearon esta técnica para mejorar la discriminación entre aislamientos (Rosner *et al.*, 1986; Semorile *et al.*, 1993), identificar cambios en la estructura poblacional de aislamientos luego de la transmisión por áfidos (Albiach-Martí, 1995) o controlar la evolución de ensayos de protección cruzada (Albiach *et al.*, 1996). La importancia de este tipo de análisis es la inclusión del genoma completo, al menos en teoría, en lugar de restringir el estudio a uno o más genes virales.

Con la finalidad de detectar regiones que muestren variación entre aislamientos, se utilizaron los clones de la biblioteca de cDNA del aislamiento C268-2. Los mismos se digirieron con dos combinaciones alternativas de enzimas de restricción, *BamH I / Hinf I / Xho I* o *BamH I / Dde I / Xho I*, para liberarlos del vector y generar fragmentos de menor tamaño. Los fragmentos se analizaron por *Southern blot* con sondas de cDNA obtenidas a partir de dsRNA de dos aislamientos de CTV de características biológicas diferentes, T387, severo y T312 débil. El primero de ellos es originario de Japón mientras que el segundo fue identificado en España. Como resultado de estos experimentos se encontraron varios clones que presentaron regiones de hibridación diferencial entre ambas sondas (Semorile *et al.*, 1993). Este trabajo se realizó en el laboratorio en una etapa previa al presente trabajo de tesis.

Los patrones de hibridación obtenidos podían deberse a variaciones de secuencia entre el clon y los aislamientos utilizados como sonda indicando que los aislamientos virales que dieron origen a las sondas difieren entre sí en dichas regiones genómicas. Con el fin de confirmar y ampliar los resultados previos se realizaron ensayos de *Southern blot* con estos y otros aislamientos virales. El análisis de los patrones de hibridación obtenidos permitió identificar regiones genómicas en las que la señal de hibridación variaba de acuerdo a la sonda empleada. Las regiones identificadas se utilizaron como sondas para caracterizar aislamientos de CTV en ensayos de *dot blot*. Los procedimientos y resultados obtenidos en el desarrollo de esta etapa del trabajo se describen a continuación.

CAPÍTULO V

SECCIÓN B: MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL Y APLICACIÓN A LA CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CTV

V.B.1) PREPARACIÓN DE CLONES PARA LOS ENSAYOS DE *SOUTHERN BLOT*

A partir de los clones de la biblioteca de cDNA del aislamiento C268-2, previamente obtenida en el laboratorio (Semorile *et al.*, 1993) se realizaron minipreparaciones de DNA plasmídico. Una alícuota de las mismas se digirió con enzimas de corte único en el *polylinker* (*Xho* I y *Bam*H I) y los fragmentos se resolvieron en geles de agarosa 0,8%-TAE 1x para determinar el tamaño de los insertos. Asimismo, se digirieron alícuotas de las minipreparaciones con distintas combinaciones de enzimas de restricción. En todos los casos se utilizaron dos enzimas de sitio de corte único en el *polylinker* del vector, *Bam*H I y *Xho* I, y una enzima de corte frecuente, *Hinf* I o *Dde* I. Las digestiones se realizaron de acuerdo a las indicaciones del proveedor (NEB), considerando la definición de unidad enzimática y los valores de sobrevida de la enzima. Una alícuota de los productos de restricción se resolvió en gel de agarosa 2%-TAE 1x para verificar la calidad de la digestión y determinar el tamaño de los fragmentos de cada clon (fig. V.B.1).

V.B.2) ENSAYOS DE *SOUTHERN BLOT*

V.B.2A) PREPARACIÓN DE MEMBRANAS

Se realizaron electroforesis en las condiciones descritas y se resolvieron los fragmentos correspondientes a los diversos clones. Las muestras se trataron y transfirieron a membrana de nylon (ZetaProbe, Bio-Rad), de acuerdo a lo descrito en la sección VIII.2 de Materiales y Métodos. Las transferencias se llevaron a cabo durante un tiempo mínimo de 16 h. Las muestras se fijaron a la membrana por iluminación con luz ultravioleta (302 nm) durante 3 min.

V.B.2B) PREPARACIÓN DE LAS SONDAS DE cDNA

Las sondas utilizadas se obtuvieron por la técnica de *short copy* cDNA, usando oligonucleótidos de secuencia al azar (*random primers*) de 6 bases de longitud. Como molde de las reacciones de síntesis se utilizaron alícuotas equivalentes a unos 100 ng de dsRNA de los distintos aislamientos. La cuantificación se realizó en geles de agarosa 0,6%-TAE 1x utilizando un marcador de masa conocida. La síntesis de los fragmentos marcados se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos, utilizando la enzima AMV-RT. Los fragmentos marcados se purificaron por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50 y se determinaron las cpm en una alícuota equivalente al 1% del volumen de cada fracción eluída de la columna. Las

fracciones correspondientes a la sonda se congelaron a -80°C hasta su utilización.

V.B.2C) HIBRIDACIÓN

Las membranas se prehibridaron durante 90 min con solución de prehibridación a 68°C , para bloquear las regiones carentes de ácidos nucleicos y minimizar hibridaciones inespecíficas. Posteriormente, se agregó la sonda, desnaturalizada por incubación a 100°C a Baño María durante 3 min. Se emplearon alrededor de 2×10^6 cpm por ensayo. Las hibridaciones se realizaron en condiciones estrictas (68°C), durante 14 h como mínimo. A continuación, se recuperaron las sondas y los filtros se lavaron, durante 15 min cada vez, con SSC 6x-SDS 0,1% y SSC 2x-SDS 0,1% a temperatura ambiente. Los resultados de la hibridación se obtuvieron por autorradiografía.

V.B.3) ENSAYOS DE DOT BLOT

Los ensayos de *Southern blot* permitieron identificar fragmentos de restricción de los clones de la biblioteca, que mostraron diferencias de hibridación entre sondas sintetizadas a partir de aislamientos pertenecientes a distintos biogrupos. Estos fragmentos se utilizaron como sondas en ensayos de hibridación en *dot blot* con dsRNA de los aislamientos a ser caracterizados.

IV.B.3A) PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO A UTILIZAR

Se utilizó un equipo Bio-Dot™ (Bio-Rad) que permite aplicar las muestras a la membrana ejerciendo vacío. Dichas muestras pueden aplicarse desnaturalizadas o, alternativamente, la desnaturalización puede llevarse a cabo sobre la membrana.

Para evaluar el rendimiento de ambos métodos se los comparó utilizando distintas concentraciones de la misma muestra (fig. V.B.2a, b y c). Se sembraron 5, 10, 50 y 100 ng de dsRNA del aislamiento C269-6. La sonda corresponde al gen p25 de CTV y se sintetizó por el método de *random priming*. Los filtros se prehibridaron durante 90 min a 68°C ; posteriormente, se agregó la sonda desnaturalizada y se incubó durante toda la noche a igual temperatura. Se efectuaron lavados con SSC 6x-0,1% SDS y con SSC 2x-0,1% SDS, a temperatura ambiente durante 15 min cada vez. La figura V.B.2 muestra los resultados obtenidos con cada protocolo. En V.B.2a las muestras se diluyeron en agua bidestilada estéril y se sembraron sin desnaturalizar. Se lavaron con 500 μl de *buffer* TE 1x y se desnaturalizaron apoyando la membrana, durante 5 minutos, sobre un papel de filtro humedecido en solución de NaOH (50 mM) y NaCl (150 mM). La neutralización se realizó durante el mismo tiempo sobre un papel embebido en una solución de Tris-HCl pH 7,2 (50 mM) y NaCl (150 mM). La membrana se incubó durante 5 min sobre un papel con SSC 2x antes de fijar el RNA por incubación con calor (80°C durante 1 h). En las figuras V.B.2b y c las muestras se desnaturalizaron por calor (100°C a

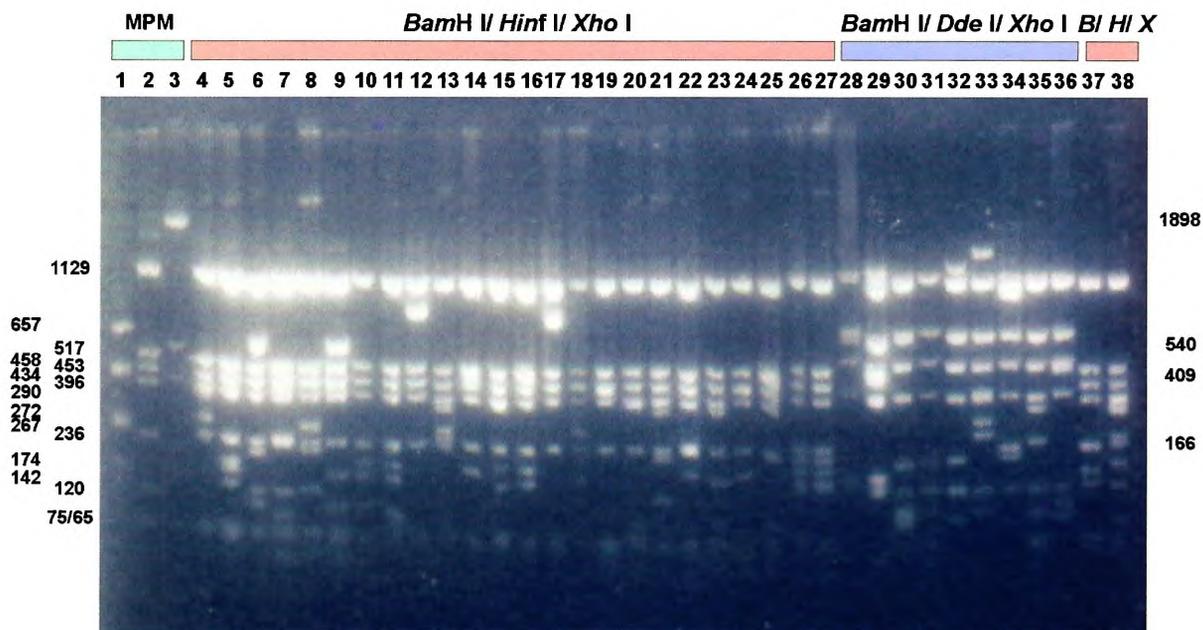


Figura V.B.1: Separación en gel de agarosa 2%-TAE 1 X de los productos de digestión de los clones de la biblioteca de cDNA del aislamiento C268-2. Calles 1, 2 y 3: marcadores de PM, plásmido pcDNA II digerido con las enzimas *Hae* III (calle 1), *Hinf* I y *Hind* III (calle 2) o *Dde* I (calle 3). Los tamaños de los fragmentos correspondientes a las calles 1 y 2 se indican a la izquierda de la figura y los de la calle 3 se señalan a la derecha de la misma. En ambos casos se expresan en pb. En la porción superior de la figura se indica la combinación enzimática utilizada en la digestión de los clones. Calles 4 a 26: clones pLT7, pLT39, pLT40, pLT41, pLT43, pLT45, pLT46, pLT47, pLT48, pLT49, pLT53, pLT54, pLT56, pLT57, pLT60, pLT61, pLT64, pLT65, pLT66, pMT26, pMT78 y pDGT2, respectivamente. Calles 27 y 28: doble siembra del clon pDGT27. Calles 28 a 38: clones pLT10, pLT45, pLT48, pLT57, pDGT30, pMT54, pMT59, pMT78, pDGT48 y pDGT76, respectivamente.

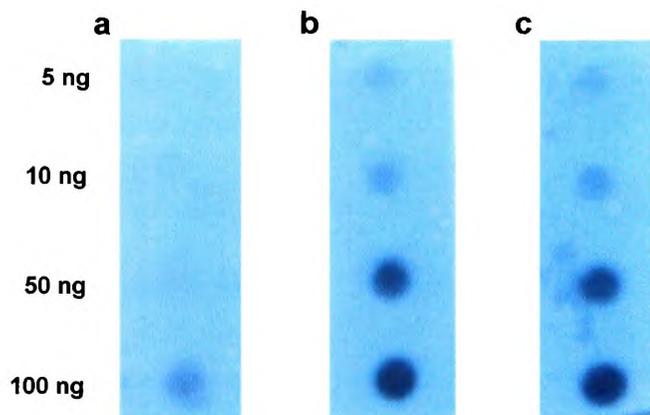


Figura V.B.2: Puesta a punto del ensayo de *dot blot*. **a:** muestras desnaturalizadas *in situ* con NaOH. **b** y **c:** muestras previamente desnaturalizadas por calor en presencia de formamida desionizada. En **c** se realizó un lavado posterior de las muestras con *buffer* TE 1x. La sonda utilizada corresponde al gen p25 de CTV. El dsRNA aplicado pertenece al aislamiento C269-6. En la figura se indican las masas sembradas en cada punto (*dot*). Exposición de 20 h.

Baño María, durante 2 min) en presencia de un volumen de formamida desionizada y se mantuvieron en agua-hielo hasta la siembra. Se aplicaron a la membrana por medio de vacío, y en el caso de la figura V.B.2c se realizó un lavado adicional con *buffer* TE 1x. El RNA se fijó a las membranas por horneado a 80°C durante 1 h.

En la figura se observa que la desnaturalización del dsRNA, previo a la siembra, aumenta la sensibilidad de detección. Utilizando métodos que usan desnaturalización previa se detectan 5 ng de muestra mientras que por el método alternativo se obtiene un resultado semejante con una masa de 50 ng. De acuerdo a estos resultados, para la realización del presente trabajo las muestras se desnaturalizaron antes de aplicar a la membrana. Dado que el lavado con TE 1x no mejora la calidad de la hibridación (fig. V.B.2c), se decidió eliminar este paso.

V.B.3B) DETERMINACIÓN DE LA MASA ÓPTIMA DE LA MUESTRA

Una vez elegido el protocolo de trabajo se realizaron ensayos para determinar la masa óptima de dsRNA a aplicar para obtener una buena señal. Se utilizó dsRNA del aislamiento C269-6 y la sonda descrita en la sección anterior. Para demostrar, además, la especificidad de la hibridación se incluyó como control, una masa equivalente de RNA total de planta sana. La prehibridación e hibridación se realizaron en las condiciones indicadas y los lavados fueron: dos con SSC 6x-SDS 0,1%, dos con SSC 2x-SDS 0,1% y dos con SSC 1x-SDS 0,1% (cada uno durante 15 min y a temperatura ambiente).

Los resultados se observan en la figura V.B.3. Si bien es notorio que aún se detecta señal con 5 ng, las mejores señales se lograron con masas entre 10 y 100 ng. Una masa equivalentes de RNA de planta sana no mostró señal de hibridación en ningún caso, indicando la especificidad de la reacción. De acuerdo con estos resultados, en los ensayos de *dot blot* se sembraron, aproximadamente 25 ng de dsRNA de cada aislamiento. Las excepciones son los aislamientos K (biogrupo I) y Capaño Bonito multiplicado en naranjo dulce Valencia (biogrupo V), de los cuales no se disponía de suficiente dsRNA, por lo cual se sembraron masas menores.

IV.B.3C) CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN Y LAVADO

En el caso de sondas sintetizadas por el método de *random priming* se utilizaron alrededor de $1,2 \times 10^6$ cpm de la sonda elegida por ensayo. Las prehibridaciones e hibridaciones se realizaron a 68°C, durante 90 min y 16 h, respectivamente. Los filtros se sometieron luego al siguiente procesamiento: a) tres lavados de 15 min cada uno con SSC 2x-SDS 0,1%, a temperatura ambiente; b) tres lavados de 15 min cada uno con SSC 0,1x-SDS 0,5%, a 68°C, c) dos lavados de 10 min cada uno con SSC 2x a temperatura ambiente y exposición a placas radiográficas (-80°C) el tiempo necesario.

En el caso de sondas sintetizadas por PCR, se utilizaron entre 0,7 y 1×10^6 cpm en cada reacción de hibridación. Inicialmente, los ensayos se efectuaron en las condiciones de hibridación y lavados descritas. En condiciones tan estrictas sólo ocurre hibridación cuando la identidad nucleotídica es superior al 95%. Con sondas de longitud completa, como ocurre en la síntesis por PCR, pueden ocurrir *mismatches* que desestabilizan la hibridación y facilitan el despegado de las mismas durante los lavados. La ausencia de hibridación positiva en estas condiciones obligó a disminuir la temperatura de hibridación y de lavado inicialmente a 60°C y posteriormente a 55°C. Como problema adicional, en otros ensayos, se detectó menor cantidad de radiactividad unida a los filtros. En este tipo de sondas resulta frecuente que las hebras se renaturalicen en solución y disminuya la masa de sonda disponible. Para salvar este inconveniente las mismas se sintetizaron por PCR asimétrica, con el objeto de enriquecer la población en una de las hebras marcadas y evitar la renaturalización.

V.B.4) CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS POR TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO

Para estimar la concentración de las muestras utilizadas en los ensayos de *dot blot*, se cuantificó la masa de las mismas por tinción con bromuro de etidio. Para ello las muestras se colocaron, sobre un portaobjetos siliconado para evitar dispersión del líquido. Cada muestra corresponde a alícuotas de 50 μ l de agua bidestilada estéril a las que se le agregó 1 μ l de bromuro de etidio de concentración inicial 10 mg/ml y 0,25 μ l de cada una de las muestras de dsRNA de los distintos aislamientos a ser cuantificados (fig. V.B.4). Como control de masa se incluyeron distintas cantidades del plásmido pcDNA II cuantificado por espectrofotometría. Con las diferentes masas del plásmido control se realizó una curva de calibración sobre la cual se extrapolaron las concentraciones de las muestras utilizando el programa *Gel Compare* (Applied Math).

V.B.5) SÍNTESIS DE SONDAS MARCADAS RADIATIVAMENTE

V.B.5A) POR *RANDOM PRIMING*

Para la síntesis de sondas por *random priming* los insertos se liberaron por digestión y los fragmentos de interés se purificaron a partir de un gel de agarosa. Como moldes se utilizaron cantidades equimolares de los distintos fragmentos. Las sondas se purificaron y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo líquido. En cada ensayo se utilizaron alrededor de $1,2 \times 10^6$ cpm de la sonda elegida.

V.B.5B) POR PCR

Para utilizar como sondas los fragmentos génicos inferiores a 150 pb que exhibieron hibridación diferencial, la incorporación de un nucleótido radiactivo se realizó por PCR. Para ello, se diseñaron varios pares de *primers* que permitieran su amplificación a partir de los clones de origen. El diseño de los

primers se realizó con los programas Prime (GCG) y Oligos. La elección de los mismos resultó compleja ya que no se deseaba incluir regiones que no mostraron hibridación diferencial y, por ende, se trabajó con secuencias muy acotadas en tamaño. Obtenidos los distintos pares de *primers* (sección A2 del Apéndice) se los probó individualmente en reacciones de amplificación con DNA plasmídico de los distintos clones y el *primer* complementario de M13. De este modo, se comprobó la especificidad individual de cada *primer* y se estableció su temperatura óptima de *annealing*. Posteriormente, se realizaron las reacciones con los distintos pares de *primers* diseñados para la amplificación de las regiones diferenciales y en todos los casos se obtuvieron productos de amplificación del tamaño adecuado. Realizada esta comprobación se efectuaron reacciones en presencia de un nucleótido radiactivo para obtener sondas marcadas, de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Se incorporaron 10 μCi de $5'[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dATP}$ por reacción y la concentración final de nucleótidos no marcados fue 500 μM para dCTP, dGTP y dTTP y 50 μM para dATP. El dATP no marcado se agrega para evitar que la concentración de dicho nucleótido sea el factor limitante de la reacción. Las amplificaciones se efectuaron en un ciclador *Air ThermoCycler 1605 (Idaho)*, en capilares de 50 μl de capacidad, con las siguientes condiciones de ciclado: a) desnaturalización inicial: 94°C, 90 min; b) 45 ciclos que constan de: desnaturalización (94°C, 5 s), *annealing* (40°C, 10 s) y extensión (72°C, 40 s) y c) extensión final: 72°C, 4 min. Se incluyeron controles reemplazando el molde por agua bidestilada estéril para verificar la ausencia de contaminación en los reactivos y pipetas utilizados.

Los productos marcados se purificaron por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G50 y una alícuota se sometió a electroforesis en gel de agarosa 0,8%-TAE 1x, para verificar la integridad y el tamaño de las sondas. Luego de la electroforesis, los ácidos nucleicos se fijaron en la matriz del gel por incubación de 15 min con TCA al 10% y de 15 min en etanol 70%. El gel se secó con papel y se reveló por autorradiografía. El control de las sondas obtenidas, correspondientes a la amplificación de los fragmentos diferenciales de los clones pLT40, pLT41, pLT47 y pLT54, se observan en la figura V.B.5.

V.B.5C) POR PCR ASIMÉTRICA

La obtención por PCR asimétrica permite enriquecer la población en una de las hebras, disminuyendo así las posibilidades de renaturalización. De esta manera se evita la competencia que se establece entre los ácidos nucleicos fijados en la membrana y los que están en solución. En las reacciones de PCR asimétrica se utilizan relaciones 100:1 o 50:1 en las concentraciones de ambos *primers*. En los primeros ciclos de la reacción ambos *primers* sirven de iniciadores de la síntesis de DNA y en ciclos sucesivos se consume el que está en menor

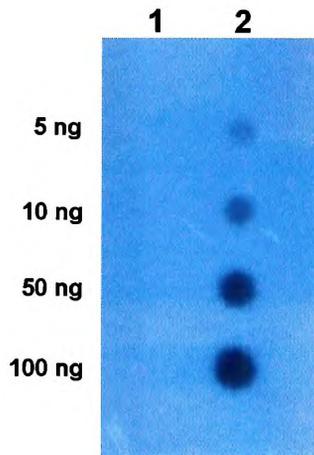


Figura V.B.3: Ensayo de sensibilidad de detección de RNA en *dot blot*. Las masas sembradas en cada *dot* se indican en la figura. Columna 1: masas crecientes de RNA total extraído de planta sana. Columna 2: masas crecientes de dsRNA del aislamiento C269-6. La hibridación se realizó con una sonda correspondiente al gen p25 obtenida por *random priming*.

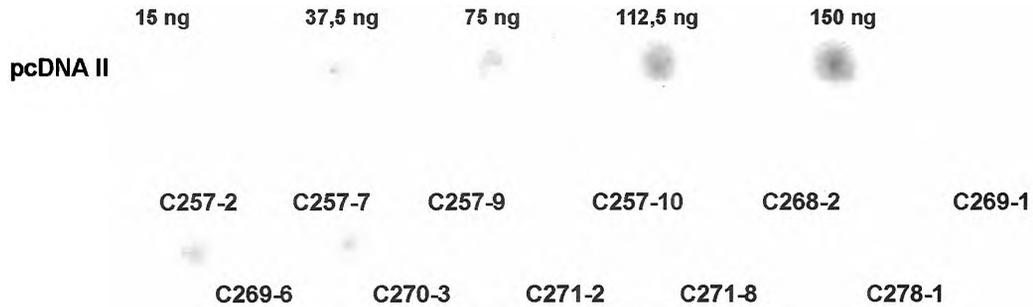


Figura V.B.4: Cuantificación de aislamientos argentinos de CTV. Imagen invertida de fluorescencia de bromuro de etidio/ UV. Como patrón de masa se utilizaron distintas concentraciones del plásmido pcDNA II. Los nombres de los distintos aislamientos comparados se indican en la figura. En cada punto se sembró un volumen igual de una preparación de dsRNA viral.

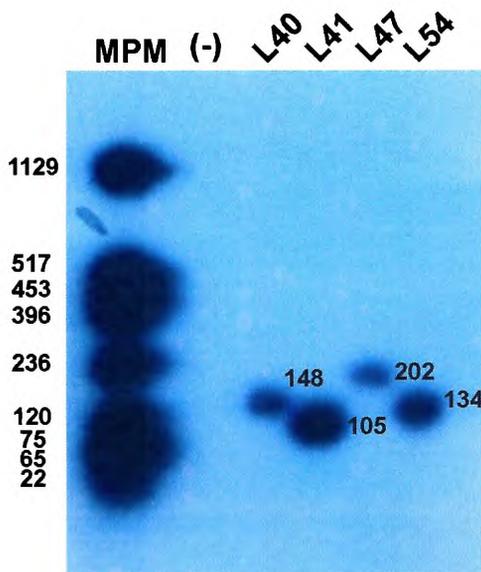


Figura V.B.5: Sondas radiactivas sintetizadas por PCR. Se observan los productos de amplificación correspondientes a los fragmentos diferenciales de los clones pLT40, pLT41, pLT47 y pLT54. En la figura se indican, en pb, los tamaños esperados. Como marcador de PM (carril MPM) se utilizó el plásmido pcDNA II/ *Hinf* I/ *Hind* III marcado por la técnica de *fill-in*. Los tamaños de las bandas del marcador de PM se indican a la izquierda.

concentración. De esta manera, una vez titulado el *primer* que está en defecto se produce un incremento lineal de una sola de las hebras del DNA.

Como el material fijado a la membrana es dsRNA se puede realizar PCR asimétrica incrementando cualquiera de las dos hebras de la sonda. En una primera etapa se realizaron PCRs asimétricas individuales con un *primer* de cada par en exceso y se analizó la incidencia en el rendimiento al utilizar un *primer* u otro en defecto. Las amplificaciones se efectuaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, utilizando el ciclado citado en la sección anterior (V.B.5B). La relación entre ambos *primers* fue de 50:1, de modo que las concentraciones finales son de 1 μ M y 0,02 μ M, respectivamente. En el caso de los fragmentos diferenciales de los clones pLT45, pDGT2, pLT40 y pLT41, se obtuvo mayor rendimiento cuando se utilizó en exceso el *primer* directo, mientras que la situación inversa se encontró con el clon pLT54, por lo cual se los usó de esa manera en la reacciones de producción de sondas.

Posteriormente las reacciones se realizaron con la inclusión de 10 μ Ci de 5' [α - 32 P] dATP. Los productos marcados se purificaron por pasaje por columna de cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G50 y una alícuota de las mismas se sometió a electroforesis en gel de agarosa para verificar tamaño e integridad.

V.B.6) PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DEL ENSAYO DE *NORTHERN BLOT*

Para lograr buenos resultados con la técnica de *Northern blot* se debió adecuar el protocolo al material utilizado (dsRNA). Para mejorar la sensibilidad de la técnica se modificó la etapa de desnaturalización del RNA. Cuando se trabaja con ssRNA la desnaturalización se efectúa en frío (4°C) durante no más de 15 min, para evitar la degradación del RNA. Estas condiciones no son suficientes para lograr la desnaturalización total del dsRNA. Para la puesta a punto de este paso cantidades equivalentes de dos preparaciones diferentes de dsRNA del aislamiento C268-2 se resolvieron, por quintuplicado, en gel de agarosa 0,6%-TAE 1x. El gel se cortó en cinco fracciones, cada una de las cuales incluía a ambas muestras. Cada fracción se procesó de manera diferente (fig. V.B.6): dos de ellas se incubaron en solución de desnaturalización a temperatura ambiente durante 20 y 30 min, respectivamente (a y b) mientras que las tres restantes se incubaron a 4°C, durante 20, 30 y 45 min, respectivamente (c, d y e). Finalizadas las incubaciones, las fracciones de gel se neutralizaron con *buffer* fosfato 25 mM y se transfirieron, por capilaridad a membrana, durante 20 h.

Los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana por exposición a luz UV, durante 3 min. La membrana se incubó con solución de prehibridación, durante 90 min, a 60°C y se hibridó, a la misma temperatura, durante 15 h, con la sonda mixta de p27 utilizada para la detección de clones recombinantes de los aislamientos argentinos de CTV (sección III.B.4 y fig. III.B.5b). Se realizaron dos lavados, de

15 min cada uno a temperatura ambiente, el primero con SSC 6x-SDS 0,1% y el segundo con la misma concentración de SDS pero con SSC 2x. El resultado de la hibridación se analizó por autorradiografía (20 h de exposición a -80°C). En la figura V.B.6 se observa que, con 20 min de incubación a temperatura ambiente la señal es muy baja (a), mientras que en frío no se obtiene señal (c). Con tiempos más prolongados de incubación se obtuvieron mejores resultados tanto cuando la desnaturalización se realizó en frío como a temperatura ambiente (b, d y e). A partir de los datos obtenidos en este ensayo se decidió extender los tiempos de desnaturalización a 30 min y se optó por realizar esta etapa en frío.

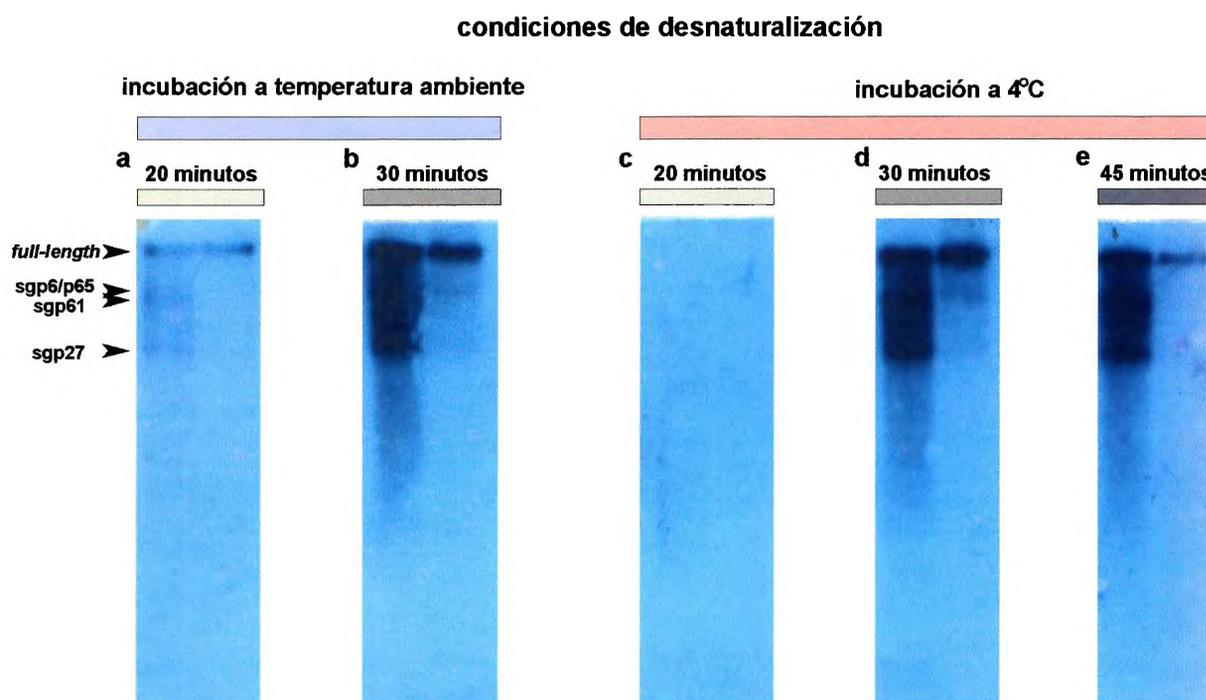


Figura V.B.6: Puesta a punto de las condiciones para los ensayos de *Northern blot*. Las autorradiografías corresponden a diferentes condiciones de desnaturalización (tiempos y temperatura). En la hibridación se utilizó una sonda mixta del gen p27. Las bandas correspondientes al dsRNA *full-length* y a los RNAs subgenómicos de los genes p6/ p65, p61 y p27 se señalan con puntas de flecha.

CAPÍTULO V

SECCIÓN C: RESULTADOS OBTENIDOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL Y APLICACIÓN A LA CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CTV

V.C.1) UBICACIÓN DE LAS REGIONES DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DEL AISLAMIENTO C268-2

El análisis de los ensayos previos de *Southern blot* permitió observar que algunos fragmentos de restricción de los clones de la biblioteca de cDNA de C268-2 mostraban diferencias en su patrón de hibridación, de acuerdo al biogrupo del aislamiento que dio origen a la sondas (Semorile *et al.*, 1993). En ese momento se emplearon dos sondas, obtenidas de aislamientos de CTV de características biológicas diferentes. Uno de ellos, T387, de origen japonés, producía los síntomas típicos de los aislamientos severos mientras que el otro, T312, de España, se comportaba como débil. Los resultados de la hibridación indicaron la presencia de diferencias de secuencias nucleotídicas en algunas regiones genómicas, entre la población viral del aislamiento origen de la sonda y la población viral de C268-2. Una vez establecidas las secuencias completas de los clones, se realizaron mapas de restricción teóricos (programa Map) para establecer la posición de fragmentos que mostraron hibridación diferencial. Así se ubicó a cada una de las bandas en el genoma viral. El análisis de las secuencias nucleotídicas de clones situados en la misma región permitió establecer la relación existente entre ellos y justificar los patrones de hibridación observados.

En la figura V.C.1 se esquematiza la posición de los fragmentos de hibridación diferencial identificados previamente (Semorile *et al.*, 1993). Se observa que diez clones presentaron bandas diferenciales con T387 y siete con T312. Un solo clon, pMT26, mostró un fragmento de hibridación diferencial con T387 y otro con T312. Por otro lado, doce clones mostraron igual patrón de hibridación con ambas sondas. Los fragmentos que exhibieron hibridación diferencial no están restringidos a una región del genoma viral sino que se distribuyen en distintas zonas del mismo. Dichas regiones génicas son: 1) poliproteína; 2) triple bloque génico (p6, p65 y p61); 3) genes de proteína de cubierta virales y 4) genes p13, p20 y p23.

Los clones que dieron señal positiva con la sonda derivada del aislamiento T387 corresponden al primer dominio de proteasa (pMT54), al dominio de helicasa (pLT60 y pLT56), al gen p65 (pLT40, pDGT27 y pLT46), al gen p27 (pLT45 y pLT47), a la región intergénica entre p27 y p25 (pLT43 y pLT41) y a la porción 3' de este último gen (pMT26) (fig.V.C.1). Por otro lado, los clones que mostraron señal positiva con T312 se encuentran en las siguientes regiones: interdominio metiltransferasa-helicasa (pLT65 y pLT39), gen p25 (pMT26),

región intergénica p18 y p13 (pDGT76), p13 (pDGT76), p20 (pDGT76) y p23 (pLT54 y pDGT30) (fig.V.C.1). Los clones que mostraron igual patrón con ambas sondas corresponden a las regiones: dominio de metiltransferasa (pLT64 y pMT59), triple bloque génico (pLT57, pLT48, pDGT48, pLT66 y pDGT87), gen p25 (pLT49), genes p13 y p20 (pLT65 y pMT78) y p23 (pLT53 y pLT10) (fig.V.C.1).

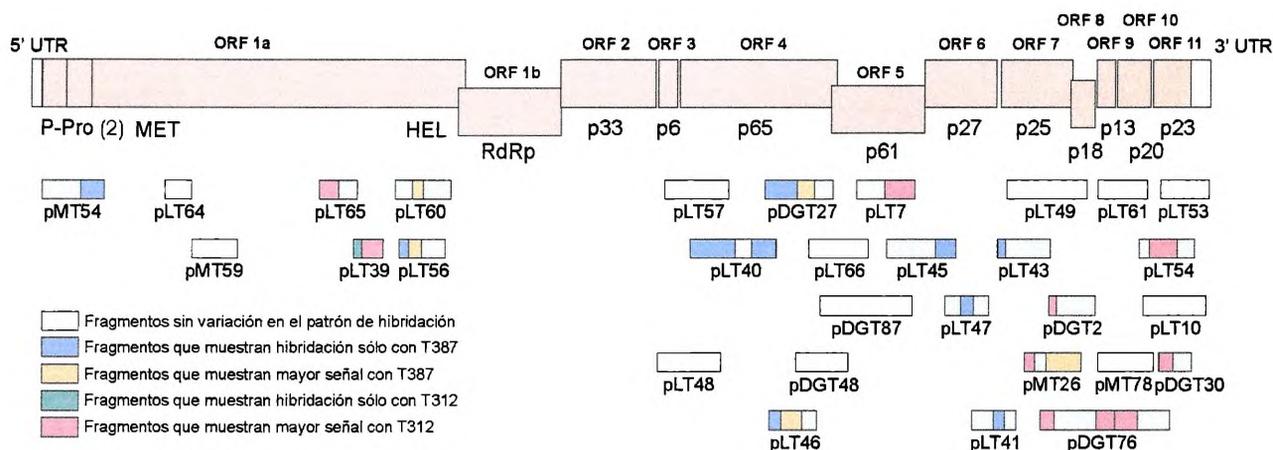


Figura V.C.1: Representación gráfica de los fragmentos de hibridación diferencial de los clones de la biblioteca C268-2. Se indican los resultados de hibridación con las sondas derivadas de T387 (severo) y T312 (débil). En gris se indican las regiones y clones que no presentaron diferencias en su patrón de hibridación con ambas sondas. Las regiones que mostraron hibridación diferencial se señalan con distintos colores (se indica la referencia en el gráfico). Los dibujos se realizaron a escala.

De acuerdo a los datos mostrados en la figura V.C.1, en una misma región génica se ubican clones que se solapan total o parcialmente. En estos casos existen dos situaciones: a) clones que pueden presentar el mismo patrón de hibridación o b) clones que difieren en su respuesta frente a las sondas. El análisis de las secuencias nucleotídicas de los mismos permitió entender este comportamiento. Los clones que comparten una elevada identidad de secuencia nucleotídica (mayor al 90%) y fragmentos solapados de tamaños semejantes presentan el mismo patrón de hibridación. De este modo, los fragmentos de 111 pb del clon pLT40, de 228 pb del clon pDGT27 y de 190 pb del clon pLT46, que corresponden al gen p65, tienen elevada identidad de secuencia (superior al 90%) y presentan hibridación diferencial con la sonda derivada de T387. En la región 5' del gen p23 ocurre algo semejante, pero con respecto a la sonda realizada con T312. Las bandas de 391 pb del clon pLT54 y de 194 pb del clon pDGT30 se solapan, tienen identidad de secuencia nucleotídica de 99,5% y presentan señal diferencial con la sonda derivada de T312.

Cuando clones situados en la misma región tienen patrones de hibridación distintos, este hecho puede deberse a dos causas: a) una baja identidad de secuencia nucleotídica o b) que los fragmentos solapados tengan tamaños diferentes debido a polimorfismos de los sitios de corte de las enzimas de

restricción utilizadas en el ensayo. La primera situación explicaría las diferencias de hibridación encontradas entre los clones pLT54, pDGT30 y pDGT76 en la región 5' de p23 (fig.V.C.1). Como ya se mencionó, los dos primeros comparten el mismo patrón y tienen elevada identidad nucleotídica. Por el contrario, el clon pDGT76, pese a presentar un fragmento de tamaño semejante (199 pb) en dicha región, no mostró hibridación diferencial con la sonda derivada de T312. La comparación de secuencias nucleotídicas de los tres clones indicó que pDGT76 difiere en los restantes en más de un 10% (tiene una identidad de 87%). La segunda explicación propuesta sería válida para los clones pLT57 y pLT40, situados en la región 5' de p65. El primero de ellos no mostró diferencias de hibridación con las sondas utilizadas. Este comportamiento puede deberse a la ausencia de sitios de corte para las enzimas de restricción usadas y, aunque la región de solapamiento con pLT40 es extensa (605 pb) y muy semejante (99% de identidad nucleotídica), el resto del clon podría hibridar del mismo modo con ambas sondas y enmascarar la señal diferencial.

Es importante mencionar que las modificaciones en la temperatura de hibridación y lavado afectan al comportamiento de los clones. De este modo, el único clon diferencial presente en la región del gen p61 se detectó cuando se disminuyó la temperatura de hibridación a 65°C. Aparentemente, las condiciones más laxas favorecen la hibridación con la sonda derivada de T312.

V.C.2) ENSAYOS DE *SOUTHERN BLOT* CON SONDAS DERIVADAS DE OTROS AISLAMIENTOS VIRALES

Con el propósito de confirmar y ampliar esta información y de comprobar si existía correlación entre los patrones de hibridación observados en los distintos aislamientos y las características biológicas de los mismos, se realizaron nuevos ensayos de *Southern blot*. Inicialmente se repitieron los ensayos con las sondas antes estudiadas, aunque como molde para la síntesis de la sonda severa se utilizó el aislamiento T388, obtenido en España a partir de T387. Si bien la sintomatología que induce T388 en plantas indicadoras es semejante a la producida por T387, los patrones de hibridación no fueron idénticos. Los nuevos aislamientos incorporados a este análisis fueron: T385 y T32 (biogrupo I, España), T300 (II, España), PeraGS y VT (III, Brasil e Israel, respectivamente), C269-6 y BaraõB (IV, Argentina y Brasil, respectivamente) y T305 (V, España).

La síntesis de las sondas y las hibridaciones se realizaron de acuerdo al protocolo descrito y en condiciones similares para cada aislamiento. En todos los casos, con excepción de la hibridación con la sonda derivada del aislamiento C269-6, se obtuvieron los correspondientes patrones de hibridación. En las figuras V.C.2a y b se observan dos de las autorradiografías resultantes de estos ensayos.

Si bien los aislamientos PeraGS y VT pertenecen al mismo biogrupo (III), sus patrones de hibridación no son exactamente iguales. Del análisis de las figuras V.C.2a y b se desprende que, aunque comparten el patrón de hibridación en la mayoría de los clones, existen algunas diferencias entre ellos. Las variaciones pueden reflejarse en las intensidades de hibridación o en la presencia de una banda en un aislamiento y no en el otro. Diferencias en intensidad se aprecian, por ejemplo, en los clones pLT40 (la última banda es mucho más débil con PeraGS), pLT46 (cuya señal de hibridación con PeraGS es muy débil) y pLT60 (los fragmentos más pequeños se ven más intensos con PeraGS que con VT). En cuanto a los fragmentos que sólo hibridan con uno u otro aislamiento, el clon pLT39 lo hace con VT mientras que los clones pLT56, pMT54 y pMT59 únicamente muestran señal con la sonda del aislamiento PeraGS.

El análisis conjunto de las autorradiografías obtenidas en los distintos eventos de hibridación permitió discriminar tipos de comportamiento para diferentes fragmentos de clones o regiones genómicas virales. Algunos fragmentos presentan el mismo patrón de hibridación con todos los aislamientos utilizados como sonda (clon pLT49, figuras V.C.3, 4 y 5); otros muestran señal positiva con algunos aislamientos y con otros no y un tercer grupo exhibe diferencias en la intensidad de la señal de hibridación según la sonda analizada.

Entre los fragmentos que muestran variación en la señal de hibridación se hallaron tres tipos de patrones: a) fragmentos que muestran una disminución en la intensidad de la señal de hibridación a medida que se incrementa la severidad de los aislamientos usados como sonda (clon pLT39, fig.V.C.3); b) clones que presentan un comportamiento opuesto al anterior, es decir, la intensidad de la señal de hibridación aumenta a medida que aumenta la severidad de las sondas (fig.V.C.4) y c) fragmentos que varían en su señal de hibridación de una manera no correlacionada con la virulencia de los aislamientos utilizados como sondas (fig.V.C.5).

Para los aislamientos del mismo biogrupo existe, en general, similitud en los patrones de hibridación. La excepción son, justamente, los dos aislamientos del biogrupo III, VT y Pera GS (fig.V.C.2a y b). El patrón de hibridación de VT se asemeja al de los aislamientos de biogrupos débiles (I y II), mientras que el de PeraGS es similar al de los aislamientos severos (IV y V).

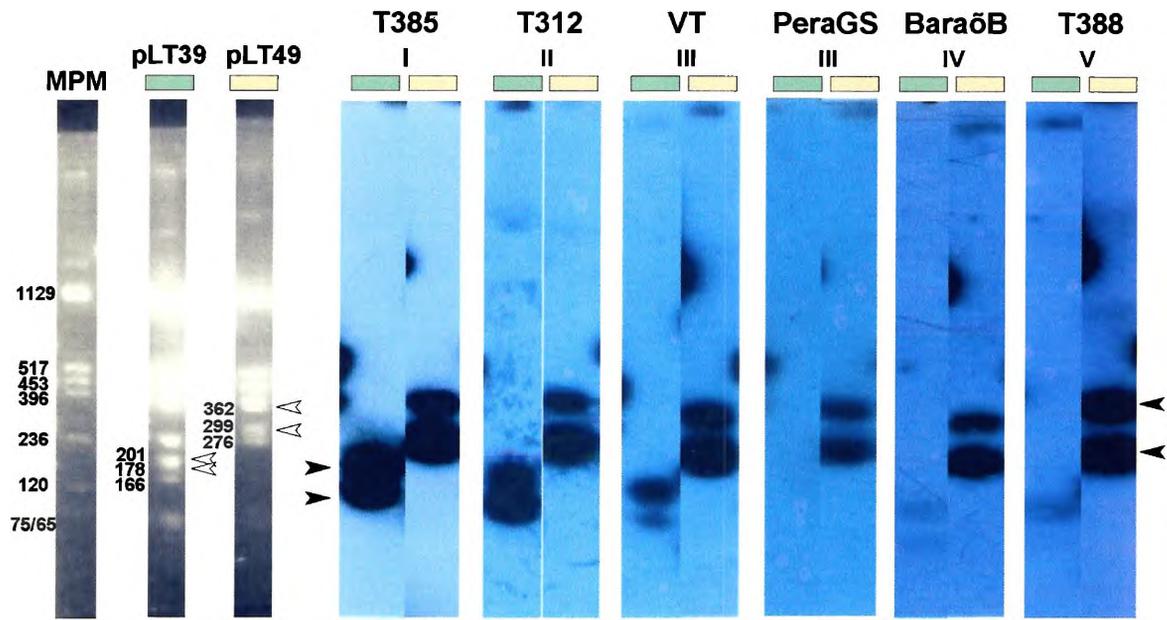


Figura V.C.3: Patrones de hibridación comparativos de los clones pLT39 y pLT49. En la figura se indican los tamaños de los fragmentos de restricción de ambos clones y las bandas del marcador de PM (plásmido pcDNA II/*Hinf* I/*Hind* III). Las imágenes de la izquierda corresponden a la fotografía del gel transferido (figura V.B.1) y las de la derecha a las autorradiografías de las hibridaciones con las sondas de los aislamientos indicados en la porción superior de la figura. Las puntas de flecha rellenas indican la posición de las bandas de hibridación de los clones pLT39 (izquierda) y pLT49 (derecha). Con puntas de flechas vacías se señala la posición de dichos fragmentos en la imagen correspondiente al gel de agarosa. Los fragmentos de 166 y 178 pb del clon pLT39 aparecen como una banda única en la hibridación.

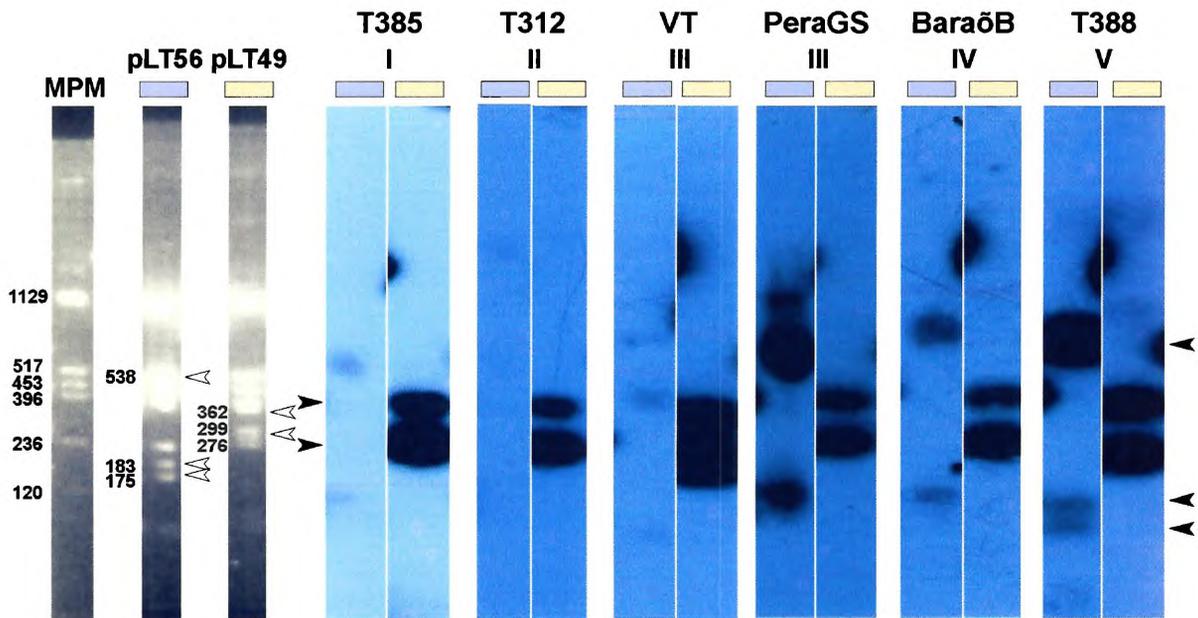


Figura V.C.4: Patrones de hibridación comparativos de los clones pLT56 y pLT49. En la figura se indican los tamaños de los fragmentos de restricción de ambos clones y del marcador de PM (plásmido pcDNA II/*Hinf* I/*Hind* III). Las imágenes de la izquierda corresponden a la fotografía del gel transferido (figura V.B.1) y las de la derecha a las autorradiografías de las hibridaciones con las sondas de los aislamientos indicados en la porción superior de la figura. Las puntas de flecha rellenas indican la posición de las bandas de hibridación de los clones pLT49 (izquierda) y pLT56 (derecha). Con puntas de flechas vacías se señala la posición de dichos fragmentos en la imagen correspondiente al gel de agarosa.

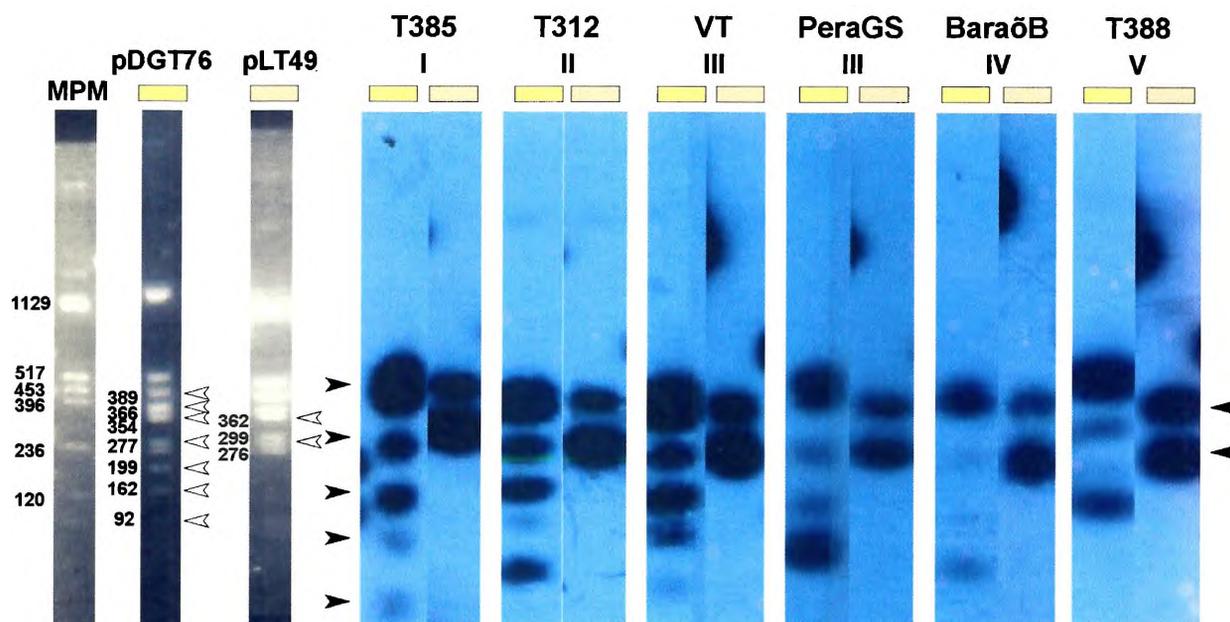


Figura V.C.5: Patrones de hibridación de los clones pDGT76 y pLT49. En la figura se indican los tamaños de los fragmentos de restricción de ambos clones y del marcador de PM (plásmido pcDNA II/ *Hinf* I/ *Hind* III). En la figura se muestran, a la izquierda, las calles correspondientes del gel transferido (figura V.B.1) y a la derecha, las autorradiografías de la hibridación con sondas sintetizadas a partir de los aislamientos indicados en la porción superior. Las puntas de flecha rellenas indican la posición de las bandas de hibridación de los clones pDGT76 (izquierda) y pLT49 (derecha). Con puntas de flechas vacías se señala la posición de dichos fragmentos en la imagen correspondiente al gel de agarosa.

El aislamiento severo T305 (biogrupo V) se originó a partir del aislamiento débil T385 (biogrupo I) y por ello resultó de interés comparar los patrones de hibridación, con las sondas correspondientes a dichos aislamientos, para determinar si existían regiones que exhibieran diferencias (fig.V.C.6). En la figura V.C.6 se observan claras diferencias de hibridación en el caso de los clones pLT41, pLT46, pLT47, pLT54, pMT78 (cuando se utiliza *Hinf* I como enzima de corte interno), pDGT30 y pDGT76. Los clones pLT41, pLT47, pLT54, pMT78 y pDGT30 presentaron fragmentos que mostraron una disminución (o ausencia) de la señal de hibridación cuando se utilizó la sonda derivada de T305 (fig.V.C.6). Por el contrario, los dos fragmentos de mayor tamaño del clon pLT46, de 190 y 180 pb respectivamente, exhiben una señal mucho más intensa con la sonda derivada de dicho aislamiento. El clon pDGT76, característico por su comportamiento variable (fig.V.C.5), también mostró diferencias entre ambas sondas. La banda mayor, compuesta por los fragmentos de 389, 366 y 354 pb, respectivamente, mostró igual intensidad con ambas sondas mientras que el fragmento menor, de 92 pb, se ve más débil con T305. Los fragmentos de 277 y 199 pb presentaron mayor intensidad de hibridación con T385 mientras que el de 162 mostró una señal mucho más intensa con T305. Los clones que presentaron hibridación diferencial entre

ambos aislamientos corresponden a las siguientes regiones génicas: p65 (pLT46), p27 (pLT47), intergénica p27-p25 (pLT41), p20 (pMT78 y pDGT76) y p23 (pDGT76, pDGT30 y pLT54). Los resultados sugieren que estas regiones del genoma viral resultan de interés como posibles marcadores moleculares, ya que podrían estar relacionadas con el comportamiento biológico de los aislamientos y su distinto grado de patogenicidad.

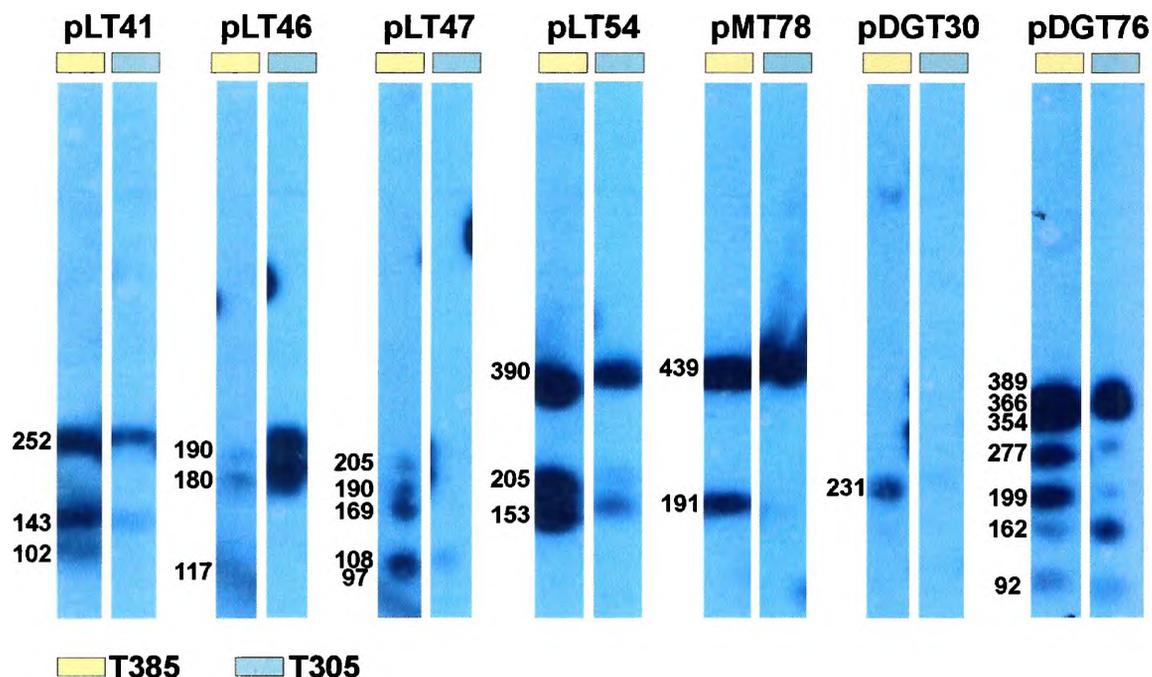


Figura V.C.6: Clones que mostraron diferencias en sus patrones de hibridación con las sondas de los aislamientos T385 y T305. Se indican los tamaños de los fragmentos de restricción de los distintos clones. La figura corresponde a las autorradiografías obtenidas con ambos aislamientos. En la porción inferior se indica la referencia de color de los mismos.

V.C.3) ANÁLISIS DE AISLAMIENTOS DE CTV EN ENSAYOS DE *DOT BLOT*

V.C.3A) SELECCIÓN DE FRAGMENTOS DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL

El objetivo de buscar regiones de hibridación diferencial entre aislamientos de CTV es disponer de marcadores moleculares útiles para la caracterización de dichos aislamientos virales. La aplicación de la técnica de hibridación sobre improntas de material de cítricos infectados a campo, requiere contar con un panel de sondas que permita discriminarlos. El análisis de los ensayos de *Southern blot* permitió encontrar ciertas regularidades en los patrones de hibridación de los fragmentos de restricción de clones de la biblioteca del aislamiento C268-2. Estos resultados plantearon la posibilidad de aplicar dichas regiones genómicas a la caracterización de aislamientos virales.

En la figura V.C.7 se representan, de manera gráfica, los resultados obtenidos luego de los ensayos de *Southern blot* con los distintos aislamientos virales empleados como sondas. Los clones que presentan la misma señal con todos los aislamientos resultan útiles para la detección de CTV. Por otro lado, los fragmentos que muestran incremento en la señal a medida que aumenta la severidad de las sondas, podrían utilizarse en la detección de aislamientos severos mientras que aquéllos que presentan una disminución de la señal en las mismas condiciones, podrían identificar aislamientos débiles. Finalmente, aquellos fragmentos que presentan hibridación con un solo aislamiento podrían permitir identificar aislamientos biológicamente similares a él.

De la observación de la figura V.C.7 se desprende que varios de los fragmentos inicialmente identificados como diferenciales en los ensayos previos, mantuvieron esa condición. Por otro lado, algunos clones mostraron patrones diferentes a los obtenidos anteriormente. El incremento en el número de aislamientos utilizados en los ensayos de *Southern blot* permitió caracterizar con mayor certeza a los fragmentos y seleccionar aquéllos que mostraron un comportamiento definido frente a las sondas usadas.

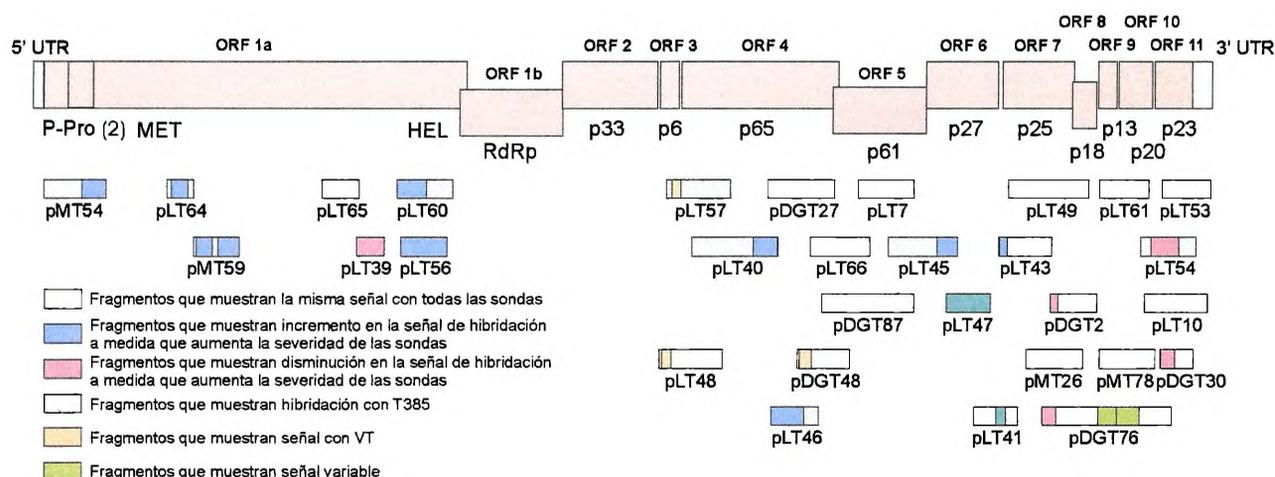


Figura V.C.7: Representación gráfica de los fragmentos de hibridación diferencial de los clones de la biblioteca C268-2. Se indican los resultados de hibridación con las sondas derivadas de los diez aislamientos utilizados. Las regiones que mostraron hibridación diferencial se señalan con distintos colores (se indica la referencia en el gráfico). Los dibujos se realizaron a escala.

La utilidad de los fragmentos de hibridación diferencial para la caracterización tanto de aislamientos de CTV argentinos como de otro origen geográfico, se determinó en ensayos de *dot blot*. Para ello se sintetizaron sondas marcadas radiactivamente por *random priming* o por PCR con *primers* específicos, en el caso de los fragmentos de menor tamaño.

V.C.3B) RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE *DOT BLOT*

En esta sección se describen los resultados obtenidos en los ensayos de *dot blot*. En la figura V.C.8a y b se indica esquemáticamente la disposición en las membranas de los distintos aislamientos de CTV estudiados. En el panel a se encuentran los aislamientos de diferentes orígenes geográficos, y en el panel b, los aislamientos argentinos. Se indica, con un código de colores, a qué biogrupo pertenece cada aislamiento.

Para iniciar el análisis se seleccionó un clon, pLT49, que mostró **el mismo patrón de hibridación con todos los aislamientos estudiados** (fig. V.C.3, 4 y 5). En la figura V.C.9a y b se muestran los resultados de hibridación de los distintos aislamientos cuando se utilizó la sonda derivada de dicho clon. Todos los aislamientos analizados, tanto de diverso origen geográfico (a) como de Argentina (b) presentaron hibridación con esta sonda. Masas equivalentes de RNA total de planta sana, incluidas en ambas membranas, no mostraron señal, indicando la especificidad de la hibridación. Tampoco incidió en la hibridación el biogrupo al que pertenecen los aislamientos. Este resultado indica, por un lado, que la región del genoma a la que corresponde el clon pLT49 está muy conservada en los distintos aislamientos virales y por otro, que esta sonda puede ser utilizada para la detección de tristeza, ya que hibrida con aislamientos de todos los biogrupos. Los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado según los ensayos de *Southern blot* previos, donde los fragmentos de digestión de este clon mostraron el mismo patrón de hibridación con los distintos aislamientos analizados.

En una segunda etapa se seleccionaron clones que mostraron **diferencias en la señal de hibridación con los distintos aislamientos estudiados**. En primer lugar se utilizó la sonda derivada del clon pLT39, que solamente había hibridado con sondas derivadas de **aislamientos débiles** (fig. V.C.3). Los resultados que se muestran en la figura V.C.10a confirman los hallazgos anteriores, ya que sólo los aislamientos de biogrupos débiles hibridaron en forma notoria con esta sonda. De los cuatro aislamientos del biogrupo I solamente K no mostró señal, quizás debido a la baja masa utilizada en el ensayo. Del biogrupo II mostraron hibridación sólo dos aislamientos, T300 y T312, mientras que los restantes, T346 y lima 50, no lo hicieron. El resto de los aislamientos, con la excepción de T305, no mostraron señal de hibridación con esta sonda. El aislamiento T305 (V), obtenido a partir de T385 (I), fue el único aislamiento severo que mostró señal positiva en los ensayos de *Southern blot* con el clon pLT39, repitiéndose el mismo resultado cuando se utilizó el clon como sonda en los ensayos de *dot blot* (fig.V.C.10). Se esperaba que el aislamiento VT mostrara hibridación con esta sonda, pero no se obtuvo ese resultado. Posiblemente, la secuencia similar pLT39 esté representada en menor concentración en ese aislamiento, ya que la señal obtenida en el ensayo de

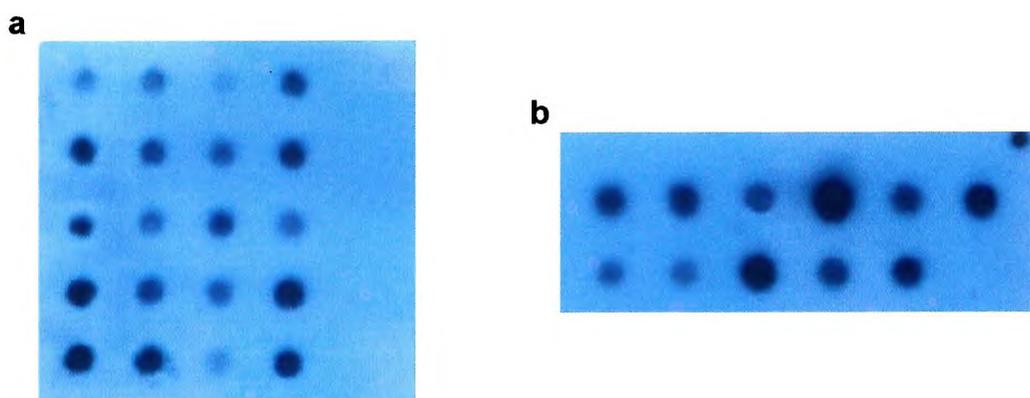
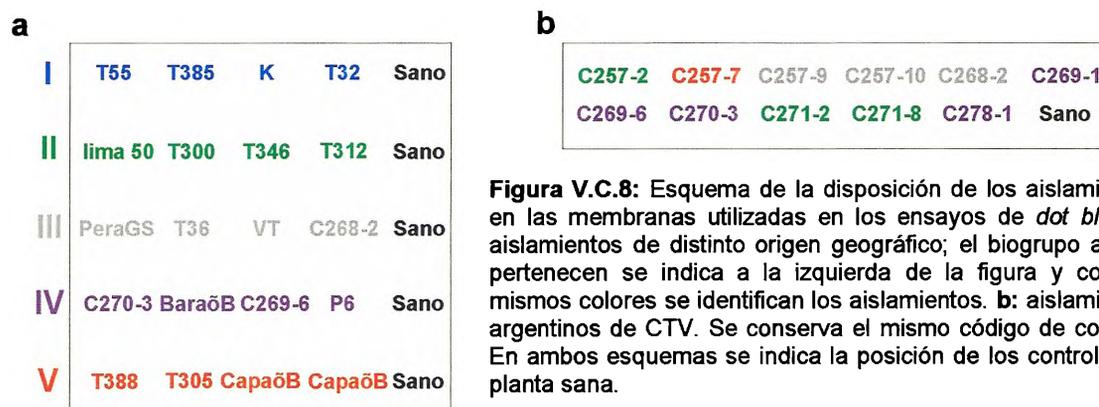


Figura V.C.9: Ensayos de *dot blot* con la sonda del clon pLT49. **a:** aislamientos de CTV de distinto origen geográfico. **b:** aislamientos argentinos de CTV. El dsRNA de los distintos aislamientos y el RNA total de planta sana utilizado como control están dispuestos de acuerdo a lo indicado en los esquemas de la figura V.C.8.

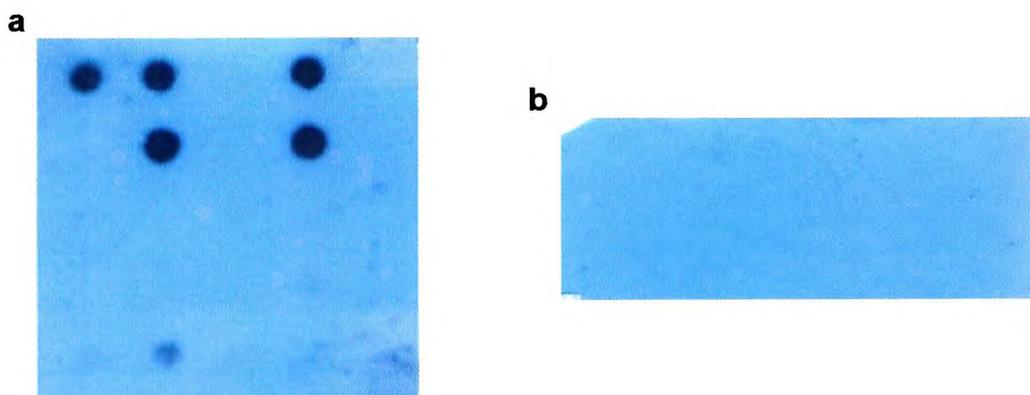


Figura V.C.10: Ensayos de *dot blot* con la sonda del clon pLT39. **a:** aislamientos de CTV de distinto origen geográfico. **b:** aislamientos argentinos de CTV. El dsRNA de los distintos aislamientos y el RNA total de planta sana utilizado como control están dispuestos de acuerdo a lo indicado en los esquemas de la figura V.C.8.

Southern blot es menor en VT que en T385 y T312 (fig.V.C.3). Otra posibilidad es que las condiciones de lavado más estrictas, utilizadas en los ensayos de *dot blot*, desestabilizaran la interacción entre el RNA y la sonda.

Ninguno de los aislamientos argentinos mostró hibridación con la sonda pLT39. Potencialmente se esperaba señal positiva de hibridación con los tres aislamientos del biogrupo II, C257-2, C257-9 y C257-10. Tampoco se encontró señal de hibridación con el aislamiento C268-2, que dio origen al clon pLT39, lo cual indicaría que esa secuencia está poco representada en la población de secuencias del aislamiento de origen, que pertenece al biogrupo III y reacciona positivamente con el anticuerpo MCA-13.

También se analizaron varios clones que mostraron señal únicamente con los aislamientos de **biogrupos moderados y severos**. El clon pLT56 mostró un aumento en la señal de hibridación a medida que se incrementó la severidad de los aislamientos utilizados como sonda (fig.V.C.4). Cuando se lo utilizó como sonda en los experimentos de *dot blot* se obtuvieron los resultados mostrados en la figura V.C.11a y b. De acuerdo a lo esperado, dicho clon no mostró hibridación positiva con ninguno de los aislamientos del biogrupo I. Los dos clones del biogrupo II que dieron señal son los que no reaccionaron con la sonda del clon pLT39 (T346 y lima 50). Los resultados del ensayo también concuerdan con lo esperado cuando se analizan los aislamientos del biogrupo III, ya que se obtuvo hibridación positiva con PeraGS y no hubo señal con VT. Los restantes aislamientos del biogrupo III, T36 y C268-2, también dieron señal positiva. Con los aislamientos de biogrupo IV la señal es muy débil para BaraõB, C269-6 y P6, mientras que no se observó señal con el aislamiento C270-3. Del biogrupo V sólo mostró señal T388. Este resultado coincide con lo previsto, ya que el clon pLT56 no dio señal positiva con el aislamiento T305. Todos los aislamientos argentinos mostraron hibridación con la sonda del clon pLT56 (panel b), aunque la señal es muy débil con los aislamientos C269-1, C269-9 y C270-3.

Los clones pMT59 y pLT46 también exhibieron incremento de intensidad en su señal de hibridación a medida que aumentaba la severidad de los aislamientos utilizados como sonda. Ambos clones se probaron como sondas en ensayos de *dot blot*, y los resultados se muestran en las figuras V.C.12 y V.C.13 respectivamente. Los datos del panel a de ambas figuras responden a lo esperado, ya que no hubo señal positiva con ninguno de los aislamientos del biogrupo I. En cambio, las sondas dieron señal positiva con uno (T346) y dos (lima 50 y T346) aislamientos del biogrupo II, respectivamente. La sonda pMT59 no mostró hibridación con el aislamiento VT (III) mientras que, tanto PeraGS como los restantes aislamientos del biogrupo III fueron positivos. También se observó señal positiva con los aislamientos del biogrupo IV y V, con excepción del aislamiento T305 (V). Por otra parte, la sonda pLT46 dio

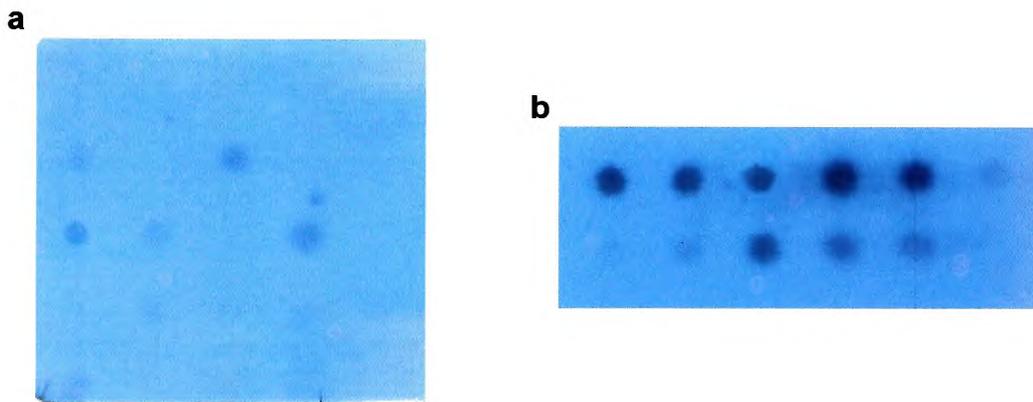


Figura V.C.11: Ensayos de *dot blot* con la sonda del clon pLT56. **a:** aislamientos de CTV de distinto origen geográfico. **b:** aislamientos argentinos de CTV. El dsRNA de los distintos aislamientos y el RNA total de planta sana utilizado como control están dispuestos de acuerdo a lo indicado en los esquemas de la figura V.C.8.

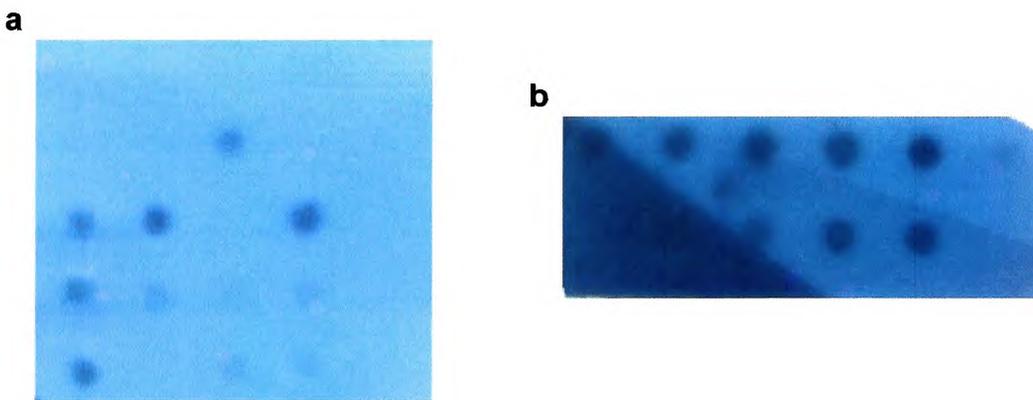


Figura V.C.12: Ensayos de *dot blot* con la sonda del clon pMT59. **a:** aislamientos de CTV de distinto origen geográfico. **b:** aislamientos argentinos de CTV. El dsRNA de los distintos aislamientos y el RNA total de planta sana utilizado como control están dispuestos de acuerdo a lo indicado en los esquemas de la figura V.C.8.

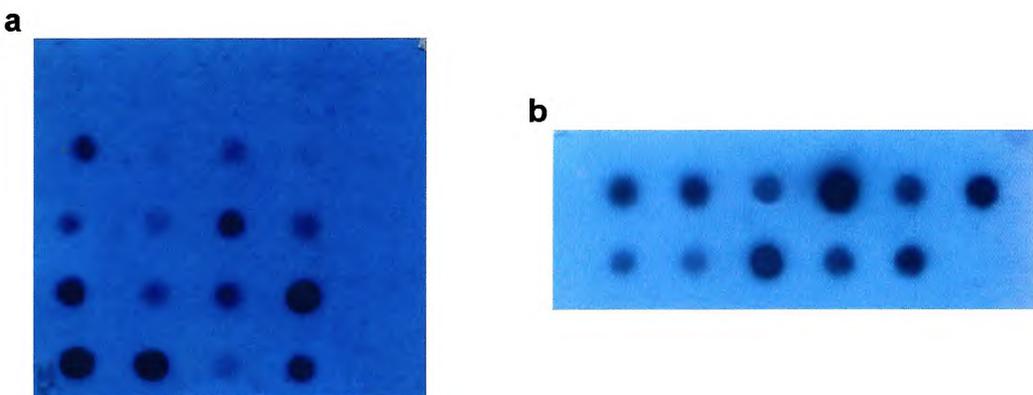


Figura V.C.13: Ensayos de *dot blot* con la sonda del clon pLT46. **a:** aislamientos de CTV de distinto origen geográfico. **b:** aislamientos argentinos de CTV. El dsRNA de los distintos aislamientos y el RNA total de planta sana utilizado como control están dispuestos de acuerdo a lo indicado en los esquemas de la figura V.C.8.

señal positiva con todos los aislamientos de los biogrupos III, IV y V y con los aislamientos argentinos; salvo que la misma es muy débil con C269-1 y C269-6 (panel b de la fig. V.C.13).

Debido a la escasa disponibilidad de dsRNA de los aislamientos de distinto origen geográfico, los restantes ensayos de *dot blot* sólo se realizaron con aislamientos argentinos. En el esquema de la figura V.C.14a se muestra la disposición en la membrana de los aislamientos de CTV estudiados (la misma de la fig. V.C.8b). Se incluyeron, como controles, tres aislamientos de características biológicas y patrones de hibridación diferentes, T385 (I), PeraGS (III) y T388 (V) (fig. V.C.14b).

Los clones pLT64 y pMT54 habían mostrado en los ensayos de *Southern blot* un incremento notorio en la señal de hibridación a medida que **umentaba la severidad de los aislamientos** utilizados como sondas. En las figuras V.C.15 y V.C.16 se observan los resultados de hibridación de los aislamientos argentinos usando sondas derivadas de estos dos clones. Todos exhibieron señal con la sonda correspondiente al fragmento mayor del clon pLT64, aunque ésta fue más débil en C269-1, C269-6 y C270-3 que en los restantes aislamientos (fig.V.C.15a). Los controles mostraron igual comportamiento que en los ensayos previos, ya que el aislamiento débil (T385) no dio señal, mientras que los moderados y severos (PeraGS y T88, respectivamente) sí lo hicieron (fig.V.C.15b). El clon pMT54 permitió la mayor discriminación entre aislamientos argentinos, ya que sólo algunos de ellos presentaron señal positiva (fig.V.C.16a). El aislamiento C268-2 (III) exhibió la señal más intensa y también presentaron hibridación positiva los aislamientos C257-2 y C271-2 (del biogrupo II), C257-10 (III) y C278-1 (IV). De acuerdo con estos resultados, la sonda pMT54 hibridó con varios de los aislamientos que causan sintomatología moderada en plantas indicadoras. La excepción es C278-1, un aislamiento que parece ejercer una acción protectora en su hospedante original (protección cruzada). Los controles se comportaron de acuerdo a lo esperado, ya que únicamente se obtuvo una señal, muy tenue, con el aislamiento T388 (fig.V.C.16b). De acuerdo a los datos parece posible que esta sonda detecte los componentes menos agresivos presentes en la población de los aislamientos argentinos. En concordancia con esta presunción los aislamientos más virulentos, C257-7, C269-6 y C270-3 no hibridaron con dicha sonda.

Los fragmentos diferenciales de los clones pLT40, pLT41, pLT47 y pLT54 se marcaron radiactivamente por PCR. Las sondas se utilizaron en ensayos de *dot blot* en las condiciones antes descritas pero sin éxito. El tamaño e integridad de estas sondas se controló previamente en gel de agarosa por lo cual la falta de resultados podría deberse a las condiciones de hibridación y lavado. Para resolver este problema se disminuyó la temperatura de hibridación y lavados y se sintetizaron las sondas por PCR asimétrica.



Figura V.C.14: Representación esquemática de la disposición de los aislamientos en los filtros utilizados en los ensayos de *dot blot*. **a:** aislamientos argentinos de CTV. **b:** controles utilizados en la hibridación. Se conserva el mismo código de colores de la figura V.C.8.

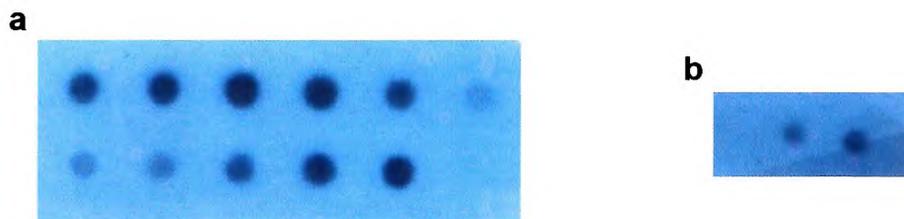


Figura V.C.15: Ensayos de *dot blot* con la sonda derivada del clon pLT64. **a:** aislamientos argentinos de CTV. **b:** controles de hibridación. El dsRNA de los distintos aislamientos y el RNA total de planta sana, utilizado como control, están dispuestos de acuerdo a lo indicado en los esquemas de la figura V.C.14.

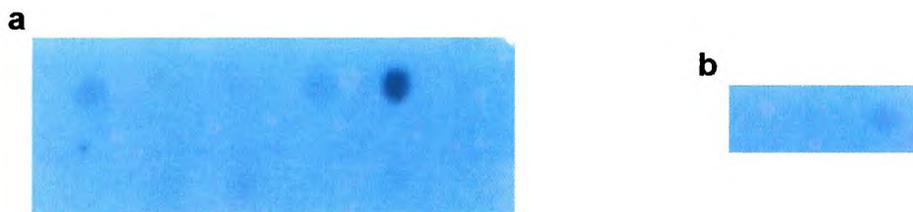


Figura V.C.16: Ensayos de *dot blot* con la sonda del clon pMT54. **a:** aislamientos argentinos de CTV. **b:** controles de hibridación. El dsRNA de los distintos aislamientos y el RNA total de planta sana, utilizado como control, están dispuestos de acuerdo a lo indicado en los esquemas de la figura V.C.14.



Figura V.C.17: Ensayos de *dot blot* con la sonda correspondiente al fragmento diferencial del clon pLT45. **a:** aislamientos argentinos de CTV. **b:** control de hibridación, dsRNA de los aislamientos T385, PeraGS y T388, respectivamente. El dsRNA de los distintos aislamientos y el RNA total de planta sana, utilizado como control, están dispuestos de acuerdo a lo indicado en los esquemas de la figura V.C.14.

Cuando se utilizaron estas nuevas sondas, a una temperatura de 55°C, se obtuvieron diferentes resultados.

De acuerdo a su comportamiento en los ensayos de *Southern blot*, donde mostraron una **disminución en la intensidad de la señal a medida que aumentaba la severidad de las sondas**, se esperaba que los clones pLT54 y pDGT2 detectaran a los aislamientos más débiles. La sonda sintetizada utilizando como molde a pDGT2 prácticamente no presentó señal con los aislamientos argentinos mientras que la derivada de pLT54 hibridó muy débilmente con algunos de ellos. En ambos casos no se observó hibridación con el control de planta sana y se obtuvo señal con el aislamiento débil incluido como control positivo (T385). También se utilizaron sondas correspondientes a los fragmentos diferenciales de los clones, pLT40, pLT41 y pLT45, que se caracterizaron por mostrar **mayor intensidad de hibridación con aislamientos severos**. Con las sondas derivadas de los dos primeros clones se obtuvo una señal débil con la mayor parte de los aislamientos argentinos. En base a resultados de ensayos previos (Semorile *et al.*, 1993), donde un fragmento del clon pLT45 presentó hibridación positiva con el aislamiento severo T387 y no con la sonda del aislamiento débil T312, se esperaba que dicho fragmento identificara aislamientos severos del virus. En la figura V.C.17a se observa que la sonda sintetizada por PCR asimétrica a partir de dicho clon mostró señal positiva con todos los aislamientos argentinos y con aquellos utilizados como control, pero no con el RNA de planta sana. De acuerdo a este resultado la sonda no podría ser utilizada para caracterizar aislamientos severos, ya que también mostró señal con el aislamiento débil T385 (I).

La totalidad de los resultados obtenidos en los ensayos de *dot blot* con las sondas de fragmentos diferenciales de clones de la biblioteca del aislamiento C268-2 se resumen en la Tabla X.

V.C.4) BÚSQUEDA DE RNAs DEFECTIVOS POR *NORTHERN BLOT*

Varios aislamientos de CTV, de diferentes regiones geográficas, contienen moléculas de RNAs defectivos. Para determinar si también están presentes en los aislamientos argentinos de campo estudiados en este trabajo y si su presencia incide en el comportamiento de hibridación de los mismos, se intentó identificarlos en ensayos de *Northern blot*. Los dsRNAs de los aislamientos estudiados se transfirieron a membrana y se hibridaron con una sonda de la región 5' del genoma viral. La sonda corresponde al clon pMT54, empleada previamente en los ensayos de *dot blot* de la figura V.C.16. Teniendo en cuenta los resultados de esos ensayos, la temperatura de hibridación se disminuyó a 60°C para permitir la hibridación con los dsRNAs de longitud total de todos los aislamientos. Si no existen moléculas defectivas se espera obtener hibridación únicamente con el dsRNA *full-length*, que es el intermediario de replicación del

Tabla X. Patrones de hibridación de distintos aislamientos de CTV con el panel de sondas de fragmentos de clones del aislamiento C268-2.

aisl.	sondas utilizadas												
	pLT49	pLT39	pLT56	pMT59	pLT46	pLT47	pLT64	pMT54	pLT54	pDGT2	pLT45	pLT40	pLT41
T55	■ ^z	■	-	-	-	□	NA						
T385	■	■	-	-	-	■	-	-	□	□	■	NA	NA
K	□	-	-	-	-	-	NA						
T32	■	■	-	-	-	■	NA						
lima50	■	-	□	-	■	-	NA						
T300	■	■	-	-	-	■	NA						
T346	■	-	□	■	■	-	NA						
T312	■	■	-	-	-	■	NA						
PeraGS	■	-	□	■	□	■	■	-	NA	NA	□	NA	NA
T36	■	-	□	■	□	□	NA						
VT	■	-	-	-	■	-	NA						
C268-2	■	-	□	■	■	□	NA						
C270-3	■	-	-	■	■	-	NA						
BaraõB	■	-	□	□	□	□	NA						
C269-6	■	-	□	□	■	□	NA						
P6	■	-	□	□	■	■	NA						
T388	■	-	□	■	■	■	■	□	NA	NA	■	NA	NA
T305	■	□	-	-	■	□	NA						
CapaõB	□	-	-	□	□	-	NA						
CapaõB	■	-	-	□	■	■	NA						
C257-2	■	-	■	■	■	■	■	□	□	-	■	□	□
C257-7	■	-	■	■	■	□	■	-	□	-	■	□	□
C257-9	■	-	■	■	■	■	■	-	□	□	■	□	■
C257-10	■	-	■	■	■	■	■	□	■	□	■	□	■
C268-2	■	-	■	■	■	□	■	■	□	□	■	□	□
C269-1	■	-	□	□	■	□	□	-	□	-	□	□	□
C269-6	■	-	□	□	□	□	□	-	□	-	-	□	-
C270-3	■	-	□	□	□	□	□	-	□	-	□	□	□
C271-2	■	-	■	□	■	□	■	□	□	□	■	□	□
C271-8	■	-	□	■	■	□	■	-	□	□	■	□	□
C278-1	■	-	□	■	■	□	■	□	■	□	■	□	□

^zintensidad de hibridación: - no detectable, □ trazas, □ baja, ■ media, ■ elevada, NA: no analizada.

virus. La presencia de bandas adicionales indica la existencia de RNAs de menor tamaño, que poseen la región 5' del genoma viral.

Tal como se observa en la figura V.C.18, C257-10 y C278-1 son los únicos aislamientos que presentan señal de hibridación adicional al RNA genómico. La posición de estas bandas se indica con puntas de flecha y el tamaño aproximado de las mismas en C257-10 es de 2500 y 2100 pb, respectivamente. La banda de hibridación presente en C278-1 tiene tamaño similar a la banda mayor de C257-10, 2500 pb. El aislamiento C257-9, analizado en otro ensayo de *Northern blot* no mostró moléculas de dsRNA de menor tamaño, que hibridaran con la sonda utilizada.

De los resultados obtenidos se desprende que, en la mayor parte de los aislamientos argentinos utilizados en este estudio no se encuentran presentes moléculas de RNAs defectivos que pueden ejercer su efecto en los resultados de los ensayos de hibridación antes descritos.

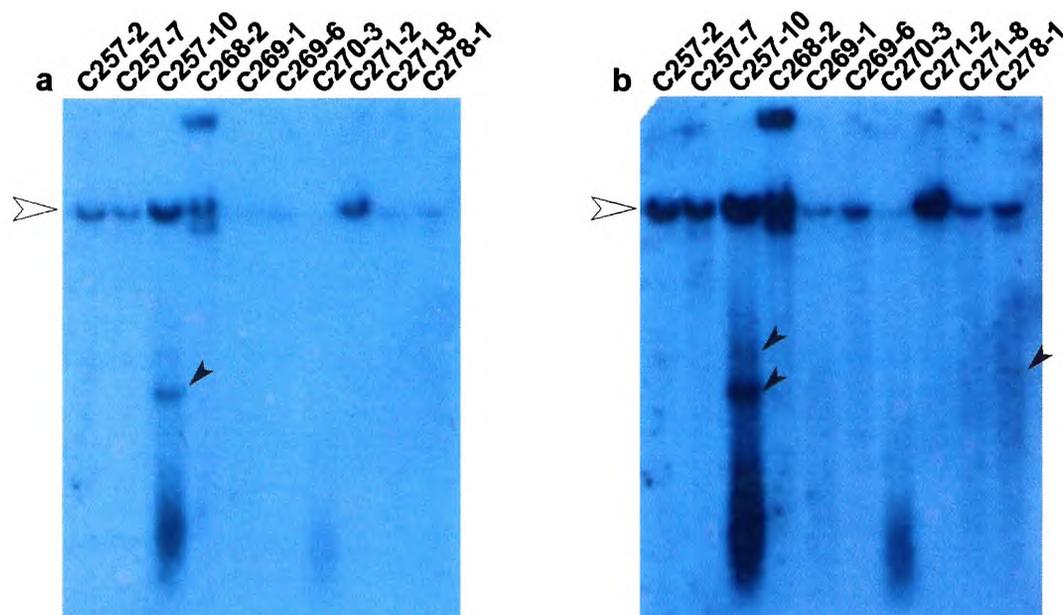


Figura V.C.18: Análisis de los aislamientos argentinos en *Northern blot*. **a:** exposición de 18 horas. **b:** exposición de 36 horas. Se utilizó la sonda correspondiente al clon pMT54. Con puntas de flechas llenas se indica la posición de posibles moléculas de RNAs defectivos. Con puntas de flechas vacías se señalan las moléculas de dsRNA de longitud total (*full-length*).

CAPÍTULO V

SECCIÓN D: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL Y APLICACIÓN A LA CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CTV

Uno de los objetivos del estudio de variantes de secuencia en regiones genómicas de CTV es la obtención de información que permita clasificar a los aislamientos de una manera más rápida, segura y económica que el *indexing* biológico. Tal como se describió en secciones precedentes existe una gran variedad de estudios realizados tanto con el uso de anticuerpos como con sondas utilizadas con el fin de identificar aislamientos de CTV. Una de las estrategias empleadas es la hibridación con clones de dos aislamientos de características biológicas diferentes que no presentan hibridación cruzada (Albiach *et al.*, 1995b).

V.D.1) IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE LA BIBLIOTECA DEL AISLAMIENTO C268-2 CON CAPACIDAD DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL

En este trabajo se obtuvo un panel de sondas que permite identificar aislamientos de CTV según sus características biológicas. Para disponer de estas sondas discriminativas de aislamientos diferentes se probó primero la hibridación de fragmentos de clones de la biblioteca de cDNA del aislamiento argentino de CTV C268-2, con diferentes sondas. Con este fin se realizaron ensayos de *Southern blot* con sondas de cDNA obtenidas a partir de dsRNA de diez aislamientos de CTV de características biológicas diferentes. En esta etapa se seleccionaron clones, o fragmentos de los mismos, que exhibieron hibridación diferencial con las sondas utilizadas.

V.D.2) CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS EN ENSAYOS DE *DOT BLOT*

Los segmentos genómicos seleccionados se utilizaron como sondas para la diferenciación de aislamientos de CTV argentinos y de distinto origen geográfico. En la mayor parte de los casos se obtuvieron resultados concordantes con el comportamiento previo de los clones. El panel de sondas utilizadas cubre diversas regiones del genoma viral, ya que se encontraron variaciones en los patrones de hibridación en clones situados en la mitad 5' del genoma y en regiones correspondientes a los genes p65, p27, p18, p20 y p23. Las sondas con mayor poder de discriminación entre aislamientos virales son aquellas que se sitúan en la porción 5' del extremo viral. Esta región está muy poco conservada entre genomas de CTV (Mawassi *et al.* 1996; Vives *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Albiach-Martí *et al.*, 2000a) y en algunos casos los aislamientos muestran valores de identidad nucleotídica menores al 40%. Es de fundamental importancia que los fragmentos utilizados en la caracterización de aislamientos cubran la mayor parte del genoma viral, ya que, tal como se indicó en las secciones precedentes, en la sintomatología causada por los

distintos aislamientos podría estar involucrada más de una región genómica. Por ende, cuanto mayor sea el número de regiones genómicas analizadas, más representativo de la realidad es el resultado obtenido.

En las condiciones estrictas de hibridación utilizadas en los ensayos, una de las sondas permite identificar todos los aislamientos de tristeza analizados, por ende puede ser usada para confirmar la presencia del virus en muestras no caracterizadas. Las restantes sondas identifican aislamientos débiles, moderados o severos, de manera rápida y eficiente. El uso de estas sondas también permitió determinar que, en el mismo biogrupo podían estar incluidos aislamientos con secuencias diferentes. Tal es el caso de los aislamientos T346 y limaGS, que están incluidos dentro del biogrupo II, pero que de acuerdo a su patrón de hibridación parecen ser más cercanos a los aislamientos del biogrupo III.

El análisis de los patrones de hibridación de los aislamientos argentinos con las sondas utilizadas permitió establecer que, en concordancia con el resultado del análisis de variabilidad poblacional del gen p27 (Cap. III), la mayoría de ellos comparte la misma secuencia mayoritaria. La excepción está dada por el aislamiento C268-2, que es el único que presenta una señal intensa con una de las sondas utilizadas (pMT54). Con esta misma sonda reaccionan, aunque muy débilmente, los aislamientos C257-2, C257-10 y C278-1. También es coincidente el comportamiento exhibido por los aislamientos C269-6 y C270-3, que mostraron baja señal de hibridación con las sondas utilizadas, indicando que presentan secuencias diferentes a ellas.

Las secuencias de las sondas descriptas en este estudio serán transferidas a la EEA INTA Concordia para su utilización en la caracterización de aislamientos de CTV por medio de ensayos de hibridación sobre improntas con sondas sintetizadas por métodos no radiactivos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

VI.1) ANÁLISIS DE VARIABILIDAD INTRA E INTERPOBLACIONAL DEL GEN P27 DE CTV

- Se determinó la variabilidad inter e intrapoblacional del gen p27 de CTV en aislamientos de distinto origen geográfico por medio del análisis de SSCP, que permite la detección rápida y confiable de la presencia de polimorfismos poblacionales.
- El estudio de SSCP, seguido de secuenciación, permitió determinar que los aislamientos de CTV analizados tienen un haplotipo mayoritario predominante y variantes poblacionales minoritarias.
- La comparación de las secuencias nucleotídicas obtenidas demostró que los aislamientos de CTV se comportan como quasiespecies y que en los aislamientos de campo más virulentos (C269-6, Baraño B, Capaño Bonito y C257-7), existen componentes minoritarios de la población que difieren notoriamente de la secuencia del haplotipo mayoritario de los mismos. Estas secuencias podrían cumplir un rol en la marcada virulencia que presentan dichos aislamientos.
- El análisis filogenético de los datos de secuencia del gen p27 permitió establecer que existe una correlación entre la secuencia de dicho gen y la sintomatología inducida por los aislamientos en plantas indicadoras. Los aislamientos de distinto origen geográfico se disponen en tres grupos definidos, formados por aislamientos débiles, moderados y severos.
- De acuerdo a los datos de filogenia, los aislamientos severos sudamericanos de CTV forman un grupo netamente diferenciado de los del resto del mundo y la mayor parte de ellos comparte la misma secuencia mayoritaria. La presencia de esta secuencia en plantas recientemente infectadas indicó que es la que está presente actualmente en la región y sigue dispersándose.
- Los ensayos de protección a RNAsas permitieron validar los resultados obtenidos, demostrando que la estructura poblacional inferida a partir de los datos del análisis de SSCP son robustos y representativos de las poblaciones virales estudiadas.
- En las secuencias aminoacídicas deducidas de los haplotipos mayoritarios de los aislamientos de distinto origen geográfico se encontraron algunos cambios que se correlacionan con la virulencia del aislamiento. Considerando que el producto peptídico codificado por p27 posiblemente sea responsable de la interacción con el áfido vector, estos residuos podrían estar relacionados con el transporte o diseminación más o menos eficiente de los aislamientos por los distintos vectores.

VI.2) SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DE cDNA DEL AISLAMIENTO C268-2

- La secuenciación de los clones de una biblioteca de cDNA del aislamiento C268-2 determinó que en el mismo coexisten variantes de secuencia muy diferentes y que no se asemeja globalmente a ninguno de los aislamientos actualmente secuenciados.
- Se demostró, de acuerdo a los datos de secuenciación de los clones, que en el aislamiento C268-2 la situación observada es contraria a lo postulado hasta el momento en la bibliografía, donde se sostiene que existe una secuencia *master* con variantes minoritarias mínimas. En base a los resultados obtenidos es posible afirmar que dentro del mismo aislamiento existen variaciones considerables de secuencia y coexisten al menos dos variantes genómicas diferentes.
- De acuerdo al análisis de variabilidad del gen p27, C268-2 es uno de los aislamientos más homogéneos, por lo que se supone que la variabilidad intrapoblacional sea aún mayor en los restantes aislamientos argentinos.

VI.3) IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL Y APLICACIÓN A LA CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS VIRALES

- Los clones de la biblioteca de cDNA de C268-2 se analizaron en ensayos de *Southern blot* con el fin de identificar regiones que pudieran utilizarse en la caracterización rápida y confiable de aislamientos de CTV.
- Se seleccionaron regiones genómicas que mostraron diferencias en su comportamiento frente a sondas de cDNA sintetizadas a partir de dsRNA de aislamientos virales caracterizados por *indexing* biológico.
- Los fragmentos seleccionados se utilizaron en ensayos de *dot blot* y permitieron, por un lado, identificar tristeza y por otro, discriminar entre aislamientos débiles, moderados y severos.
- Se encontró que, en concordancia con los resultados del análisis de variabilidad del gen p27, la mayor parte de los aislamientos argentinos presentaron un patrón de hibridación semejante, indicando que poseen haplotipos mayoritarios similares.

APÉNDICE

SECCIÓN A: SECUENCIAS DE PRIMERS**A1) PRIMERS UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN P27 COMPLETO Y DE LOS FRAGMENTOS A Y B DEL MISMO**

p27-5': 5' CAT GGC AGG TTA TAC 3' (directo)
p27-3': 5' CTA TAA GTA CTT ACC CAA ATC 3' (reverso)
p25-3': 5' TCA ACG TGT GTT GAA TTT CCC 3' (reverso)
intp27-3': 5' ACT TAC GTA GAG CGT TTG G 3' (reverso)
extp27: 5' CCA AAC GCT CTA CGT AAG T 3' (directo)

A2) PRIMERS UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL

S40D: 5' CGG ATC CGG TCA 3' (directo)
S40R: 5' TCG GGC ATG CT 3' (reverso)
S41D: 5' CGA CTC TTG ATA TAT T 3' (directo)
S41R: 5' CTC AGC TGC AAC AAC 3' (reverso)
S45D: 5' GAT TCC ACT GAA AAA 3' (directo)
S45R: 5' AGC CAA GTG AAC CA 3' (reverso)
S47D: 5' CCG AAT GCT CTA CG 3' (directo)
S47R: 5' TCG GAC GCT CGA A 3' (reverso)
S54D: 5' GCG AAA CTG CGA 3' (directo)
S54R: 5' GGA CTC AAA ACT GG 3' (reverso)
S2D: 5' GGG CTG ATG AGG 3' (directo)
S2R: 5' CGA GAA TCA GAA CG 3' (reverso)

A3) PRIMERS UTILIZADOS EN LA SECUENCIACIÓN DE LOS CLONES DE LA BIBLIOTECA DE CDNA AISLAMIENTO C268-2

C131: 5' ATT CCC GGG GGT GCT TTT GGG TTT AGA C 3'(directo)
C78: 5' CAA GAT CTT TAC AAT GGA TAA TAC TAG C 3' (directo)
L49: 5' ATT GAA AAA GCG AGG GGC 3' (directo)
L56: 5' TGA TGA GTA GGA AGC GAG 3', (directo)
L66: 5' CCT TCT TGA ATC AAC TCG 3' (directo)
M59: 5' CGG GAA GAT TAT CAC CCG AG 3' (directo)
D27: 5' CGG TTA CGA CTT TCA GTG 3' (directo)
D87: 5' ATT GGA CTG CGT AAT TCA AG 3' (reverso)

A4) PRIMERS UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN P6

p6D: 5' **AAT GGA** CTG CGT AAT TCA AG 3' (directo, en negrita, codón de iniciación de traducción del gen)
p6R: 5' ACC CAA AAG CAC CAT ACC 3' (reverso)

SECCIÓN B: TABLAS

Tabla XI. Ubicación y tamaño de los clones de la biblioteca de cDNA del aislamiento C268-2.

clon	localización (con respecto a T36)	tamaño (en pb)
pMT54	p349 (561-2288)	1731
pLT64	p349 (3264-3817)	551
pMT59	p349 (3864-4778)	916
pLT65	p349 (6526-7214)	686
pLT39	p349 (7128-7694)	567
pLT60 ¹	p349 (8023-8903)	881
pLT56	p349 (8097-8968)	872
pLT48	p6 y p65 (11918-12715)	798
pLT57	p6 y p65 (11987-12749)	763
pLT40 ¹	p65 (12266-13317)	1052
pLT46	p65 (13054-13553)	500
pDGT48	p65 (13434-14132)	699
pDGT27	p65 y p61 (13000-13805)	806
pLT66	p65 y p61 (13605-14374)	770
pDGT87	p61 (13791-14974)	1184
pLT7	p61 (14546-15179)	634
pLT45 ²	p61 y p27 (14914-15771)	861
pLT47	p27 (15599-16125)	526
pLT41	p27 y p25 (15973-16491)	518
pLT43	p25 (16102-16767)	664
pLT49	p25 y p18 (16160-17183)	1024
pMT26	p25 y p18 (16482-17179)	698
pDGT2 ¹	p25 y p18 (16768-17344)	577
pDGT76 ¹	p25 a p23 (16761-18689)	1929
pLT61	p13 y p20 (17534-18169)	636
pMT78	p13 y p20 (17548-18292)	745
pLT54	p20 y p23 (17987-18562)	577
pLT10	p20 y p23 (18182-18991)	809
pDGT30	p23 (18324-18815)	493
pLT53	p23 y 3' UTR (18516-19414)	626

¹clones secuenciados por el Lic. Jorge Trelles. El clon PDGT2 se volvió a secuenciar en este trabajo para corroborar las zonas dudosas.

²clon secuenciado por el Lic. Eneas Acuña (tesina de graduación, 1996). Se volvió a secuenciar en este trabajo para corroborar la secuencia obtenida.

Tabla XII. Comparación entre las secuencias nucleotídicas de los clones de la biblioteca del aislamiento C268-2 y las secuencias presentes en bancos de datos.

clon	localización	T30	T385	T36	VT	SY568	NUagA
pMT54	p349	76,3 ^z	76,2	76,0	74,5	75,8	74,3
pLT64	p349	79,9	79,7	95,8	80,2	81,9	81,3
pMT59	p349	78,9	78,7	91,5	75,9	78,1	78,9
pLT65	p349	72,3	71,9	62,8	71,6	74,6	72,3
pLT39	p349	96,6	96,1	62,4	84,3	87,6	84,1
pLT60	p349	82,5	82,2	75,7	80,6	82,2	82,4
pLT56	p349	77,0	76,7	90,7	76,0	77,3	76,8
pLT48	p6 y p65	87,0	87,0	86,5	94,9	87,0	97,2
pLT57	p6 y p65	87,0	86,8	86,1	90,0	87,0	90,8
pLT40	p65	85,6	85,3	86,0	89,3	85,6	90,8
pLT46	p65	88,2	88,0	89,0	91,0	88,6	93,0
pDGT48	p65	90,3	90,8	91,0	96,1	90,7	97,4
pDGT27	p65 y p61	89,6	89,8	90,6	93,3	90,1	94,0
pLT66	p65 y p61	88,4	88,8	89,0	94,7	88,6	97,3
pDGT87	p61	92,4	92,3	91,9	87,5	92,2	88,6
pLT7	p61	93,5	93,7	96,5	86,0	93,7	85,8
pLT45	p61 y p27	87,9	87,9	87,6	95,2	91,0	98,5
pLT47	p27	91,6	91,4	90,9	85,7	92,0	87,6
pLT41	p27 y p25	92,1	92,1	91,7	89,9	90,3	89,9
pLT43	p25	90,8	90,7	90,7	91,6	91,3	91,9
pLT49	p25 y p18	90,2	90,5	91,2	91,2	91,1	91,7
pMT26	p25 y p18	92,3	92,4	93,0	94,0	93,6	94,3
pDGT2	p25 y p18	89,6	89,9	89,8	89,1	89,4	90,3
pDGT76	p25 a p23	91,1	91,2	90,9	93,4	93,9	94,2
pLT61	p13 y p20	93,2	93,7	91,5	96,4	98,6	98,4
pMT78	p13 y p20	93,0	93,4	92,3	96,5	98,8	98,6
pLT54	p20 y p23	93,9	94,3	88,4	89,6	90,3	90,3
pLT10	p20 y p23	89,9	90,2	91,0	89,4	89,9	90,0
pDGT30	p23	94,7	95,5	89,4	88,6	89,9	89,9
pLT53	p23 y 3' UTR	92,3	92,8	91,9	92,0	91,7	91,7

^zse muestran valores de identidad de secuencia nucleotídica (expresados como porcentaje) con la región correspondiente de los distintos aislamientos de CTV. En gris se indica el mayor valor obtenido.

Tabla XIII. Comparación entre las secuencias aminoacídicas deducidas de los clones del aislamiento C268-2 y los aislamientos presentes en bancos de datos.

clon	ORF	T30		T385		T36		VT		SY568		NUagA	
pMT54	P349	80,7 ^z	75,2	80,7	74,8	65,4	61,2	78,3	72,5	80,2	73,8	77,2	71,6
pLT64	P349	91,8	88,6	91,8	88,6	97,3	96,2	89,1	84,2	91,3	87	91,8	87,5
pMT59	P349	91,1	87,9	90,8	87,9	93,7	92,4	84,9	82,3	89,8	86,6	90,5	87,5
pLT65	P349	79,5	72,5	79,5	72,0	62,4	56,8	74,7	68,6	76,8	72,5	75,5	69,9
pLT39	P349	93,6	93,1	93,1	92,6	56,1	51,3	83,6	80,9	86,2	83,1	83,6	80,4
pLT60	P349	92,8	89,1	91,8	87,4	86	80,2	90,4	86	93,5	89,4	93,5	89,7
pLT56	P349	90,7	86,9	90,3	86,9	96,2	95,9	87,6	84,1	90,3	87,2	90,3	86,5
pLT48	P6	97,6	97,6	97,6	97,6	88,1	88,1	90,5	88,1	97,6	97,6	97,6	97,6
	P65	93,7	92,8	93,2	92,3	94,1	92,8	96,4	96,4	94,1	93,2	99,1	98,7
pLT57	P6	94,7	94,7	94,7	94,7	78,9	78,9	89,5	84,2	94,7	94,7	84,2	84,2
	P65	94,4	93,1	94	92,7	94,4	92,7	96,1	95,7	94,8	93,6	98,3	97,4
pLT40	P65	94,9	92	94,6	91,7	94,6	92,6	94,9	93,7	95,4	92,6	98,3	97,4
pLT46	P65	97	95,8	96,4	95,8	95,8	94,6	97,6	97	97,6	97	99,4	98,8
pDGT48	P65	92,6	93,2	96,2	94	97	96,2	92,5	90,2	96,2	94	97,7	97,7
	P61	98,4	96,8	99,2	97,6	99,2	97,6	99,2	97,6	99,2	97,6	96,8	96,8
pDGT27	P65	97,4	95,9	97,4	96,3	97	96,3	96	95,1	98,1	97	98,5	98,1
	P61	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	87,5	87,5
pLT66	P65	98,7	96,1	98,7	96	97,4	96	90,8	86,8	98,7	96	96	96
	P61	96,1	94,7	96,1	94,7	95,6	94,2	96,6	94,7	96,1	94,7	97,6	97,6
pDGT87	P61	95,7	94,2	95,6	94,2	94,9	93,4	93,7	90,9	95,4	93,9	94,2	92,4
pLT7	P61	97,6	95,7	97,6	95,7	97,2	96,7	94,3	91,5	97,6	95,7	93,8	91,0
pLT45	P61	90,7	86	91,3	86,7	90	86	96	95,7	90,7	86	97,4	97,4
	P27	94,4	94,4	94,4	94,4	96,5	95,8	98,6	98,6	94,4	94,4	99,3	99,3
pLT47	P27	97,4	96,7	97,4	96,8	98,0	96,7	95,5	94,8	97,4	96,7	98,7	98,0
pLT41	P27	96,6	96,6	96,6	96,6	96,6	96,6	93,1	93,1	96,6	96,6	96,6	96,6
	P25	96,4	94,6	95,5	94,6	94,6	92,9	96,4	94,6	99,1	98,2	99,1	97,3
pLT43	P25	97,5	95,6	97,1	95,6	96,6	95,6	96,6	95,6	98,5	98,0	98,5	97,5
pLT49	P25	97,7	95,9	97,3	95,9	96,8	95,5	96,8	95,9	98,6	98,2	98,6	97,7
	P18	96,9	92,0	97,7	93,8	97,7	94,6	93,8	90,8	96,9	93,1	98,5	94,6
pMT26	P25	100	98,3	100	98,3	100	99,1	98,3	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1
	P18	96,1	95,3	96,9	96,9	96,9	96,1	94,6	94,6	96,9	96,9	97,7	97,7
pDGT2	P25	100	100	100	100	100	94,7	100	100	100	100	100	100
	P18	93,4	90,5	94,1	91,7	93,4	91,7	91,1	89,3	92,9	90,5	94,6	92,3
pDGT76	P25	95,4	95,4	95,4	95,4	95,4	90,9	95,4	95,4	95,4	95,4	95,4	95,4
	P18	95,2	94,6	95,8	95,8	95,2	94,6	94	94	96,4	96,4	97,6	97,6
	P13	96,7	94,2	95,8	93,3	94,2	91,7	95	94,2	91,7	90	93,3	91,7
	P20	95,1	93,4	95,1	93,4	96,7	95,6	96,7	96,7	98,4	98,4	98,4	98,4
	P23	90,8	84,7	91,8	85,7	90,8	84,7	94,9	92,8	95,9	92,8	96,9	93,9
pLT61	P13	86,3	86,3	86,3	86,3	90,2	90,2	94,1	94,1	94,1	94,1	96,1	96,1
	P20	97	95,6	97	95,6	98,5	97	97,8	97,8	100	100	100	100
pMT78	P13	87,2	87,2	87,2	87,2	91,5	91,5	95,7	95,7	95,7	95,7	97,9	97,9
	P20	96,6	94,9	96,6	94,9	98,3	97,2	98,3	98,3	100	100	100	100
pLT54	P20	94,4	93,5	94,4	93,5	94,4	92,6	94,4	92,6	95,4	93,5	95,4	93,5
	P23	94,6	91,1	96,4	92,9	83,9	78,6	82,1	78,6	87,5	82,1	85,7	80,4
pLT10	P20	93	93	93	93	100	100	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7
	P23	94	91	93,5	90,5	92,5	89,9	92,5	88,4	94,5	90	94	90
pDGT30	P23	96,4	93,6	97,9	95	91,4	86,4	90,7	85	93,6	87,1	92,9	86,4
pLT53	P23	95,9	92,3	95,3	91,7	94,7	91,1	93,5	89,9	94,7	91,1	94,1	91,1

^zse muestran valores de similitud e identidad (expresados como porcentaje) con la región correspondiente de los distintos aislamientos de CTV. En gris se indica el mayor valor de similitud obtenido.

SECCIÓN C: ALINEAMIENTOS DE SECUENCIAS

C1) ALINEAMIENTOS MÚLTIPLES DE SECUENCIAS DE LOS FRAGMENTOS A Y B DEL GEN P27 EN LOS AISLAMIENTOS DE DISTINTO ORIGEN GEOGRÁFICO

	1					60
♣ bbc44a (m)	-----	-----	---c-agt	t-----	-----	-a-a----
♣ c2696c43a (m)	-----	-----	-----g-	t---t--	-----	-a-a----
♣ c2696c5a (M)	-----	-----	-----g-	t---t--	-----	-----
♣ capaoc1a (M)	-----	-----	-----g-	t---t--	-----	-----
♣ bbc9a (M)	-----	-----	-----g-	t-c-t--	-----	-----
♣ c2682c3a (m)	-----	-----	-----g-	t---t--	-----	-----
♣ peracla (M)	-----	-----	-----g-t	-----	-----	-----
♣ perac36a (m)	-----	-----	-----g-t	-----	-----	-----
♣ c2682c6a (M)	-----	-----	-----g-t	-----	-----	-----
♣ t388c17a (m)	-----	-----	-----t-	---c----	-----	-----a
♣ t388c3a (M)	-----	-----	-----t-	---c----	-----	-----a
♣ t300c1a (m)	-----	-----	-----t-	-----	-----	-----
♣ t312c1a (M)	-----	-----	-----t-	-----	-----	-----
♣ t300c4a (M)	-----	-----	-----t-	-----	-----	-----
♣ t385c24a (m)	-----	-----	-----t-	-----	-----	-----
♣ t385c2a (M)	-----	-----	-----t-	-----	-----	-----
♣ t32c7a (M)	-----	-----	-----t-	-----	-----	-----
■ consenso	CATGGCAGGT	TATACAGTAC	TTCTTAA-AC	CGATGACAAA	GAAATGGATC	CGGTGAGTGC
61						120
♣ bbc44a (m)	t-----	--c-a-c-	---c----	c----g--	---a-t---	---g----
♣ c2696c43a (m)	t-----	--c-a-c-	---ca---	c-----	---a-t---	---g--t-
♣ c2696c5a (M)	-----	-----c-	-----t-	-----	---a---	---t---
♣ capaoc1a (M)	-----	-----g--	-----c-	-----t-	---a---	---t---
♣ bbc9a (M)	-----	-----g--	-----gc-	-----t-	---a---	---t---
♣ c2682c3a (m)	-----	-----	-----c-	-----t-	-----	---g----
♣ peracla (M)	---c-g--	-----	-----g-	g-----	-----	-----
♣ perac36a (m)	--tc-g--	-----	-----g-	g-----	-----	-----
♣ c2682c6a (M)	-----	-----	-----g-	g-----	-----	-----
♣ t388c17a (m)	-----	-----	-----g-	-----	---a---	-----g
♣ t388c3a (M)	-----	-----	-----g-	-----	---a---	-----
♣ t300c1a (m)	-----	-----	-----	-----	-----c-	-----
♣ t312c1a (M)	-----	-----	-----	-----	-----c-	-----
♣ t300c4a (M)	-----	-----	-----	-----	-----c-	-----
♣ t385c24a (m)	-----	-----	-----	-----	-c-----	-c-----
♣ t385c2a (M)	-----	-----	-----	-----	-----c-	-----
♣ t32c7a (M)	-----	-----	-----	-----	-----c-	-----
■ consenso	CGCTGTACCC	GGTAAGTATC	CGGATGTCAT	TGAAAAATTT	GTGGCCAATA	GGTCCGTAGA
121						180
♣ bbc44a (m)	-----	-----	---c----	---c----	---g----	-----
♣ c2696c43a (m)	-----	-----	---c----	---c-t---	---g----	-----
♣ c2696c5a (M)	t-----	-----	-----	-----	---g----	-----
♣ capaoc1a (M)	t-----	-----	-----	-----	---g----	-----
♣ bbc9a (M)	t-----	-----	-----	-----	---g----	-----
♣ c2682c3a (m)	t-----	-----	-----	-----	---g----	-----
♣ peracla (M)	t-----	-----	-----	-----	-----	-g-----
♣ perac36a (m)	t-----	-----	-----	-----	-----	-g-----
♣ c2682c6a (M)	t-----	-----	-----	-----	-----	-g-----
♣ t388c17a (m)	-----	-----	-----c-	-----	-----	-----
♣ t388c3a (M)	-----	-----	-----c-	-----	-----	-----
♣ t300c1a (m)	-----	-----	-----c-	-----	-----	-----
♣ t312c1a (M)	-----	-----	-----c-	-----	-----	-----
♣ t300c4a (M)	-----	-----	-----c-	-----	-----	-----
♣ t385c24a (m)	-----	-----	-----c-	-----	-----	-----
♣ t385c2a (M)	-----	-----	-----c-	-----	-----	-----
♣ t32c7a (M)	-----	-----	-----c-	-----	-----	-----
■ consenso	CGCGTTAATA	GAAGGCGTTA	TAAGTAAGTT	GGATACCAAT	TCAATATACG	AAGATTCCAC

	181					240
♣ bbc44a (m)	-----g- -ac- -g- t-----					
♣ c2696c43a (m)	-----g- -ac- -g- t-----					
♣ c2696c5a (M)	-----gt -a- -g- -c-----					
♣ capaoc1a (M)	-----gt -a- -g- -c-----					
♣ bbc9a (M)	-----gt -a- -g- -c-----					
♣ c2682c3a (m)	-----g- -g- -g- -c-----					
♣ perac1a (M)	-----t-----					
♣ perac36a (m)	-----t-----					
♣ c2682c6a (M)	-----t-----					
♣ t388c17a (m)	-----t-----					
♣ t388c3a (M)	-----t-----					
♣ t300c1a (m)	-----					g-----
♣ t312c1a (M)	-----					g-----
♣ t300c4a (M)	-----					g-----
♣ t385c24a (m)	-----					g-----
♣ t385c2a (M)	-----					g-----
♣ t32c7a (M)	-----					g-----
■ consenso	TGAAAAATTT	ACTGGTGAAC	ACTTGAAATA	CGTTATGGTT	ACTATGGATA	CTTCTTATT
	241					300
♣ bbc44a (m)	-----t-- -a-----			ac-----t	c-g-----	-t-g-----
♣ c2696c43a (m)	-----t-- -a-----			ac-----t	c-g-----	-t-----
♣ c2696c5a (M)	-----t-- -a-----			-a-----		
♣ capaoc1a (M)	-----t-- -a-----			-a-----		
♣ bbc9a (M)	-----t-- -a-----			-a-----		
♣ c2682c3a (m)	-----t-- -a-----			-a-----		
♣ perac1a (M)	-----					
♣ perac36a (m)	-----					
♣ c2682c6a (M)	-----g-----					
♣ t388c17a (m)	-----				c-----	
♣ t388c3a (M)	-----				c-----	
♣ t300c1a (m)	-----					
♣ t312c1a (M)	-----					
♣ t300c4a (M)	-----				-c-----	
♣ t385c24a (m)	-----					
♣ t385c2a (M)	-----				-g-----	
♣ t32c7a (M)	-----					g-----
■ consenso	AGAAAACACTAC	AAGACGAAAA	CGGAAGATCT	GTTGGTTCAC	TTAGCTATGA	TCCAAAAGAG
	301					360
♣ bbc44a (m)	-----		-t-----	--a-t-t	---g---	
♣ c2696c43a (m)	-----		-t-----	--a-t-t	---g---	
♣ c2696c5a (M)	---a---c-----		-t-----	t-----	---g---	
♣ capaoc1a (M)	---a---c-----		-t-----	t-----	---g---	
♣ bbc9a (M)	---a-t-c-----		-t-----	t-----	---g---	
♣ c2682c3a (m)	---a---c-----		-t-----	t-----	---g---	
♣ perac1a (M)	-----					
♣ perac36a (m)	-----					
♣ c2682c6a (M)	-----					
♣ t388c17a (m)	-----					
♣ t388c3a (M)	-----					
♣ t300c1a (m)	-----	-c-----				
♣ t312c1a (M)	-----	-c-----				
♣ t300c4a (M)	-----	-c-----				
♣ t385c24a (m)	-----	-c-----				
♣ t385c2a (M)	-----	-c-----				
♣ t32c7a (M)	-----	-c-----				
■ consenso	GTTGTGCACT	ATATCCACGA	GCACTAAAAC	CAAGTCCGC	GATAAAGTT	GTATTAGTTA

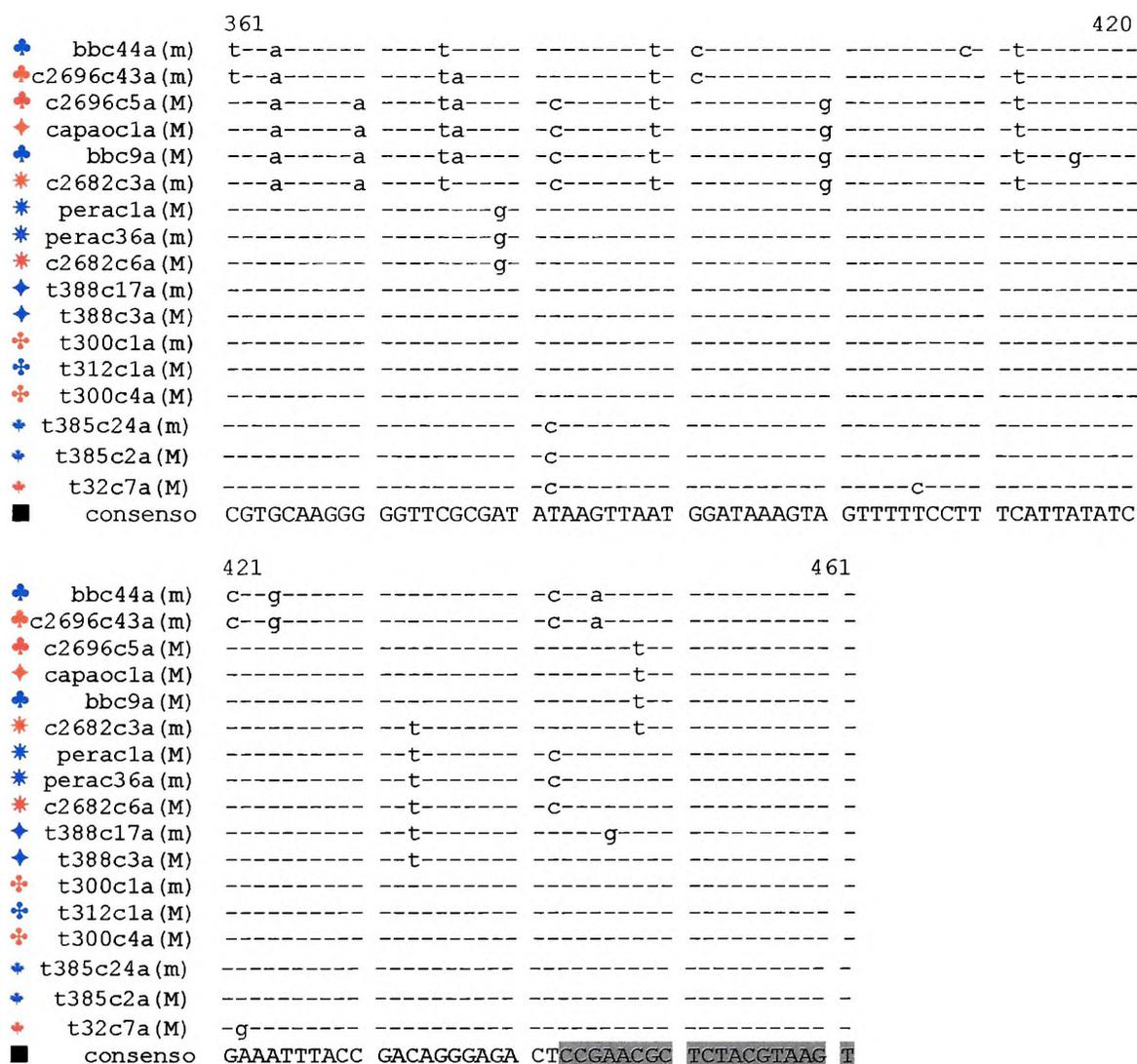


Figura C.1A: Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas correspondientes al fragmento A de los clones analizados. Símbolos: (♣) aislamientos del biogrupo I (T32 en rojo; T385 en azul); (♣) aislamientos del biogrupo II (T300 en rojo; T312 en azul); (*) aislamientos del biogrupo III (C268-2 en rojo; PeraGS en azul); (♣) aislamientos del biogrupo IV (C269-6 en rojo; BaraδB en azul); (♠) aislamientos del biogrupo V (Capaδ Bonito en rojo; T388 en azul). Clones mayoritarios de cada aislamiento (M), clones minoritarios (m). La secuencia consenso (■) es la generada por el programa Pretty sobre un alineamiento múltiple realizado con el programa PileUp, las bases idénticas al consenso se reemplazan por guiones. Con fondo gris se indica la secuencia de los primers utilizados en la amplificación del fragmento.

	443					502
♣ c2696c47b (m)	-----t-----	-----	-----	-----	-----a-----	-----a
♣ c2696c5b (M)	-----t-----	-----	-----	-----	-----a-----	-----a
♦ capaoc1b (M)	-----t-----	-----	-----	-----	-----a-----	-----a
* perac38b (m)	-----t-----	-----	-----	-----	-----a-----	-----a
♦ capaoc4b (m)	-----t-----	-----	-----	-----	-----a-----	-----a
♣ bbc9b (M)	-----t-----	-----	-----	-----	c-----a-----	-----a
* c2682c3b (m)	-----t-----	-----	-----	-----	-----a-----	-----
* c2682c6b (M)	-----t-----	-----	-----	-----	-----t-a-----	-----
* perac1b (M)	-----t-----	-----	-----	-----	-----a-----	-----
♦ t388c10b (m)	-----	-----	-----	-----	-----g-----	-----
♦ t388c3b (M)	-----	-----	-----	-----	-----g-----	-----
♣ t300c4b (M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t312c1b (M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t300c13b (m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t32c7b (M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t385c15b (m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t385c2b (M)	-----	-----	-----	c-----	-----	-----
♣ t312c20b (m)	-----	-----	-----	-----	-----	c-----
♣ bbc44b (m)	--a-----	-----	-----t-c	--t-----a-	-----	-----a
■ consenso	CCGAACGCTC	TACGTAAGTA	TGCTTGCACT	TTCGAGGAGT	TACACTTGTG	TATGGCTAGG

	503					562
♣ c2696c47b (m)	--a-----	--c-----	g-----	-----g-	-t-----	-----
♣ c2696c5b (M)	--a-----	--c-----	g-----	-----g-	-t-----	-----
♦ capaoc1b (M)	--a-----	--c-----	g-----	-----g-	-a-----	-----
* perac38b (m)	--a-----	--c-----	g-----	-----g-	-t-----	-----
♦ capaoc4b (m)	--a-----	--c-----	g-----	-----g-	-t-----	-----
♣ bbc9b (M)	--a-----	--c-----	g-----	-----g-	-t-----	-----
* c2682c3b (m)	--a-----	--c-----	g-----	-----g-	-t-----	-----
* c2682c6b (M)	-----	-----	-----	-----	-----	g-----g
* perac1b (M)	-----	-----	-----	-----	-----	g-----g
♦ t388c10b (m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♦ t388c3b (M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t300c4b (M)	-----	-----	-----	-----t-----	-----	-----g
♣ t312c1b (M)	-----	-----	-----	-----t-----	-----	-----g
♣ t300c13b (m)	-----	-----	-----	-----t-----	-----	-----g
♣ t32c7b (M)	-----	-----	-----g-----	-----t-----	-----	-----g
♣ t385c15b (m)	-----	-----	-----	-----t-----	-----	-----g
♣ t385c2b (M)	-----	-----	-----	-----t-----	-----	-----g
♣ t312c20b (m)	-----	-----	-----	-----t-----	-----	g-----g
♣ bbc44b (m)	--a-----	--c-----	--c-----	--a-----	-t-a-----	g-c-----
■ consenso	TTGAGACCCG	ACTTATACGA	AAATAAAAAG	ACGACCAAAG	CCGGGACTCC	ACATTTAAAA

	563					622
♣ c2696c47b (m)	--t-----	---t-----	-----	-----	-----	g-----
♣ c2696c5b (M)	--t-----	---t-----	-----	-----	-----t--	g-----
♦ capaoc1b (M)	--t-----	---t-----	-----	-----	-----t--	g-----
* perac38b (m)	--t-----	---t-----	-----	-----	-----t--	g-----
♦ capaoc4b (m)	--t-----	---t-----	-----	-----	-----t--	g-----
♣ bbc9b (M)	--t-----	---t-----	-----	-----	-----t--	g-----
* c2682c3b (m)	--t-----	---t-----	-----	-----	-----t--	g-----
* c2682c6b (M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----g---
* perac1b (M)	-----	-----	-----	-----	-----g---	-----g---
♦ t388c10b (m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♦ t388c3b (M)	-----	-----	-----c-----	-----	-----	-----
♣ t300c4b (M)	-----t-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t312c1b (M)	-----t-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t300c13b (m)	---c-t-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t32c7b (M)	-----t-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t385c15b (m)	-----t-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t385c2b (M)	-----t-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ t312c20b (m)	-----t-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ bbc44b (m)	-----g-	---t--t--	---a-----	-----t---	-a-----	---c-----g
■ consenso	GGCTACTTAT	CAGCCGACTT	TCTTTCGGGT	TCTCTCCCAG	GGTACTCCGA	ACATGAACGA

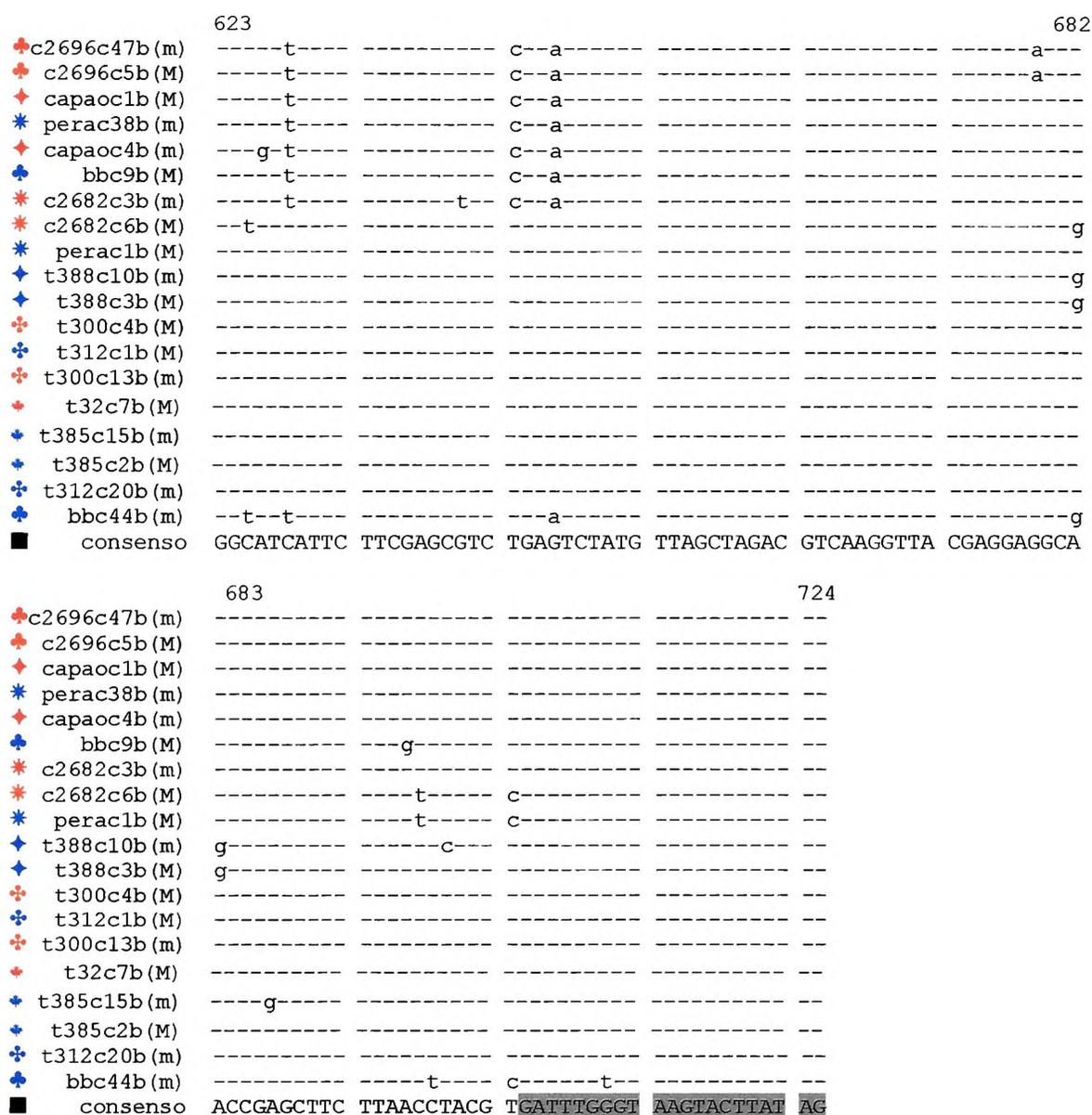


Figura C.1B: Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas correspondientes al fragmento B de los clones analizados. Símbolos: (♣) aislamientos del biogrupo I (T32 en rojo; T385 en azul); (♠) aislamientos del biogrupo II (T300 en rojo; T312 en azul); (♠) aislamientos del biogrupo III (C268-2 en rojo; PeraGS en azul); (♣) aislamientos del biogrupo IV (C269-6 en rojo; BaraõB en azul); (♠) aislamientos del biogrupo V (Capaõ Bonito en rojo; T388 en azul). Secuencias de clones representativos de los patrones mayoritarios de cada aislamiento (M), clones minoritarios (m). La secuencia consenso (■) es la generada por el programa Pretty sobre un alineamiento múltiple generado con el programa PileUp, las bases idénticas al consenso se reemplazan por guiones. Con fondo gris se indica la secuencia de los *primers* utilizados en la amplificación del fragmento.

C2) ALINEAMIENTOS MÚLTIPLES DE SECUENCIAS DE LOS FRAGMENTOS MENOR Y MAYOR DEL GEN P27 EN AISLAMIENTOS ARGENTINOS DE CTV

	1					60
*c101 (C268-2M)	-----	-----	-----t	c-----c--	-----	-----
*c107 (C268-2m)	-----	-----	-----t	c-----c--	-----	-a-----
* c53 (C257-9m)	-----	-----	-----t	c-----c--	-----	-----
♣c238 (C278-1m)	-----	-----	-----t	c-----c-g-	-----	-----
♣ c19 (C257-2m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ c7 (C257-2m)	-----	-----	-----	-----	-----a	-----
♣ c17 (C257-2m)	-----	-----	-----g-----	-----	-----a	-----
♣ c1 (C257-2M)	-----	-----	-----	-----	-----a	-----
♣c126 (C269-6M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c153 (C270-3M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c177 (C271-2M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c204 (C271-8M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
* c59 (C257-9M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
*c76 (C257-10M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c202 (C271-8m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c236 (C278-1M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c256 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ c36 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c250 (C269-1M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c251 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ c38 (C257-7M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
* c54 (C257-9m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
*c85 (C257-10m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----a
♣c211 (C271-8m)	-t-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c263 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c127 (C269-6m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c141 (C269-6m)	-----	-----	-----c--agt	-----c--	-----	-----a--a-----
■ Consenso	CATGGCAGGT	TATACAGTAC	TTCCTAAGAC	TGATGATAAA	GAAATGGATC	CGGTGAGTGC

	61					120
*c101 (C268-2M)	-----g--	-----t-	-----cg-	---g-----	-----c--	-----c--
*c107 (C268-2m)	-----g--	-----t-	-----cg-	---g-----	-----c--	-----c--
* c53 (C257-9m)	-----g--	-----t-	-----cg-	---g-----	-----c--	-----c--
♣c238 (C278-1m)	---c-g--	-----t-	-----cg-	---g-----	-----c--	-----c--
♣ c19 (C257-2m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣ c7 (C257-2m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣ c17 (C257-2m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣ c1 (C257-2M)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c126 (C269-6M)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c153 (C270-3M)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c177 (C271-2M)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c204 (C271-8M)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
* c59 (C257-9M)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
*c76 (C257-10M)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c202 (C271-8m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c236 (C278-1M)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c256 (C269-1m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣ c36 (C257-7m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c250 (C269-1M)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c251 (C269-1m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣ c38 (C257-7M)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
* c54 (C257-9m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
*c85 (C257-10m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c211 (C271-8m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c263 (C269-1m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c127 (C269-6m)	-----g--	-----t-	-----	-----	-----g--	-----c--
♣c141 (C269-6m)	t-----	---c-a---	---ca-c-	c-----	---a-t---	---g-----
■ Consenso	CGCTGTACCC	GGTAAGTACC	CGGATGTTAT	TGAAAAATTT	GTGGCAAATA	GGTCTGTAGA

	121				180
*c101 (C268-2M)	-----	-----	-----	-----	-a----- -g-----
*c107 (C268-2m)	-----	-----	-----	-----	-a----- -g-----
* c53 (C257-9m)	-----	-----	-----	-----	-a----- -g-----
*c238 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-a----- -g-----
* c19 (C257-2m)	c-----	-----	-----	-----	-----
* c7 (C257-2m)	c-----	-----	-----	-----	-----
* c17 (C257-2m)	c-----	-----	-----	-----	-----
* c1 (C257-2M)	c-----	-----	-----	-----	-----g-----
*c126 (C269-6M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c153 (C270-3M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c177 (C271-2M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c204 (C271-8M)	-----	-----	-----	-----	-----
* c59 (C257-9M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c76 (C257-10M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c202 (C271-8m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c236 (C278-1M)	-----	-----	-----	-----	-----a-----
*c256 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----a-----
* c36 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----a-----
*c250 (C269-1M)	-----	-----	-----	-----	-----a-----
*c251 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----a-----
* c38 (C257-7M)	-----	-----	-----	-----	-----a-----
* c54 (C257-9m)	c-----	-----	-----	-----	-----
*c85 (C257-10m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c211 (C271-8m)	-----	-----	-----	-----	-----g----- -g-----
*c263 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----a-----
*c127 (C269-6m)	-----	-----	-----	-----	-----c----- -c-----t-----
*c141 (C269-6m)	c-----	-----	-----	-----	-----c----- -c-----t-----
■ Consenso	TGCGTTAATA	GAAGGCGTTA	TAAGTAAAGTT	GGATACCAAT	TCGATATACG AAGATTCCAC

	181				240
*c101 (C268-2M)	-----a---	-----a-	---g-a--	---c-----	-----t-
*c107 (C268-2m)	-----a---	-----a-	---g-a--	---c-----	-----t-
* c53 (C257-9m)	-----a---	-----a-	---g-a--	---c-----	-----t-
*c238 (C278-1m)	-----a---	-----a-	---g-a--	---c-----	-----t-
* c19 (C257-2m)	-----	-----c	---g---	-----	-----
* c7 (C257-2m)	-----	-----c	---g---	-----	-----
* c17 (C257-2m)	-----	-----c	---g---	-----	-----
* c1 (C257-2M)	-----	-----c	---g-a-	-----	-----
*c126 (C269-6M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c153 (C270-3M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c177 (C271-2M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c204 (C271-8M)	-----	-----	-----	-----	-----
* c59 (C257-9M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c76 (C257-10M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c202 (C271-8m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c236 (C278-1M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c256 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
* c36 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c250 (C269-1M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c251 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
* c38 (C257-7M)	-----	-----	-----	-----	-----
* c54 (C257-9m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c85 (C257-10m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c211 (C271-8m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c263 (C269-1m)	-----	-----g-c	-----	-----	-----
*c127 (C269-6m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c141 (C269-6m)	-----a---	-----c	-ac-g---	t-----	-----t-
■ Consenso	TGAAAAGTTT	ACTGGTGAGT	ACTTAAAGTA	CGTTATGGTT	ACTATGGACA CTTTCTTATT

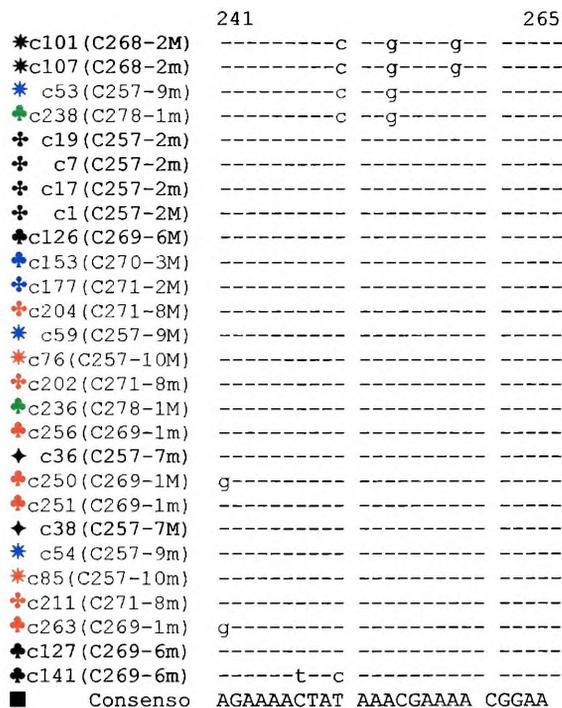
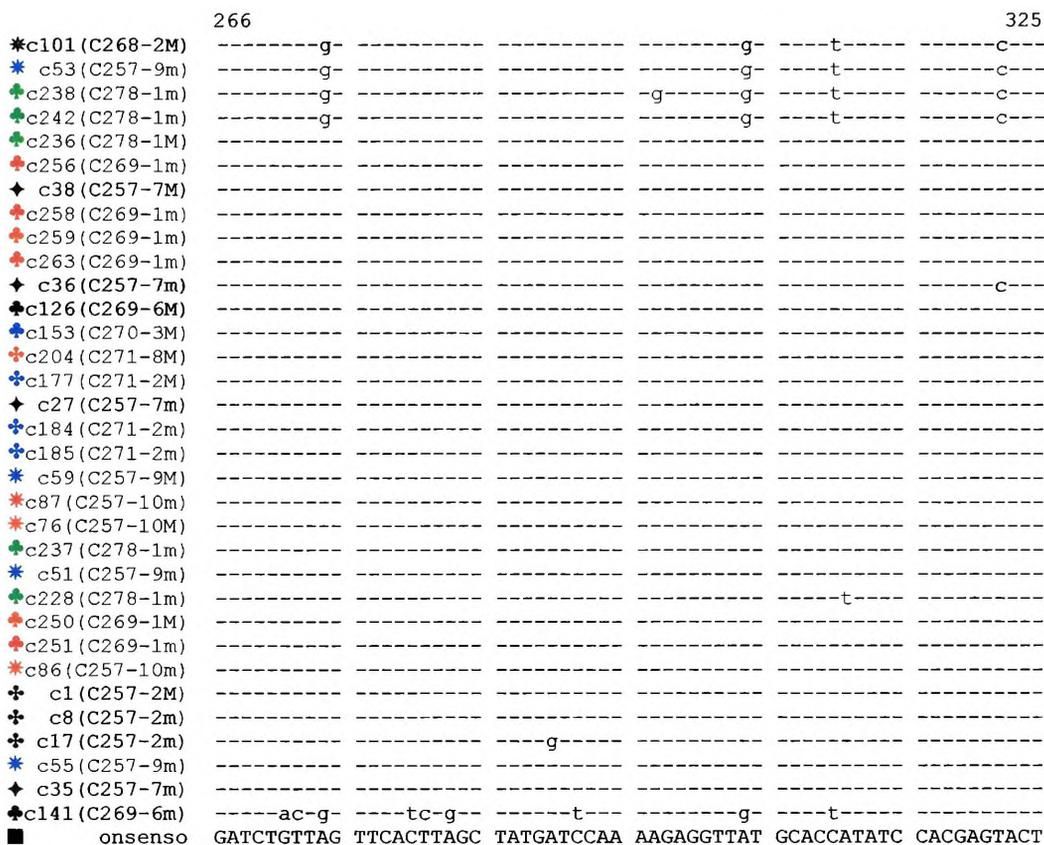


Figura C.2A: Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas correspondientes al fragmento menor de la totalidad de los clones analizados. Símbolos: (♣) aislamientos del biogrupo II (C257-2 en negro; C271-2 en azul y C271-8 en rojo). (*) aislamientos del biogrupo III (C268-1 en negro; C257-9 en azul, C257-10 en rojo). (♣) aislamientos del biogrupo IV (C269-6 en negro; C270-3 en azul; C269-1 en rojo; C278-1 en verde). (♣) aislamiento del biogrupo V (C257-7 en negro). Secuencias de clones representativos de los patrones mayoritarios de cada aislamiento (M), clones minoritarios (m). La secuencia consenso (■) se obtuvo con el programa PRETTY sobre el alineamiento múltiple producido con el programa PILEUP, las bases idénticas al consenso se reemplazan por guiones. Con fondo gris se indica la secuencia del primer directo utilizado en la amplificación del gen p27.



	326				385
*c101 (C268-2M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c53 (C257-9m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c238 (C278-1m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c242 (C278-1m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c236 (C278-1M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c256 (C269-1m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c38 (C257-7M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c258 (C269-1m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c259 (C269-1m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c263 (C269-1m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c36 (C257-7m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c126 (C269-6M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c153 (C270-3M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c204 (C271-8M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c177 (C271-2M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c27 (C257-7m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c184 (C271-2m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c185 (C271-2m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c59 (C257-9M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c87 (C257-10m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c76 (C257-10M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c237 (C278-1m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c51 (C257-9m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c228 (C278-1m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c250 (C269-1M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c251 (C269-1m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c86 (C257-10m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c1 (C257-2M)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c8 (C257-2m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c17 (C257-2m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c55 (C257-9m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
* c35 (C257-7m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
*c141 (C269-6m)	-----c-----	-----a-----	-----g-----	-----g-----	-----g-----
■ Consenso	AAACTAAGT	TCCGCGATAA	GGGTTGTATT	AGTTACGTAC	AAGGAGGTTT
					ACGATACAAG

	386				445
*c101 (C268-2M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---c-----
* c53 (C257-9m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---c-----
*c238 (C278-1m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---c-----
*c242 (C278-1m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c236 (C278-1M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c256 (C269-1m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
* c38 (C257-7M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c258 (C269-1m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c259 (C269-1m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c263 (C269-1m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
* c36 (C257-7m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c126 (C269-6M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c153 (C270-3M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c204 (C271-8M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c177 (C271-2M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
* c27 (C257-7m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c184 (C271-2m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c185 (C271-2m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
* c59 (C257-9M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c87 (C257-10m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c76 (C257-10M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c237 (C278-1m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
* c51 (C257-9m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c228 (C278-1m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c250 (C269-1M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c251 (C269-1m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c86 (C257-10m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
* c1 (C257-2M)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
* c8 (C257-2m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
* c17 (C257-2m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
* c55 (C257-9m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
* c35 (C257-7m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
*c141 (C269-6m)	---a-----	---a-----	---c-----	---t-----	---g-c-----
■ Consenso	TTATTGGATA	AAGTGGTTTT	TCCTTTTATT	ATATCGAAAT	TTACCGACAG
					GGAGACTCCG

	446					505
*c101 (C268-2M)	--c-----	-----	-----	-----	-t-----	-----g--g
* c53 (C257-9m)	--c-----	-----	-----	-----	-----	-----g--g
c238 (C278-1m)	--c-----	-----	-----	-----	-----	-----g--g
c242 (C278-1m)	--c-----	-----	-----	-----	-----	-----g--g
c236 (C278-1M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c256 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ c38 (C257-7M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c258 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c259 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c263 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ c36 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c126 (C269-6M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c153 (C270-3M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c204 (C271-8M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c177 (C271-2M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ c27 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c184 (C271-2m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c185 (C271-2m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
* c59 (C257-9M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
*c87 (C257-10m)	-----g-	-----	-----	-----	-----	-----
*c76 (C257-10M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c237 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
* c51 (C257-9m)	-----	-----	-g-	-----	-----	-----
c228 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c250 (C269-1M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c251 (C269-1m)	-----	-----	-----c-	-----	-----	-----
*c86 (C257-10m)	-----	-----	-----	-----t	-----	-----
♣ c1 (C257-2M)	-----	-----	-----t	-----	-----g-	-----g-
♣ c8 (C257-2m)	-----	-----	-----t	-----	-----g-	-----g-
♣ c17 (C257-2m)	-----	-----	-----	-----	-----g-	-----g-
* c55 (C257-9m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----g-g
♣ c35 (C257-7m)	--c-----	-----	-----t	-----t	-----g-c-	-----g-c-g
♣c141 (C269-6m)	--c-----	-----	-----t-c-t	-----	-----g-	-----
■ Consenso	AATGCTCTAC	GTAAGTATGC	TTGCACTTTC	GAGGAGTTAC	ACTTATGTAT	GGCTAGATTA

	506					565
*c101 (C268-2M)	-----t	-----a-	-----	-----a-c-	-----	-----g-c
* c53 (C257-9m)	-----t	-----a-	-----	-----a-c-	-----	-----g-c
c238 (C278-1m)	-----t	-----a-	-----	-----a-c-	-----	-----g-c
c242 (C278-1m)	-----t	-----a-	-----	-----a-c-	-----	-----g-c
c236 (C278-1M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c256 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣ c38 (C257-7M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c258 (C269-1m)	-----	-----	-----	-g-	-----	-----
c259 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c263 (C269-1m)	-----	-----	-----	-a-	-----	-----
♣ c36 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
♣c126 (C269-6M)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
c153 (C270-3M)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
c204 (C271-8M)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
c177 (C271-2M)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
♣ c27 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
c184 (C271-2m)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
c185 (C271-2m)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
* c59 (C257-9M)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
*c87 (C257-10m)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
*c76 (C257-10M)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
c237 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
* c51 (C257-9m)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
c228 (C278-1m)	-----	-----	-----g-	-----	-----	-----
c250 (C269-1M)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
c251 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
*c86 (C257-10m)	-----	-----	-----	-----	-----a-	-----
♣ c1 (C257-2M)	-----t	-----	-----	-----	-----a-	-----
♣ c8 (C257-2m)	-----t	-----	-----	-----	-----a-	-----
♣ c17 (C257-2m)	-----t	-----	-----	-----	-----a-	-----
* c55 (C257-9m)	-----t	-----a-	-----	-----a-c-	-----	-----g-c
♣ c35 (C257-7m)	-----t	-----a-	c-----	-----a-	-----	-----c
♣c141 (C269-6m)	-----t	-----a-	c-----a	-----a-	-----a-	-----c
■ onsenso	AGACCCGACC	TATACGAGAA	TAAAAGGACG	ACCAAGGCTG	GGACTCCGCA	TTTAAAAGGT

	566				625
*c101 (C268-2M)	-----	-c-----	-----	-----	---c--a-- ---g-----t
* c53 (C257-9m)	-----	-c-----	-----	-----	---c--a-- ---g-----t
c238 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
c242 (C278-1m)	-----	-c-----	-----	-----	-----
c236 (C278-1M)	-----	-----	-----	-----	-----
c256 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c38 (C257-7M)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c258 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c259 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c263 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c36 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----
♣c126 (C269-6M)	-----	-----	-----	-----	-----
♣c153 (C270-3M)	-----	-----	-----	-----	-----
♣c204 (C271-8M)	-----	-----	-----	-----	-----
♣c177 (C271-2M)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c27 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----
♣c184 (C271-2m)	-----	-----	-----	-----	-----
♣c185 (C271-2m)	-----	-----	-----	-----	-----
* c59 (C257-9M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c87 (C257-10m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c76 (C257-10M)	-----	-----	-----	-----	-----
c237 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
* c51 (C257-9m)	-----	-----	-----	-----	-----
c228 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
♠c250 (C269-1M)	-----	-----	-----	-----	-----
♠c251 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c86 (C257-10m)	-----	-----	-----	-----	-----
♣ c1 (C257-2M)	-----	-----	c-----	-----	-----
♣ c8 (C257-2m)	-----	-----	c-----	-----	-----
♣ c17 (C257-2m)	-----	-----	-----	-----	-----
* c55 (C257-9m)	-----	-c-----	-----	-----	---c--a-- ---g-----t
♠ c35 (C257-7m)	-----	-----	-a-----a	-----a-	---c--a-- ---g-----t
♣c141 (C269-6m)	-----g-----	-----t-----	-a-----	-t-----a-	---c--a-- c-----g--t
■ Consenso	TACTTATCAG	CTGACTTTCT	TTCGGGTTCT	CTCCCAGGGT	ACTCTGAGCA TGAACGAGGC

	626				685
*c101 (C268-2M)	--c-----	-----t--	g-----	-----	-----g--
* c53 (C257-9m)	--c-----	-----t--	g-----	-----	-----g--
c238 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
c242 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
c236 (C278-1M)	-----	-----	-----	-----	-----
c256 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c38 (C257-7M)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c258 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c259 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c263 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c36 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----
♣c126 (C269-6M)	-----	-----	-----	-----	-----a-----
♣c153 (C270-3M)	-----	-----	-----	-----	-----a-----
♣c204 (C271-8M)	-----	-----	-----	-----	-----a-----
♣c177 (C271-2M)	-----	-----	-----	-----	-----
♠ c27 (C257-7m)	-----	-----	-----	-----	-----
♣c184 (C271-2m)	-----	-----	-----	-----	-----
♣c185 (C271-2m)	-----	-----	-----	-----	-----g-----
* c59 (C257-9M)	-----	-----	-----	-----	-----
*c87 (C257-10m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c76 (C257-10M)	-----	-----	-----	-----	-----
c237 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
* c51 (C257-9m)	-----	-----	-----	-----	-----
c228 (C278-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
♠c250 (C269-1M)	-----	-----	-----	-----	-----
♠c251 (C269-1m)	-----	-----	-----	-----	-----
*c86 (C257-10m)	-----	-----	-----	-----	-----t-----
♣ c1 (C257-2M)	-----	-----	-----	-----	-----
♣ c8 (C257-2m)	-----	-----	-----	-----	-----
♣ c17 (C257-2m)	-----	-----	-----	-----	-----
* c55 (C257-9m)	--c-----	-----t--	g-----	-----	-----
♠ c35 (C257-7m)	--c-----	-----t--	-----	-----	-----
♣c141 (C269-6m)	--c-----	-----	-----	-----	-----a-----
■ Consenso	ATTATTCTTC	GAGCGTCCGA	ATCTATGTTA	GCTAGACGTC	AAGGTTACGA GGAGGCAACC


```

.....p25+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
pDGT2 > -----T--C-----T--A--CA-----G--G----A- 118
pDGT76 > -----C-----C--G--TC-----A--T-----G- 125
pMT26 > -----C-----C--G--TC-----A--T-----G- 404
pLT49 > -----T-----A--T--A--CA-----G--C--G----A- 726
CONSENSO > ACACACGTTGATyTatTGCgTTCTGatTCyCGrTTymTATCGGGATGGTGGAGTTTCrTtGTkAACGTfRG 4970

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
pDGT2 > -C--T-----C-----C-----AA-----GA-----A- 188
pDGT76 > -T--C-----T-----T-----TG-----AG-----G- 195
pMT26 > -T--C-----T-----T-----TG-----AG-----G- 474
pLT49 > -C--T-----C-----C-----AA-----GA-----A- 796
CONSENSO > GyGAYATAATCGTCCGgTTTGCgTTACAYgTTCCTAGyGAAGAwfTGCTGAATfrrTTTTTCfRGCTATATC 5040

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
pDGT2 > -----G-----T-----GG-----A-----T-G- 258
pDGT76 > -----A-----C-----C-----C-----C-A- 265
pMT26 > -----A-----C-----C-----C-----C-A-C- 544
pLT49 > -----G-----T-----T-----A-----T-G- 866
CONSENSO > GAATTGCACAATCATAGCfRGACGGTAGTGCyTTACTAAAAGACaaCACCGTmGTTGAYCfTtTAGAAGGC 5110

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
pDGT2 > -C-----C-----A-----A-----C----- 328
pDGT76 > -----T-----C-----G----- 335
pMT26 > -----T-----G----- 614
pLT49 > -----C-----A-----C-----C----- 936
CONSENSO > AtGAACCCyTTGGCTTATTTGTtAAAATTAGCfRAAAACgACTACTACTATtTGTtTtAcTatGTCTAATA 5180

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
pDGT2 > -----T-----G-----T-G- 398
pDGT76 > -----A-----A-----C-A- 405
pMT26 > -----A-----A-----C-A- 684
pLT49 > -----T-----G-----C-AA-----T-G- 1006
CONSENSO > AGGTTCTTTTTGGwACTACTAAATCCGAACCFCTTAGTtGtTTAGCTATyACfRfCGGATCGAGTTTTATT 5250

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
pDGT2 > -----G-----A-----T-----C-----A- 468
pDGT76 > -----A-----T-----C-----T-----G- 475
pMT26 > -----A----- 698
pLT49 > -----G----- 1024
CONSENSO > CAAAGTTfTTATGGGTACTAACGTTGATGATwCTCGATGCGGyTGCAGTATyTGGTTTTACAACAATGGRf 5320

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....p18+.....+.....+
pDGT2 > -T---G---A-----G-T-----A---A-T-T-----G---GA--- 538
pDGT76 > -C---A---G---A-C-----G---G---C---C---A---AT--- 545
CONSENSO > AyGTTTCfRAACGGfTTGACCCGTTGTfAYAAATCTCGTCfCTTTfTTyAGyGCGACTTfACACfRWAGTG 5390

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....*p13.....+.....+
pDGT2 > G-A---AG-A---T---G----- 577
pDGT76 > A-C---CC-G---A---C----- 615
CONSENSO > fCmGTTmsGrTTTAAwTGCTsCAATGAGTATTTCGACGCTGCGGTAAAGGTTGTGGCCGTGATTACGGT 5460

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
pDGT76 > ----- 685
CONSENSO > ATTGTGGTACGGTAAAGAGCCTTCGATTAGTGAAGGCTACAATGCTCTTATGAATGACGACTTTAAGTTT 5530

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
pDGT76 > ----- 755
CONSENSO > ATCGATACGCATTTTCAAACGTTTCTTATGCTAAGAAGTGTACGAATTGGCTAATTTTCGATTAGACT 5600

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
pMT78 > ----- 38
pLT61 > ----- 52
pDGT76 > -----A---C-----A---A- 825
CONSENSO > TTCTACGCATCGTTATCATTCCTTGGAGTGGTgCGGtGAATGAATCGCGTGTGATCGCgCTAACgT 5670

.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
pMT78 > ----- 108
pLT61 > -----G----- 122
pDGT76 > -----G-----T----- 895
CONSENSO > TTCAGAGATTGTCAATCGCaTaTGAGCGACCGAGACAGAATGAAaATCTTGTTCGCTAATAAGCGGATC 5740

```

pMT78	>+.....+.....p13+.....+.....+.....+.....+.....+.....	178
pLT61	>	-----	192
pDGT76	>	-----G-----G-----	965
CONSENSO	>	CAGATTCCTTCGCTCTTACCTTGCGaTAACTAGAGTCTACTCAGTAGTACaTCTACTAGTATAACGTATT	5810
pMT78	>+.....+.....+.....*p20.....+.....+.....+.....+.....	248
pLT61	>	-----	262
pDGT76	>	G-----G-----	1035
CONSENSO	>	aAACACTTTAGTGAGaAGTTTGTTTAAACCAAACAATATGCGAGCTTACTTTAGTGTTAACGATTACAT	5880
pMT78	>+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....	318
pLT61	>	-----	332
pDGT76	>	-----G-----	1105
CONSENSO	>	AAGCCTTTTGCTAAGGTCGGCGCAGTTGTGGAACGTTTGTGCGATCCCAGCGTaACTCTCACGGAAGTG	5950
pMT78	>+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....	388
pLT61	>	-----	402
pDGT76	>	-----C-----A-----A-----	1175
CONSENSO	>	ATGGACGAAATTAATGAtTTAACTCGTTTCTCGCTTgGTACACTCTATGAAGTCgGACATGAACGGCG	6020
pLT54	>+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....	19
pMT78	>	-----C-----	458
pLT61	>	-----	472
pDGT76	>	-----G-----	1245
CONSENSO	>	ATCATCAGGATGGTCACCATGAGATGGGTGAACACAAGTCTCGATTGTTGTGCAAtATAGAGCGAAaCT	6090
pLT54	>+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....	89
pMT78	>	---G---C---C---A---A---T---T---	528
pLT61	>	-----T-----	542
pDGT76	>	-----C-----G-----	1315
CONSENSO	>	GCGAaTACTTCTCGAyATCATAAGACGTGGTTtACTCGCGAaAAgCTGCTCTGTaCCAGcGCaACAGAT	6160
pLT54	>+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....	159
pMT78	>	-----CG-----T-----AC---	598
pLT61	>	-----C-----	612
pDGT76	>	-----GC-----T-----T---A---	1385
CONSENSO	>	GTCATGGGCTTCTTCGTtaTGAGGTACATGagTTCTAGTCACAcCAGTTTyGAgTCCGTAAATGCgaACGG	6230
pLT10	>+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....	34
pLT54	>	-AT---G---G---G---A---G---A---	229
pMT78	>	-----G---T-----GT-G---	668
pLT61	>	-----A---T-----	636
pDGT76	>	-----A---A---A---A---C---	1455
CONSENSO	>	AgcTGAAaTTAGTgGTTAAaGCgGTaCTgTCgGATTTtTCcCGcgCGCATAAacTaGATTTTAGCGAGCG	6300
pLT10	>+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....	104
pLT54	>	---T---T-----G-----GT-----C-----	299
pMT78	>	-----A-----G-C-G-A-----TA-----	738
pDGT76	>	-----G-----A-----C-----	1525
CONSENSO	>	AGCcTTTGCgGCTTACGGTATCCTTTtCAAAGGGTtaCtGTfgCgACCGTTTgGTCAGTTTgACATT	6370
pDGT30	>+.....+.....p20+.....+.....+.....+.....+.....+.....	32
pLT10	>	-----G-----G-----	174
pLT54	>	-----C-----	369
pMT78	>	-----	745
pDGT76	>	-----A-----C-----	1595
CONSENSO	>	AATTTAGTtTCTCCgTCTTGCgGTAGGTTAATACGtTTCTCAGAACGTfTGGTGTaTTAACTAaCTTT	6440
pDGT30	>+.....+.....+.....*p23.....+.....+.....+.....+.....	102
pLT10	>	-----T-----A-----	242
pLT54	>	---G---G---C---A---G---TAG---	439
pDGT76	>	-----T-----A-----	1664
CONSENSO	>	AaTTcGAACAAaTTTATTgttTAAAGTCTGbGAGTTACgATGfAcgaTACTAGCGGACAAACTTTCgTTT	6510

+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+	
pDGT30	> -----G-----G--C--AG--G--A--AA-----	172
pLT10	> -----A--T--GC--AG--C--GT-----T-----	312
pLT54	> -----G--C--AG--G--A--AA-----	509
pDGT76	> -C-----G--T--T--GA--A--C--GT--T-----	1734
CONSENSO	> CtGTGAACCTTTCTGAcGAAAGCAACACaGcAGyACTrvAGTTraAAmCGTAArwTCgGAAGCgGATCG	6580
+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+	
pLT53	> -----C-----T--C-----	49
pDGT30	> -----A--C--T-----C--G-----C	242
pLT10	> -----C-----T--C-----	382
pLT54	> -----A--T-----C--G-----	577
pDGT76	> -----CG-----T-----A-----G-----	1804
CONSENSO	> CTTGGApTTTTTACGdAAAATGAAtCCCTThaTtAtcGAcGCTtTGgTaCGGAAAACCAaTTATCAGGGt	6650
+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+	
pDGT30	> -----T-----G-----C--C--C--	312
pLT53	> -----A-----T-----	119
pLT10	> -----A-----T-----	452
pDGT76	> -----G--G-----A--T--C--G--	1874
CONSENSO	> GCTCGCTTTCGcGCrArAATAATAGGAGTaTGCGTpGATTGTGGTAGAAAACAGAhAAGGggttgAaGA	6720
+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+	
pDGT30	> -T-----G-----G-----G-----G-----	382
pLT53	> -C-----A-----T-----A-----	189
pLT10	> -C-----A-----C-----A-----	524
pDGT76	> -T-----G-----C-----G-----C--T--	1930
CONSENSO	> CyGAACGTAArTGTAAGGTCAAcAAAtACaCAGTcTCArAACGAGGTGGCGCaTaTGTTaATGCACGATCC	6790
+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+	
pDGT30	> -----A-----C--A-----G--T-----	452
pLT53	> -----	259
pLT10	> -----	594
CONSENSO	> CGTTAAgTATTTAAAtAAAgGAAAGGCTAGAGCCTTTTCTAACGAGAGATGTTGCaATcGATTGGTT	6860
+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+	
pDGT30	> T-----A-----G-----	493
pLT53	> -----	329
pLT10	> -----G-----	664
CONSENSO	> aTGTACACCAAGGaAAAGCAgTTGGCGGTTaATTTGGCCCTGAAAGGGAGAAGACGAGACTGGCTCGTA	6930
+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+	
pLT53	> -----	399
pLT10	> -----	734
CONSENSO	> GACACCCGATGCGTTCTCCGGAAGAACTCCGGAATTCTATAAATTCGGTATAACTGCTAAAGCAATGTT	7000
+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+	
pLT53	> -----	469
pLT10	> -----	804
CONSENSO	> ACCGAACATCAACGCTGTGGACGTTGGTGATAACGAGGACACTTCGTCGAGTACCCAGTGAGTCTGAGT	7070
+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+	
pLT53	> -----p23+.....+.....+.....+.....+.....+	539
pLT10	> -----	811
CONSENSO	> GTTCTGACGGAGTTCTCCGTGAACACCACTTCATCTGATTGAAGTGGACGGAATAAGTTCCTTGGCGAA	7140
+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+	
pLT53	> -----	609
CONSENSO	> CTTTATGTCGGGTTGGTAAAAACCCTTATGATGGTGATGATCACTAGACAATAACCGGATGGGTAAAGT	7210
+.....	
pLT53	> ----- 626	
CONSENSO	> CTTTAAATGATCGAGG 7227	

Figura C3: Alineamiento múltiple de las secuencias de los clones correspondientes a la mitad 3' del aislamiento C268-2. En la secuencia consenso se indican minúsculas cuando la base no se encuentra conservada en la totalidad de las secuencias comparadas. Se utiliza el código IUPAC-IUB para posiciones ambiguas: en rojo, transiciones (y= C o T, r= G o A), en verde, transversiones (m= A o C; w= A o T; s= C o G; k= G o T) y en azul, letras que representan tres nucleótidos distintos (v= A, C o G; h= A, C o T; d= A, G o T; b= C, G o T). Los guiones (-) representan bases iguales a las de la secuencia consenso en esa posición. Se indica el comienzo (*) y final (+) de cada ORF.

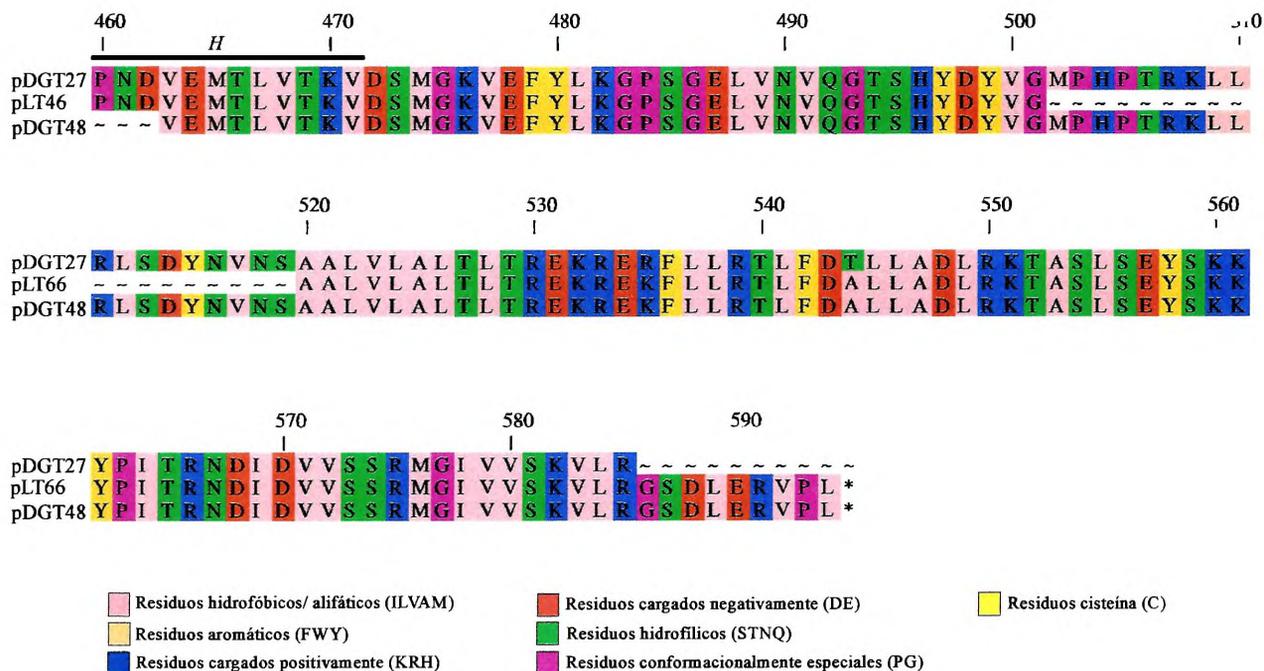


Figura C5: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de clones situados en la zona correspondiente al gen p65. El alineamiento se realizó con el programa PileUp (GCG) y se visualizó con el editor Jalview. El código de colores corresponde a Zappo y está indicado en la porción inferior del esquema. Con barras sobre la secuencia se indican los motivos conservados en proteínas de la familia HSP70 (A a H).

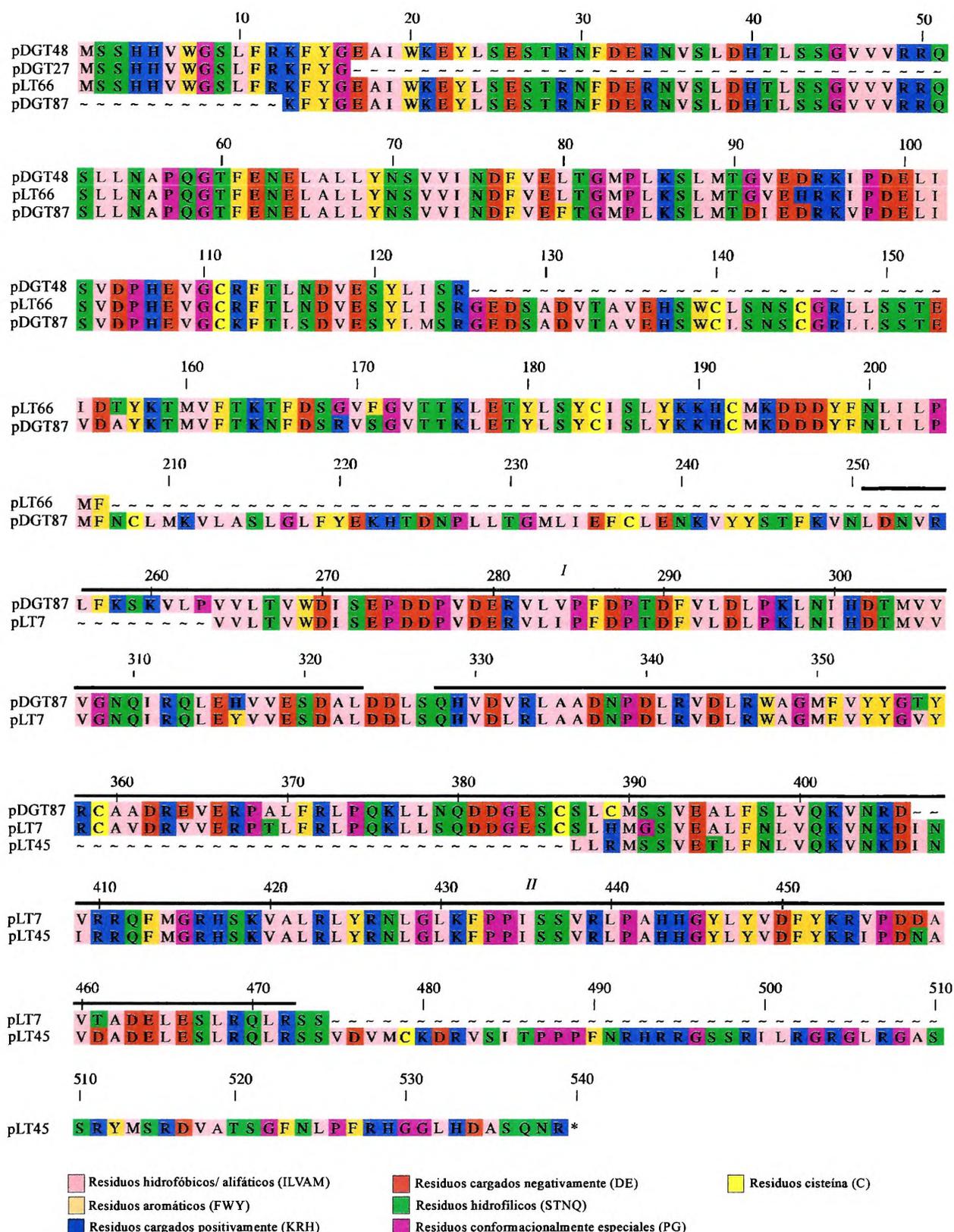


Figura C6: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de clones situados en la zona correspondiente al gen p61. Se realizó con el programa PileUp (GCG) y se visualizó con el editor Jalview. El código de colores corresponde a Zappo y está indicado en la porción inferior del esquema. Se indican los motivos conservados en la familia HSP90.

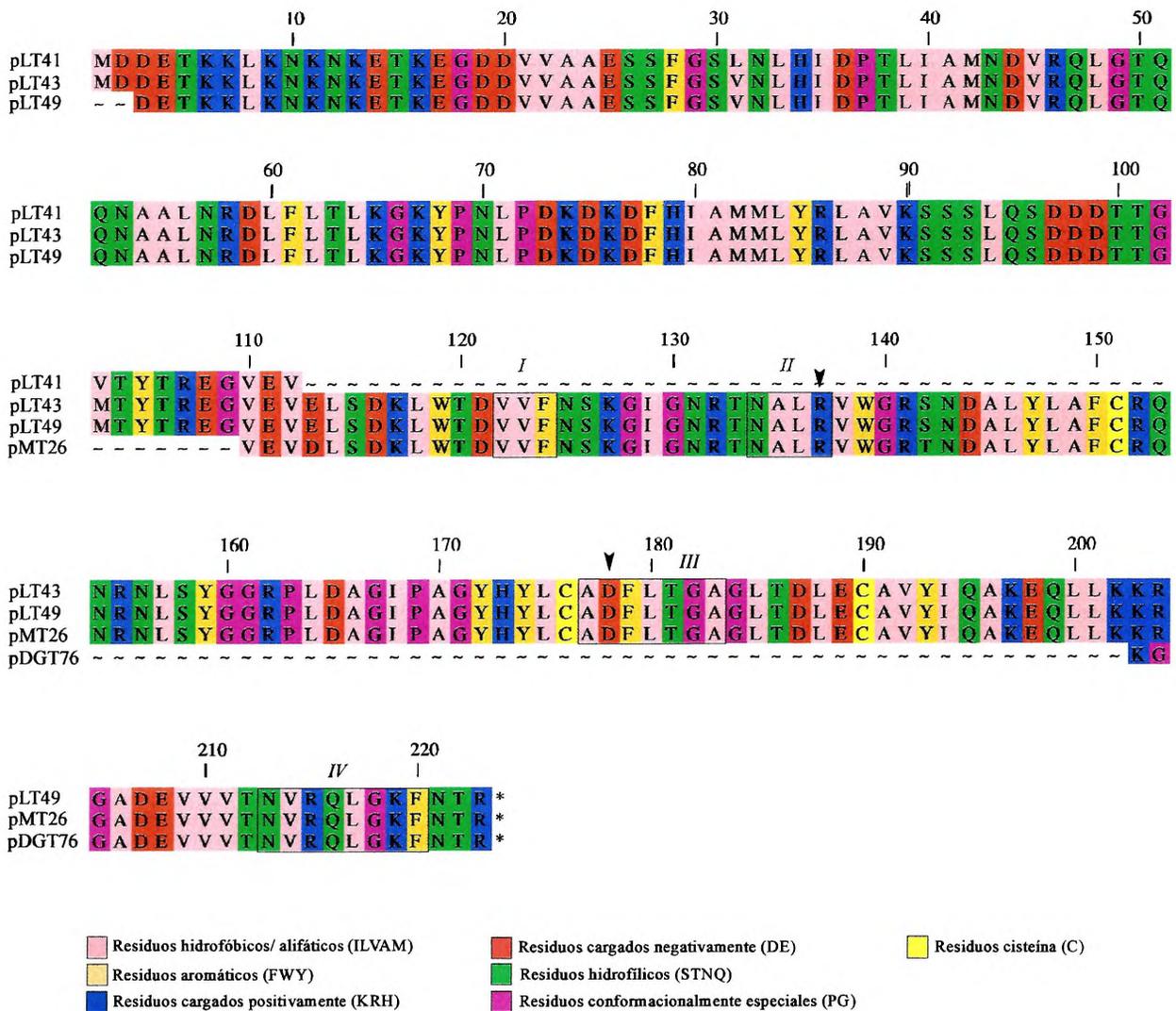


Figura C8: Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas deducidas correspondientes a P25. Se realizó con el programa PileUp (GCG) y se visualizó con el editor Jalview. Los colores utilizados corresponden al esquema de Zappo y se indican en la porción inferior de la figura. Con recuadros se señalan los cuatro motivos conservados entre ambas proteínas de cubierta viral. Las puntas de flecha indican la posición de los residuos conservados en todas las proteínas de cubierta de virus flexuosos de vegetales.

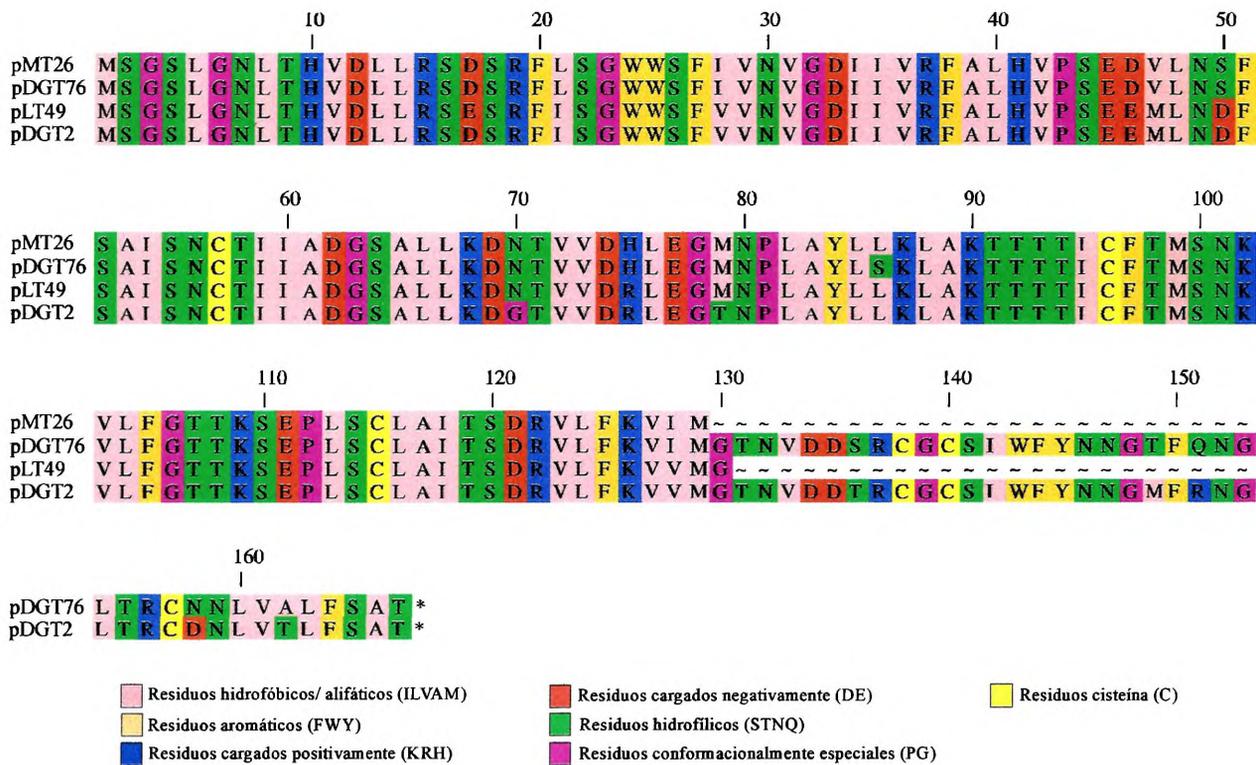


Figura C9: Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas correspondientes a P18. Se realizó con el programa CLUSTAL W y se editó con el programa Jalview. El esquema de colores corresponde a Zappo.

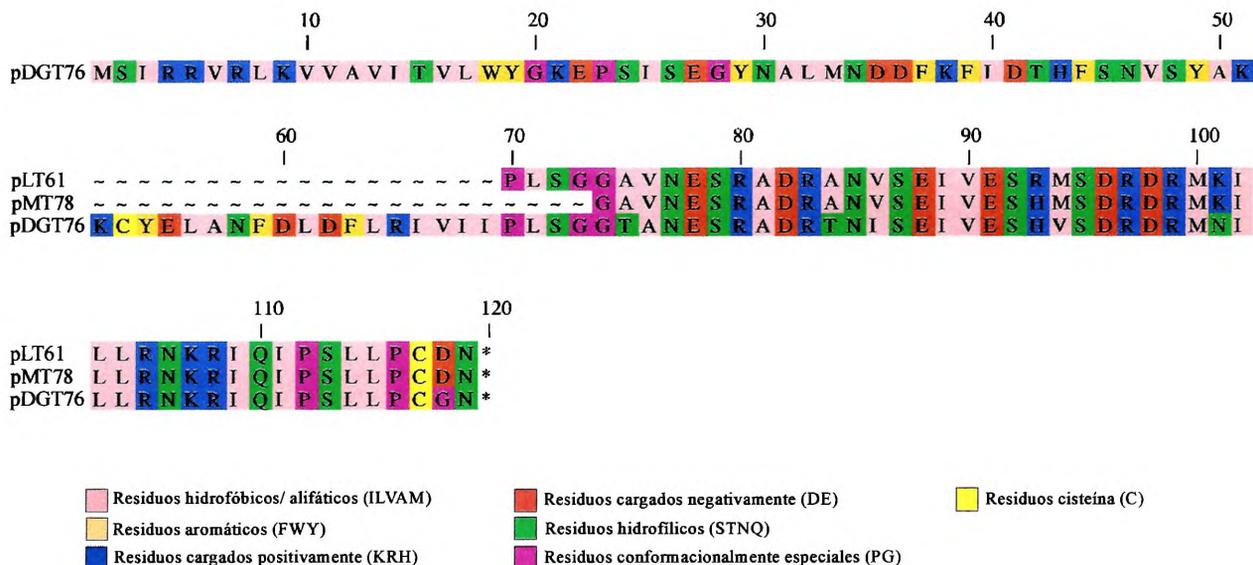


Figura C10: Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas correspondientes a P13. Se realizó con el programa PileUp y se visualizó con el programa Jalview. El esquema de colores corresponde a Zappo.

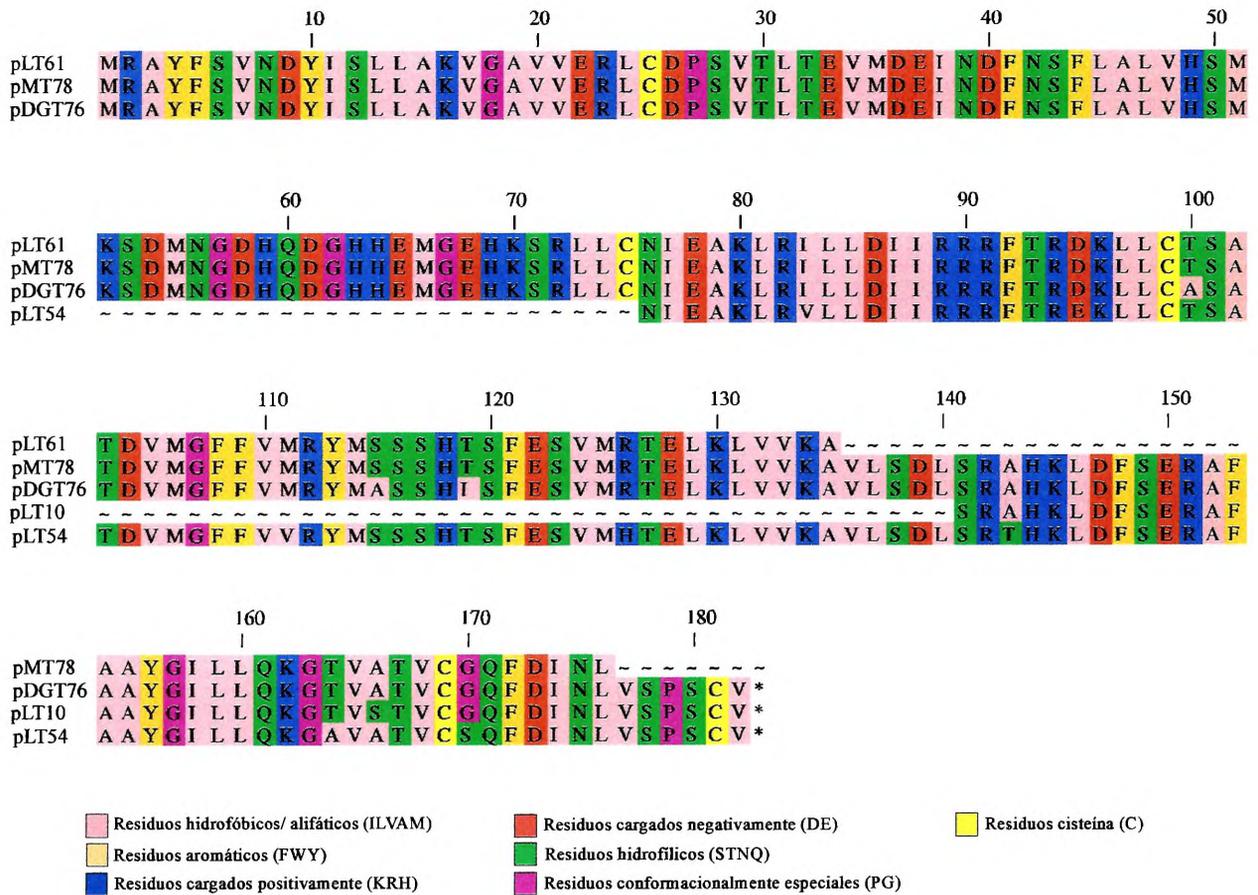


Figura C11: Alineamiento múltiple de secuencias deducidas de clones situados en la región correspondiente al gen p20. Se generó con el programa PileUp y se visualizó con el Jalview. Los colores corresponden la esquema de Zappo (porción inferior del gráfico).

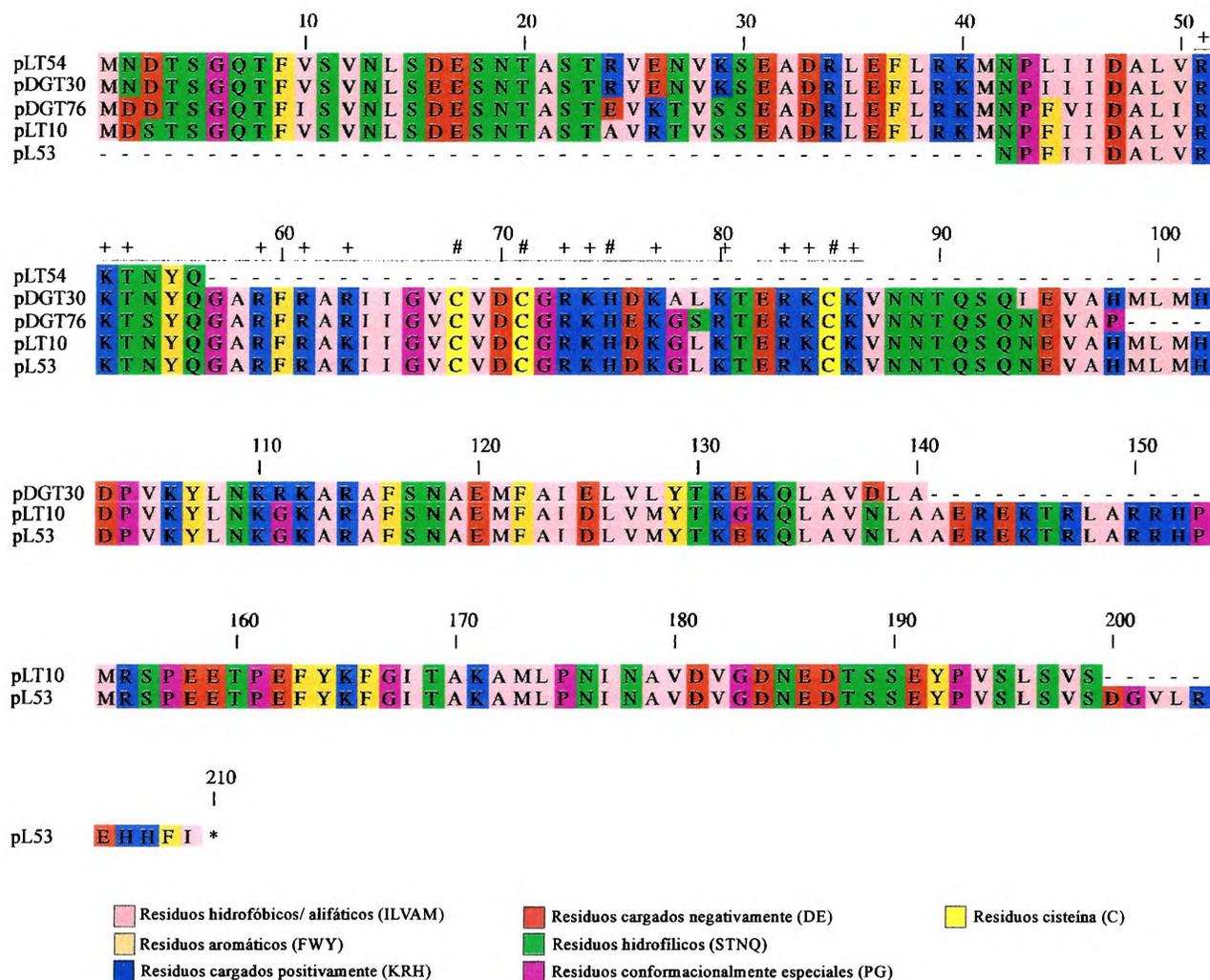


Figura C12: Alineamiento múltiple correspondiente a P23. Se realizó con el programa Clustal W y se analizó con el editor Jalview. El esquema de colores corresponde a Zappo. Se indica el motivo de unión a RNA. (+): aminoácidos con carga positiva involucrados en la interacción. (#): cisteínas e histidina involucradas en el potencial zinc- *finger* (tomado de López *et al.*, 2000).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- AGRANOVSKY, A.A.; BOYKO, V.P.; KARASEV, A.V.; LUNINA, N.A.; KOONIN, E.V. and DOLJA, V.V. (1991). Nucleotide sequence of the 3' terminal half of beet yellows closterovirus RNA genome. Unique arrangement of eight virus genes. *J. Gen. Virol.* **72**, 15-23.
- AGRANOVSKY, A.A.; KOONIN, E.V.; BOYKO, V.P.; MAISS, E.; FROTSCHL, R.; LUNINA, N.A. and ATABEKOV, J.G. (1994). Beet yellows closterovirus. Complete genome structure and identification of leader papain-like thiol protease. *Virology* **198**, 311-324.
- AGRANOVSKY, A.A.; LESEMANN, D.E.; MAISS, E.; HULL, R. and ATABEKOV, J.G. (1995). "Rattlesnake" structure of filamentous plant RNA virus built of two capsid proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2470-2473.
- AGRANOVSKY, A.A. (1996). Principles of molecular organization, expression, and evolution of closterovirus: over the barriers. *Adv. Virus Res.* **47**, 117-158.
- AGRANOVSKY, A.A., FOLIMONOVA, S.Y.; FOLIMONOV, A.S.; DENISENKO, O.N. and ZINOVKIN, R.A. (1997). The beet yellows closterovirus p65 homologue of HSP70 chaperones has ATPase activity associated with its conserved N-terminal domain but does not interact with unfolded protein chains. *J. Gen. Virol.* **78**, 535-542.
- AMIGO, J. (2000). La actividad cítrica argentina. Informe de FEDERCITRUS, período 1999/2000.
- ALBIACH-MARTI, M.R. (1995). Diferenciación bioquímica de razas del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y su aplicación a la protección cruzada. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Facultad de Ciencias Químicas.
- ALBIACH-MARTI, M.R.; RUBIO, L.; GUERRI, J.; LAIGRET, F.; BOVE, J.M. and MORENO, P. (1995b). Diferenciación de razas del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) mediante hibridación molecular. *Invest. Agr.: Prod. Prof. Veg.* **10(2)**, 263-274.
- ALBIACH-MARTI, M.R.; DA GRAÇA, J.V.; VAN VUUREN, S.P.; GUERRI, J.; LAIGRET, F.; CAMBRA, M. and MORENO, P. (1996). The effects of different hosts and natural pressure on mild isolates of citrus tristeza virus (CTV). pp. 147-153 in: *Proc. 13th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (J.V. Da Graça, P. Moreno and R.K. Yokomi, eds.) IOCV, Riverside.
- ALBIACH-MARTI, M.R.; MAWASSI, M.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; HILF, M.E.; SHANKER, S.; ALMIRA, E.C.; VIVES, M.C.; LOPEZ, C.; GUERRI, J.; FLORES, R.; MORENO, P.; GARNSEY, S.M. and DAWSON, W.O. (2000a). Sequences of Citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical. *J. Virol.* **74(15)**, 6856-6865.
- ALBIACH-MARTI, M.R.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; GARNSEY, S.M. and MORENO, P. (2000b). Differentiation of citrus tristeza virus isolates by serological analysis of p25 coat protein peptide maps. *J. Virol. Methods* **88(1)**, 25-34.
- APPLIED BIOSYSTEMS (1994). Preparation of plasmid DNA. A modified mini alkaline-lysis/PEG. **2**: 9-10.
- AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; MOYA, A.; GUERRI, J. and MORENO, P. (1999). The haplotype distribution of two genes of citrus tristeza virus is altered after host change or aphid transmission. *Virology* **255**, 32-39.
- AYLLÓN, M.A.; LÓPEZ, C.; NAVAS-CASTILLO, J.; GARNSEY, S.M.; GUERRI, J.; FLORES, R. and MORENO, P. (2001). Polimorphism of the 5 terminal region of *Citrus tristeza virus* (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Arch. Virol.* **146**, 27-40.
- BAHNER, Y.; LAMB, J.; MAYO, M.A. and HAY, R.T. (1990). Expression of the genome of potato leafroll virus: readthrough of the coat protein termination codon in vivo. *J. Gen. Virol.* **71**, 2251-2256 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- BALLESTER-OLMOS, J.F.; PINA, J.A.; MORENO, P.; HERMOSO DE MENDOZA, A.; CAMBRA, M. and NAVARRO, L. (1988a). Biological characterization of different citrus tristeza virus isolates in Spain. pp. 22-27 in: *Proc. 10th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (L.W. Timmer, S.M. Garnsey and L. Navarro, eds.), IOCV, Riverside.

- BALLESTER-OLMOS, J.F.; PINA, J.A. and NAVARRO, L. (1988b). Detection of a tristeza-seedling yellows strain in Spain. pp. 28-32 in: *Proc. 10th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (L.W. Timmer, S.M. Garnsey and L. Navarro, eds.), IOCV, Riverside.
- BAR-JOSEPH, M.; LOEBESTEIN, G. and COHEN, J. (1970a). Partial purification of viruslike particles associated with the citrus tristeza disease. *Phytopathology* **60**, 1510-1512.
- BAR-JOSEPH, M. and LOEBESTEIN, G. (1970b). Rapid diagnosis of citrus tristeza disease by electron microscopy of partially purified preparations. *Phytopathology* **60**, 75-78.
- BAR-JOSEPH, M. and LOEBESTEIN, G. (1973). Effect of strain, source plant and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid. *Phytopathology* **63**, 716-720.
- BAR-JOSEPH, M. and HULL, R. (1974). Purification and partial characterization of sugar beet yellows virus. *Virology* **62**, 552-562 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- BAR-JOSEPH, M.; GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; MOSCOVITZ, M.; PURCIFULL, D.E.; CLARK, M.F. and LOEBENSTEIN, G. (1979a). The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **69**(2), 190-194.
- BAR-JOSEPH, M.; GARNSEY, S.M. and GONSALVES, D. (1979b). The closterovirus: A distinct group of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.* **25**, 93-168 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- BAR-JOSEPH, M.; Marcus, R. and LEE, R. (1989a). The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 291-316.
- BAR-JOSEPH, M. and LEE, R. (1989). Citrus tristeza virus. *CMI/AAB Descriptions of plant virus*, no. 353 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- BAR-JOSEPH, M.; YANG, G.; GAFNY, R. and MAWASSI, M. (1997). Subgenomic RNAs: The possible building blocks for modular recombination of *Closteroviridae* genomes. *Seminars in Virology* **8**, 113-119.
- BEIDLER, L.L., HILLIARD, P.R. and RILL, R.L. (1982). Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochemistry* **126**, 374-380.
- BECK, D.L.; GUILFORD, P.J.; VOOT, D.M. ANDERSEN, M.T. and FORSTER, R.L.S. (1991). Triple gene block proteins of white clover mosaic potyvirus are required for transport. *Virology* **183** (2), 695-702.
- BEN-ZE'EV, I.S.; BAR-JOSEPH, M.; NITZAN, Y. and Marcus, R. (1989). A severe citrus tristeza virus isolate causing the collapse of trees of sour orange before virus is detectable throughout the canopy. *Ann. Appl. Biol.* **114**, 293-300.
- BIRNBOIM, H.C. and DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513.
- BOYKO, V.P.; KARASEV, A.V.; AGRANOVSKY, A.A.; KOONIN, E.V. and DOLJA, V.V. (1992). Coat protein gene duplication in a filamentous RNA virus of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9156-9160.
- BRANDES, J. and BERCKS, R. (1965). Gross morphology and serology as a basis for classification of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.* **11**, 1-12 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- BROADBENT, P.; BEVINGTON, K.B. and COOTE, B.G. (1991). Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection. pp. 64-70 in: *Proc. 11th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (R.H. Brlansky, R.F. Lee and L.W. Timmer, eds.), IOCV, Riverside.
- BROADBENT, P.; BRLANSKY, R.H. and INDSTO, J. (1996). Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease* **80**, 329-333.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. and GREESHOFF, P.M. (1994). Staining nucleic acids with silver an alternative to radioisotopic and fluorescent methods. *Promega Notes* **45**, 13-18.
- CAMBRA, M. (1983). Diagnóstico del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) mediante la técnica de ELISA: interés y aplicaciones. *Levante Agrícola* **245**, 11-17.

- CAMBRA, M.; GARNSEY, S.M.; PERMAR, T.A.; HENDERSON, C.T.; GUMPF, D.J. and VELA, C. (1990). Detection of citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology* **80**, 1034.
- CAMBRA, M.; CAMARASA, E.; GORRIS, M.T.; GARNSEY, S.M.; GUMPF, D.J. and TSAI, M.C. (1993). Epitope diversity of citrus tristeza virus in Spain. pp. 33-38 in: *Proc. 12th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (P. Moreno; J.V. Da Graça L.W. Timmer, eds.), IOCV, Riverside.
- CAMBRA, M.; CAMARASA, E.; GORRIS, M.T. y ROMAN, M.P. (1995). Distribución actual de la tristeza de los cítricos y nuevos métodos de diagnóstico. *Phytoma* **72**, 150-158.
- CERVERA, M.; JUÁREZ, N. NAVARRO, J.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N. and L. PEÑA, L.. (1998). Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res.* **7**, 51-59.
- CEVIK, B.; PAPPU, S.S.; BENCHER, D.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; IREY, M. and NIBLETT, C.L. (1996). Application of bi-directional PCR to citrus tristeza virus: Detection and strain differentiation. pp. 47 in: *Proc. 13th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (J.V. Da Graça, P. Moreno and R.K. Yokomi, eds.) IOCV, Riverside.
- CHENG, S.L.; DOMIER, L.L. and D'ARCY, C. (1994). Detection of the readthrough protein of barley yellow dwarf virus. *Virology* **202**, 1003-1006.
- CLARE, J.J.; BELCOURT, M. and FARABAUGH, P.J. (1988). Efficient translational frameshifting occurs within a conserved sequence of the overlap between the two genes of a yeast Ty1 transposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 6816-6820 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y. and HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110 (de SAMBROOK, J., FRISTCH, E.J. and MANIATIS, T., 1989).
- COMPENDIUM OF CITRUS DISEASES. (1988). (Edited by J.O. Whiteside; S.M. Garnsey and L.W. Timer). pp. 1-3. APS Press, The American Phytopathological Society.
- COSTA, N. (1995). Estado actual de la tristeza en la Argentina. *Proceedings of the Third International Workshop on Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus in the Caribbean Basin: management strategies* (Lee, R.; Rocha-Peña, M.; Niblett, C.; Ochoa, F.; Garnsey, S.; Yokomi, R. and Lastra, R., eds.), pp. 99-107, Univ. of Florida.
- COSTA, A.S. and MÜLLER, G.W. (1980). Tristeza control by cross protection: a U.S.- Brazil cooperative success. *Plant disease* **64**, 538-541.
- DA GRAÇA, J.V.; MARAIS, L.J. and VON BROEMSEN, L.A. (1984). Severe tristeza stem pitting decline of young grapefruit in South Africa. pp. 62-65 in: *Proc. 9th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (Garnsey, S.M.; L.W. Timmer and Dodds, J.A., eds.), IOCV, Riverside.
- DENHARDT, D.T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 641 (de SAMBROOK, J., FRISTCH, E.J. and MANIATIS, T., 1989).
- DEVERAUX, V., HAEBERLI, P. and SMITHIES, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12(1)**, 387-395 (de WISCONSIN PACKAGE, VERSION 9.0, 1996).
- DODDS, J.A.; JORDAN, R.L.; HEICK, J.A. and TAMAKI, S.J. (1984). Double-stranded RNA for the indexing of citrus and avocado virus. pp. 330-336 in: *Proc. 9th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (Garnsey, S.M.; L.W. Timmer and Dodds, J.A., eds.), IOCV, Riverside.
- DODDS, J.A.; JARUPAT, T.; LEE, J.G. and ROISTACHER, C.N. (1987a). Detection of strain specific double-stranded RNAs in citrus species infected with citrus tristeza virus. analysis of citrus tristeza virus: A review. *Phytophylactica* **19**, 131-137.
- DODDS, J.A.; JARUPAT, T.; LEE, J.G. and ROISTACHER, C.N. (1987b). Effects of strain, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **77**, 442-447.

- DOLJA, V.V.; BOYKO, V.P.; AGRANOVSKY, A.A. and KOONIN, E.V. (1991). Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: Two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. *Virology* **184**, 79-86.
- DOLJA, V.V.; KARASEV, A.V. and KOONIN, E.V. (1994). Molecular biology and evolution of closterovirus: Sophisticated build-up of large RNA genomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 261-285.
- DOMINGO, E. and HOLLAND, J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 151-178.
- DUFFUS, J.E.; LARSEN, R.C. and LIU, H.Y. (1986). Lettuce infectious yellows virus -a new type of withefly-transmitted virus. *Phytopathology* **76**, 97-100.
- D'URSO, F.; AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; SAMBADE, A.; HERMOSO DE MENDOZA, A.; GUERRI, J.; and MORENO, P. (2000). Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. *Plant Pathology* **49**, 288-294.
- FARABAUGH, P.J.; ZAHO, H. and VIMALADITHAN, A. (1993). A novel programmed frameshift expresses the POL3 gene of retrotransposon Ty3 of yeast: frameshifting without tRNA slippage. *Cell* **74**, 93-103 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- FARABAUGH, P.J. (1993). Alternative readings of the genetic code- Metting review. *Cell* **74**, 591-596 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- FAS ONLINE, HORTICULTURAL & TROPICAL PRODUCTS DIVISION (2000). World fresh citrus situation. <http://www.fas.usda.gov/htp/circular/2000/00-08/ctrs2.html/>
- FEBRES, V.F.; PAPPU, H.R.; ANDERSON, E.J.; PAPPU, S.S.; LEE, R.F. and NIBLETT, C.L. (1994). The diverged copy of the citrus tristeza virus coat protein is expressed *in vivo*. *Virology* **201**, 178-181.
- FEBRES, V.F.; ASHOULIN, L.; MAWASSI, M.; FRANK, A.; BAR-JOSEPH, M; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F. and NIBLETT, C.L. (1996). The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* **86**, 1331-1334.
- FILICHKIN, S.A.; LISTER, R.M.; MCGRATH, P.F. and YOUNG, M.J. (1994). In vivo expression and mutational analysis of the barley yellow dwarf virus readthrough gene. *Virology* **205**, 290-299.
- FUJIOKA, S.; KOIDE, H.; KITaura, Y.; DUGUCHI, H. and KAWAMURA, K. (1995). Analysis of enterovirus genotypes using single-strand conformation polymorphism of polymerasa chain reaction products. *J. Virol. Methods* **51**, 253-258.
- GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D. and PURCIFULL, D.E. (1977). Mechanical transmission of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **67**, 965-968.
- GARNSEY, S.M.; PERMAR, T.A.; CAMBRA, M. and HENDERSON, C.T. (1993). Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). pp. 39-50 in: *Proc. 12th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (P. Moreno; J.V. Da Graça L.W. Timmer, eds.), IOCV, Riverside.
- GARNSEY, S.M.; CIVEROLO, E.L.; LEE, R.F.; YOKOMI, R.K. and BEHE, C.C. (1995). Using the Beltsville international CTV collection facility to determine severity of Caribbean isolates of citrus tristeza virus. *Proceedings of the Third International Workshop on Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus in the Caribbean Basin: management strategies* (Lee, R.; Rocha-Peña, M.; Niblett, C.; Ochoa, F.; Garnsey, S.; Yokomi, R. and Lastra, R., ed), pp. 253-259 F.A.O., Univ. of Florida, USDA-OICD, Lake Alfred.
- GILLINGS, M.; BROADBENT, P.; INDSTO, J. and LEE, R. (1993). Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **44**, 305-317.
- GILLINGS, M.; BROADBENT, P. and INDSTO, J. (1996). Restriction analysis of amplified CTV coat protein cDNA as a sensitive and rapid method for monitoring and controlling CTV infections. pp. 25-38 in: *Proc. 13th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (J.V. Da Graça, P. Moreno and R.K. Yokomi, eds.) IOCV, Riverside.

- GORBALENYA, A.E. and KOONIN, E.V. (1993). Helicases: Amino acid sequence comparisons and structure-function relationship. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 419-429 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996)..
- GOLDRICK, M.; KESSLER, D. and WINKLER, M. (1996). RNA analysis by nuclease protection. pp. 105-131 in: *A laboratory guide to RNA* (P. Krieg, ed.) Wiley-Liss, New York.
- GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; IREY, M.; BORBÓN, J.; SEDILES JEAN, A. and ROJAS SOLÍS, A. (1995). Rate of disease increase and patterns of spread of CTV when vectored by *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii*. *Proceedings of the Third International Workshop on Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus in the Caribbean Basin: management strategies* (Lee, R.; Rocha-Peña, M.; Niblett, C.; Ochoa, F.; Garnsey, S.; Yokomi, R. and Lastra, R., eds.), pp. 99-107, Univ. of Florida.
- GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; DAVIS, C.L.; NAVAS-CASTILLO, J.; ALBIACH-MARTÍ, M.R.; MAWASSI, M.; VALKOV, N.; BAR-JOSEPH, M.; MORENO, P. and DAWSON, W.O. (2000). The p20 gene product of citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* **274**(2), 246-254.
- GUERRI, J.; MORENO, P. and LEE, R.F. (1990). Identification of strains of citrus tristeza virus by peptide maps of the virion coat protein. *Phytopathology* **80**, 692-698.
- GUERRI, J.; MORENO, P.; MUÑOZ, N. and MARTÍNEZ, M.E. (1991). Variability among Spanish citrus tristeza virus isolates revealed by double-stranded RNA analysis. *Plant Pathology* **40**, 38-44.
- HE, X.; HARPER, K.; GRANTHAM, G.; YANG, C.H. and CREAMER, R. (1998). Serological characterization of the 3'-proximal encoded proteins of beet yellows closterovirus. *Archives of Virology* **143**, 1349-1363 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- HILF, M.E.; KARASEV, A.V.; PAPPU, H.R.; GUMPF, D.J.; NIBLETT, C.L. and GARNSEY, S.M. (1995). Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* **208**, 576-582.
- HONGYO, T.; BUZARD, G.S.; CALVERT, R.J. and WEGHORST, C.M. (1993). 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3637-3642.
- IWAHANA H., YOSHIMOTO, K. and ITAKURA, M. (1992). Detection of point mutations by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. *BioTechniques* **12**, 64-66.
- JARUPAT, T.; DODDS, J.A. and GARNSEY, S.M. (1988). Effect of host passage on dsRNA of two strains of citrus tristeza virus. pp. 39-45 in: *Proc. 11th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (R.H. Bransky, R.F. Lee and L.W. Timmer, eds.) IOCV, Riverside.
- KARASEV, A.V.; AGRANOVSKY, A.A.; ROGOV, V.V.; MIROSHNICHENKO, N.A.; DOLJA, V.V. and ATABEKOV, J.G. (1989). Virion RNA of beet yellows closterovirus: cell-free translation and some properties. *J. Gen. Virol.* **70**, 241-245 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- KARASEV, A.V.; KASHINA, A.S.; GELFAND, V.I. and DOLJA, V.V. (1992). HSP70-related 65 kDa protein of beet yellows closterovirus is a microtubule-binding protein. *FEBS Letters* **304**, 12-14.
- KARASEV, A.V.; NICOLAEVA, O.N.; HILF, M.E.; KOONIN, E.V.; GUMPF, D.J.; and GARNSEY, S.M. (1994). Screening of the closterovirus genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* **75**, 1415-1422.
- KARASEV, A.V.; BOYKO, V.P.; GOWDA, S.; NICOLAEVA, O.N.; HILF, M.E.; KOONIN, E.V.; NIBLETT, C.L.; CLINE, K.C.; GUMPF, D.J.; GARNSEY, S.M.; LEWANDOSWSKI, D.J. and DAWSON, W.O. (1995). Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* **208**, 511-520.
- KARASEV, A.V. (2000). Genetic diversity and evolution of Closteroviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 293-324.
- KLAASEN; V.A.; BOESHORE, M.L.; KOONIN, E.V.; TIAN, T. and FALK, B.W. (1995). Genome structure and phylogenetic analysis of lettuce infectious yellows virus, a whitefly-transmitted, bipartite closterovirus. *Virology* **208**, 99-110.

- KITAJIMA, E.W.; SILVA, D.M.; OLIVERA, A.R.; MÜLLER, G.W. and COSTA, A.S. (1965). Electron microscopical investigations of tristeza. pp.1-9 in: *Proc. 3rd. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (W.C. Price ed.), IOCV, Gainesville (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- KOENIG, R. and TORRANCE, L. (1986). Antigenic analysis of potato virus X by means of monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **67**, 2145-2151.
- KOENIG, R.; LÜDDECKE, P. and HAEBERLE, A.M. (1995). Detection of been necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *J. Gen. Virol.* **76**, 2051-2055.
- KOONIN, E.V. and DOLJA, V.V. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 375-430 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- KOONIN, E.V. (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **67**, 2197-2206.
- KORCH, C. and DRABKIN, H. (1999). Manganese citrate improves base-calling accuracy in DNA sequencing reactions using rhodamine-based fluorescent dye-terminators. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1405-1407.
- LAKE, J.A. and MOORE, J.E. (1998). Phylogenetic analysis & comparative genomics. *Trends guide to Bioinformatics* 22-23.
- LEE, R.F.; CALVERT, L.A.; NAGEL, J. and HUBBARD, J.D. (1988). Citrus tristeza virus: characterization of coat proteins. *Phytopathology* **78**, 1221-1226.
- LIU, Q. and SOMMER, S.S. (1995). Restriction endonuclease fingerprinting (REF): a sensitive method for screening mutations in long, contiguous segments of DNA. *BioTechniques* **18**, 470-477.
- LÓPEZ, C.; AYLLÓN, M.A.; NAVAS-CASTILLO, J.; GUERRI, MORENO, P. and FLORES, R. (1998). Molecular variability of the 5'-and 3'-terminal regions of the citrus tristeza virus RNA. *Phytopathology* **88**, 685-691.
- LOPEZ, C.; NAVAS-CASTILLO, J.; GOWDA, S.; MORENO, P. and FLORES, R. (2000). The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of citrus tristeza virus is an RNA-binding protein. *Virology* **269**, 462-470.
- LØVLIE, R. and EIKEN, H.G. (1997). Increase^d ³²P-SSCP sensitivity by combining RE digestion and extended X-ray film exposures. *BioTechniques* **22**, 598-602.
- MAGOME, H.; YOSHIKAWA, N. and TAKAHASHI, T. (1999). Single-strand conformation polymorphism analysis of apple stem grooving capillovirus sequence variants. *Phytopathology* **89**, 136-140.
- MATTHEWS, R.E.F. (1991). Replication I: Introduction to the study of virus replication: The strategies of plant viral genomes. In: "Plant virology". pp. 149-150. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- MAWASSI, M.; GAFNY, R. and BAR-JOSEPH, M. (1993). Nucleotide sequence of the coat protein gene of citrus tristeza virus: comparison of biologically diverse isolates collected in Israel. *Virus Genes* **7:3**, 265-275.
- MAWASSI, M.; GAFNY, R., GAGLIARDI, D. and BAR-JOSEPH, M. (1995a). Populations of citrus tristeza virus contain smaller-than-full-length particles which encapsidates sub-genomic RNA molecules. *J. Gen. Virol.* **76**, 651-659.
- MAWASSI, M.; KARASEV, A.V.; MIETKIEWSKA, E., GAFNY, R.; LEE, R.F.; DAWSON, W.O. and BAR-JOSEPH, M. (1995b). Multiple species of defective RNAs in plants infected with citrus tristeza virus. *Virology* **214**, 264-268.
- MAWASSI, M., MIETKIEWSKA, E., GOFMAN, R., YANG, G. AND BAR-JOSEPH, M. (1996). Unusual sequence relationships between two isolates of citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* **77**, 2359-2364.
- MIRKOV, T.E.; YANG, Z.N.; FANG, D.; MOONAN, F. and ROOSE, M.L. (1998). Towards map-based cloning of the CTV resistance gene of *Poncirus*. (in press) *Proc. 14th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.*

- MORENO, P.; GUERRI, J. and MUÑOZ, N. (1990). Identification of Spanish strains of citrus tristeza virus by analysis of double stranded RNA. *Phytopathology* **80**, 477-482.
- MORENO, P.; GUERRI, J.; BALLESTER-OLMOS, J.F. and MARTÍNEZ, M.E. (1991). Segregation of citrus tristeza virus strains evidenced by double stranded RNA (dsRNA) analysis. pp. 20-24 in: *Proc. 11th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (R.H. Brlansky, R.F. Lee and L.W. Timmer, eds.) IOCV, Riverside.
- MORENO, P.; NAVARRO, L.; FUERTES, C.; PINA, J.A.; BALLESTER-OLMOS, J.F.; HERMOSO DE MENDOZA, A.; JUAREZ, J. and CAMBRA, M. (1993). Preliminary data on tolerance of Gou Tou orange to tristeza in Spain. pp. 78-83 in: *Proc. 12th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (P. Moreno; J.V. Da Graça and L.W. Timmer, eds.) IOCV Riverside.
- MORENO, P. and GUERRI, J. (1997). Variability of citrus tristeza closterovirus (CTV): Methods for differentiating isolates. in: *Filamentous viruses of woody plants*. pp. 97-107.
- MOROZOV, S.YU.; DOLJA, V.V. and ATABEKOV, J.G. (1989). Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *J. Mol. Evol.* **297**, 52-62 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- MOROZOV, S.YU.; MIROSHNICHENKO, N.A.; ZELENINA, D.A.; FEDORKIN, O.N.; SOLOVIEV, A.G.; LUKASHEVA, L.I. and ATABEKOV, J.G. (1990). Expression of RNA transcripts of potato virus X full-length and subgenomic cDNAs. *Biochemie* **72**, 677-684 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- MORRIS, T.J. and DODDS, J.A. (1979). Isolation analysis of double-stranded RNA from virus-infected plants and fungal tissues. *Phytopathology* **69**, 854-858.
- MÜLLER, G.W. and COSTA, A.S. (1987). Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunizate Tristeza control by cross protection: a U.S.- Brazil cooperative success. *Plant disease* **64**, 538-541.
- NAVARRO, L.; JUAREZ, J.; PINA, J.A. and BALLESTER-OLMOS, J.F. (1984). The citrus quarantine station in Spain. pp. 365-370 in: *Proc. 9th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (S.M. Garnsey; L.W. Timmer and J.A. Dodds, eds.) IOCV, Riverside.
- NAVARRO, L. (1993). Citrus sanitation, quarantine and certification programs. pp. 383-391 in: *Proc. 12th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (P. Moreno; J.V. Da Graça and L.W. Timmer, eds.) IOCV, Riverside.
- NEEDLEMAN, S.B. and WUNSCH, C.D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. of Molecular Biology* **48**, 443-453 (de WISCONSIN PACKAGE, VERSION 9.0, 1996).
- NIBLETT, C.L.; GENE, H.; CEVIK, B.; HALBERT, S.; BROWN, L.; NOLASCO, G.; BONACALZA, B.; MANJUNATH, K.L.; FEBRES, V.J.; PAPPU, H.R. and LEE, R.F. (2000). Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Res.* **71**, 97-106.
- NOLASCO, G. and SEQUEIRA, O.A. (1997). New approaches in analyzing genomic variability of citrus tristeza virus. pp. 109-120 in: *Filamentous viruses of woody plants*. (P. Monette, ed.) Reseach Signpost, Trivandrum, India.
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K. and SEKIYA, T. (1988). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2766-2770.
- OTO, M.; SATOSHI, M. and YUASA, Y. (1993). Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minislabs gel electrophoresis apparatus. *Anal. Biochemistry* **213**, 19-22.
- PAGE, R.D. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358.
- PAPPU, H.; PAPPU, S.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R. and NIBLETT, C. (1993a). Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3641-3644.

- PAPPU, H.; PAPPU, S.; NIBLETT, C.; LEE, R. and CIVEROLO, E. (1993b). Comparative sequence analysis of the coat proteins of biologically distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes* **7:3**, 255-264.
- PAPPU, H.R.; KARASEV, A.V.; ANDERSON, E.J.; PAPPU, S.S; HILF, M.E.; FEBRES, V.; ECKLOFF, R.M.G.; MCCAFFERY, M.; BOYKO, V.; GOWDA, S.; DOLJA, V.V; KOONIN, E.V.; GUMPF, D.J.; CLINE, K.C.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O.; LEE, R.F. and NIBLETT, C.L. (1994). Nucleotide sequence and organization of eighth 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* **199**, 35-46.
- PAPPU, S.; FEBRES, V.J.; PAPPU, H.; LEE, R. and NIBLETT, C. (1997). Characterization of the 3' proximal gene of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virus Research* **47**, 51-57.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N. and NAVARRO, L. (1995). High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Science* **104**, 183-191.
- PEREMYSLOV, V.V.; HAGIWARA, Y. and DOLJA, V.V. (1999). HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14771-14776.
- PERKIN ELMER APPLIED BIOSYSTEMS. (1996). User bulletin.
- PERMAR, T.A.; GARNSEY, S.M.; GUMPF, D.J. and LEE, R. (1990). A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **80**, 224-228.
- RIPPMANN, F., TAYLOR, W.R., ROTHBARD, J.B. and GREEN, N.M. (1991). A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA. *EMBO J.* **10(5)**, 1053-1059 (de AGRANOVSKY, A.A., 1996).
- ROCHA-PEÑA, M.; LEE, R.; PERMAR, T.A.; YOKOMI, R.K. and GARNSEY, S.M. (1991). Use of enzyme-linked immunosorbent and dot-immunobinding. Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* **79**, 437-445.
- ROCHA-PEÑA, M.; LEE, R.; LASTRA, R.; NIBLETT, C.L.; OCHOA-CORONA, F.M.; GARNSEY, S.M. and YOKOMI, R.K. (1995). Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* **79**, 437-445.
- ROISTACHER, C.N.; NAUER, E.M.; KISHABA, A. and CALAVAN, E.C. (1980). Transmission of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* reflecting changes in virus transmissibility in California. pp. 76-82 in: *Proc. 8th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (E.C. Calavan, S.M. Garnsey, and L.W. Timmer, eds.), IOCV, Riverside.
- ROISTACHER, C.N. and MORENO, P. (1991). The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus- A review. pp. 9-19 in: *Proc. 11th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (R.H. Brlansky, R.F. Lee and L.W. Timmer, eds.) IOCV, Riverside
- ROSNER, A; LEE, R.F. and BAR-JOSEPH, M. (1986). Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **76**, 820-824.
- ROZANOV, M.N.; KOONIN, E.V. and GORBALENYA, A.E. (1992). Conservation of the putative methyltransferase domain. A hallmark if the "Sindbis-like" supergroup of positive RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **73**, 2129-2134.
- RUBIO, L.; AYLLÓN, M.A.; GUERRI, J.; PAPPU, H.; NIBLETT, C. and MORENO, P. (1996). Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann. Appl. Biol.* **129**, 479-489.
- RUBIO, L. (1997). Diferenciación y caracterización molecular de aislados del virus de la tristeza de los cítricos (CTV). Aplicación al control de la enfermedad. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Facultad de Ciencias Biológicas.
- RYCHLIK, W. and RHOADS, R.E. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**, 8543-8551.
- RYCHLIK, W.; SPENCER, W.J. and RHOADS, R.E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6409-6412.

- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. and ERLICH, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487 (de SAMBROOK, J., FRISTCH, E.J. and MANIATIS, T., 1989).
- SAMBROOK, J., FRISTCH, E.J. and MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467 (de SAMBROOK, J., FRISTCH, E.J. and MANIATIS, T., 1989).
- SATYANARAYANA, T.; BAR-JOSEPH, M.; MAWASSI, M.; ALBIACH-MARTI, M.R.; AYLLON, M.A.; GOWDA, S.; HILF, M.E.; MORENO, P.; GARNSEY, S.M. and DAWSON, W.O. (2001). Amplification of Citrus tristeza virus from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology* **280**(1), 87-96.
- SEKIYA, M.E.; LAWRENCE, S.D.; MCCAFFERY, M. and CLINE, K. (1991). Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* **72**, 1013-1020.
- SEVENTH REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON VIRUS TAXONOMY (2000). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses (M.H.V van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner, eds.), Academic Press, San Diego, California, USA.
- SEMORILE, L.; DEWEY, R.; GARCÍA, M.L.; DAL BO, E.; GHIRINGHELLI, P.D.; ROMANOWSKI, V. and GRAU, O. (1993). cDNA clones of CTV that discriminate severe and mild strains. pp.28-32 in: *Proc. 12th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (P. Moreno; J.V. Da Graça and L.W. Timmer, eds.), IOCV, Riverside.
- SHI, N.N.; CHEN, J.; WILSON, T.M.; MACFARLANE, S.A.; ANTONIW, J.F. and ADAMS, M.J. (1996). Single-strand conformation polymorphism analysis of RT-PCR products of UK isolates of barley yellow mosaic virus. *Virus Res.* **44**, 1-9.
- SHUKLA, D.D.; STRIKE, P.M.; TRACY, S.L.; GOUGH, K.H. and WARD, C.W. (1988). The N and C termini of coat proteins of potyvirus are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *J. Gen. Virol.* **69**, 1497-1508.
- SMITH, T.F. and WATERMAN, M.S. (1981). Comparison of Bio-Sequences. *Advances in Applied Mathematics* **2**, 482-489 (de WISCONSIN PACKAGE, VERSION 9.0, 1996).
- SMITH, D.B.; MCALLISTER, J.; CASINO, C. and SIMMONDS, P. (1997). Virus 'quasispecies': making a mountain out of a molehill?. *J. Gen. Virol.* **78**, 1511-1519.
- SUASTIKA, G.; NATSUAKI, T.; KANO, T.; IEKI, H. and OKUDA, S. (2000). Nucleotide sequence of citrus tristeza virus seedling yellows strain. *Unpublished*. GI:11414863[GenBank] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.J.; WADDELL, P.J. and HILLIS, D.M. (1996). In "Molecular Systematics" (D.M. Hillis, C. Moritz and B.K.Mable, ed), pp. 407-514. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- SWOFFORD, D.L. (1998). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. and GIBSON, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- TIAN, T.; RUBIO, L.; YEY, H.; CRAWFORD, B. and FALK, B.W. (1999). Lettuce infectious yellows virus: *in vitro* acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *J. Gen. Virol.* **80**, 1111-1117.
- TOLLIN, P. and WILSON, H.R. (1988). In "The Plant Viruses. The filamentous plant viruses" (R.G. Milne, ed), Vol. 4, pp. 51-83. Plenum Press, New York.
- VAN VUUREN, S.P.; COLLINS, R.P. and DA GRAÇA, J.V. (1993). Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in south Africa. *Plant Disease* **77**, 24-28.

- VIVES, M.C.; RUBIO, L.; LOPEZ, C.; NAVAS-CASTILLO, J.; ALBIACH-MARTI, M.R.; DAWSON, W.O.; GUERRI, J.; FLORES, R. AND MORENO, P. (1999). The complete genome sequence of the major component of a mild citrus tristeza virus isolate. *J. Gen. Virol.* **80**, 811-816.
- WALLACE, J.M. and DRAKE, R.J. (1974). Field performance of tristeza susceptible citrus trees carrying virus derived from plants that recovered from seedlings yellows. pp 67-74 in: *Proc. 6th. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* (L.G. Weathers and M. Cohen, eds.) IOCV, Richmond.
- WISCONSIN PACKAGE, VERSION 9.0 (1996). Madison, WI: Genetics Computer Group, December 1996.
- YANG, G.; MAWASSI, M.; ASHOULIN, L.; GAFNY, R.; GABA, V.; GAL-ON, A. and BAR-JOSEPH, M. (1997a). A cDNA clones from a defective RNA of citrus tristeza virus is infective in the presence of the helper virus. *J. Gen. Virol.* **78**, 1765-1769.
- YANG, G.; MAWASSI, M.; GOFMAN, R.; GAFNY, R.; and BAR-JOSEPH, M. (1997b). Involvement of subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective citrus tristeza virus molecules. *J. of Virology* **71**, 9800-9802.
- YANG, Z.N., MATHEWS, D.M., DODDS, J.A. and MIRKOV, T.E. (1999). Molecular characterization of an isolate of citrus tristeza virus that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes* **19** (2), 131-142.
- YOKOMI, R.K.; LASTRA, R.; STOETZEL, M.B.; DAMSTEEGT, V.D.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M; GOTTWALD, T.R.; ROCHA-PEÑA, M. and NIBLETT, C.L. (1984). Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus. *J. Econ. Entomol.* **87**, 1078-1085.
- ZINOVKIN, R.A.; JELKMANN, W. and AGRANOVSKY, A.A. (1999). The minor coat protein of beet yellows closterovirus encapsidates the 5' terminus of RNA in virions. *J. Gen. Virol.* **80**, 269-272.