



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN
POLEROVIRUS EN FRUTILLA (*Fragaria x ananassa*) Y
SU IMPORTANCIA EN ARGENTINA**

Cecilia Elizabeth Luciani

Tesis

Para optar al Grado Académico de

Doctora en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2018

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLEROVIRUS EN FRUTILLA (*Fragaria x ananassa*) Y SU IMPORTANCIA EN ARGENTINA

Cecilia Elizabeth Luciani

Comisión Asesora de Tesis

Directora: Dra. Vilma C. Conci

Codirector: Dr. Marcos G. Celli

Asesora: Dra. Paula Bima

Tribunal Examinador de Tesis

Ing. Agr. Dra. Paula Bima

.....

Ing. Agr. (Ph.D.) Daniel S. Kirschbaum

.....

Biól. Dra. Fabiana Guzmán

.....

Presentación formal académica

Fecha:

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Vilma Conci, directora de esta tesis, por proporcionarme todas las herramientas materiales e intelectuales, su tiempo en horario laboral y no laboral; por brindarme su apoyo incondicional y su cariño.

Al Dr. Marcos Celli, codirector de esta tesis, quien con mucha dedicación me enseñó, aconsejó y acompañó en todo momento durante estos años.

A la Dra. Paula Bima, miembro de la comisión asesora y evaluadora de tesis, por los aportes permanentes en este trabajo.

A Daniel Kirschbaum y Fabiana Guzmán, miembros de la comisión evaluadora, por los importantes aportes realizados a esta tesis.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET).

Al Centro de Investigaciones Agropecuarias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

A la Ing. Agr. Florencia Asinari, por su importante colaboración en los muestreos y el procesamiento y análisis de las muestras.

Al Dr. Daniel Kirschbaum, Dra. Natalia Meneguzzi, Ing Agr. María del Huerto Sordo, Ing. Agr. Enrique Adlerkreutz, Ing. Agr. Rolando Quiroga y a la Ing. Agr. María Eugenia Navarro por su colaboración en los muestreos.

A mis compañeras Elizabeth Pozzi y Cecilia Perotto, con quienes hacemos un hermoso equipo de trabajo, por todo el apoyo.

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

A mi familia y amigos, por ser el motor de mi vida.

RESUMEN

Los virus en frutilla son responsables de importantes pérdidas del rendimiento y calidad de los frutos. En Argentina se ha detectado la presencia de *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV), *Strawberry mottle virus* (SMoV) y *Strawberry crinkle virus* (SCV). Entre 2015 y 2016 en los laboratorios del IPAVE-INTA se obtuvieron fragmentos genómicos correspondientes a un polerovirus infectando frutilla. Simultáneamente se reportó en Canadá a Strawberry polerovirus 1 (SPV1). El objetivo de esta tesis fue identificar y caracterizar específica e intraespecíficamente el nuevo virus detectado en el país, y evaluar aspectos epidemiológicos que permitan dilucidar la importancia del patógeno. Los objetivos específicos fueron: 1) Identificar y caracterizar el posible polerovirus detectado en frutilla de Argentina. 2) Implementar un sistema de diagnóstico capaz de detectar el virus en cultivo. 3) Obtener la secuencia genómica completa de virus. 4) Detectar y analizar la variabilidad específica e intraespecífica del polerovirus y su filogenia. 5) Implementar un sistema de diagnóstico sensible que permita el análisis simultáneo de los virus. 6) Evaluar aspectos epidemiológicos que contribuyan a determinar la importancia y distribución del SPV1 en zonas productoras de frutilla en relación a otros virus presentes. Los resultados confirmaron la presencia de SPV1 en Argentina, se implementó un sistema para su detección y se transmitió a plantas de *Fragaria vesca* var. *Semperflorens* “Alpina”. Se obtuvo el 99,5% de la secuencia genómica del virus y su análisis filogenético permitió detectar que SPV1 forma un *cluster* diferente en el género *Polerovirus*. Se obtuvieron 8 secuencias del gen de la cubierta proteica del virus y se detectaron diferencias genómicas entre los aislamientos reportados, relacionadas con el origen de plantas madres. Se determinó la incidencia y prevalencia del SPV1 en las principales regiones productoras del país y su relación con los parámetros climáticos, regiones, cultivares, síntomas y su relación con SMYEV, SMoV y SCV, para los cuales se implementó un RT-PCR *Multiplex* para su detección. El SPV1 fue el tercer virus más frecuente de frutilla en Argentina y se relacionó de manera positiva con la región de Coronda y las precipitaciones.

Palabras clave: SPV1, virus, epidemiología, filogenia, *Fragaria*

ABSTRACT

Strawberry viruses are responsible for significant yield and fruit quality losses. *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV), *Strawberry mottle virus* (SMoV) and *Strawberry crinkle virus* (SCV) have been detected in Argentina. Genomic fragments belonging to a polerovirus infecting strawberry were obtained at IPAVE-INTA between 2015 and 2016. Simultaneously, Strawberry polerovirus 1 (SPV1) was reported in Canada. The objective of this thesis was to identify and characterize, the new virus detected in the country at the species and intraspecies levels, and to evaluate epidemiological aspects that determine the importance of the pathogen. The specific objectives were to: 1) identify and characterize the possible polerovirus detected in strawberry from Argentina; 2) implement a diagnostic system capable of detecting the virus in the crop; 3) obtain the complete genomic sequence of the virus; 4) detect and analyze the specific and intraspecific variability of the polerovirus and its phylogeny; 5) implement a sensitive diagnostic system that allows the simultaneous analysis of viruses; 6) evaluate epidemiological aspects that contribute to the determination of the importance and distribution of SPV1 in strawberry-producing areas in relation to other viruses present. The results confirmed the presence of SPV1 in Argentina; a system was implemented for its detection and it was transmitted to plants of *Fragaria vesca* var. *Semperflorens* "Alpina". Most (99.5%) of the genomic sequence of the virus was obtained and its phylogenetic analysis showed that SPV1 forms a different cluster in the genus *Polerovirus*. Eight sequences of the virus protein coat were obtained and the reported isolates showed genomic differences, related to mother plant origins. The incidence and prevalence of SPV1 was determined in the main producing regions of the country and its relationship with the climatic parameters, regions, cultivars, and symptoms as well as with SMYEV, SMoV and SCV, for which a Multiplex RT-PCR was implemented for their detection. SPV1 was the third most common strawberry virus in Argentina and was positively related to the Coronda region and precipitations.

Keywords: SPV1 Virus Epidemiology Variability *Fragaria*

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
EL CULTIVO DE FRUTILLA.....	1
La planta de frutilla: origen y características taxonómicas	1
La planta de frutilla: características morfológicas y fisiológicas	1
Importancia económica del cultivo de frutilla	2
PRINCIPALES PATÓGENOS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE FRUTILLA	3
Virus que afectan al cultivo de frutilla a nivel mundial y nacional.....	5
Virus del género <i>Polerovirus</i>	6
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
CAPÍTULO 2	8
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO VIRUS EN FRUTILLA Y DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA SU DIAGNÓSTICO	8
INTRODUCCIÓN	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Material vegetal y extracción de ARN	9
Identificación molecular de Strawberry polerovirus 1	10
Injertos a plantas indicadoras	11
Obtención de la secuencia genómica completa del virus y análisis filogenético	12
RESULTADOS	16
Identificación molecular de Strawberry polerovirus 1	16
Injerto a plantas indicadoras	17
Obtención de la secuencia genómica completa del virus y análisis filogenético	20
DISCUSIÓN	24
CAPÍTULO 3	27
ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE Strawberry polerovirus 1	27

INTRODUCCIÓN	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Material vegetal	28
Amplificación de la CP	28
Clonado y secuenciación	29
Análisis de secuencias	29
Análisis de Recombinación	32
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	42
CAPÍTULO 4	45
EVALUACIÓN DE ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS QUE CONTRIBUYEN A DETERMINAR LA IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DEL SPV1 EN ZONAS PRODUCTORAS DE FRUTILLA EN RELACIÓN A OTROS VIRUS PRESENTES EN ARGENTINA	45
INTRODUCCIÓN	45
MATERIALES Y MÉTODOS	48
Recolección de muestras	48
Implementación del sistema de diagnóstico	49
Detección de virus	50
Análisis estadístico	51
RESULTADOS	51
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES GENERALES	66
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	68
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXO 1	77
ANEXO 2	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Cebadores específicos diseñados para la detección de Strawberry polerovirus 1.....	11
Tabla 2.2. Plantas indicadoras <i>Fragaria vesca</i> var. <i>Semperflorens</i> (Duch) “Alpina”, injertadas con plantas de frutilla infectadas con distintas combinaciones de los virus SMYEV, SCV, SMoV y SPV1.....	12
Tabla 2.3. Cebadores específicos para completar los espacios de genoma faltante....	13
Tabla 2.4. Secuencias de polerovirus y enamovirus utilizadas en la elaboración del árbol filogenético.....	14
Tabla 2.5. Porcentaje de identidad de nt y aa de los diferentes marcos abiertos de lectura de la secuencia NACCXXX-SPV1 (ARG) obtenida.....	21
Tabla 3.1. Secuencias de polerovirus utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.....	30
Tabla 3.2. Secuencias del gen de la cubierta proteica de aislamientos de SPV1 obtenidas en esta tesis provenientes de plantas de frutilla de diferentes cultivares y orígenes.....	33
Tabla 3.3. Porcentaje de identidad de nucleótidos del gen de la cubierta proteica de Strawberry polerovirus 1.....	35
Tabla 3.4. Porcentaje de identidad de aminoácidos del gen de la cubierta proteica de Strawberry polerovirus 1.....	35

Tabla 3.5. Sustitución de nucleótidos en el gen de la cubierta proteica de Strawberry polerovirus 1.....	36
Tabla 4.1. Cebadores específicos utilizados para la detección de SPV1, SMYEV, SMoV y SCV.....	50
Tabla 4.2. Incidencia y prevalencia de SPV1, SMYEV, SMoV y SCV.....	53
Tabla 4.3. Incidencia de SPV1, SMYEV, SMoV y SCV por cultivar de frutilla y región muestreada.....	54
Tabla 4.4. Temperatura máxima, mínima, media y precipitaciones en cada región productora de Argentina.....	56
Tabla 4.5. Análisis de correlación de Spearman entre virus, plantas con síntomas y parámetros climáticos.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 2.1. Corrida de electroforesis de producto de PCR en gel de agarosa 2%.	17
Fig. 2.2. Plantas de <i>Fragaria vesca</i> var. <i>Semperflorens</i> “Alpina” después de 12 días de realizados los injertos de foliolos de frutillas que presentaban infecciones virales mixtas.	18
Fig. 2.3. Plantas de <i>Fragaria vesca</i> var. <i>Semperflorens</i> “Alpina” después de 20 días de realizados los injertos de foliolos de frutillas que presentaban infecciones virales mixtas.	18
Fig. 2.4. Plantas de <i>Fragaria vesca</i> var. <i>Semperflorens</i> “Alpina” después de 60 días de realizados los injertos de foliolos de frutillas que presentaban infecciones virales mixtas.	19
Fig. 2.5. Plantas de <i>Fragaria vesca</i> var. <i>Semperflorens</i> “Alpina” después de 90 días de realizados los injertos de foliolos de frutillas que presentaban infecciones virales mixtas.	19
Fig. 2.6. Esquema representativo del genoma de Strawberry polerovirus 1.	21
Fig. 2.7. Árbol filogenético resultante del alineamiento de 98 secuencias de 30 polerovirus usando el método <i>Maximum Likelihood</i> ajustado al modelo GTR.	23
Fig. 3.1. Corrida de electroforesis en gel de agarosa 2% mostrando productos de PCR de 803 nt de diferentes aislamientos de Strawberry polerovirus 1.	33

Fig. 3.2. Árbol filogenético construido con secuencias de nucleótidos del gen de la cubierta proteica de 24 virus del género <i>Polerovirus</i>	38
Fig. 3.3. Ampliación del <i>cluster</i> IIB (de Strawberry polerovirus 1) proveniente del árbol filogenético construido con secuencias de nucleótidos de la cubierta proteica de polerovirus.	39
Fig. 3.4. Árbol filogenético construido con 52 secuencias de aa del gen de la cubierta de 24 polerovirus y un enamovirus extragrupo).....	40
Fig. 3.5. Ampliación del <i>cluster</i> IB (de Strawberry polerovirus 1) proveniente del árbol filogenético construido con secuencias de aminoácidos de la cubierta proteica de polerovirus.....	41
Fig. 4.1. Sección del mapa de Argentina que muestra los departamentos de cada provincia donde fueron tomadas muestras de frutilla.....	49
Fig. 4.2. Corrida de electroforesis en gel de agarosa 2% mostrando fragmentos amplificados de tamaño esperado para <i>Strawberry mild yellow edge virus</i> , <i>Strawberry mottle virus</i> y <i>Strawberry crinkle virus</i>	52
Fig. 4.3. Corrida de electroforesis en gel de agarosa 2% mostrando fragmentos amplificados de tamaño esperado para Strawberry polerovirus 1..	52
Fig. 4.4. Porcentaje de plantas infectadas con diferentes números de especies virales.....	55
Fig. 4.5. Porcentaje de plantas de frutilla infectadas con virus en diferentes combinaciones.....	56

Fig. 4.6. <i>Biplot</i> del análisis exploratorio de componentes principales entre condiciones climáticas, regiones muestreadas y virus.....	57
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μl	Micro litro
μM	Micromolar
aa	Aminoácidos
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Cadena simple de ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
CTAB	Bromuro de hexadecilmetilamonio
DEPC	Diethyl polycarbonato
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DAS-ELISA	Inmuno ensayo de doble sándwich de antisuero
Gap	Porción genómica no secuenciada
ha	Hectárea
INDEAR	Instituto de Agrobiotecnología Rosario
IPAVE	Instituto de Patología Vegetal
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
LABYV	Luffa aphid-borne yellows virus
min	Minuto
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT	Retro transcripción
SCV	<i>Strawberry crinkle virus</i>
ScYLV	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>

SMoV	<i>Strawberry mottle virus</i>
SMYEV	<i>Strawberry mild yellow edge virus</i>
SPV1	Strawberry polerovirus
t	Tonelada
U	Unidad
var.	Variedad
WLYaV	Wheat leaf yellowing-associated virus
SVBV	<i>Strawberry vein banding virus</i>
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>Next Generation Sequencing</i>)

INTRODUCCIÓN

EL CULTIVO DE FRUTILLA

La planta de frutilla: origen y características taxonómicas

La frutilla es una planta perteneciente a la familia de las Rosáceas, subfamilia *Rosoidea* género *Fragaria*. Su nombre proviene del latín *Fraga* que significa fragancia. Existían en el pasado más de 54 especies dentro del género *Fragaria*. Los principales cultivares comerciales son el producto del cruce entre la especie *Fragaria virginiana*, originaria de Norteamérica con la especie chilena *Fragaria chiloensis*. Estos híbridos se caracterizan por presentar frutos más jugosos y de mayor tamaño (Baraona y Sancho, 1998).

La planta de frutilla: características morfológicas y fisiológicas

La frutilla es una planta rastrera, perenne y posee tallos modificados: rizomas y corona central. En esta última se encuentran las yemas axilares que pueden dar origen a las flores, estolones o coronas secundarias. Las hojas son compuestas, trifolioladas con gran cantidad de estomas y un sistema radical adventicio superficial. Esto la convierte en una planta altamente sensible al suministro de agua, humedad ambiental, intensidad lumínica y a la duración del día. Las flores son blancas, perfectas y hermafroditas. La infrutescencia consta de un receptáculo carnoso que contiene a los aquenios (Baraona y Sancho, 1998). Puede cultivarse en una amplia variedad de climas, pero los mejores rendimientos se obtienen en zonas templadas, sin vientos ni heladas en primavera, y sin lluvias ni elevadas temperaturas en épocas de cosecha. El desarrollo vegetativo y la floración de la planta de frutilla dependen del frío recibido antes de su plantación y de las temperaturas durante el desarrollo. Los cultivares

de día corto responden también al fotoperiodo requiriendo menos de 14 h de luz para desarrollar yemas florales (Undurranga y Vargas, 2013).

Importancia económica del cultivo de frutilla

A nivel mundial se producen 4,5 millones de toneladas (t) de frutas finas, de las cuales el 62% corresponde a frutilla, esto la convierte en la fruta fina de mayor impacto económico. En Argentina se cultivan alrededor de 2000 ha de frutilla (entre producción de frutas y viveros) distribuidas principalmente en 8 provincias. Las plantas madres son importadas, y provienen principalmente de Estados Unidos y España. Estas plantas madres son reproducidas agámicamente durante un año en un número muy reducido de viveros, localizados en las provincias de Mendoza, Chubut y Neuquén. Los plantines reproducidos son distribuidos a los productores de fruta, principalmente en las provincias de Tucumán, Jujuy, Santa Fe, Corrientes y Buenos Aires. Los cultivares más utilizados son San Andreas, Festival y Sabrina como variedades tempranas; Benicia, Albion, Camarosa y Sweet Ann como intermedios, y Camino Real como tardío (Adlercreutz, 2013; Kirschbaum, 2014). Todos los años los productores renuevan los plantines de frutilla, aunque en las regiones más frías (Mar del Plata, Mendoza y Patagonia), el cultivo puede comportarse como bienal o trienal. En Mar del Plata, la época de plantación es febrero/marzo, y la cosecha comprende los meses de noviembre a mayo, por dos años consecutivos.

La frutilla en Argentina es comercializada tanto en fresco como congelada. Se exportan un promedio de 3,8 t de frutilla congelada, con un precio de 1.949 USD FOB/t. El principal destino de la fruta congelada fue Estados Unidos y Brasil (90%), Canadá, Uruguay, Japón y Chile. Alrededor de 5,9 t de frutilla fresca proveniente principalmente de Buenos Aires, Santa Fe y Tucumán se comercializa en el Mercado Central de Buenos Aires. Los gastos desde implantación a cosecha de una ha de frutilla, se estiman en 34 mil dólares para un rinde de 40 t/ha. El gasto en plantines es el más importante, ya que representa el 37% de los gastos totales (Rodriguez *et al.*, 2016). Además, la producción de frutilla es generadora de mano de obra intensiva, llegando a ocupar en forma directa e indirecta cerca de 1000 jornales por hectárea

cultivada. Esto lo convierte en un cultivo de importancia social (Telam, 2017; Kirschbaum, 2014).

PRINCIPALES PATÓGENOS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE FRUTILLA

Varias enfermedades afectan la planta de frutilla disminuyendo su longevidad, el rendimiento y la calidad de la fruta. Entre los patógenos se mencionan *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. acutatum*, *Phytophthora cactorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Gnomonia comari*, *Mycosphaerella fragariae*, *Diplocarpon earliana*, *Phomopsis obscurans*, *Podosphaera aphanis*, *Macrophomina phaseolina*, *Acremonium strictum*, *Xanthomonas fragariae* (Fraire Cordero *et al.*, 2003; France, 2013; Kirschbaum *et al.*, 2017). La frutilla también es atacada por trips (*Frankliniella* spp.), moscas blancas, ácaros, orugas y áfidos. Entre estos últimos, han sido mencionados *Chaetosiphon* spp., *Aphis* spp., *Myzus* spp., *Macrosiphum rosae*, *Acyrtosiphon malvae*, *Amphorophora agathonica*, *Rhodobium pososum*, y *Aulacorthum solani*, que no solo causan daños mecánicos en el cultivo, sino que también fueron descriptos como vectores de virus de frutilla (Maas, 1998). En Argentina, *Aphis forbesi*, *Aphis gossypii*, *Chaetosiphon fragaefolii*, *Chaetosiphon minor*, *Chaetosiphon thomasi*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus persicae* han sido detectados en regiones productoras de frutilla (Dughetti *et al.*, 2017).

Debido a que la frutilla se propaga de manera vegetativa, las enfermedades sistémicas se transmiten de la planta madre a la descendencia. Por ello, las virosis son de gran importancia sanitaria. Los virus son transmitidos por vectores de manera no persistente o persistente, esta última puede ser circulativa o propagativa. Los tipos de transmisión se diferencian por el tiempo requerido por el vector para adquirir el virus y por la cantidad de tiempo en el que es capaz de transmitirlo. En transmisiones no persistentes, el virus puede ser adquirido y transmitido por el vector en segundos, pero el virus es retenido por el insecto solo por algunas horas. Cuando la transmisión es persistente, el insecto necesita alimentarse de la

planta por minutos, u horas, para poder adquirir el virus y después de un período de latencia son capaces de transmitirlo. La transmisión persistente puede ser circulativa, en la cual el virus circula a través del cuerpo del vector pero es incapaz de multiplicarse dentro de él; o propagativa, donde el virus se multiplica en el vector (Schumann, 2006). Los virus de frutilla transmitidos por pulgones se transmiten de manera persistente circulativa o propagativa, dependiendo del virus (Martin y Tzanetakis, 2006).

Los virus son nucleoproteínas que se propagan en el interior de células vivas y tienen la capacidad de producir enfermedad mediante el uso de las sustancias celulares, ocupando los espacios libres en las células, alterando sus componentes, procesos celulares y el metabolismo. Constan de una cubierta proteica (CP) helicoidal o cúbica, que contiene a por lo menos una cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) de doble o simple cadena. Los métodos que se utilizan para detectar a los virus incluyen principalmente la transmisión del virus de una planta enferma a una sana ya sea por gemación, injerto o fricción con savia de la planta; observación en el microscopio electrónico; pruebas serológicas y técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Agrios, 1995).

Las plantas de frutilla infectadas con virus manifiestan un marcado enanismo, reducción del vigor, clorosis, deformación de hojas y pérdidas en el rendimiento (Converse, 1987; Mass, 1998; Torrico *et al.*, 2017). La expresión de síntomas depende en gran medida de la presencia de infecciones múltiples en las plantas y, en general, las infecciones simples son asintomáticas aunque se ha registrado una disminución en la producción (Torrico *et al.*, 2010a).

Virus que afectan al cultivo de frutilla a nivel mundial y nacional

Las enfermedades virales son un importante factor responsable de la disminución del rendimiento y de la calidad de fruto en el mundo. Debido a ello, es necesario hacer uso de plantas libres de virus para mantener una rentabilidad aceptable. A nivel mundial, las plantas de frutilla son infectadas por más de 30 patógenos sistémicos (Converse, 1987; Martin y Tzanetakis, 2006).

Fueron reportados virus transmitidos por mosca blanca entre los cuales se mencionan miembros del género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae* (Wisler *et al.*, 1998; Rubio *et al.*, 1999; Wintermantel, 2004). También fueron reportados virus transmitidos por nematodos, *Tomato ringspot virus*, *Arabis mosaic virus*, *Raspberry ringspot virus*, *Tomato black ring virus* y *Strawberry latent ringspot virus* (Martin y Tzanetakis, 2013), por hongos *Tobacco necrosis virus*, y por polen y semilla *Strawberry necrotic shock virus*, *Fragaria chiloensis latent virus* y *Apple mosaic virus*. Existen otros virus que aún no han sido caracterizados como el *Fragaria chiloensis cryptic virus* (Tzanetakis y Martin, 2005a) y *Strawberry latent virus* (Tzanetakis y Martin, 2005b).

También fueron reportados virus transmitidos por áfidos, que han sido considerados los más importantes a nivel económico en la mayoría de las áreas de producción, *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV), *Strawberry crinckle virus* (SCV), *Strawberry mottle virus* (SMoV), *Strawberry vein banding virus* (SVBV), *Strawberry pseudo mild yellow edge virus*, *Strawberry chlorotic fleck virus* y el *Strawberry latent C virus*. Entre ellos, los más frecuentes son: SCV, SMYEV, SMoV y SVBV (Converse, 1987; Maas, 1998).

Hasta el momento de la construcción del proyecto de tesis, en Argentina solo había sido reportada la presencia de SMoV, SMEYV y SCV (Nome y Yossen, 1980; Conci *et al.*, 2009; Torrico *et al.*, 2010; Perotto *et al.*, 2014). Entre 2015 y 2016, se obtuvieron en el laboratorio del IPAVE-INTA, fragmentos genómicos de virus, provenientes de una

Secuenciación de Nueva Generación (NGS) a través del método 454 de Roche, que permitieron sospechar la presencia de un polerovirus infectando el cultivo de frutilla en Argentina. Simultáneamente se reportó, al este de Canadá, la secuencia completa de un nuevo polerovirus en frutilla, nombrado tentativamente como Strawberry polerovirus 1 (SPV1, Xiang *et al.*, 2015).

Por ser SPV1 un nuevo virus, se desconoce la variabilidad intraespecífica existente en los cultivos, pudiendo existir variantes o razas del virus según las regiones o cultivares que infecte. También se desconoce su distribución y frecuencia tanto en Argentina como en otros países.

En la actualidad, las virosis de frutilla son un tema de fundamental importancia tanto para productores de fruta como para productores de plantines (viveristas). También es un tema de interés para el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), como organismo de control de material vegetal, debido que necesita evitar la permanente entrada de nuevos patógenos al país. Hasta el presente no existen sistemas de diagnósticos rápidos y confiables para todos los virus, ya que muchos de ellos se encuentran en bajas concentraciones en la planta. Esto hace que no pueda implementarse sistemas serológicos como DAS-ELISA para inspección sanitaria masiva cuando los plantines ingresan al país y cuando son distribuidos a los productores.

Virus del género *Polerovirus*

Los virus del género *Polerovirus*, son miembros de la familia *Luteoviridae*, se caracterizan por ser partículas icosaédricas de 25 a 30 nm de diámetro. La CP contiene a una cadena simple de ARN genómico de sentido positivo. Los virus de este género se encuentran distribuidos en un amplio rango de hospedantes y se transmiten por áfidos de manera persistente circulativa. Cuando los áfidos se alimentan del floema de la planta se produce la adquisición del virus, el cual entra en el hemocele del áfido, circula en la hemolinfa y entra en

la glándula salival accesoria. La inoculación ocurre al introducir la saliva virulífera dentro del tejido floemático vegetal a través del ducto salival durante la alimentación del áfido (King *et al.*, 2012).

HIPÓTESIS

El polerovirus detectado en frutilla en otras zonas productoras del mundo está presente en el país y adquiere considerable importancia en el cultivo debido a que está uniformemente distribuido en las diferentes regiones productoras.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar específica e intraespecíficamente el nuevo virus detectado en el país (posible *Polerovirus*), y evaluar aspectos epidemiológicos que permitan dilucidar la importancia del patógeno detectado y su relación con otros virus presentes, para contribuir a un manejo sustentable de la enfermedad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar y caracterizar el posible polerovirus detectado en frutilla de Argentina.
2. Implementar un sistema de diagnóstico capaz de detectar el virus en el cultivo.
3. Obtener la secuencia genómica completa del virus en estudio.
4. Detectar y analizar la variabilidad específica e intraespecífica del polerovirus encontrado y su filogenia.
5. Evaluar aspectos epidemiológicos que contribuyan a determinar la importancia y distribución del SPV1 en zonas productoras de frutilla en relación a otros virus presentes en Argentina.
6. Implementar un sistema de diagnóstico sensible que permita el análisis simultáneo de los virus.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO VIRUS EN FRUTILLA Y DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA SU DIAGNÓSTICO

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del amarillamiento del borde de la hoja (*Strawberry mild yellow edge disease*) fue la primera enfermedad de frutilla atribuida a un virus (Converse, 1987). Las propiedades del agente causal fueron descritas en un primer momento como partículas isométricas de 23 nm de diámetro y clasificadas como un virus perteneciente a la familia *Luteoviridae* (Converse, 1987). Años más tarde, Jelkmann *et al.* (1990) reportaron un potexvirus asociado a esta enfermedad. Construyeron un clon infectivo del potexvirus que fue capaz de reproducir los síntomas de la enfermedad, y el virus fue llamado subsecuentemente SMYEV. Estos autores, además concluyeron, que el SMYEV podría estar asociado al luteovirus citado por Converse (1987). El trabajo realizado en Canadá por Xiang *et al.* (2015) mostró que SPV1 se encontró frecuentemente asociado a SMYEV, sugiriendo que SPV1 podría ser el agente causal citado por Converse (1987). Hasta el momento de la realización de esta tesis se desconocía la presencia de SPV1 infectando la planta de frutilla en Argentina. Tampoco existía un sistema de diagnóstico que permitiera detectarlo, ya que las secuencias de SPV1 publicadas en la base de datos del *GenBank* fueron obtenidas por NGS (Xiang *et al.*, 2015). La detección de este virus mediante una técnica sensible es de fundamental importancia.

La técnica de injerto en frutilla es usada frecuentemente para la detección y diagnóstico de infecciones virales. Las plantas indicadoras de virus de uso común son selecciones de

plantas silvestres de *Fragaria vesca*, UC5, UC6 y var *Semperflorens* Duch. (Alpina), y de *F. virginiana* UC 12, entre otras (Thomas y Marcus, 1953; Converse, 1987; Mass, 1998).

Los virus de la familia *Luteoviridae* incluyen tres géneros: *Luteovirus*, *Polerovirus* y *Enamovirus* (Domier, 2012). Los virus del género *Polerovirus* poseen una cadena simple y positiva de ARN de aproximadamente 5-6 kb de longitud que típicamente contiene seis marcos abiertos de lectura (ORF), y tres regiones no codificantes, en los que están incluidos los extremos 5' y 3' y una región intergénica entre ORF2 y ORF3 (Krueger *et al.*, 2013; Domier, 2012). Se ha demostrado que la proteína que codifica el ORF0 tiene una función supresora del silenciamiento viral en algunas plantas (Pfeffer *et al.*, 2002; Mangunde *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2016). Este ORF distingue a los polerovirus de los miembros del género *Luteovirus* que carecen de ORF0 (Miler *et al.*, 1995). El ORF1 superpuesto con ORF0 y ORF2 codifica para una serina proteasa (P1). La proteína de fusión P1-P2 (ARN Polimerasa), puede ser producida por el ORF1 y ORF2 en baja frecuencia. El ORF3 y el ORF4 codifican la CP y para una proteína de movimiento respectivamente (Domier, 2012). El ORF5 se expresa como una proteína de lectura P3-P5 y se encuentra implicado en la transmisión por áfidos y la especificidad del virus al floema (Brault *et al.*, 2015).

Los objetivos de este capítulo son:

1. Identificar y caracterizar el polerovirus detectado en frutilla de Argentina.
2. Implementar un sistema de diagnóstico capaz de detectar el virus en cultivo.
3. Obtener la secuencia genómica completa del virus en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de ARN

Se recolectaron plantas de frutilla provenientes de lotes productivos con síntomas de virosis, las cuales fueron mantenidas en invernadero a temperatura y humedad controlada. Para obtener la secuencia genómica del virus en estudio, se extrajo ARN de hojas jóvenes

usando el *kit RNeasy Plant* (QIAGEN, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la implementación del sistema de diagnóstico se extrajeron los ácidos nucleicos totales de hojas jóvenes de 51 plantas mediante el método bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Chang *et al.*, 2007) con modificaciones (CTAB, Anexo I).

Identificación molecular de Strawberry polerovirus 1

El ARN obtenido a partir de una planta de frutilla con síntomas (denominada Berra 2), fue empleado para NGS en la plataforma genómica y bioinformática de INDEAR, Rosario Argentina, usando el secuenciador Genómico 454 FLX+ de Roche. Las lecturas de las secuencias de ADN fueron ensambladas en *contigs* usando el programa *Newbler Assembly* v2.5.3. Los *contigs* fueron analizados usando las herramientas *ORF Finder* y *BLAST* disponibles en la página del centro nacional de información biotecnológica (NCBI).

Basada en las secuencias parciales obtenidas y las secuencias de SPV1 disponibles en la base de datos del *GenBank*, se diseñaron 6 cebadores específicos, de los cuales 2 pares corresponden al sitio que codifica para la polimerasa del virus y el tercero hibrida en el gen de la CP del virus (Tabla 2.1). A partir del ARN de 44 plantas de frutilla se generaron cadenas simples de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa utilizando la enzima M-MLV (*Epicentre*) y cebadores *random*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una PCR usando 2 µl de tampón 10x, 0,5 µl de dNTP 10 µM, 1 µl de cada cebador específico diseñado (10 µM, Tabla 2.1), 1 U de enzima Taq polimerasa (*Kapa*) y agua Dietil policarbonato (DEPC) suficiente para completar un volumen final de reacción de 20 µl. Las condiciones térmicas de ciclado consistieron en un paso de desnaturalización a 95 °C por dos minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. El ciclado concluyó con un paso de extensión final a 72 °C por 7 min.

Los fragmentos amplificados fueron clonados y secuenciados bidireccionalmente. Las secuencias fueron ensambladas usando el programa *SeqMan* del paquete *DNASTAR* (lasergene 8.0 versión 5) y se ajustaron manualmente cuando fue necesario.

Tabla 2.1. Cebadores específicos diseñados para la detección de Strawberry polerovirus 1

Nombre	Secuencia 5'→3'	nt ¹	Región
Polero47Fw	GAGTGTCACCACCCCTCACTAC	897	Polimerasa
Polero2Rv	AGGCCTACACCAGCATCTAACTCA		
Polero2Fw	CCAAC TAGCCAAGATCCCATCTGAAG	1030	Polimerasa
Polero40Rv	CGAGACCTCGACTTTGAAACCCA		
Polero40Fw	GATGGACAACAAATAGGTAGAAGG	324	CP
Polero760Rv	TTAGCCACGGGAAGTAGAAAG		

¹ Cantidad de nucleótidos que amplifica el par de cebadores específicos.

Injertos a plantas indicadoras

Dos plantas de frutilla con síntomas y positivas para SMYEV, SCV, SMoV y SPV1 por RT-PCR (denominadas 15CA y Berra12), fueron usadas para realizar injertos de folíolo medio a tres plantas de *Fragaria vesca* var. *Semperflorens* (Duch) “Alpina”, utilizadas como plantas indicadoras (Tabla 2.2).

Los injertos fueron observados diariamente visualizando la aparición de síntomas de infección viral. Se extrajeron de las plantas injertadas los ácidos nucleicos totales por el método CTAB (Chang *et al.*, 2007) con modificaciones (AnexoI) a los 20, 30, 70 y 90 días después de realizados los injertos. Se evaluó la presencia de SPV1, SMYEV SMoV y SCV mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos (Luciani *et al.*, 2016; Perotto *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2003; Thompson y Jelkmann, 2004).

Tabla 2.2. Plantas indicadoras *Fragaria vesca* var. *semperflorens* (Duch) “Alpina”, injertadas con plantas de frutilla infectadas con distintas combinaciones de los virus SMYEV, SCV, SMoV y SPV1

Planta indicadora	Planta utilizada para el injerto	Virus presentes en las plantas utilizadas
1	Berra 12	SMYEV/SMoV/SPV
2	Berra 12	SMoV/SPV
3	15 CA	SMYEV/SMoV/SCV/SPV

SMYEV, *Strawberry mild yellow edge virus*; SCV, *Strawberry crinkle virus*; SMoV, *Strawberry mottle virus*; SPV1, *Strawberry polerovirus 1*.

Obtención de la secuencia genómica completa del virus y análisis filogenético

El ARN extraído de la planta denominada “15 CA” infectada naturalmente con SPV1 fue secuenciado con tecnología de secuenciación de alto rendimiento *Illumina HiSeq 1500* en INDEAR (Plataforma genómica y bioinformática, INDEAR Inc., Rosario, Argentina). Las lecturas obtenidas fueron ensambladas de *novo* usando el programa *Newbler Assembly v2.5.3* (Roche). Se utilizó la herramienta *BLAST* del NCBI para la identificación de los *contigs* obtenidos. Los *contigs* de interés fueron alineados junto con las secuencias de SPV1 (Xiang *et al.*, 2015) usando el programa *Geneious* versión 9.0.5. Se diseñaron cebadores específicos para las porciones genómicas no secuenciadas o *gaps* (Tabla 2.3), y se amplificaron los fragmentos por RT-PCR.

Para obtener las porciones genómicas de los extremos 5' y 3', se realizó extracción de ARN a la planta 15 CA y a la planta 3 de *Fragaria vesca* (Tabla 2.2) por el método CTAB modificado y con el *kit* de extracción *Quick-RNA MiniPrep* (Zymo). Para el extremo 3' se adicionó a los ARN obtenidos una cola poli A con el *kit E. coli Poly(A) Polymerase* (BioLabs), se generó un ADNc con cebadores ECO/NOT (Morin *et al.*, 2003) y hexámeros aleatorios y se amplificó por PCR utilizando los cebadores específicos SPV 3'Fw (Tabla 2.3) y PC-R4 (Tsuneyoshi *et al.*, 1998). Para la obtención del extremo 5' se realizó una RT con el

cebador específico SPV 5'Rv (Tabla 2.3) al cual fue agregado una cola poli C, seguido de la amplificación por PCR utilizando cebador específico para SPV1 y un cebador “ancla”.

Todos los fragmentos obtenidos fueron clonados y secuenciados por método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología (CICVyA – CNIA – INTA) y ensamblados con los *contigs* utilizando en programa *Geneious* versión 9.0.5.

La secuencia total obtenida fue analizada con la herramienta ORF *Finder* del NCBI para determinar los marcos abiertos de lectura (ORF). Cada ORF fue alineado con las secuencias de SPV1 publicadas en la base de datos del *GenBank* (Xiang *et al.*, 2015), y se calculó el porcentaje de identidad con el programa SDT.

El análisis filogenético se hizo utilizando el programa MEGA7 a partir del alineamiento de la secuencia obtenida en este trabajo y otras 98 secuencias completas de 30 polerovirus disponibles en el la base de datos del *GenBank* (Tabla 2.4). Se utilizó el método de *máximum likelihood* (Nei y Tajima, 1983), ajustando el modelo GTR (Tavaré 1986) con *bootstrap* de 10000 réplicas. Como extra grupo se utilizó la secuencia de *Pea enation mosaic virus* (PEMV).

Tabla 2.3. Cebadores específicos para completar los espacios de genoma faltante

Nombre	Secuencia 5'→3'	nt ¹
<i>Gap</i> Fw	GGTCAGTCCATGGCGCTTTTAAC	527
<i>Gap</i> Rv	TCTGCGATATCCTCGTCAGAGAAT	
SPV 3'Fw	GTAGACACAGCCCGACCTGAA	209
SPV 5'Rv	CCTCGAAAACCCTACTCGATTGTACT	786

¹ Cantidad de nucleótidos que amplifican los cebadores

Tabla 2.4. Secuencias de polerovirus y enamovirus utilizadas en la elaboración del árbol filogenético

Nº Acceso*	Virus	Sigla
KX856971	African eggplant yellowing virus	AeYV
KT962089	Barley virus G	BVG
LC259081	Barley virus G	BVG
AF352024	<i>Beet chlorosis virus</i>	BChV
AF352025	<i>Beet chlorosis virus</i>	BChV
DQ132996	<i>Beet mild yellowing virus</i>	BMVY
EF107543	<i>Beet mild yellowing virus</i>	BMVY
AF473561	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
EU636990	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
EU636991	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
HM804471	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
KM076647	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
KU521324	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
KU521325	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
LC198684	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
AB903032	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
HQ388348	Brassica yellows virus	BYV
HQ388350	Brassica yellows virus	BYV
JN015068	Brassica yellows virus	BYV
KF015269	Brassica yellows virus	BYV
KF923236	Brassica yellows virus	BYV
KY310572	Brassica yellows virus	BYV
MF314820	Brassica yellows virus	BYV
AY695933	<i>Carrot red leaf virus</i>	CtRLV
AF235168	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>	CYDV
EF521827	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>	CYDV
KY553235	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>	CYDV
KY623680	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>	CYDV
L25299	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>	CYDV
AY956384	<i>Chickpea chlorotic stunt virus</i>	CpCSV
JF507725	<i>Chickpea chlorotic stunt virus</i>	CpCSV
GU167940	<i>Cotton leafroll dwarf virus</i>	CLRDV
HQ827780	<i>Cotton leafroll dwarf virus</i>	CLRDV
KF359946	<i>Cotton leafroll dwarf virus</i>	CLRDV
KF906260	<i>Cotton leafroll dwarf virus</i>	CLRDV
KY364846	Cowpea polerovirus 1	CPPV1
EU000535	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
EU636992	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
GQ221223	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV

Tabla 2.4. Secuencias de polerovirus y enamovirus utilizadas en la elaboración del árbol filogenético - continuación

Nº Acceso¹	Virus	Sigla
HQ439023	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
JF939812	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
JF939813	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
JF939814	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
JQ700305	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
KR231942	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
LC082306	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
LC217993	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
MG780352	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
X76931	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
KX122023	<i>Luffa aphid-borne yellows virus</i>	LABYV
KR476808	<i>Luffa aphid-borne yellows virus</i>	LABYV
KU291107	<i>Maize yellow mosaic virus</i>	MYMV
KC921392	<i>Maize yellow dwarf virus</i>	MYDV
KT992824	<i>Maize yellow dwarf virus</i>	MYDV
MF974579	<i>Maize yellow dwarf virus</i>	MYDV
KU179221	<i>Maize yellow mosaic virus</i>	MYMV
EU000534	<i>Melon aphid-borne yellows virus</i>	MABYV
JQ700307	<i>Melon aphid-borne yellows virus</i>	MABYV
NC_003629	<i>Pea enation mosaic virus</i>	PEMV
KU315177	<i>Pepo aphid-borne yellows virus</i>	PABYV
AB594828	<i>Pepper vein yellows virus</i>	PeVYV
KP326573	<i>Pepper vein yellows virus</i>	PeVYV
KU999109	<i>Pepper vein yellows virus</i>	PeVYV
HM439608	<i>Pepper yellow leaf curl virus</i>	PYLCV
LT559483	<i>Pepper yellows virus</i>	PYV
KT962999	<i>Phasey bean mild yellows virus²</i>	
AF453388	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
AF453389	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
AY138970	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
JQ346189	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
JQ346190	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
KC456052	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
KP090166	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
KU586454	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
KX073467	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
KX712226	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
KY856831	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
KM233705	<i>Strawberry polerovirus 1</i>	SPV1
KM233706	<i>Strawberry polerovirus 1</i>	SPV1
NACCXXX	<i>Strawberry polerovirus 1</i>	SPV1

Tabla 2.4. Secuencias de polerovirus y enamovirus utilizadas en la elaboración del árbol filogenético - continuación

Nº Acceso¹	Virus	Sigla
JQ700308	<i>Suakwa aphid-borne yellows virus</i>	SABYV
AF157029	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
AJ249447	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
AY236971	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
GU190159	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
GU327735	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
HQ342888	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
JF925152	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
KF477092	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
KF477093	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
KF680098	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
KT960995	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
KY052165	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
KY052166	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
EF529624	<i>Tobacco vein distorting virus</i>	TVDV
KY038943	Tobacco virus 2	TV2
JQ862472	<i>Turnip yellows virus</i>	TuYV
KR706247	<i>Turnip yellows virus</i>	TuYV
KY605226	Wheat leaf yellowing-associated virus	WLYaV
FM865413	Wheat yellow dwarf virus ²	

¹ Número de acceso de la base de datos del *GenBank*.

² Virus a los que no fueron asignadas siglas hasta el momento.

RESULTADOS

Identificación molecular de Strawberry polerovirus 1

A partir de la NGS usando el secuenciador Genómico 454 FLX+ de Roche, se obtuvieron dos *contigs* pertenecientes a un polerovirus. El primer *contig* de 1202 nt (acceso KR094960), contenía un marco abierto de lectura de 624 nt que coincidió en un 99% de identidad con el gen que codifica para la CP de las secuencias de SPV1 de Canadá, disponibles en la base de datos del *GenBank*. El segundo *contig* de 847 nt mostró ser un fragmento del gen dependiente de la polimerasa, con una identidad del 98% con las dos secuencias de SPV1 disponibles en la base de datos del *GenBank* (accesos KM233706 y KM233705).

Los tres pares de cebadores específicos diseñados amplificaron los fragmentos de tamaños esperados (324pb, 897pb y 1030pb, Fig. 2.1). Los fragmentos clonados y secuenciados mostraron entre un 98 y 99% de identidad con las secuencias de SPV1 publicadas en la base de datos del *GenBank* (accesos KM233706 y KM233705). De las 51 plantas analizadas por RT-PCR, 15 amplificaron el fragmento correspondiente a SPV1.

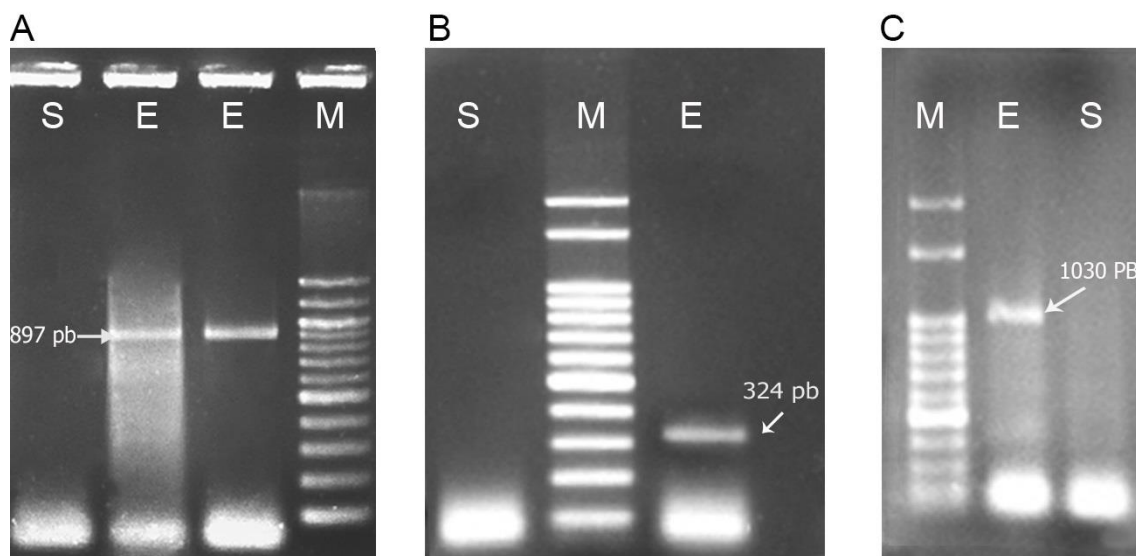


Fig. 2.1. Corrida de electroforesis de producto de PCR en gel de agarosa 2%. PCR con cebadores específicos. (A) Polero40Fw/Polero760Rv, (B) Polero47Fw/Polero2Rv y (C) Polero2Fw/Polero40Rv. (S) Planta de *Fragaria vesca* utilizada como control sano; (M) marcador de peso molecular de 100 pb (*Embiotec*); (E) Planta de frutilla infectada con Strawberry polerovirus 1, mostrando amplificación de fragmento del tamaño esperado.

Injerto a plantas indicadoras

A los 20 días de realizados los injertos, las tres plantas amplificaron el fragmento de tamaño esperado para SPV1 mediante RT-PCR. También se observó amplificación a los 30, 70 y 90 días. Además, se comprobó la transmisión de los otros virus que estaban presentes: SMoV en la planta 1; SMYEV y SMoV en la planta 2 y SMYEV, SMoV y SCV en la planta 3.

Las plantas injertadas mostraron síntomas de virus a los 12 días. Se observaron hojas jóvenes con folíolos deformados y disminución de tamaño en la planta 1, necrosis nerval en la

planta 2 y una disminución de tamaño de las hojas jóvenes, pero sin deformaciones, en la planta 3 (Fig. 2.2).



Fig. 2.2. Plantas de *Fragaria vesca* var. *semperflorens* “Alpina” después de 12 días de realizados los injertos de folíolos de frutillas que presentaban infecciones virales mixtas. 1, Planta 1 con SMoV/SPV1; 2, Planta 2 con SMYEV/SMoV/SPV1; 3, Planta 3 con SMYEV/SMoV/SCV/SPV1.

Al día 20 se observó deformación en los folíolos de la hoja más joven en la planta 1, necrosis internerval, en la planta 2 y clorosis nerval en la planta 3 (Fig. 2.3).



Fig. 2.3. Plantas de *Fragaria vesca* var. *semperflorens* “Alpina” después de 20 días de realizados los injertos de folíolos de frutillas que presentaban infecciones virales mixtas. 1, Planta 1 con SMoV/SPV1; 2, Planta 2 con SMYEV/SMoV/SPV1; 3, Planta 3 con SMYEV/SMoV/SCV/SPV1.

A los 60 días, no se observaron síntomas de virus en la planta 1. Se detectaron hojas deformadas y con un severo moteado clorótico en la planta 2 y enanismo y clorosis en la planta 3 (Fig. 2.4).



Fig. 2.4. Plantas de *Fragaria vesca* var. *semperflorens* “Alpina” después de 60 días de realizados los injertos de folíolos de frutillas que presentaban infecciones virales mixtas. 1, Planta 1 con SMoV/SPV1; 2, Planta 2 con SMYEV/SMoV/SPV1; 3, Planta 3 con SMYEV/SMoV/SCV/SPV1.

A los 90 días, las plantas 1 y 2 no manifestaron síntomas de virus. Se observó un marcado enanismo, clorosis y deformación de folíolos en la planta 3 (Fig. 2.5).



Fig. 2.5. Plantas de *Fragaria vesca* var. *semperflorens* “Alpina” después de 90 días de realizados los injertos con folíolos de frutillas que presentaban infecciones virales mixtas. 1, Planta 1 con SMoV/SPV1; 2, Planta 2 con SMYEV/SMoV/SPV1; 3, Planta 3 con SMYEV/SMoV/SCV/SPV1.

Obtención de la secuencia genómica completa del virus y análisis filogenético

La NGS mediante Illumina Hi Seq 1500 generó un total de 17,2 millones de lecturas con una longitud promedio de 100 nt, de las cuales 504 fueron utilizadas para el ensamblado de la secuencia de SPV1 y formaron tres *contigs*: *contig1* (1249 nt), *contig2* (1504 nt) y *contig3* (3080 nt). Los *contigs* 1, 2 y 3 se alinearon con la secuencia de referencia de SPV1 en la posición 18 a 1267; 1285 a 1789 y 2882 a 5962 respectivamente. La porción genómica no secuenciada (*gap*) entre el *contig* 1 y 2 fue de 19 nt; y el *gap* entre el *contig* 2 y 3 fue de 90 nt. Ambos *gaps* se ubicaron en la región del gen que codifica para la polimerasa del virus. Los cebadores específicos *GapFw/GapRv* amplificaron el fragmento de tamaño esperado de 527 nt uniendo los *contig* 1 y 2. Los cebadores *Polero2Fw/Polero40Rv* amplificaron un fragmento que cerró el *gap* entre los *contigs* 2 y 3 (Fig. 2.6).

La rápida amplificación de los extremos 5' y 3' (*RACE*) realizado a la planta 15CA y al injerto con ARN obtenido por extracción CTAB modificado y con el *kit* de extracción (Zymo), utilizando los cebadores específicos diseñados y cebadores universales no amplificaron los fragmentos de tamaño esperado.

El clonado y secuenciación por Sanger de los fragmentos obtenidos, cerraron los espacios entre los *contigs* y dieron como resultado una secuencia de 5944 nt y se la denominó NACCXXX-SPV1 (ARG). A través de la herramienta *ORF Finder* se determinaron 6 marcos abiertos de lectura: ORF0, ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 y ORF5, cuya organización es característica a la organización de los polerovirus (Fig. 2.6).

La comparación *BLAST* de la secuencia obtenida mostró un 97% de identidad con las secuencias de SPV1 publicadas en la base de datos del *GenBank*. La identidad de nt y aminoácidos (aa) de cada ORF realizada con el programa SDT, mostró valores entre 96,5 (ORF0) y 99.8% (ORF3 y ORF4) para nt y entre 96,9 (ORF0) y 100% (ORF3) para aa (Tabla 2.5).

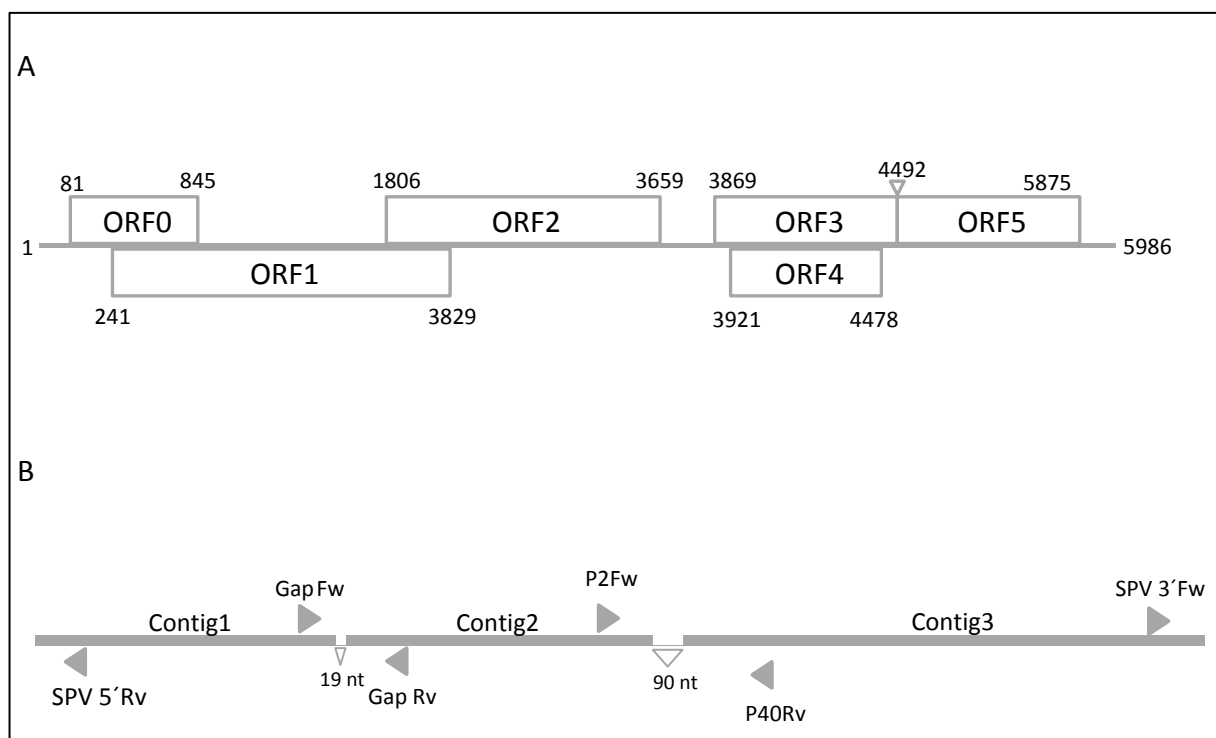


Fig. 2.6. Esquema representativo del genoma de Strawberry polerovirus 1. (A) organización de los marcos abiertos de lectura (ORF). (B) *Contigs* obtenidos a través de secuenciación de nueva generación y cebadores diseñados para completar la secuencia.

Tabla 2.5. Porcentaje de identidad de nt y aa de los diferentes marcos abiertos de lectura de la secuencia NACCXXX-SPV1 (ARG) obtenida

Secuencia	ORF											
	0		1+2		1		3+5		3		4	
	Ident (%)	Ident (%)	Ident (%)	Ident (%)	Ident (%)	Ident (%)	Ident (%)	Ident (%)	Ident (%)	Ident (%)	Ident (%)	Ident (%)
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
KM233705 (CAN)	97,3	97	98,4	99	98,6	99	96,8	99	99,8	100	99,8	99,5
KM233706 (CAN)	96,5	97	98,3	99	98,4	99	96,8	99	99,8	100	99,8	99,5

CAN, Canadá

Un árbol filogenético fue generado con las 99 secuencias de 30 polerovirus publicados. Se detectaron dos *clusters*, entre los virus del género polerovirus. El *cluster* I, se dividió en los *subclusters* IA y IB. Phasey bean mild yellow virus, BYV, CABYV, MABYV, BWYV,

TuYV, Cowpea polerovirus, BMYV, CpCSV, CLRDV, BChV, PLRV, TV2, WYDV, SABYV, CYDV, PeVYV, AeYV, TVDV CtRLV y PYLCV formaron parte del *subcluster* IA, mientras que MYDV, MYMV BVG, WLYaV y ScYLV conformaron el *subcluster* IB. Las secuencias de SPV1 se diferenciaron de todos los polerovirus analizados con un valor de *bootstrap* de 100% formando un nuevo *cluster* (II). Las secuencias de KM233705-SPV1 (CAN) y KM233706-SPV1 (CAN) se diferenciaron de NACCXXX (ARG) con valor de *bootstrap* de 100% (Fig. 2.7).

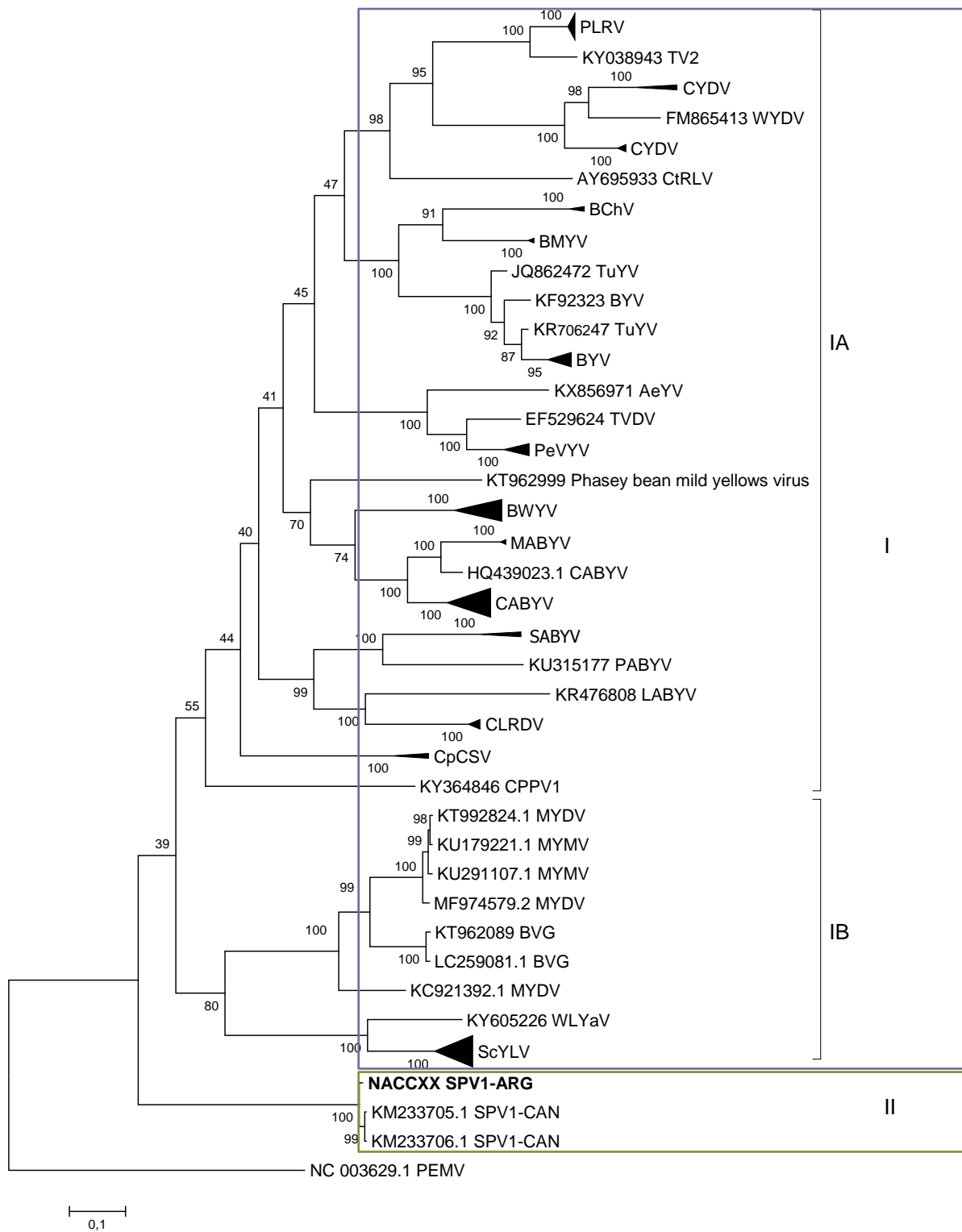


Fig. 2.7. Árbol filogenético resultante del alineamiento de 98 secuencias de 30 polerovirus usando el método *Maximum Likelihood* ajustado al modelo GTR.

DISCUSIÓN

Las enfermedades virales en frutilla juegan un rol importante en el sistema productivo causando amarillamiento, enanismo, deformaciones, manchas cloróticas y pérdidas en el rendimiento que llegan hasta un 80% en infecciones mixtas y hasta un 36% en infecciones simples asintomáticas (Converse, 1987; Mass, 1998; Torrico *et al.*, 2017). Hasta el momento de realización de esta tesis se desconocía la presencia de SPV1 en los cultivos de frutilla de Argentina. La secuenciación genómica mediante 454 FLX de Roche proporcionó secuencias que corresponden al gen que codifica para la CP del virus, y a un fragmento del gen dependiente de la ARN polimerasa, que permitieron confirmar la presencia de SPV1 por comparación con las secuencias publicadas previamente de este virus (Xiang *et al.*, 2015). Los cebadores específicos diseñados en esta tesis posibilitaron amplificar mediante RT-PCR, fragmentos correspondientes a la secuencia genómica de SPV1 permitiendo así su diagnóstico.

SPV1, junto con SMYEV, SMoV y SCV, fue transmitido por injerto a plantas *Fragaria vesca* var. *Semperflorens Alpina*, las que manifestaron síntomas de virus 12 días después de haber sido injertadas. En la planta 1 se transmitieron SPV1 y SMoV, y los síntomas desaparecieron a los 60 días. SPV1, SMYEV y SMoV se transmitieron a la planta 2 produciendo marcados síntomas de moteado clorótico, y deformación de folíolos, los que desaparecieron a los 90 días. En la planta 3 se transmitieron SPV1, SMYEV, SCV y SMoV, con síntomas severos y permanentes en la planta. Con frecuencia ha sido mencionado que la presencia de un virus en cultivares de frutillas comerciales no produce síntomas (Converse, 1987; Mass, 1998; Martin y Tzanetakis, 2006; Conci *et al.*, 2017), sin embargo en las plantas indicadoras, sobretudo en Alpina, los virus manifiestan síntomas. En esta tesis, en la planta 1 pudo observarse la presencia de SPV1 y SMoV. Si bien la planta manifestó síntomas los primeros días, estos desaparecieron con el tiempo volviéndose asintomática. Este fenómeno nunca había sido reportando, constituyendo una novedad en el diagnóstico y en el comportamiento de los virus de frutilla. En el caso de la planta 2, en la cual se detectó a SPV1 formando una infección mixta con SMYEV y SMoV. Es conocido que tanto SMYEV como SMoV producen síntomas de diferente grado de intensidad en *F. vesca* var. *Semperflorens*

“Alpina” (Converse, 1987), sin embargo, los síntomas en la planta 2 también desaparecieron con el tiempo. En la planta 3 se detectó infección mixta con cuatro virus, incluida la presencia de SCV. En este caso los síntomas no desaparecieron y fueron muy severos. Las infecciones mixtas pueden causar pérdidas significativas en el rendimiento (Converse, 1987; Martin y Tzanetakis, 2006), pero poco se sabe sobre la conducta de los síntomas en presencia de uno, dos, tres o cuatro virus. Algunas interacciones entre virus han sido estudiadas, como es el caso de SVBV, donde la infección mixta SVBV+SCV podía causar mayores pérdidas que SVBV+SMoV o SVBV+SMYEV (Martin y Tzanetakis, 2006). Esto no es extraño ya que SCV ha sido citado como el virus más dañino que afecta a frutilla (Converse, 1987), sin embargo, es necesario indagar sobre el comportamiento que producen las infecciones mixtas de SPV, SMYEV, SMoV y SCV, en diferentes combinaciones y su efecto en la severidad y niveles de daño, para determinar si existe una combinación de virus que sea la responsable de la agresividad, o si existe un virus determinante para que esto ocurra.

Estos resultados sugieren mayores estudios acerca del rol que cumple SPV1 en la modificación de expresión de los síntomas, la influencia de las infecciones múltiples en la manifestación de síntomas y sus efectos en el rendimiento de los cultivares comerciales.

Respecto a la obtención de la secuencia completa de un aislamiento argentino de SPV1, se obtuvo la secuencia NACXXX de 5944 nt, que corresponde al 99,5% de la secuencia completa, la cual contiene los 6 ORFs característicos de los polerovirus. El análisis en la similitud de nt y aa para cada ORF con las dos únicas secuencias completas de SPV1 disponibles en el *GenBank* mostró que el ORF0 fue el más variable tanto en nt como en aa. Éste codifica para la proteína P0, la cual para el caso de *Potato leaf roll virus* se encuentra involucrada en la especificidad del rango de hospedantes (Mayo *et al.*, 1989; Veidt *et al.*, 1992) y en la expresión de síntomas (Van der Wilk *et al.*, 1997). En algunos polerovirus como BWYV, CABYV, PLRV y MYMV, la P0 muestra una fuerte actividad supresora de silenciamiento viral expresado en hojas de *Nicotiana benthamiana* (Pfeffer *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2016). Determinar el efecto en la variabilidad de este gen podría ser interesante para evaluar posibles razas virales más severas del virus.

En el árbol filogenético elaborado se observan claramente dos *clusters*. El *cluster* I se divide en el *subcluster* IA que contiene a 23 polerovirus, y en el *subcluster* IIB, donde se encuentran 5 polerovirus que afectan a maíz, trigo, cebada y caña de azúcar. Esta organización filogenética también fue observada por Huang *et al.* (2005), donde analizaron la filogenia de *Carrot read leaf virus* (CtRLV), utilizando las secuencias de referencia de 16 virus de la familia *Luteoviridae*. Krueger *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares al estudiar la filogenia de *Barley yellows dwarf virus*-RMV, elaborando un árbol filogenético junto con 22 secuencias de referencia de miembros de la familia *Luteoviridae*. En el *cluster* II, diferenciadas del resto de las secuencias de polerovirus, se encuentran las secuencias de SPV1. Si bien SPV1 ha sido mencionado en frutilla por otros autores (Xiang *et al.*, 2015; Thekke-Veetil y Tzanetakis, 2016), es la primera vez que se construye un árbol filogenético con 5944 nt pertenecientes a la secuencia de SPV1. La posición de SPV1 formando un nuevo *cluster* dentro del género polerovirus es novedoso, ya que en análisis previos realizados de otras 29 secuencias de la familia *Luteoviridae*, los árboles filogenéticos elaborados posicionan a SPV1 junto con *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) cuando se analiza la ARN Polimerasa, y con CtRLV cuando es analizada la CP (Xiang *et al.*, 2015). La secuencia NACCXXX (ARG) muestra ser significativamente diferente de las secuencias de las únicas dos secuencias de SPV1 de Xiang *et al.* (2015). Resultados similares se obtuvieron para otro polerovirus, donde el árbol filogenético construido con 12 secuencias completas de PLRV, mostró divergencias según el origen geográfico de los aislamientos (Guyader y Ducray, 2002). Serían necesarios mayores estudios sobre la evolución filogenética de SPV1 y su relación con la procedencia de los aislamientos.

CAPÍTULO 3

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE Strawberry polerovirus 1

INTRODUCCIÓN

La caracterización molecular es actualmente la herramienta más usada para clasificar especies virales. Conocer las secuencias genómicas permite diferenciar especies y razas o variantes de una especie viral. La variación genética de los virus es debida a mutaciones (inserción o delección de bases, recombinación entre regiones genómicas etc.) que se producen durante la replicación (García-Arenal, 2008). La CP de muchos virus de plantas a menudo cumplen varias funciones, y se encuentra involucrada en una variedad de interacciones además de la formación de partículas de virus, que incluye la replicación, el movimiento de virus entre las células, las interacciones con vectores y con la planta huésped, dando lugar a la susceptibilidad o resistencia (Callaway *et al.*, 2001). En los polerovirus el gen de la CP contiene al gen que codifica para la proteína involucrada en las funciones de movimiento del virus, por lo tanto las mutaciones que ocurran a este nivel, podrían influir en las propiedades de movimiento, ya sea sistémico o célula-célula. El gen de la CP es altamente conservado en los polerovirus (Huser *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2016), y es comúnmente utilizado para establecer grados de parentesco o identidad entre los virus.

SPV1 fue reportado en Canadá y Estados Unidos (Xiang *et al.*, 2015; Thekke-Veetil y Tzanetakis, 2016), y este trabajo de tesis reveló la presencia del virus en Argentina (Luciani *et al.*, 2016) pero se desconocía si existían posibles variantes del virus y su relación con la procedencia geográfica de las plantas, regiones productoras y cultivares. Es por esta razón, que este capítulo tiene como objetivo detectar y analizar la variabilidad específica e intraespecífica del SPV1 y su filogenia.

MATREIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se tomaron hojas de plantas de frutilla en lotes productivos de Lules (Tucumán) y Coronda (Santa Fe) entre los años 2011 y 2014. Los cultivares utilizados fueron Camarosa, San Andreas y Festival, los cuales tienen origen en California (Estados Unidos) y Florida (Estados Unidos). Se utilizaron plantas de *Fragaria virginiana* Clon UC-12 multiplicadas en condiciones controladas y pertenecientes al stock de plantas indicadoras de virus de frutilla del IPAVE-INTA como testigo sano.

Amplificación de la CP

En base a las secuencias disponibles se diseñaron cebadores específicos: Polero CPFw (TGATGATGATATAGATAGAT) y Polero CP2Rv (ATGCATCGATGCTAGCTATTC-GATACT) que amplifican 803 nt (sin tener en cuenta a los cebadores), en la región que contiene al gen que codifica para la CP de SPV1.

Se extrajeron los ácidos nucleicos totales de las hojas de cada planta usando el método de CTAB (Chang *et al.*, 2007) con modificaciones (Anexo I). Se generaron ADNc por transcripción reversa utilizando hexámeros aleatorios transcriptasa reversa MMLV *High Performance Reverse Transcriptase* (Epicentre) siguiendo instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una PCR, usando 2 µl de buffer 5x, 0,5 µl de dNTP 10 µM, 1 µl de cada cebador específico y 1 U de enzima Taq Polimerasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.) agua DEPC suficiente para completar un volumen final de reacción de 20 µl. Las condiciones térmicas de ciclado consistieron en un paso de desnaturalización a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 52 °C por 40 s y 72 °C por 1,5 min. El ciclado concluyó con un paso de extensión final a 72 °C por 5 min.

Clonado y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos de diferentes plantas fueron ligados al vector de clonado pGEM-T mediante el *kit* de clonado *pGEM Easy vector Systems*. A continuación, células de *Escherichia coli* DH5[∞] se transformaron mediante este vector de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega Madison, WI, EE.UU.) y se cultivaron en placas de Petri en medio LB (Sigma) con agar (Anexo II), ampicilina (100mg/ml, Sigma), X-Gal (1mM, Promega) e IPTG (50mg/ml, Promega). Las bacterias transformadas seleccionadas fueron repicadas y probadas por PCR con los cebadores específicos Polero CPFw/Polero CP2Rv. Las transformantes positivas fueron cultivadas durante la noche en medio LB con ampicilina (Anexo II) y los plásmidos se purificaron usando *ZR Plasmid Miniprep Classic* (Zymo, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los clones fueron secuenciados en ambas direcciones por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) usando cebadores universales M13 forward y M13/pUC reverse.

Análisis de secuencias

Las secuencias de los distintos clones de SPV1 fueron analizadas y procesadas con los programas *Editseq*, *Seqman* del paquete *DNAStar* (lasergene 8.0 versión 5) y *MEGA7* y subidas a la base de datos del *GenBank*. En cada secuencia se estableció el marco abierto de lectura correspondiente a la CP del virus con la herramienta *ORF Finder* (NCBI). Todas las secuencias de la CP de SPV1 obtenidas en esta tesis y las publicadas en la base de datos del *GenBank* provenientes de Xiang *et al.* (2015), fueron alineadas por el método Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Se calcularon los porcentajes de identidad de secuencias de nt y aa usando el programa SDT.

Por otra parte, 52 secuencias de nt y aa del gen que codifica para la CP de 24 polerovirus (Tabla 3.1), y un enamovirus (*Pea enation mosaic virus*) utilizado como extragrupo, fueron alineadas por el método Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). En base a los

alineamientos, se construyeron árboles filogenéticos usando el método de *Maximum Likelihood* (Nei y Tajima, 1983) ajustando el modelo Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969) para nt y JTT (Jones *et al.*, 1994) para aa, con *bootstrap* de 1000 réplicas utilizando el programa MEGA7. También se determinó el número de sitios polimórficos, sitios de parsimonia, sitios monomórficos y regiones conservadas con el programa DnaSP v5.

Tabla 3.1. Secuencias de polerovirus utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos

Nombre	Nº Acceso	Virus	Sigla
KX856971AeYV	KX856971	African eggplant yellows virus	AeYV
NC029906BVG	NC029906	Barley virus G	BVG
NC002766BChV	NC002766	<i>Beet chlorosis virus</i>	BChV
AB903034BWYV	AB903034	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
HQ388350BYV	HQ388350	Beet yellows virus	BYV
KF015269BYV	KF015269	Beet yellows virus	BYV
KM076647BYV	KM076647	Beet yellows virus	BYV
GQ221223CABYV	GQ221223	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
GQ221224CABYV	GQ221224	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
JF939813CABYV	JF939813	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
KR231948CABYV	KR231948	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
KR231949CABYV	KR231949	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
KR231950CABYV	KR231950	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
LC082306CABYV	LC082306	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
LC217994CABYV	LC217994	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
X76931CABYV	X76931	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
GU167940CLR DV	GU167940	<i>Cotton leafroll dwarf virus</i>	CLR DV
KY364846CPPV2	KY364846	Cowpea polerovirus 2	CPPV2
KY364847CPPV2	KY364847	Cowpea polerovirus 2	CPPV2
AY956384CpCSV	AY956384	<i>Cowpea chlorotic stunt virus</i>	CpCSV
AY695933CtLRV	AY695933	<i>Carrot read leaf virus</i>	CtLRV

Tabla 3.1. Secuencias de polerovirus utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos - continuación

Nombre	N° Acceso	Virus	Sigla
EF521827CYDV	EF521827	<i>Cereal yellows dwarf virus</i>	CYDV
KY553235CYDV	KY553235	<i>Cereal yellows dwarf virus</i>	CYDV
KY623680CYDV	KY623680	<i>Cereal yellows dwarf virus</i>	CYDV
KR476808*	KR476808	Lufa aphid borne yellows virus	LABYV
EU000534MABYV	EU000534	<i>Melon aphid-borne yellows virus</i>	MABYV
KC921392MYDV	KC921392	<i>Maize yellows dwarf virus</i>	MYDV-RMV
NC029990MYDV	NC029990	<i>Maize yellows dwarf virus</i>	MYDV-RMV2
MF425860MYMV	MF425860	<i>Maize yellow mosaic virus</i>	MYMV
NC003629PEMV	NC003629	Pea enation mosaic virus ¹	PEMV
KU315177PABYV	KU315177	<i>Pepo aphid-borne yellows virus</i>	PABYV
LT559484PeYV	LT559484	<i>Pepper yellows virus</i>	PeYV
NC028793 ¹	NC028793	Phasey bean mild yellows virus ²	
KX073467PLRV	KX073467	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
KX712226PLRV	KX712226	<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV
JF925152ScYLV	JF925152	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
KF680098ScYLV	KF680098	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
KY052166ScYLV	KY052166	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
NC000874ScYLV	NC000874	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	ScYLV
KM233705SPV1	KM233705	Strawberry polerovirus1	SPV1
KM233706SPV1	KM233706	Strawberry polerovirus1	SPV1
KR094960SPV1	KR094960	Strawberry polerovirus1	SPV1
MG838673SPV1	MG838673	Strawberry polerovirus1	SPV1
MG838674SPV1	MG838674	Strawberry polerovirus1	SPV1
MG838675SPV1	MG838675	Strawberry polerovirus1	SPV1
MG838676SPV1	MG838676	Strawberry polerovirus1	SPV1
MG838677SPV1	MG838677	Strawberry polerovirus1	SPV1
MG838678SPV1	MG838678	Strawberry polerovirus1	SPV1

Tabla 3.1. Secuencias de polerovirus utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos - continuación

Nombre	Nº Acceso	Virus	Sigla
NACCXXXSPV1	NACCXXX	Strawberry polerovirus1	SPV1
EF529624TVDV	EF529624	<i>Tobacco vein distorting</i>	TVDV
KY605226WLYaV	KY605226	Wheat leaf yellowing-associated virus	WLYaV
NC035451WLYaV	NC035451	Wheat leaf yellowing-associated virus	WLYaV
NC012931WYDV	NC012931	Wheat yellow dwarf virus	WYDV

1Secuencia de enamovirus utilizada como extragrupo.

2Virus a los que no fueron asignadas siglas hasta el momento.

Análisis de Recombinación

Se realizó un análisis para detectar las probables secuencias recombinantes, identificar posibles secuencias parentales y localizar posibles puntos de recombinación, utilizando el programa RDP4 Beta 4.95, que contiene nueve algoritmos para la detección de recombinantes. El análisis se llevó a cabo considerando una probabilidad $P=0,001$; se seleccionó la opción de secuencia lineal y los parámetros restantes se usaron con la configuración predeterminada.

RESULTADOS

Los cebadores específicos Polero CPFw y Polero CP2Rv, amplificaron el fragmento de tamaño esperado de 803 nt (Fig. 3.1), los cuales contenían al gen de la CP del virus.

Para cada planta, se probaron por amplificación directa entre 12 y 24 colonias de *Escherichia coli* blancas. Se observó amplificación de fragmentos de 803 pb. La pureza ($Abs_{260} \text{ nm}/Abs_{280} \text{ nm}$) del ADN de los plásmidos varió entre 2,14 y 2,25, con concentraciones promedio de 200ng/ μl .

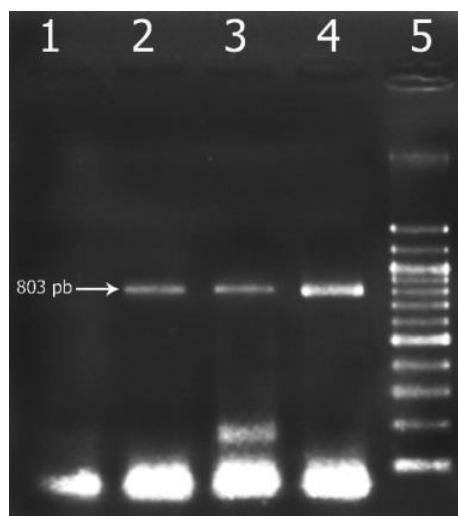


Fig. 3.1. Corrida de electroforesis en gel de agarosa 2% mostrando productos de PCR de 803 nt de diferentes aislamientos de Strawberry polerovirus1. Línea 1, Planta Sana; línea 2-4, Plantas de frutilla infectadas con SPV1; Línea 5, Marcador de peso molecular de 100 a 1200pb.

Ocho aislamientos de SPV1 fueron obtenidos de cinco plantas de frutilla provenientes de lotes productivos de Lules y Coronda, cuyas secuencias fueron publicadas en la base de datos del *GenBank* (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Secuencias del gen de la cubierta proteica de aislamientos de SPV1 obtenidas en esta tesis provenientes de plantas de frutilla de diferentes cultivares y orígenes

Planta	Nº Acceso	Cultivar	Lugar de toma de muestra	Origen
Berra 12	<u>MG838677</u>	Camarosa	Coronda	California
15CA	<u>NACCXXX</u> ¹	Camarosa	Lules	California
197	<u>MG838675</u>	San Andreas	Lules	California
197	<u>MG838673</u>	San Andreas	Lules	California
197	<u>MG838674</u>	San Andreas	Lules	California
9	<u>MG838676</u>	San Andreas	Lules	California
F3	<u>MG838678</u>	Festival	Lules	Florida
Berra 2	<u>KR094960</u>	Camarosa	Coronda	California

¹Secuencia no publicada en la base de datos del *GenBank*

Los fragmentos de SPV1 amplificados contenían un marco abierto de lectura de 624 nt, perteneciente al gen que codifica para la CP del virus, la cual consta de 207 aa. Todas las secuencias analizadas de la CP de SPV1 (de Argentina y Canadá) presentan el codón de inicio ATG y el codón de finalización TAG.

Los porcentajes de identidad de la CP de SPV1 variaron entre 97,8 y 100% para nt (Tabla 3.3) y entre 96 y 100% para aa (Tabla 3.4).

La identidad de la CP de aislamientos de SPV1 provenientes de plantas de frutilla de Coronda y de Lules varió entre 98,1-100% para nt (Tabla 3.3) y entre 97,1-100% para aa (Tabla 3.4). Entre los cultivares provenientes de California la identidad de nt fue entre 99,5-100% (Tabla 3.3), mientras que la identidad de aa fue del 100% para todas las secuencias de la UCA a excepción de la secuencia MG838673, que mostró valores de identidad de 99,5%. (Tabla 3.4).

Las secuencias provenientes de plantas de cultivares de California variaron su identidad con la secuencia de Florida entre 97,8-98,1% en nt (Tabla 3.3) y entre 96,6 -97,1% en aa (Tabla 3.4).

Tabla 3.3. Porcentaje de identidad de nucleótidos del gen de la cubierta proteica de Strawberry polerovirus 1

Secuencia	CALIFORNIA							FLORIDA	CANADÁ	
	Coronda		Lules					Lules		
	Camarosa		Camarosa	San Andreas				Festival		
	KR09460	MG838677	NACCXXX	MG838676	MG838675	MG838673	MG838674	MG838678	KM233705	KM233706
KR09460	100	100	100	99,8	99,8	99,7	100	98,1	99,8	99,8
MG838677		100	100	99,8	99,8	99,7	100	98,1	99,8	99,8
NACCXXX			100	99,8	99,8	99,7	100	98,1	99,8	99,8
MG838676				100	99,7	99,5	99,8	97,9	99,7	99,7
MG838675					100	99,5	99,8	97,9	99,7	99,7
MG838673						100	99,7	97,8	99,5	99,5
MG838674							100	98,1	99,8	99,8
MG838678								100	97,9	97,9
KM233705									100	100
KM233706										100

Tabla 3.4. Porcentaje de identidad de aminoácidos del gen de la cubierta proteica de Strawberry polerovirus 1

Secuencia	CALIFORNIA							FLORIDA	CANADÁ	
	Coronda		Lules					Lules		
	Camarosa		Camarosa	San Andreas				Festival		
	KR09460	MG838677	NACCXXX	MG838676	MG838675	MG838673	MG838674	MG838678	KM233705	KM233706
KR09460	100									
MG838677	100	100								
NACCXXX	100	100	100							
MG838676	100	100	100	100						
MG838675	100	100	100	100	100					
MG838673	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	100				
MG838674	100	100	100	100	100	99,5	100			
MG838678	97,1	97,1	97,1	97,1	97,1	96,6	97,1	100		
KM233705	100	100	100	100	100	99,5	100	97,1	100	
KM233706	100	100	100	100	100	99,5	100	97,1	100	100

En las 10 secuencias de nucleótidos del gen que codifica para la CP de SPV1, no se observaron inserciones ni deleciones. Del total de 624 nt que componen la CP, se encontraron 607 nt invariables (monomórficos) y 17 variables (polimórficos, Tabla 3.5). Se generaron 7 sustituciones de aminoácidos a lo largo de la CP del virus, de las cuales 1 fue de parsimonia (Posición 534, Tabla 3.5). El tipo de cambio en las sustituciones fue conservado para una de ellas y diferente para las 6 restantes (Tabla 3.5). También fue posible observar una región conservada ubicada en la posición 163 a 273 de la CP del virus.

Tabla 3.5. Sustitución de nucleótidos en el gen de la cubierta proteica de Strawberry polerovirus 1

Secuencia	Posición		aa codificado	Sustitución	aa codificado²	Tipo de cambio
	5'→3'	Codón¹				
MG838678	73	TCA	Ser	CCA	Pro	No sinónimo
MG838673	82	GCT	Ala	ACT	Thr	No sinónimo
MG838678	160	AAC	Asn	GGT	Gly	No sinónimo
MG838678	161	AAC	Asn	GGT	Gly	No sinónimo
MG838678	162	AAC	Asn	GGT	Gly	No sinónimo
MG838676	274	TTA	Leu	CTA	Leu	Igual
MG838678	343	AAC	Asn	CAC	His	No sinónimo
MG838673	417	TCA	Ser	TCG	Ser	Igual
MG838675	450	TTT	Phe	TTC	Phe	Igual
MG838678	453	CCC	Pro	CCA	Pro	Igual
MG838678	459	AAG	Lys	AAA	Lys	Igual
MG838678	465	AAC	Asn	AAT	Asn	Igual
MG838678	470	AGG	Arg	AAG	Lys	Sinónimo
MG838678	519	ACC	Thr	ACA	Thr	Igual
MG838678	523	TCA	Ser	GCA	Ala	No sinónimo
KM233705	534 ³	TGT	Cys	TGC	Cys	Igual
KM233706	534 ³	TGT	Cys	TGC	Cys	Igual
MG838678	593	ACC	Thr	ATC	Ile	No sinónimo

Las letras en negrita señalan las bases sustituidas.

1 Codón consenso de todas las secuencias de la CP de SPV1.

2 Codón generado con la sustitución de la/s base.

3 Sitio de parsimonia

Se obtuvieron árboles filogenéticos a partir del alineamiento de nt y aa de la CP de 53 secuencias de 24 polerovirus y un enamovirus utilizado como extra grupo. El árbol filogenético construido a partir del alineamiento de nt, mostró una clara separación de polerovirus y enamovirus. *Luffa aphid borne yellows virus* (LABYV) se separó del resto de los polerovirus analizados, los que formaron dos *clusters* (I y II). El *cluster* I se conformó con las secuencias de 20 polerovirus. El *cluster* II, se separó en los *clusters* IIA y IIB. En el *cluster* IIA se ubicaron las secuencias de ScYLV y WLYaV, mientras que en el *cluster* IIB se ubicaron las secuencias de SPV1. Dentro del *cluster* IIB, la secuencia MG838678 (ARG) (Planta de frutilla originaria de Florida), se separó del resto de las secuencias de SPV1 con un valor de *bootstrap* de 100% (Fig. 3.2). Las secuencias de SPV1 (ARG) provenientes de plantas de frutilla con origen en California se ubicaron en el mismo *cluster* con las secuencias de SPV1 de Canadá. La secuencia MG838673.SPV1 (ARG) mostró mayor distanciamiento de su rama, indicando mayor cantidad de sustituciones por sitio (Fig. 3.3).

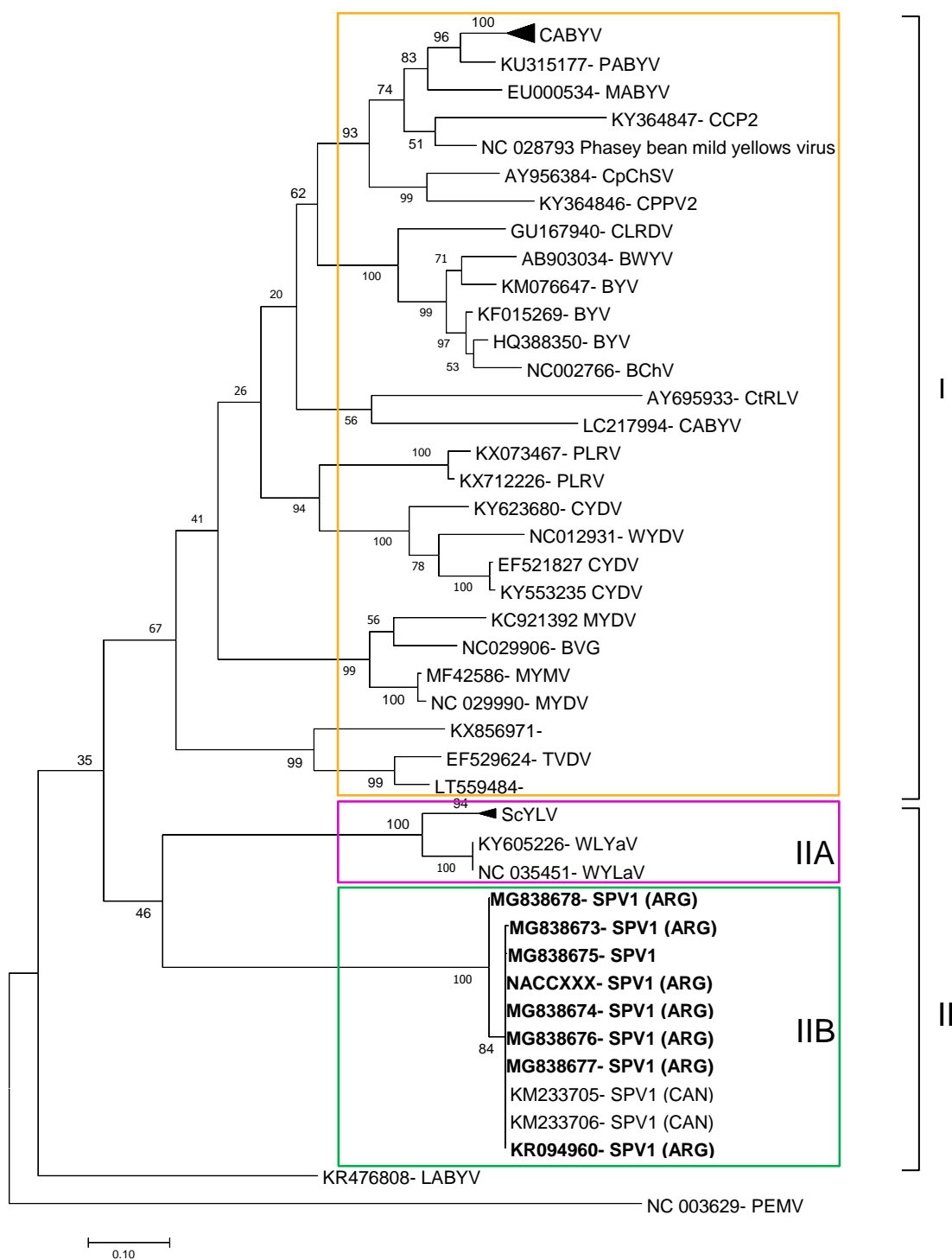


Fig. 3.2. Árbol filogenético construido con secuencias de nucleótidos de la cubierta proteica de 24 virus del género *Ploverovirus*. Método de *Maximum Likelihood* (Nei y Tajima, 1983) ajustado al modelo Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969) con *bootstrap* de 1000 réplicas.

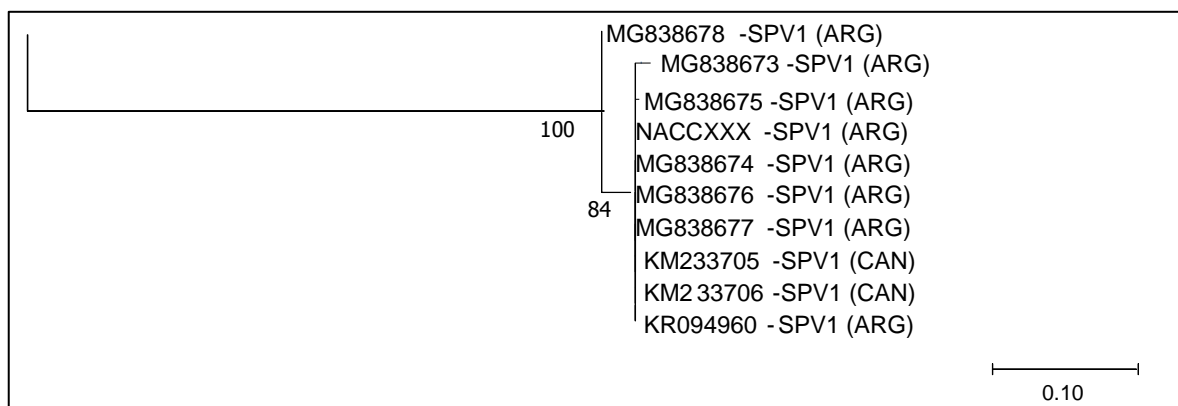


Fig. 3.3. Ampliación del *cluster* IIB (de Strawberry polerovirus 1) proveniente del árbol filogenético construido con secuencias de nucleótidos de la cubierta proteica de polerovirus. Método de *Maximum Likelihood* (Nei y Tajima, 1983) ajustado al modelo Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969) con *bootstrap* de 1000 réplicas.

Cuando el árbol filogenético fue construido en base al alineamiento de la secuencia deducida de aa, *Luffa aphid-borne yellows virus* se separó del resto de los polerovirus analizados, los cuales se dividieron dos *clusters* (I y II). En el *cluster* II se ubicaron las secuencias de ScYLV y WLYaV. El *cluster* I se separó en el *cluster* IA y IB. En el *cluster* IA se ubicaron las secuencias de 20 polerovirus, y en el *cluster* IB las secuencias de SPV1 (Fig. 3.4). En el *cluster* IB, la secuencia MG838678-SPV1 (ARG) (Florida) se separó de resto de las secuencias de SPV1 utilizadas en el análisis con valor de bootstrap de 100% (Fig.3.4). La secuencia MG838673-SPV1 (ARG) mostró una mayor distancia con las secuencias de su *cluster* (Fig. 3.5).

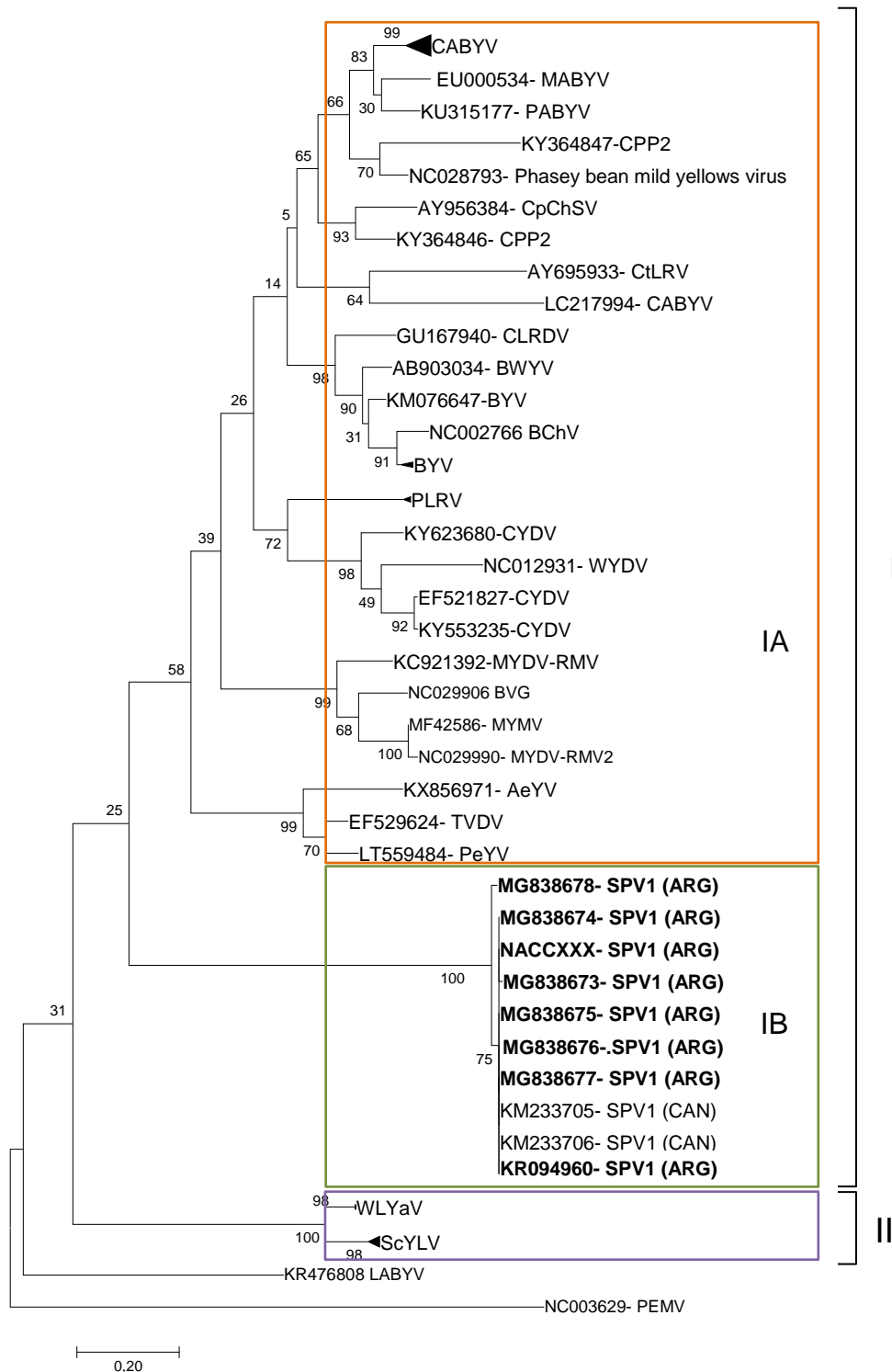


Fig. 3.4. Árbol filogenético construido con 52 secuencias de aa del gen de la cubierta proteica de 24 polerovirus y un enamovirus (extragrupo). Método de *Maximum Likelihood* (Nei y Tajima, 1983) ajustado al modelo JTT (Jones *et al.*, 1994) con *bootstrap* de 1000 réplicas.

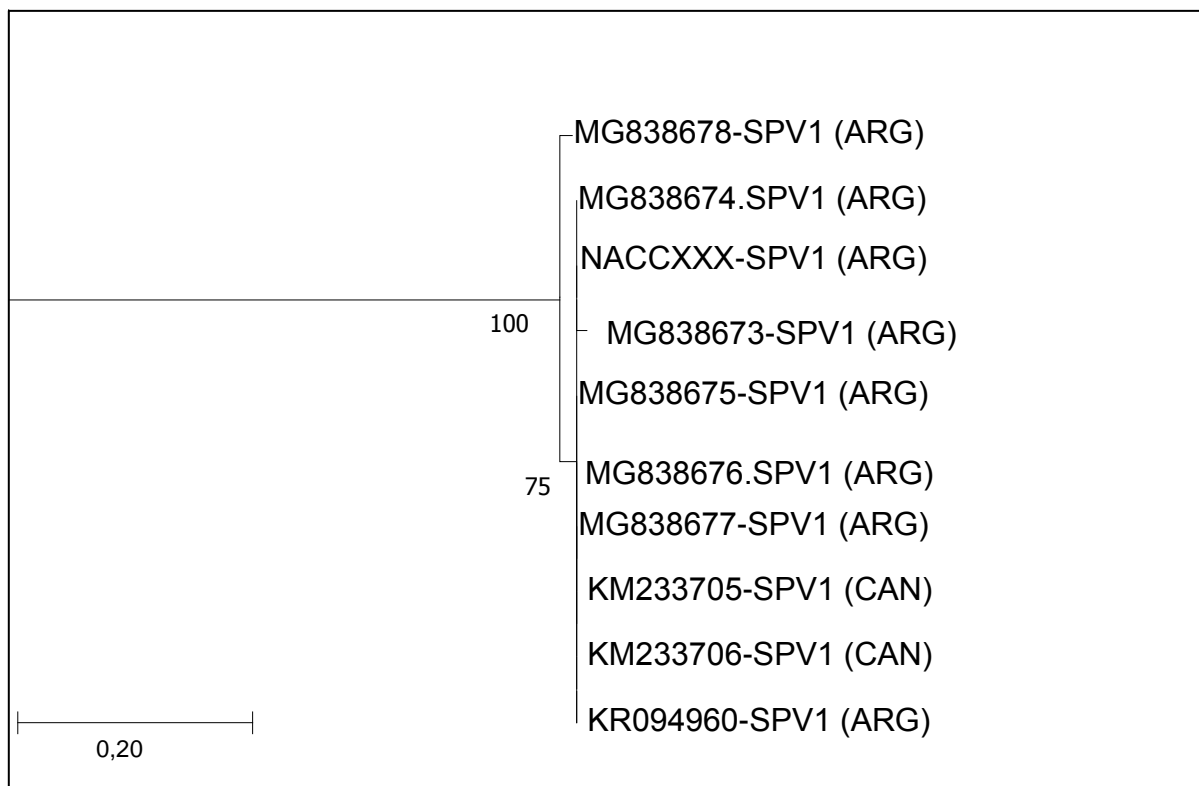


Fig. 3.5. Ampliación del *cluster* IB (de SPV1) proveniente del árbol filogenético construido con secuencias de aminoácidos de la cubierta proteica de polerovirus. Método de *Maximum Likelihood* (Nei y Tajima, 1983) ajustado al modelo JTT (Jones *et al.*, 1994) con *bootstrap* de 1000 réplicas.

El análisis realizado con el programa RDP4 Beta 4.95 para detectar las probables secuencias recombinantes, utilizando el alineamiento de las 52 secuencias de la CP de 24 polerovirus, no mostró sitios de recombinación significativa ($P= 0,001$) en las secuencias de SPV1.

DISCUSIÓN

Debido a la alta variabilidad de las plantas obtenidas por semilla, la planta de frutilla es multiplicada agámicamente para mantener las propiedades del cultivar. Por este motivo es que las enfermedades sistémicas, como es el caso de las virosis, son un aspecto relevante. Los resultados muestran que SPV1 se encuentra presente en plantas de frutilla de diferentes cultivares, provenientes de distintos programas de mejoramiento obtenidos en otros países, multiplicados y cultivados en diferentes regiones de Argentina.

Con el propósito de detectar la variabilidad existente en SPV1, se clonó y secuenció el gen que codifica para la CP y se comparó con las demás secuencias conocidas de SPV1 publicadas en Canadá.

La CP de muchos virus de plantas a menudo cumplen varias funciones y se encuentra involucrada en una variedad de interacciones que incluyen la replicación, movimiento, interacciones con vectores y con la planta huésped (Callaway *et al.*, 2001). En este sentido, las mutaciones que ocurren en el gen de la CP del virus pueden cambiar las características del virus. Tal es el caso del potyvirus *Tobacco vein mottling virus*, donde las mutaciones producidas en la CP causaron la pérdida de transmisibilidad por parte de los insectos (Atreya *et al.*, 1991).

Hasta el momento de realización de esta tesis se desconocía si existía variabilidad en diferentes aislamientos de SPV1. Los cebadores específicos diseñados, permitieron amplificar exitosamente un fragmento genómico que contenía el gen que codifica para la CP de SPV1. Fue posible clonar y secuenciar los fragmentos amplificados y se obtuvieron 8 secuencias parciales del genoma del SPV1 que fueron publicadas en *GenBank*.

Tres de las secuencias (MG838675, MG838673 y MG838674) se encontraron en una misma planta. Esto sugiere la presencia de infecciones mixtas de posibles variantes del virus. Un resultado similar ocurrió con SMYEV en el que hubo infecciones de diferentes variantes

del virus en una misma planta de frutilla (Torrico *et al.*, 2016). Es posible que los vectores puedan haber transmitido las diferentes variantes del virus, pero también, probablemente el virus haya sufrido modificaciones naturales a través del tiempo (mutaciones, recombinación, etc.). Esto es factible sobre todo en especies como frutilla, donde la propagación se hace de forma vegetativa para mantener las características del cultivar, en donde los virus pueden estar hospedados en la planta y pasar a las plantas hijas de forma sucesiva.

Se compararon los porcentajes de identidad de las 10 secuencias de la CP de SPV1 (8 obtenidas en esta tesis y 2 de Canadá obtenidas por Xiang *et al.* en 2015). No se observaron diferencias entre los aislamientos de Lules y de Coronda ni entre las variedades provenientes de California. Sin embargo, cuando se analizó el porcentaje de identidad entre las secuencias cuyas plantas madres provenían de diferentes orígenes, se observó una marcada diferencia tanto en la identidad de nt como de aa entre las secuencias de California y Florida. Si bien no se observaron inserciones ni deleciones, se detectaron sitios polimórficos que en su mayoría generaron sustituciones de aa del tipo no sinónimo. La secuencia MG838678 fue la que más polimorfismo presentó, con 8 sustituciones de aminoácidos, de las cuales 7 fueron sustituciones no sinónimas y que posiblemente puedan haber dado lugar a alteraciones en la estructura de la CP. El estudio de estas alteraciones son de gran interés, ya que podrían estar relacionadas con la capacidad de infección y transmisión del virus, al empaquetamiento de las partículas y a la acumulación del virus dentro de la planta (Brault *et al.*, 2003).

No se encontraron sitios recombinantes en la región de la CP, probablemente por ser una región de alto grado de conservación debido a la función que cumple la proteína, (Brault *et al.*, 2003; Huser *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2016).

Cuando se construyó el árbol filogenético en base al alineamiento de nt de la CP de los polerovirus, los aislamientos de SPV1 se ubicaron en el *cluster* II, junto con ScYLV y WLYaV, mientras que el árbol filogenético construido en base al alineamiento de aa, ubica a las secuencias de SPV1 en el *cluster* IB. Ambos árboles, mostraron que MG838678-SPV1 (ARG) se diferenció del resto de las secuencias SPV1 con *bootstrap* de 100% , y MG838675-

SPV1 (ARG) presentó una mayor distancia con las secuencias de su *cluster*, indicando un mayor número de sustituciones por sitio. Xiang *et al.* (2015) no encontraron los mismos resultados cuando analizaron las CP de 29 miembros de la familia *Luteoviridae*, cuyo árbol filogenético separa la secuencia de SPV1 y *Carrot red leaf virus* del resto de las secuencias de polerovirus. Esta diferencia de resultados puede deberse al conocimiento de 8 nuevas secuencias de SPV1. La diferenciación entre las secuencias de SPV1 estuvieron asociadas al área geográfica de origen, ya que las secuencias obtenidas a partir de cultivares comerciales de frutilla de California, se separaron del cultivar con origen en Florida (MG838678-SPV1). Diferencias filogenéticas asociadas al origen geográfico también han sido detectadas en otros polerovirus (Guyader y Ducray, 2002). Sin embargo para confirmar esto, en el caso de SPV1, es necesario obtener mayor número de secuencias de cada origen. En base a los análisis realizados en el gen de la CP de 10 aislamientos de SPV1 se observó variabilidad. Son necesarios mayores estudios para detectar el surgimiento de nuevas variantes de SPV1.

CAPÍTULO 4

EVALUACIÓN DE ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS QUE CONTRIBUYEN A DETERMINAR LA IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN DEL SPV1 EN ZONAS PRODUCTORAS DE FRUTILLA EN RELACIÓN A OTROS VIRUS PRESENTES EN ARGENTINA

INTRODUCCIÓN

En Argentina el 70% de la producción de frutilla se concentra principalmente en tres regiones: Lules (Tucumán), Coronda (Santa Fe) y Mar del Plata (Buenos Aires). Los altos costos de producción hacen de la frutilla uno de los cultivos más caros. Debido a ello, es fundamental conocer la importancia de los agentes causales de daño, para implementar prácticas de manejo que puedan disminuir los riesgos que afectan su rentabilidad.

Mundialmente, los virus son uno de los patógenos más importantes, responsables de la pérdida de rendimiento y calidad de la fruta. Esta es la razón por la cual las plantas libres de virus son absolutamente necesarias para obtener una producción de fruta aceptable. En Argentina se han detectado cuatro virus transmitidos por áfidos: SPV1, SMoV, SMYEV y SCV (Nome y Yossen, 1980; Conci *et al.*, 2009; Perotto *et al.*, 2014, Luciani *et al.*, 2016; Conci *et al.*, 2017).

Como ya se mencionó en esta tesis, el SPV1 es un polerovirus recientemente reportado, presente en Argentina, Canadá y Estados Unidos (Xiang *et al.*, 2015; Luciani *et al.*, 2016, Thekke-Veetil y Tzanetakis, 2016), que si bien se ha detectado en plantas con síntomas formando infecciones simples o mixtas con otros virus (Conci *et al.*, 2017), se desconoce a nivel mundial cuál es su distribución, el porcentaje de plantas infectadas en las diferentes regiones productoras y su relación con otros virus, por consiguiente la importancia que tiene este virus en el cultivo de la frutilla.

SMYEV, SMoV, SCV y SVBV han sido considerados los virus más importantes en todas las zonas productoras de frutilla del mundo (Converse, 1987; Spiegel y Martin, 1998). SMoV fue reportado como uno de los virus más extendidos en frutilla, responsable de importantes pérdidas de rendimiento (Converse, 1987, Spiegel y Martin, 1998, Martin y Tzanetakis, 2006). SMoV pertenece a la familia *Secoviridae* y se transmite por áfidos de manera semipersistente (Mellor y Frazier, 1970; Converse, 1987; Maas, 1998; Martin y Tzanetakis, 2006).

SCV es considerado uno de los virus de frutilla más dañinos, responsable de pérdidas en el rendimiento y la calidad de la fruta, pero hay pocos estudios que informan los porcentajes de plantas infectadas con este patógeno. SCV es un cytorhabdovirus transmitido por *Chaetosiphon fraegaefolii* y *C. jacobii* en forma persistente-propagativa (Schoen *et al.*, 2001; Converse, 1987; Martin y Tzanetakis, 2006). SCV también fue detectado en otros países de América del Sur como Brasil (Betti *et al.*, 1980) y Chile (Thompson *et al.*, 2003; Cabrera *et al.*, 2004).

SMYEV es un potexvirus ampliamente distribuido en frutilla (Horne, 1922, Converse, 1987, Martin y Tzanetakis, 2006). Se ha logrado determinar que es responsable de importantes pérdidas en los rendimientos cuando se encuentra formando infecciones mixtas con los otros virus y recientemente se han reportado los efectos de este virus en la producción cuando se encuentra asilado, causando una disminución en la producción de hasta un 36% en plantas infectadas asintomáticas (Torrico *et al.*, 2017). Las especies del género *Chaetosiphon* fueron mencionadas como los principales vectores que transmiten el virus de manera persistente-circulativa (Prentice 1946; Mellor y Fitzpatrick 1951; Krczal, 1982). Sin embargo se desconoce la distribución, frecuencia, incidencia y prevalencia de estos virus en las regiones productoras de Argentina y en muchos otros países.

La detección de virus a través de técnicas serológicas como el ensayo inmunoenzimático de doble sándwich de anticuerpo (DAS-ELISA) o sonda de hibridación molecular, es lo que con frecuencia se utiliza para los muestreos porque permiten el análisis de

una gran cantidad de plantas simultáneamente, sin embargo, no todos los virus de frutilla pueden ser probados por esta técnica, probablemente debido a la baja concentración viral. De los cuatro virus de frutilla detectados en Argentina, sólo SMYEV puede analizarse mediante DAS-ELISA, también se han reportado sondas de hibridación molecular para la detección de SMoV (Li *et al.*, 2014; Asinari *et al.*, 2016). Sin embargo, la RT-PCR ha sido la única técnica que ofrece la mayor seguridad para el diagnóstico de los cuatro virus reportados en Argentina, debido a que son métodos altamente sensibles para detectar virus, principalmente en especies como frutilla, donde la concentración del virus es muy baja.

La prueba de PCR es costosa y laboriosa, especialmente para un gran número de muestras, razón por la cual es necesario implementar un sistema de diagnóstico sensible y eficiente, que facilite la detección de virus en un gran número de muestras de manera simultánea.

Los objetivos de este capítulo son:

1. Implementar un sistema de diagnóstico sensible que permita el análisis simultáneo de los virus.
2. Evaluar aspectos epidemiológicos que contribuyan a determinar la importancia y distribución del SPV1 en zonas productoras de frutilla en relación a otros virus presentes en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Durante el año 2014 entre los meses de octubre y diciembre se tomaron muestras de hojas jóvenes de plantas de frutilla provenientes del primer año de cultivo, en 43 lotes ubicados en las áreas de producción más importantes de Argentina: Lules, en la provincia de Tucumán (-26.9255515 S, -65.337851 O), Coronda, en la provincia de Santa Fe (-31.957895 S, -60.930951 O) y Mar del Plata en la provincia de Buenos Aires (-38.018455 S, -57.583571 O, Fig. 4.1). El área muestreada representó entre el 8-10% de la superficie plantada en cada región. Un total de 606 muestras fueron recolectadas durante el período de floración y fructificación (208 de Lules, 285 de Coronda y 113 de Mar del Plata).

Los lotes fueron recorridos en dirección de los surcos y se tomó una muestra aleatoria cada 10 metros. Se recogieron entre 10 y 30 muestras por lote, dependiendo del tamaño del mismo. Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico, se transportaron en frío al laboratorio y luego se mantuvieron a -75 °C hasta su análisis. Los cultivares muestreados fueron Camino Real, Festival, Benicia, Splendor y San Andreas. Además, se contaron las plantas con síntomas de virus observadas durante el recorrido. Se analizaron por RT-PCR los cuatro virus detectados en Argentina: SMYEV, SMoV, SCV y SPV1.

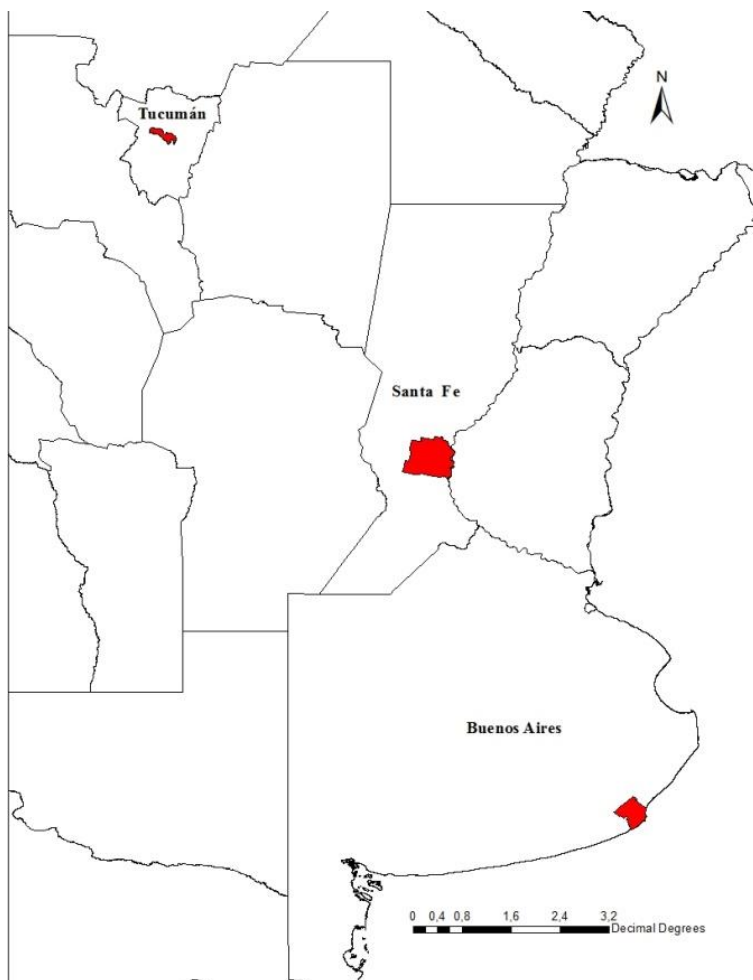


Fig. 4.1. Sección del mapa de Argentina que muestra los departamentos de cada provincia donde fueron tomadas muestras de frutilla.

Implementación del sistema de diagnóstico

Se desarrolló un RT-PCR *Multiplex* utilizando cebadores YT1 e Y2 para SMYEV, Cito2 / for y Cito2 / rev para SCV y cebadores D1 y D3 para SMoV (Tabla 4.1). La mezcla de PCR (volumen final de 12,5 µl) contenía 1 µl de ADNc, 1,25 µl de tampón de reacción 10x (*Kapa*), mezcla de dNTP 0,25 µM, cebadores YT1 / Y2 0,05 µM, D1 / D3 0,25 µM, Cito2/ for Cito2 /rev 0,6 µM y 0,5 U de Taq ADN Polimerasa. La condición de ciclo se dedujo

empíricamente y la condición final utilizada fue una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 40 ciclos de 94°C a 30 s, 53°C a 40 s, 72°C a 1 min y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min.

Detección de virus

Los ácidos nucleicos totales se obtuvieron usando el método de CTAB realizado por Chang *et al.* (2007) modificado (Anexo I). Se generaron ADNc por transcripción reversa (RT) utilizando el *kit MMLV High Performance Reverse (Epicentre)* siguiendo instrucciones del fabricante.

El SPV1 se analizó mediante una PCR única, con los cebadores Polero2Fw / Polero40Rv (Tabla 4.1) según las indicaciones del capítulo 2. Plantas sanas de *Fragaria virginiana* clon UC-12, se usaron como control negativo y plantas de frutilla infectadas con SMYEV, SMoV, SCV y SPV1 se utilizaron como controles positivos. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE y se visualizaron bajo luz ultra violeta después de tinción con bromuro de etidio.

Tabla 4.1. Cebadores específicos utilizados para la detección de SPV1, SMYEV, SMoV y SCV

Virus	Cebador	Secuencia 5'→3'	nt	Región	Cita
SMYEV	YT1	CCGCTGCAGTTGTAGGGTA	861	Polimerasa	Thompson y Jelkmann, 2004
	Y2	CATGGCACTCATTGGAGCTGGG			
SMoV	D1	TAAGCGACCACGACTGTGACAAAG	219	No codificante	Thompson <i>et al.</i> 2003
	D3	TCTTGGGCTTGGATCGTCACCTG			
SCV	Cito2/for	ATGGGACCTATGTACCGGACATC	687	Polimerasa	Perotto <i>et al.</i> , 2014
	Cito2/rev	GGAAATTGTGTCTCTCCCCATTTG			
SPV1	Polero2Fw	CCAACTAGCCAAGATCCCATCTGAAG	1030	Polimerasa	Luciani <i>et al.</i> , 2016
	Polero40Rv	CGAGACCTCGACTTTGAAACCCA			

SPV1, Strawberry polerovirus 1; SMYEV, *Strawberry mild yellow edge virus*; SMoV, *Strawberry mottle virus*; SCV, *Strawberry crinkle virus*.

Análisis estadístico

La prevalencia de los virus fue calculada como el porcentaje de lotes con plantas infectadas (Madden *et al.*, 2007). La incidencia se calculó como el porcentaje de plantas infectadas ajustado a un modelo generalizado bajo distribución binaria con función logit para la variable presencia / ausencia para cada virus, con comparación LSD de Fisher (Fisher, 1936) por región y cultivar usando el programa Infostat versión 2013. Posteriormente se estimó un modelo lineal general y mixto para los siguientes parámetros climáticos en cada región: temperatura máxima (Tmáx), temperatura mínima (Tmin) Temperatura media (Tmed) y precipitaciones (PP) y se realizó una prueba LSD Fisher a posteriori. Se elaboró un *biplot* basado en el análisis de componentes principales entre las variables climáticas y la incidencia, usando como criterio de clasificación las regiones. Se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman (Conover, 1999) para evaluar las asociaciones entre virus, entre virus y plantas con síntomas y entre virus y parámetros climáticos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa Infostat versión. 2013.

RESULTADOS

El RT-PCR *Multiplex* implementado, amplificó los fragmentos genómicos del tamaño esperado para SMYEV, SCV y/o SMOV. Las plantas con infección simple, doble y triple fueron claramente detectadas y se observaron diferentes intensidades de bandas en diferentes plantas infectadas (Fig. 4.2). Estas pruebas se utilizaron para la detección de virus de las muestras recogidas de las tres regiones muestreadas. El RT-PCR para SPV1 también amplificó el fragmento de tamaño esperado (Fig. 4.3).

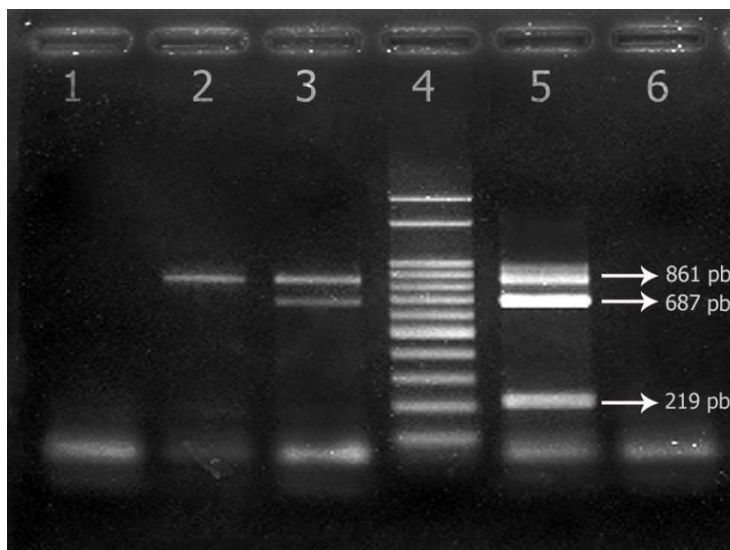


Fig. 4.2. Corrida de electroforesis en gel de agarosa 2% mostrando fragmentos amplificados de tamaño esperado para *Strawberry mild yellow edge virus*, *Strawberry mottle virus* y *Strawberry crinkle virus*. Línea 1, Control de mezcla; Línea 2, planta de frutilla infectada con SMYEV; Línea 3, planta de frutilla infectada con SMYEV y SCV; Línea 4, marcador molecular de 100pb (*Epicentre*); Línea 5, planta de frutilla infectada SMYEV, SCV y SMoV; Línea 6, planta de frutilla sana utilizada como control negativo.

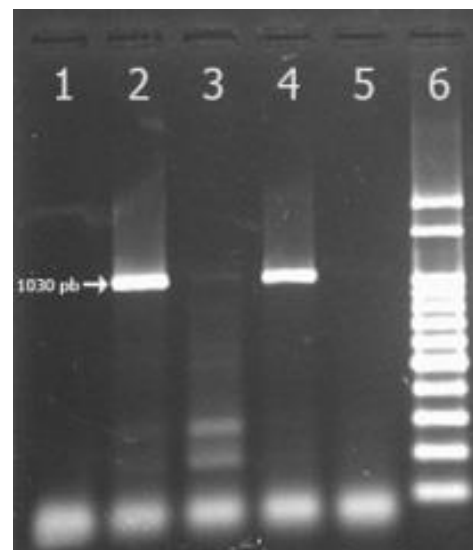


Fig. 4.3. Corrida de electroforesis en gel de agarosa 2% mostrando fragmentos amplificados de tamaño esperado para Strawberry poleroviurs 1. Línea 1, Planta sana; Línea 2-5, planta de frutilla provenientes de Coronda; línea 6, Marcador de peso molecular de 100 pb(*Epicentre*).

Los cuatro virus fueron detectados en las tres regiones muestreadas. De las 606 plantas analizadas, SMYEV se encontró en 124 muestras (20,5%), SMoV en 94 plantas (15,5%), SPV1 en 72 plantas (12%) y SCV en 14 plantas (2%). Los datos revelaron que SMYEV fue el virus con mayor incidencia en todas las regiones (17 a 35% dependiendo de la región). La mayor incidencia de SMYEV se detectó en Mar del Plata (35 %). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la prevalencia de SMYEV entre regiones. La incidencia de SMoV varió entre 15 a 17% y la prevalencia alcanzó valores entre el 62 a 64%, sin diferencias significativas entre las regiones. La incidencia de SCV fue la más baja de los virus analizados (0,5 a 8%), pero se observaron diferencias significativas entre las regiones, donde los mayores valores tanto de incidencia como prevalencia fueron encontrados en Mar del Plata (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Incidencia y prevalencia de SPV1, SMYEV, SMoV y SCV

	SMYEV		SMoV		SPV1		SCV	
Región	Incid.	Prev.	Incid.	Prev.	Incid.	Prev.	Incid.	Prev.
Lules	16.8 b	69 a	16.8 a	62 a	8.2 b	46 a	0.5 b	8 b
Coronda	17.2 b	64 a	14.7 a	64 a	15.1 a	50 a	1.4 b	9 b
Mar del Plata	35.4 a	88 a	15.0 a	63 a	10.6 ab	50 a	8.0 a	50 a
Total ¹	20.5	69.7	15.5	62.8	11.9	48.8	2.3	16.3

Los valores con letras diferentes, presentan diferencias significativas entre regiones de acuerdo al análisis a posteriori elaborado con LSD de Fisher ($P < 0.05$).

¹ La incidencia y prevalencia total se calculó a partir del total de plantas analizadas, no como un promedio de regiones.

Los cultivares más afectados por SMYEV fueron San Andreas en Lules y Mar del Plata, y Camino Real en Coronda, con incidencias entre el 31 y 35% de plantas infectadas. La menor incidencia de SMYEV (3%) fue observada en Camino Real en Lules. En los cultivares Festival, Splendor y Benicia la incidencia varió entre 4 y 19% (Tabla 4.3). De las plantas infectadas por SMoV, el cultivar San Andreas de Lules mostró la mayor incidencia (34%). Sin embargo para este virus no se detectaron diferencias significativas en incidencia entre cultivares, independientemente de la región (Tabla 4.3). Los cultivares más afectados por SPV1 fueron Benicia y Camino Real en Coronda, y Festival en Lules (21 a 29%). Sin embargo, la incidencia de SPV1 no presentó diferencias significativas entre Festival y Camino Real de Lules y San Andreas de Mar del Plata. Además, para el cultivar Camino Real la incidencia fue significativamente más baja en Lules (9%) que en Coronda (29%). Lo mismo pudo observarse en el cultivar Festival, en el que los valores de incidencia variaron significativamente entre Lules (21%) y Coronda (1%, Tabla 4.3). SCV no fue detectado en algunos cultivares específicos de las regiones. San Andreas de Mar del Plata fue el cultivar más afectado por SCV (8%). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las incidencias de SCV entre cultivares y regiones (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Incidencia¹ de SPV1, SMYEV, SMoV y SCV por cultivar de frutilla y región de producción muestreada.

Cultivar-Región	SMYEV		SMoV		SPV1		SCV	
Camino Real-Lules	3	e	4	a	9	bcd	0	a
Camino Real-Coronda	31	ab	26	a	29	a	1	a
Festival-Lules	7	cde	0	a	21	ab	4	a
Festival-Coronda	4	de	4	a	1	d	0	a
Splendor-Coronda	13	cd	13	a	3	cd	5	a
Benicia-Coronda	19	bc	16	a	24	a	0	a
San Andreas-Lules	33	a	34	a	3	cd	0	a
San Andreas-Mar del Plata	35	a	15	a	11	bc	8	a

Los valores que presentan letras diferentes, presentan diferencias significativas entre regiones de acuerdo al análisis a posteriori elaborado con LSD de Fisher ($P < 0.05$).

¹ Valores expresados en porcentaje.

De las 606 plantas analizadas, 207 estaban infectadas con virus (34%), de las cuales 63, 29, 7 y 1% estaban infectadas por uno, dos, tres y cuatro virus, respectivamente (Fig. 4.4). Las infecciones más frecuentes fueron las causadas por SMYEV (26%), SMoV (18%) y SPV1 (17%) encontrados en infecciones simples y SMYEV + SMoV (16%). Las infecciones con SMYEV + SPV1 (7%), o SMYEV + SMoV + SPV1 (6%) ocurrieron con baja frecuencia, mientras que las combinaciones virales restantes fueron escasas (Fig. 4.5).

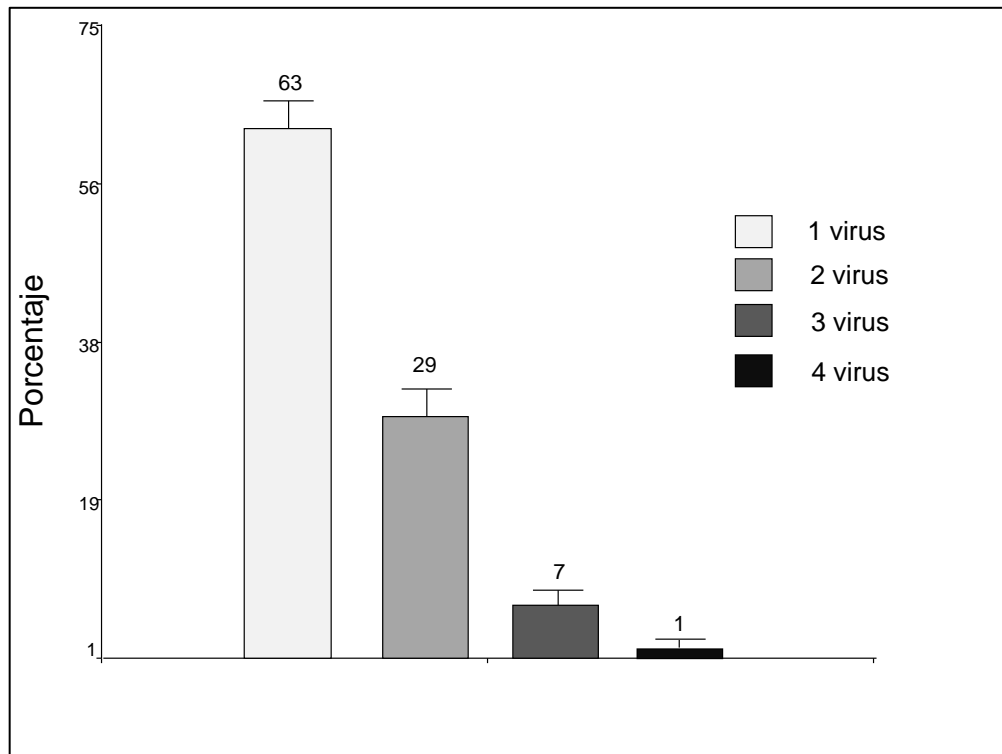


Fig. 4.4. Porcentaje de plantas infectadas con diferentes números de especies virales.

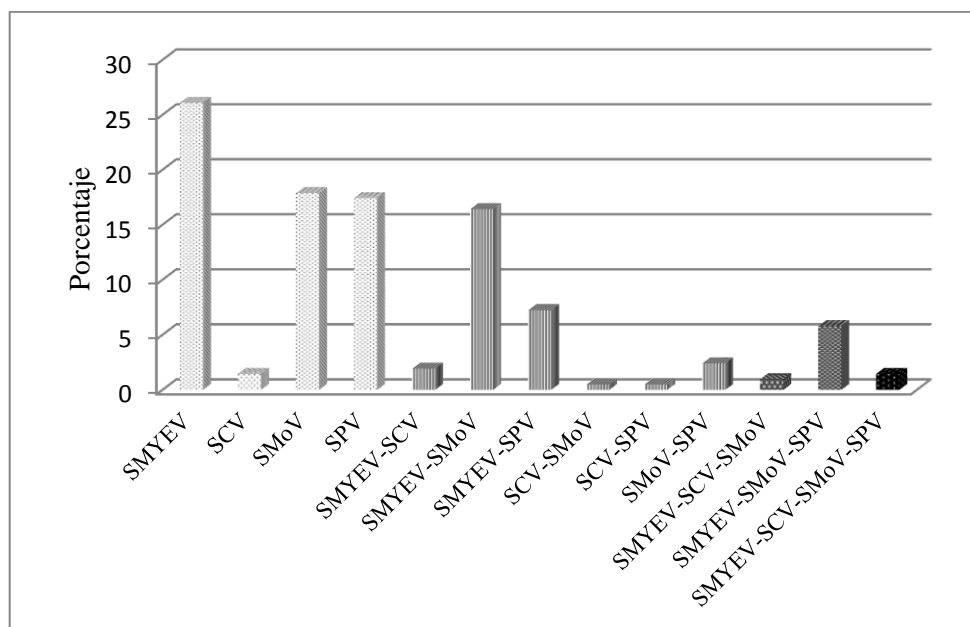


Fig. 4.5. Porcentaje de plantas de frutilla infectadas con virus en diferentes combinaciones.

Se estimó un modelo lineal general y mixto para los factores climáticos: temperatura máxima (Tmax), mínima (Tmin) y media (Tmed), y media de precipitación (PP) de cada región. El análisis a posteriori LSD de Fisher para los factores climáticos detectó diferencias significativas entre las regiones muestreadas. Mar del Plata registró valores más bajos de Tmax (20,9), Tmin (7,3) y Tmed (13,6) que Lules y Coronda. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en las PP de las diferentes regiones (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Temperatura máxima, mínima, media y precipitaciones en cada región productora de Argentina

Región	Tmax ¹	Tmin ¹	Tmed ¹	PP ²
Lules	23,6 b	11,4 b	17,2 b	1,2 a
Coronda	22,8 b	12,3 b	17,2 b	2,4 a
Mar del Plata	20,9 a	7,3 a	13,6 a	1,8 a

¹ Temperaturas en °C.

² Precipitación en mm.

El *biplot* resultante del análisis multivariado de componentes principales, muestra que el componente principal 1 y el componente principal 2 explican el 64 y el 36% de la variabilidad de los datos respectivamente. SMYEV y SCV se relacionaron positivamente entre sí y con Mar del Plata, y negativamente con las temperaturas. SPV1 estuvo relacionado con Coronda y las PP, mientras que SMoV estuvo relacionado con Lules y parcialmente relacionado con Tmax. y Tmed. (Fig. 4.6).

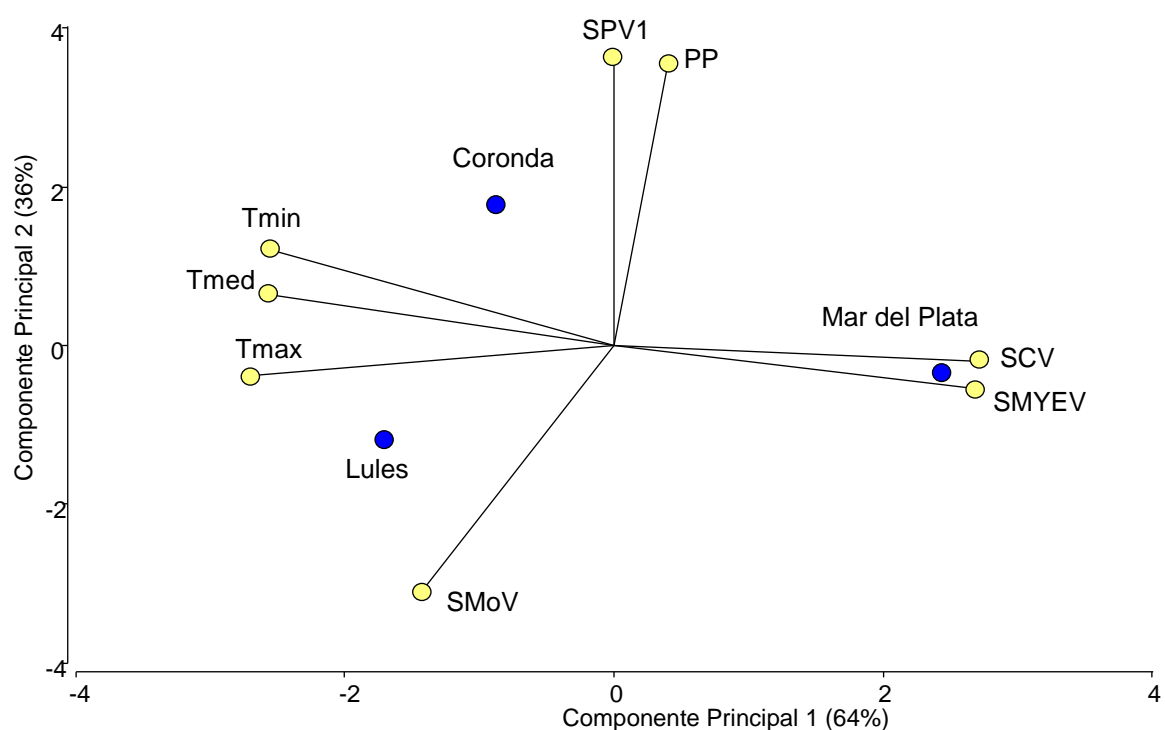


Fig. 4.6. *Biplot* del análisis exploratorio de componentes principales entre condiciones climáticas, regiones muestreadas y virus.

En el análisis de correlación de Spearman, se observó una correlación significativa y positiva de SMYEV con SMoV, SCV y SPV1, así como de SMoV con SCV y SPV1 (Tabla 4.5). También hubo correlaciones significativas y positivas entre el número de plantas con síntomas en cada lote y la incidencia de SCV y SMYEV (Tabla 4.5). Se observaron correlaciones negativas significativas entre los parámetros de temperatura (Tmax, Tmin y

Tmed) y virus específicos (SMYEV y SCV), mientras que las PP se correlacionaron solo con SPV1 (Tabla 4.5). Los valores de rho de las correlaciones fueron bajos.

Tabla 4.5. Análisis de correlación de Spearman entre virus, plantas con síntomas y parámetros climáticos

Variable(1)	Variable(2)	Spearman	P-valor
SMYEV	SCV	0,17	<0,0001
SMYEV	SMoV	0,36	<0,0001
SMYEV	SPV1	0,19	<0,0001
SMoV	SCV	0,12	0,0042
SMoV	SPV1	0,12	0,0022
SCV	SPV1	0,08	0,051
Plantas con síntomas	SMYEV	0,12	0,0026
Plantas con síntomas	SCV	0,17	<0,0001
Plantas con síntomas	SMoV	0,07	0,0852
Plantas con síntomas	SPV1	0,02	0,6714
Tmax	SMYEV	-0,13	0,0011
Tmax	SCV	-0,15	0,0002
Tmax	SMoV	0,02	0,5881
Tmax	SPV1	-0,05	0,2084
Tmin	SMYEV	-0,13	0,0017
Tmin	SCV	-0,11	0,0052
Tmin	SMoV	-0,01	0,7496
Tmin	SPV1	0,08	0,0534
Tmed	SMYEV	-0,13	0,0017
Tmed	SCV	-0,11	0,0052
Tmed	SMoV	-0,01	0,7496
Tmed	SPV1	0,08	0,0534
PP	SMYEV	-0,02	0,6897
PP	SCV	0,01	0,8717
PP	SMoV	-0,02	0,5416
PP	SPV1	0,1	0,0173

Análisis de correlación de Spearman con el total de plantas (n=606).

DISCUSIÓN

Los diagnósticos de enfermedades virales, a menudo se llevan a cabo utilizando métodos como ELISA, porque permite el análisis simultáneo de un número elevado de plantas. De los cuatro virus de frutilla detectados en Argentina, solo SMYEV puede analizarse mediante DAS-ELISA, probablemente porque es el único que tiene suficiente concentración en la planta para ser detectado serológicamente. SCV, SMoV y SPV1 deben analizarse mediante técnicas más sensibles. La RT-PCR representa la técnica más confiable para detectar virus porque es altamente sensible, incluso a bajas concentraciones de virus. Los inconvenientes de las pruebas de diagnóstico basadas en PCR incluyen el hecho de que son relativamente costosas y laboriosas, especialmente cuando se analizan muchas muestras. Por esta razón, se implementó un RT-PCR *Multiplex* que incluyó tres de los virus detectados, facilitando el diagnóstico de virus en un gran número de muestras.

Las plantas muestreadas en las tres principales regiones productoras de frutilla fueron infectadas por SMYEV, SMoV, SCV y SPV1, en diferente medida según el virus y la región. Se conocen estudios de incidencia y prevalencia de SMYEV detectado por DAS-ELISA (Torrico *et al.*, 2017), sin embargo, los análisis moleculares en 606 muestras aleatorias en Tucumán, Coronda y Mar del Plata, para los cuatro virus detectados en Argentina, proporcionaron nuevos detalles sobre la incidencia, la prevalencia y las relaciones virales, gracias a la implementación del RT-PCR *Multiplex* logrado en esta tesis.

Los resultados mostraron que el virus más abundante fue SMYEV, seguido de SMoV y SPV1. SCV fue detectado en baja frecuencia, pero los valores de incidencia y prevalencia indicaron que este virus fue significativamente más abundante en Mar del Plata en relación a las otras regiones. Comparar estos datos de prevalencia e incidencia viral con los de otros estudios realizados en otros países puede ser problemático debido a que la mayoría de estos trabajos publicados reportan análisis con un bajo número de muestras y los porcentajes de infección que detectan se refieren sólo a las plantas con síntomas. A nivel mundial existen

pocos trabajos sobre la incidencia de SMoV, SPV1 y SCV en un gran número de plantas tomadas al azar desde diferentes lotes de frutilla (Martin y Tzanetakis, 2013; Rojas et al., 2013).

Los resultados de esta tesis permitieron detectar que el 17% de las plantas en Lules y Coronda estuvieron infectadas con SMYEV, mientras que en Mar del Plata se encontró un 35% de infección. En la región de Mar del Plata con frecuencia se mantiene la planta de frutilla durante dos, o tres años, y esta es una condición importante para aumentar la concentración y dispersión de los virus. Curiosamente, este aumento en el número de plantas infectadas en Mar del Plata solo se observó para SMYEV y SCV, pero no para los otros dos virus.

La infección generalizada de SMYEV no fue particularmente notable debido a que este virus ha sido detectado en muchos países del mundo (Converse, 1987; Martin y Tzanetakis, 2006). Por lo tanto, no fue sorprendente que la prevalencia de SMYEV fuera alta (64 a 88%), dependiendo de la región. En muestras recolectadas al azar de diferentes regiones de América del Norte, 167 de 464 (36%) plantas de frutilla se encontraban infectadas con SMYEV (Martin y Tzanetakis, 2013). Además, en la región antiguamente conocida como Yugoslavia, la incidencia de SMYEV fue del 20% (Dulic-Markovic *et al.*, 1998), mientras que en China, se detectó SMYEV en 53 de 93 plantas analizadas (57%), muestras recolectadas en diferentes áreas productoras de frutillas entre los años 2005 y 2009 (Li y Yang, 2011). Un estudio anterior en Chile indicó que la incidencia de SMYEV fue del 66% en plantas sintomáticas (Cabrera *et al.*, 2004), mientras que un estudio más reciente con 20 plantas seleccionadas al azar informó una incidencia de SMYEV entre 0 y 100% (Rojas *et al.*, 2013). En Argentina, SMYEV se reportó por primera vez en 2009, cuando se detectó en el cultivar Camarosa en la provincia de Tucumán. El virus estuvo presente en el 67% de las plantas con síntomas (8/12) y en el 3% de las plantas asintomáticas (12/454) (Conci *et al.*, 2009).

Cuando se estudian los patógenos que afectan el cultivo, es necesario establecer los daños causados por ese patógeno en el rendimiento. Por esto es importante determinar el

porcentaje de plantas afectadas (incidencia) y el número de lotes en el que el virus está presente (prevalencia). Estos parámetros son fundamentales para estimar el grado de afección en el rendimiento y en la calidad el fruto. Esta información contribuye a establecer estrategias de manejo de cultivos, que tiendan a disminuir la incidencia y prevalencia del patógeno. En estudios previos realizados en Argentina se concluyó que SMYEV puede reducir la producción de frutilla en un 28 a 63% (Torrico *et al.*, 2017) y en EEUU entre 0 y 30% (Tzanetakis y Martin, 2006). Por lo tanto, la incidencia y la prevalencia de SMYEV observadas en este estudio probablemente causen una disminución considerable en la producción de frutilla.

Cuando se analizó la presencia de SMYEV en cultivares y regiones, se observaron diferencias significativas en los datos de las plantas Camino Real cultivadas en Lules y Coronda, pero no para los otros cultivares que se analizaron simultáneamente en más de una región. Muchos cultivares de frutilla muestran una respuesta diferencial a las infecciones virales (Martin y Tzanetakis, 2006). Aunque se desconoce si existe resistencia a SMYEV entre *Fragaria* spp., la mayoría de los cultivares son tolerantes a la infección simple de SMYEV. En general, los genotipos susceptibles exhiben enanismo, clorosis marginal, distorsión foliar y disminución del tamaño del fruto, mientras que las especies tolerantes son asintomáticas a menos que estén infectadas por una cepa altamente virulenta o por más de un virus (Martin y Tzanetakis, 2006).

SMoV fue el segundo virus más abundante en este muestreo, la incidencia y la prevalencia de este virus no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las regiones analizadas ni tampoco entre los cultivares probados. Se detectó un 15% de incidencia y 63% de prevalencia promedio entre las regiones. Sin embargo, este virus ha sido citado como el virus de frutilla más disperso en las regiones productoras de frutilla en el mundo (Converse, 1987; Maas, 1998; Martin y Tzanetakis, 2006). Al igual que otros virus de frutilla, hay pocos estudios que evalúan la incidencia y prevalencia del virus tomando muestras al azar.

Se han reportado datos de una prevalencia relativamente alta de SMoV (> 60%) en otros países, sin embargo en este trabajo se observó que la incidencia en Argentina ha sido inferior a ésta, sin diferencias significativas entre las regiones. En muestras recolectadas al azar de diferentes partes de América del Norte, 182 de 464 plantas fueron infectadas por SMoV, con diferencias importantes entre las regiones (8 a 69%) (Martin y Tzanetakis, 2013). En Chile, se detectó SMoV en seis de las siete regiones investigadas (86%) (Rojas *et al.*, 2013). Además, en siete regiones productoras de frutilla de la antigua Yugoslavia, el virus de frutilla más frecuente fue SMoV, detectándose en 24 de 33 lotes (73%, Dulic-Markovic *et al.*, 1998).

El SCV fue el virus detectado con menor frecuencia en Argentina, con una incidencia y prevalencia de 2,3 y 16,3%, respectivamente. Esta observación es consistente con los resultados de estudios previos realizados en otros países. En Yugoslavia, SCV infectó solo tres de los 33 campos analizados (Dulic-Markovic *et al.*, 1998), mientras que en América del Norte, solo 50 de 464 plantas fueron detectadas infectadas por el SCV, con diferencias entre regiones (Martin y Tzanetakis, 2013). En este muestreo se observaron diferencias significativas en la incidencia y prevalencia de SCV entre las regiones, correspondiendo los valores más altos a Mar del Plata (8 y 50% respectivamente). Las condiciones ambientales en la región de Mar del Plata pudieron haber sido el factor que favoreció el aumento de la población de vectores, o la concentración viral en las plantas. El SCV es un rhabdovirus transmitido por áfidos de manera persistente-propagativa. En este caso el tiempo de transmisión está influenciado por la temperatura, y para la transmisión eficiente de SCV, el vector debe permanecer vivo durante un período suficientemente largo que permita la finalización del período de latencia del virus (Krczal, 1982). Por lo tanto, es probable que el ciclo de vida relativamente largo de la frutilla en la región de Mar del Plata, sea favorable para la transmisión de SCV por sus vectores, ya que si bien se muestrearon plantas de un año de cultivo, las plantas provenientes de varios ciclos, podrían estar actuando como fuente de infección. Teniendo en cuenta además, que estas atravesaron dos veranos, estación del año en la cual el pico de pulgones es mayor.

Nuestros análisis revelaron una fuerte correlación entre los niveles de SCV y las plantas con síntomas de virus observadas en el campo ($P < 0,0001$). Esto es consistente con los resultados de otros estudios en los que los investigadores concluyeron que SCV es probablemente el más dañino de los virus de frutilla, y algunas cepas podrían producir síntomas severos, principalmente en infecciones mixtas (Martin y Tanezakis, 2006)

De las regiones analizadas, Mar del Plata presentó las temperaturas más bajas (T_{max} , 20.89 °C; T_{min} , 7.27 °C; y T_{med} , 13.55 °C), donde los parámetros de temperatura se correlacionaron negativamente con SMYEV y SCV. Esto es consistente con los valores de incidencia más bajos registrados para Lules y Coronda, que se asociaron con temperaturas relativamente altas (T_{max} , 23 a 24 °C; T_{min} , 11 a 12 °C; y T_{med} , 17 °C), y con lo reportado por Frazier *et al.* (1965) quienes detectaron que SCV se inactivó en un alto porcentaje de plantas con las temperaturas estivales que alcanzaron una media de 32 °C.

El tercer virus más importante fue SPV1, con una incidencia y prevalencia promedio de 12 y 49%, respectivamente. La incidencia de SPV1 varió significativamente entre regiones y cultivares. Como se mencionó previamente en esta tesis, Xiang *et al.* (2015) describieron recientemente a este polerovirus (*Luteoviridae*) infectando frutilla, por lo tanto, no hay informes de incidencia previos. Sin embargo, antiguos trabajos mencionaban la presencia de un luteovirus en las plantas de frutilla (Yoshikawa *et al.*, 1984; Converse, 1987). El hecho de que el agente causal de la enfermedad conocida como “Strawberry mild yellow edge disease” fuera considerado en un primer momento como un luteovirus (Converse, 1987) y que luego se identificara un potexvirus (SMYEV) asociado a esta patología, sugiere que SMYEV y un luteovirus podrían estar relacionados (Jelkmann *et al.*, 1990). Varios años después, Xiang *et al.* (2015) detecta un miembro de la familia *Luteoviridae* en frutilla (SPV1) y observó que el 87% de las plantas infectadas con SMYEV también estaban infectadas con SPV1. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis no permitieron detectar una correlación entre estos dos virus. En cambio, la combinación más común observada fue SMoV-SMYEV, lo que no es sorprendente teniendo en cuenta que estos dos virus fueron los más frecuentes. El análisis de correlación de Spearman indicó que SMYEV se correlacionó con SCV, SMoV y SPV1 ($P < 0,0001$), aunque los valores de rho fueron bajos. Además, el análisis de

componentes principales reveló que SMYEV estaba estrechamente relacionado con el SCV en la región de Mar del Plata, pero no con SMoV y SPV1. Es evidente que la potencial interacción entre SMYEV y SPV1 debería seguir siendo estudiada y analizada en futuros trabajos.

El análisis de componentes principales también reveló que SPV1 estuvo estrechamente relacionado con Coronda y con las PP que fueron mayores en esta región, pero no significativamente diferente de las regiones de Mar del Plata y Lules; debido a ello, esta relación no está clara. Sin embargo, en el análisis de Spearman, también se detectó una relación significativa entre PP y SPV1. Esto también debería ser estudiado con mayor profundidad, ya que es difícil encontrar una asociación entre PP y virus, o vectores virales.

Considerando el total de plantas infectadas detectadas (34%), las infecciones más frecuentes fueron causadas solo por un virus (63%). Asumiendo que en la mayoría de los cultivares de frutilla se observan síntomas cuando ocurren mezclas de virus, se puede suponer que el 37% del total de plantas infectadas mostraron síntomas de enfermedad. Se sabe que las plantas de frutilla con síntomas de virus disminuyen la calidad y producción de frutas (Maas, 1998) por lo que a partir de los resultados obtenidos en esta tesis, podría inferirse que en Argentina habría una reducción en la producción a causa de los virus.

Sin lugar a dudas, otro factor importante que influye en la distribución de estos virus es la presencia de áfidos. Según los informes, las especies de *Chaetosiphon*, especialmente *C. fragaefolii*, son los principales vectores naturales de los virus de frutilla (Converse, 1987), incluidos SMYEV, SMoV, SCV y SPV1. Además, se ha detectado *C. fragaefolii* en los campos de frutillas argentinos (Dughetti *et al.*, 2017). La abundancia de este áfido en las plantas de frutilla parece estar influenciada por el cultivar. Carmine, Diamante y Festival son cultivares que están asociados con los niveles más altos de áfidos (Rondon y Cantliffe, 2004). Esto implica que los áfidos tienen preferencias para algunos cultivares de frutilla, lo que puede aumentar las posibilidades de que los cultivares preferidos se infecten, lo cual puede explicar, al menos parcialmente, algunas de las diferencias entre cultivares observadas en este estudio.

Sin embargo, las incidencias de virus de las plantas en el cultivar Festival no fueron más altas que las de los otros cultivares. Este punto debe examinarse con mayor detalle en futuros estudios.

Se han informado con frecuencia fluctuaciones en el tamaño de la población para muchas especies de áfidos de frutilla (Bernardi *et al.*, 2013; Dughetti *et al.*, 2017). Por ejemplo, en el caso de *C. fragaefolii* en Argentina, se han observado cambios significativos en el tamaño de la población durante el ciclo de vida de la planta. Estos cambios pueden estar relacionados con las prácticas agronómicas utilizadas durante la producción (Cedola y Greco, 2010). Los cambios en la población de áfidos pueden ser particularmente problemáticos porque no se pueden detectar hasta que es demasiado tarde. Un método de uso frecuente para controlar las poblaciones de áfidos implica la aplicación regular de insecticidas según un cronograma anual. Sin embargo, muchos productores están empezando a disminuir el uso de pesticidas debido a los costos asociados al deseo de producir frutas libres de contaminantes químicos. Generalmente se recomienda el uso controlado de plaguicidas, pero un manejo ineficiente de las poblaciones de áfidos, especialmente en el vivero, puede aumentar el número de áfidos y la propagación de virus.

Los virus están ampliamente distribuidos en todas las áreas de cultivo de frutilla en todo el mundo. Su presencia debe ser motivo de preocupación, ya que pueden transmitirse por los vectores y producir infecciones mixtas con consecuencias nefastas para la producción. Los efectos sinérgicos entre las diferentes combinaciones virales conducen a disminuciones considerables en la calidad y cantidad de fruta, precedidas de deformaciones severas de las plantas.

CONCLUSIONES GENERALES

- El polerovirus, SPV1 se encuentra presente en el cultivo de frutilla en Argentina, y gracias a parte de este trabajo de tesis, se reportó la primera cita de este virus en Latinoamérica y la segunda a nivel mundial (Luciani *et al.*, 2016).
- Se implementó un sistema de diagnóstico de alta sensibilidad para la detección de SPV1 mediante RT-PCR.
- El SPV1 fue transmitido a *Fragaria vesca* var. *Semperflorens* “Alpina” por injerto produciendo síntomas típicos de virus.
- Se obtuvo una secuencia genómica de SPV1 detectado en Argentina de 5944 nt.
- El análisis filogenético de las secuencias genómicas comparando diferentes polerovirus permitió detectar que SPV1 forma un grupo o *cluster* diferente en el género *Polerovirus*.
- El SPV1 se encontró presente en plantas de frutilla de diferentes cultivares, provenientes de distintas regiones de Argentina y del mundo.
- Se diseñó un juego de cebadores que permitió amplificar la CP del SPV1.
- Se obtuvieron 8 secuencias del gen que codifica para la CP de SPV1.
- Se detectaron diferentes variantes de SPV1 en una planta.
- Se detectaron diferencias genómicas entre los aislamientos, relacionadas con el área geográfica de producción de plantas madres, que podrían estar indicando la presencia de diferentes razas o variantes del virus.
- La secuencia de nt de la CP de SPV1 se encontró asociada a la CP de ScYLV y WLYaV.
- Fue posible implementar un RT-PCR *Multiplex* para la detección de SMYEV, SMoV Y SCV, tres de los cuatro virus citados en frutilla en el país.
- Los cuatro virus citados en frutilla en Argentina se encontraron ampliamente distribuidos en las principales regiones productoras de frutilla de Argentina.
- El virus más abundante fue SMYEV, siendo la incidencia significativamente más alta en Mar del Plata que en Lules y Coronda.

- El SMOV fue el segundo virus más abundante, aunque sin diferencias significativas de incidencia y prevalencia entre regiones.
- El SCV fue el virus menos frecuente.
- Fue detectada una correlación positiva entre SCV y SMYEV con las plantas con síntomas de virus observadas en el campo.
- Fue detectada una correlación negativa entre los parámetros de temperatura y los virus SMYEV y SCV.
- El SPV1 fue el tercer virus más frecuente de frutilla en Argentina.
- El SPV1 se relacionó de manera positiva con la región de Coronda y las precipitaciones.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

- Evaluar la influencia de las infecciones virales simples y múltiples en la manifestación de síntomas y su relación con el rendimiento.
- Evaluar la actividad supresora de silenciamiento viral en las diferentes razas virales de SPV1.
- Continuar con los estudios de filogenia de SPV1.
- Evaluar los efectos de la variabilidad de la CP en la planta hospedante.
- Obtener la secuencia completa de las diferentes variantes de SPV1.
- Continuar con estudios acerca de la correlación entre parámetros climáticos y aspectos epidemiológicos.
- Evaluar la tolerancia a SPV1 de diferentes cultivares.
- Buscar resistencia y/o tolerancia a SPV1.

BIBLIOGRAFÍA

- Adlercreutz E. G. 2013. Producción e ingreso bruto de frutilla según fecha de plantación. Publicado en internet, disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/produccion-e-ingreso-bruto-de-frutilla-segun-fecha-de-plantacion>. Activo 2018.
- Agrios G. N. 1995. Fitopatología. Limusa S:A., Méjico, 838 pp.
- Asinari F., Cafrune E. E., Guzmán F. A., Conci L. R. and Conci V. C. 2016. Development of a non-radioactive molecular hybridization probe for detecting *Strawberry mottle virus* in strawberry. *AgriScientia* 33: 39-45.
- Atreya P. L., Atreya C. D. and Pirone T. P. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 7887-7891.
- Baraona M. y Sancho E. 1998. Fruticultura especial Manzana, melocotón, frutilla y mora. Universidad Estatal a distancia, San José Costa Rica, 145 pp.
- Bernardi D., Araujo E. S., Zawadneak M. A. C., Botton M., Mogor A. F., Garcia M. S. 2013. Aphid Species and Population Dynamics Associated with Strawberry. *Neotropical Entomology* 42: 628-633.
- Betti J. A. 1980. Viroses do morangueiro e sue controle. *Fitopatologia Brasileira* 6: 217-218.
- Brault V., Bergdoll M., Muttterer J., Prasad V., Pfeffer S. and Erdinger M. 2003. Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *Journal of Virology* 77: 3247–3256.
- Brault V., Périgon S., Reinbold C., Erdinger M., Scheidecker D., Herrbach E., Richards K. and Ziegler-Graff V. 2005. The Polerovirus Minor Capsid Protein Determines Vector Specificity and Intestinal Tropism in the Aphid. *Journal of Virology* 79: 9685–9693.
- Cabrera M., Toro M., Muñoz M., Flores R., Baldera M., Bustos A., Lopez L. y Martin R. 2004. Prospección de virus en plantas de *Fragaria x annanasa* y *Fragaria chiloensis* en la VIII región. XIV Congreso Nacional de Fitopatología, Universidad de Talca, Chile, 30 de noviembre al 3 de diciembre.
- Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock E. T., Sit T. L. and Lommel S. A. 2001. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology* 39: 419-460.
- Cédola C. and Greco N. 2010. Presence of the aphid, *Chaetosiphon fragaefolii*, on strawberry in Argentina. *Journal of Insect Science* 10: 1-9.

- Chang L., Zhang Z., Yang H., Li H. and Dai H. 2007. Detection of strawberry RNA and DNA viruses by RT-PCR using total nucleic acid as a template. *Journal of Phytopathology* 155: 431-436.
- Chen S., Jiang G., Wu J., Liu Y., Qian Y. and Zhou X. 2016. Characterization of a novel polerovirus infecting maize in China. *Viruses* 8: 120.
- Conci V. C., Torrico A. K., Cafrune E., Quevedo V., Bains O., Ramallo J. C., Borquez A. M., Mollinedo V. A., Agüero J. J. and Kirschbaum D. 2009. First Report of *Strawberry mild yellow edge virus* in Argentina. Proc. VIth International, Strawberry Symposium. *Acta Horticulture* 842: 303-306.
- Conci V. C., Luciani C. E., Merino M. C., Celli M. G., Perotto M. C., Torrico A. K., Pozzi E., Strumia G., Dughetti A. C., Asinari F., Conci L. R., Fernandez F. D., Salazar S. M., Meneguzzi N. G. and Kirschbaum D. S. 2017. Advances in characterization and epidemiology of strawberry viruses and phytoplasmas in Argentina. *Acta Horticulturae* 1156: 801-809.
- Converse R. H. 1987. Virus and viruslike diseases of *Fragaria* (Strawberry). En: *Virus Diseases of Small Fruits*. Converse R. H. (ed.). United States Department of Agriculture, Agriculture Hand-book, Corvallis, Oregon, USA, pp. 1-100.
- DnaSP. 2009. Versión 5. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-Del Barrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. and Sánchez-Gracia A. Eds. Universitat de Barcelona, España.
- DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis Software. 2000. Versión 5. Misener S., Krawetz S.A. Eds. Humana Press, Totowa, Estados Unidos.
- Domier L. L. 2012. Family luteoviridae. En: *Virus taxonomy*, 9th report of the ICTV. Elsevier/Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 1045-1053.
- Dughetti A. C., Kirshbaum D. y Conci V. C. 2017. Áfidos transmisores de virus detectados en cultivos de frutilla en Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 43: 36-50.
- Dulic-Markovic I., Rankovic M., Converse R. H. 1998. Occurrence of strawberry viruses in Yugoslavia. 8th International Symposium Small Fruit Virus Diseases 471: 35-38.
- Fraire Cordero M. L., Yáñez Morales M. J., Nieto A. D., Vázquez Gálvez G. 2003. Hongos Patógenos en Fruto de Frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 3: 285-291.
- France A. 2013. Manejo de enfermedades en frutilla. En: *Manual de Frutilla*. Undurraga P. y Vargas S. Eds. Boletín INIA N° 262, Chillán, Chile, pp. 61-71.
- Frazier N. W., Voth V., Bringrust R. S. 1965. Inactivation of two strawberry viruses in plants grown in natural high temperature environment. *Phytopathology* 55: 1203-1205.

- García-Arenal F., Malpica J. M. y Fraile A. 2008. Análisis de la variabilidad de los virus de plantas. En: Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología. Madrid, España, pp. 135-146.
- Geneious. 2012. Versión 9.0.5. Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P. and Drummond A.. Department of Computer Science, University of Auckland, Auckland, New Zealand.
- Guyader S. and Ducray D. G. 2002. Sequence analysis of *Potato leafroll virus* isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *Journal of General Virology* 83: 1799–1807.
- Hauser S., Stevens M., Mougél C., Smith H. G., Fritsch C., Herrbach E. and Lemaire O. 2000. Biological, serological, and molecular variability suggest three distinct polerovirus species infecting beet or rape. *Phytopathology* 90: 460-466.
- Horne W. T. 1922. Strawberry troubles. California Agricultural Experiment Station Report 1921-22: 122-123.
- Huang L. F., Naylor M., Pallet D. W., Reeves J., Cooper J. I. and Wang H. 2005. The complete genome sequence, organization and affinities of carrot read leaf virus. *Archives of Virology* 150: 1845-1855.
- InfoStat. 2013. Versión 2013. Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- Jelkmann W., Martin R. R., Lesemann D. E., Vetten H. J., Skelton F. 1990. A new potexvirus associated with strawberry mild yellow edge disease. *Journal of General Virology* 71: 1251-1258.
- Jones D. T., Taylor W. R. and Thornton J. M. 1994. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* 33: 3038-3049.
- Jukes T. H. and Cantor C. R. 1969. Evolution of protein molecules. En: *Mammalian protein metabolism*. Munro H. N. (ed.). Nueva York, Estados Unidos, pp. 21-132.
- King A. M., Adams M. J., Carstens E. B. and Lefkowitz E. J. 2012. *Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Londres, Inglaterra, 1327 pp.
- Kirschbaum D. S. 2014. Frutilla: Condiciones del cultivo en el inicio de la cosecha en Tucumán. Publicado en internet, disponible en <http://inta.gov.ar/noticias/frutilla-condiciones-del-cultivo-en-el-inicio-de-la-cosecha-en-tucuman>. Activo 2018.

- Kirschbaum D. S., Vicente C. E., Cano-Torres M. A., Gambardella-Casanova M., Veizaga-Pinto F. K. and Antunes L. E. 2017. Strawberry in South America: from the Caribbean to Patagonia. *Acta Horticulturae* 1156: 801-810.
- Krczal H. 1982. Investigations of the biology of the strawberry aphid (*Chaetosiphon fragaefolli*), the most important vector of strawberry viruses in West Germany. *Acta Horticulturae* 129: 63-68.
- Krueger E. N., Beckett R. J., Gray S. M. and Miller W. A. 2013. The complete nucleotide sequence of Barley yellow dwarf virus-RMV reveals it to be a new Polerovirus distantly related to other yellow dwarf viruses. *Frontiers in Microbiology* 4: 1-11.
- Li L., Yang H., Zhao M. and Lai Y. 2014. Detection of Strawberry mottle virus by molecular hybridization. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6: 426-429.
- Luciani C. E., Celli M. G., Merino M. C., Perotto M. C., Pozzi E. and Conci V. C. 2016. First report of Strawberry polerovirus 1 in Argentina. *Plant Disease* 100: 1510.
- Maas J. R. 1998. Compendium of Strawberry Virus Diseases. APS, Minnesota, Estados Unidos, 98pp.
- Madden L. V., Hughes G. and van den Bosch F. 2007. The Study of Plant Disease Epidemics. St Paul, Minnesota, Estados Unidos, 421 pp.
- Mangwende T., Wang M., Borth W., Hu J., Moore P. H., Mirkov T. E. and Albert H. H. 2009. The P0 gene of Sugarcane yellow leaf virus encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology* 384: 38-50.
- Martin R. R. and Tzanetakis I. E. 2013. High risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: Implications for certification, nurseries, and fruit production. *Plant Disease* 97: 1358-1362.
- Martin R. R. and Tzanetakis I. E. 2006. Characterization and recent advances in detection of Strawberry Viruses. *Plant Disease* 90: 384-396.
- Martin R. R., Tzanetakis I. E. 2006. Characterization and recent advances in detection of Strawberry Viruses. *Plant Disease* 90: 384-396.
- Mayo M., Robinson D. J., Jolly C. A. and Hyman L. 1989. Nucleotide sequence of *Potato leafroll luteovirus* RNA. *Journal of General Virology* 70: 1037-1051.
- MEGA7. 2016. version 7.0. Kumar S., Stecher G. and Tamura K. Eds. Filadephia, Estados Unidos.

- Mellor F. C., Frazier N. W. 1970. Strawberry mottle. En: Virus diseases of small fruits and grapevines. Frazier N. W. (ed.) University of California, Division of Agricultural Sciences, Berkeley, pp 4-8.
- Miller W. A., Dinesh-Kumar S. P. and. Paul C. P. 1995. Luteovirus Gene Expression. Critical Reviews in Plant Sciences 14: 179-211.
- Morin F., Vannier B., Houdart F., Regnacq M., Berges T. and Voisin P. 2003. A proline-rich domain in the gamma subunit of phosphodiesterase 6 mediates interaction with SH3-containing proteins. Molecular Vision 9: 449-459.
- NCBI BLAST. 2016. Publicado en internet, disponible en blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Activo 2018.
- NCBI ORF Finder. 2016. Publicado en internet, disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/. Activo 2018.
- Nei M. and Tajima F. 1983. Maximum Likelihood Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions from Restriction Sites Data. Genetics 105: 207-217.
- Newbler Assembly. 2012. Versión 2.5.3. University of Arizona. Roche. Arizona, Estados Unidos.
- Nome S. F. y Yossen V. 1980. Identificación de virus de frutilla en Argentina. I. Virus del moteado de frutilla (*Strawberry mottle virus*). Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA, XV: 245-258.
- Perotto M. C., Luciani C., Celli M. G., Torrico A. K. and Conci V. C. 2014. First report of *Strawberry crinkle virus* in Argentina. New Disease Reports 30: 5.
- Pfeffer S., Dunoyer P., Heim F., Richards K. E., Jonard G. and Ziegler-Graff V. 2002. P0 of Beet Western Yellows Virus Is a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing 76: 6815-6824.
- Prentice I. W., Harris R. V. 1946. Resolution of strawberry virus complexes by means of the aphid vector *Capitophorus fragariae* Theo. Annals of Applied Biology 33: 50-53.
- RDP4. 2015. Versión 4.95. Martin D. P., Murrell B., Golden M., Khoosal A. and Muhire B.. Cape Town-South Africa.
- Rodriguez G., Pérez D. y Paredes V. 2016. Actividad comercial del cultivo de frutilla en la Argentina y Tucumán, campaña 2015 vs 2014 y gastos de producción en el año 2015. Boletín N° 123, 8 pp.

- Rojas P., Almada R. D., Sandoval C., Keller K. E., Martin R. R. and Caligari P. D. S. 2013. Occurrence of aphidborne viruses in southernmost South American populations of *Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis*. *Plant Pathology* 62: 428-435.
- Rondon S. I. and Cantliffe D. J. 2004. *Chaetosiphon Fragaefolii* (Homoptera: *Aphididae*): a potential new pest in Florida? *Florida Entomologist* 87: 612–615.
- Rubio L., Soong J., Kao J. and Falk, B. W. 1999. Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: Lettuce infectious yellows virus, Cucurbit yellow stunting disorder virus, and Beet pseudo-yellows virus. *Phytopathology* 89: 707-711.
- Schoen C. D., Limpens W., Moller I., Groeneveld L., Klerks M. M. and Lindner J. L. 2001. The complete genomic sequence of Strawberry crinkle virus, a member of the *Rhabdoviridae*. *Acta Horticulturae* 656: 45-50.
- Schumann G. L. and D'Arcy C. J. 2006. *Essential plant pathology*. Milwaukee, Estados Unidos, 338 pp.
- SDT Sequence Demarcation Tool. 2014. Versión 1.2.. Muhire B. M., Varsani A. and Martin D. P. Cape Town, South Africa.
- Spiegel S. and Martin R. R. 1998. Virus and viruslike diseases. En: *Compendium of Strawberry Diseases*. Maas J. L. (ed.) St. Paul, Estados Unidos, pp. 62- 72.
- Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on mathematics in the life sciences* 17: 57-86.
- Telam. 2017. La producción de frutillas se extiende en la provincia. Publicado en internet, disponible en <http://www.telam.com.ar/notas/201709/204683-jujuy-produccion-frutillas-crecimiento.html>. Activo 2018.
- Thekke-Veetil T., Tzanetakis I. E. 2016. First report of Strawberry polerovirus-1 in strawberry in the United States. *Plant Disease* 100: 867.
- Thomas H. E. and Marcus C. P. 1953. Virus diseases of the strawberry. *Yearbook of Agriculture* 1953: 765-69.
- Thompson J. R., Wetzel S., Klerks M. M., Vašková D., Schoen S. D., Špak J. and Jelkmann, W. 2003. *Journal of Virological Methods* 111: 85–93.
- Thompson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

- Thompson J. R. and Jelkmann W. 2003. The Detection and Variation of *Strawberry mottle virus*. Plant Disease 87:385–391.
- Thompson J. R. and Jelkmann W. 2004. Strain diversity and conserved genome elements in Strawberry mild yellow edge virus. Archives of Virology 149: 1897–1909.
- Thompson J. R., Wetzel S., Klerks M. M., Vašková D., Schoen S. D., Špak J. and Jelkmann W. 2003. *Multiplex* RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. Journal of Virological Methods 111: 85-93.
- Torricon A. K., Salazar S. M., Kirschbaum D. S., Borquez A. M. y Conci V. C. 2010a. Preliminary results of yield losses produced by *Strawberry mild yellow edge virus*. 28th International Horticultural Congress, Berries Symposium. Agosto, 2010, Lisboa-Portugal. pp 22-27.
- Torricon A. K., Celli M. G., Cafrune E. E., Kirschbaum D. S. and Conci V. C. 2016. Genetic variability and recombination analysis of the coat protein gene of Strawberry mild yellow edge virus. Australasian Plant Pathology 45: 401-409.
- Torricon A. K., Ishikawa A., Meneguzzi N. G., Fernández F. D., Conci L. R., Sordo M. D. H. and Conci V. C. 2010. Incidencia and prevalence of *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV) in Argentina. International Plant Viruses Epidemiology Symposium. 11. Workshop of the Plant Virus Ecology Network. 20-24, junio, 2010. NuevaYork, Estados Unidos.
- Torricon A. K., Salazar S. M., Kirschbaum D. S. and Conci V. C. 2017. Yield losses of asymptomatic strawberry plants infected with Strawberry mild yellow edge virus. European Journal of Plant Pathology 150: 983-990.
- Tsuneyoshi T., Matsumi T., Natsuaki K. T. and Sumi S. 1998. Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three potyvirus species in *Allium* plants. Archives of Virology 143: 97-113.
- Tzanetakis I. E. and Martin R. R. 2005a. First report of strawberry as a natural host of *Apple mosaic virus*. Plant Disease 89: 431-431.
- Tzanetakis I. E. and Martin R. R. 2005b. New features in the genus Ilarvirus revealed by the nucleotide sequence of *Fragaria chiloensis latent virus*. Virus Research 112: 32-37.
- Undurraga P. y Vargas S. 2013. Manual de frutilla. Boletín INIA N° 262, Chillán, Chile, 112 pp.
- Van der Wilk F., Verbeek M., Dulleman A. M. and Van Den Heuvel, J. F. 1997. The genome-linked protein of potato leafroll virus is located downstream of the putative protease domain of the ORF1 product. Virology 234: 300-303.

- Veidt I., Bouzoubaa S. E., Leiser R. M., Ziegler-Graff V. A., Guilley H., Richards K. and Jonard G. 1992. Synthesis of full-length transcripts of beet western yellows virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology* 186: 192-200.
- Wintermantel W. M. 2004. Emergence of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) transmitted criniviruses as threats to vegetable and fruit production in North America. Publicado en internet, disponible en: www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/GreenhouseWhitefly.aspx. Activo 2018.
- Wisler G. C., Duffus J. E., Liu H. Y. and Li R. H. 1998. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Disease* 82: 270-280.
- Xiang H. Y., Shang Q. X., Han C. G., Li D. W. and Yu J. L. 2008. Complete sequence analysis reveals two distinct poleroviruses infecting cucurbits in China. *Archives of virology* 153: 1155.
- Xiang Y., Bernardy M., Bhagwat B., Wiersma P. A., DeYoung R. and Bouthillier M. 2015. The complete genome sequence of a new polerovirus in strawberry plants from eastern Canada showing strawberry decline symptoms. *Archives of Virology* 160: 553-556.
- Yoshikawa N., Ohki S. T., Kobatake H., Osaki T., Inouye T. 1984. Luteovirus-like particles in phloem tissue of Strawberry mild yellow edge virus infected plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 50: 659-663.
- Zhang Y. and Frohman M. A. 1997. Using rapid amplification of cDNA ends (RACE) to obtain full-length cDNAs. En: *cDNA library protocols*. Cowell L G., Austin C. A. (eds.) University of Newcastle, Inglaterra, pp. 61-87.
- Conover W. J. 1999. *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Fisher R. A. 1936. The Use of Multiple Measurements in Taxonomy Problems. *Annals of Eugenics*, 7: 179-188.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry* 74: 5463-5467.

ANEXO 1

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES CTAB MODIFICADO

1. Colocar en un tubo de 1,5 ml, 0,05gr de muestra molida con Nitrógeno líquido.
2. Agregar 500µl de tampón CTAB 2% y 10µl de β-mercapto.
3. Incubar 20 min a 65°C.
4. Agregar 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
5. Centrifugar 5 min a 10.000 rpm.
6. Colectar el sobrenadante en un nuevo tubo de 1,5 ml.
7. Repetir los pasos 4-6.
8. Agregar 1/10 v/v de acetato de sodio 3M pH 5,2 y agitar suavemente.
9. Agregar 2,5 v/v de etanol absoluto.
10. Mezclar por inversión 20 a 30 veces.
11. Incubar a -70°C por 40 min.
12. Centrifugar a 12.000rpm 30 min.
13. Descartar el sobrenadante y agregar 1ml de etanol 70% sin resuspender el pellet.
14. Centrifugar a 12.000rpm 10 min a 4°C.
15. Descartar el sobrenadante y secar el pellet en estufa a 37°C.
16. Resuspender toda la noche el pellet en 30µl de agua DEPC
- 17.

ANEXO 2

MEDIO DE CULTIVO PARA CÉLULAS COMPETENTES

Medio de cultivo liquido:

- LB Broth (Sigma) 20 g.
- Agua destilada 1 l.

Autoclavar 20 minutos

Medio de cultivo agarizado:

- LB Broth (Sigma) 20 g.
- Bacto-agar (Gibco) 15 g.
- Agua destilada 1 l.

Autoclavar 20 minutos.

Plaquear el medio de cultivo agarizado agregando:

- Ampicilina (100ug/ul): 1µl/ml en el medio fundido.
- IPTG (50 mg/ml): 3,5 µl por placa en la superficie.
- X-gal: 16 µl por placa (en la superficie).
- Centrifugar las reacciones de ligación previamente.