

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACHAPARRAMIENTO DE LA ALFALFA,
UNA NUEVA ENFERMEDAD VIRAL EN
ARGENTINA**

por

Lic. Verónica Milagros Trucco

Director: Dr. Fabián José Giolitti



Tesis Doctoral desarrollada en el Instituto de Patología Vegetal (IPAVE)
Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP)
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2018

COMISIÓN ASESORA

Dra. María Laura García, Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM- CONICET CCT La Plata)

Dr. Joel Demian Arneodo, Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA-CICVYA-INTA, Buenos Aires)

Dr. Fabián José Giolitti, Instituto de Patología Vegetal (IPAVE-CIAP-INTA, Córdoba)

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Dra. Ma. Laura García (IBBM-CONICET, La Plata)

Firma: Dr. Joel D. Arneodo (IMyZA-INTA, Buenos Aires)

Firma: Dr. Marcelo Desimone (FCEFN-UNC, Córdoba)

*Dedicada a todos los soñadores que
atesoran cada momento de la vida y
convierten cada encuentro en una
oportunidad*

The image shows the Japanese phrase 'ichi-go ichi-e' (一期一会) written in a bold, expressive calligraphic style. The characters are arranged in two rows: the top row contains two horizontal strokes representing the number '1', and the bottom row contains the characters '会' (meeting) and '期' (time/opportunity).

“ICHI-GO ICHI-E”

”Un encuentro, una oportunidad”

Japón, 2013.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco inmensamente a mi director de tesis Dr. Fabián Giolitti, por esta oportunidad, por acompañarme en cada detalle de este trabajo de tesis, por confiar siempre en mí, por guiarme e incentivar mi formación, por compartir exquisitas cervezas luego de los largos viajes de muestreo, por ser mucho más que un director, una excelente persona! GRACIAS!

A los ex directores del Instituto de Patología Vegetal Dra. Vilma Conci y Mg. Alejandro Rago, y al ex director del Centro de Investigaciones Agropecuarias Dr. Sergio Lenardon, por recibirme en la institución y brindarme el lugar de trabajo, apoyando el desarrollo de este trabajo y también mi formación. Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por aportar los fondos para realizar este postgrado.

A la Universidad Nacional de Córdoba y Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. A Laura Guzmán y Julio Linares por su dedicación y excelente predisposición para ayudar y salvar dudas.

A mis asesores de tesis, Dra. Ma. Laura García y Dr. Joel Arneodo, quienes con mucho compromiso y dedicación acompañaron el desarrollo de esta tesis desde el inicio, aportando valiosos comentarios y sugerencias. Muchas gracias!

Al Dr. Marcelo Desimone por aceptar ser parte del Tribunal Evaluador y corregir esta tesis mejorando la calidad de su contenido. Muchas gracias!

A Sole de Breuil, Nico Bejerman y Dariel Cabrera por el apoyo, el trabajo en grupo realizado, por los momentos compartidos y todo lo que me han enseñado! Muchas gracias!

A Moni Cornacchione de la EEA-Sgo del Estero (INTA), por el envío de muestras vegetales y de áfidos, por sus cálidas bienvenidas cada vez que la visitamos, por su valiosa colaboración en el estudio del achaparramiento de la alfalfa. Muchas gracias!

Al grupo de mejoramiento de alfalfa de la EEA-Manfredi (INTA) por la colaboración brindada, buena predisposición y facilitar semillas de alfalfa.

A las Dras. Ma. Teresa Cosa y Ana Pía Weimer de la Cátedra de Morfología Vegetal (FCEfyN-UNC) por ayudarme a describir las alteraciones histopatológicas en muestras vegetales con presencia de enaciones.

A Flor Moreno por su colaboración en el laboratorio, en el invernadero y en las salidas a campo en búsqueda de pulgones, y sobre todo por su amistad. A Clau Nome por su ayuda con el microscopio electrónico y encontrar al rhabdovirus! A Tiki por enseñarme las técnicas de histología vegetal y por ofrecerme colonias de áfidos. A mamá Fanny por cuidarme, alentarme y asesorarme en las técnicas de hibridación molecular. A Gastón Vaghi Medina por aclararme dudas sobre filogeografía.

A mi familia que siempre me ha apoyado, especialmente a mis padres, hermanos y Juan. A Germán por transitar por Córdoba una noche lluviosa de un miércoles de mayo, por acompañarme en esta última etapa, siempre comprendiendo y animándome. Muchas gracias!

A Aine y Flor Z por encontrarnos y estar siempre cerca aunque vivamos distantes, por su amistad incondicional e inalterable en el tiempo!

A las personas que están en un lugar muy especial de mi universo: pela, Jor, Facchin, Lore G, Flor A, Flor M, Landy, Mauro, Javi, Gaby Pittaro, Pau Venier, Nathy, Marianita Ferrer, Papu, Anita, Fer Mattio, Evi, Anita... Gracias!

A Fer Maurino por tu compañía, tus consejos, tu ayuda, por acompañarme en este viaje y sobre todo por tu amistad.

A Lore Giachero y Flor A por compartir conmigo apuntes, cursos y viajes; y Lore por regalar frases inspiradoras!.

A mis compañeros de laboratorio, becario y personal de apoyo.

A todos con los que compartí cursos de postgrado, congresos y viajes!

A todos mis compañeros y amigos del INTA.

A la vida misma.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

2016. Verónica Trucco, Soledad de Breuil, Nicolás Bejerman, Sergio Lenardon, Fabián Giolitti. *Bean leafroll virus (BLRV) in Argentina: molecular characterization and detection in alfalfa fields* European Journal of Plant Pathology, 146, 207-212. DOI 10.1007/s10658-016-0899-5.

2014. Verónica Trucco, Soledad de Breuil, Nicolás Bejerman, Sergio Lenardon, Fabián Giolitti. *Complete nucleotide sequence of Alfalfa mosaic virus isolated from alfalfa (Medicago sativa L.) in Argentina*. Virus Genes 48: 562-565. DOI: 10.1007/s11262-014-1045-0.

REUNIONES CIENTÍFICAS:

2017. Trucco, VM.; Bejerman, N.; de Breuil, S.; Lenardon, S.; Giolitti, F. *Efecto del achaparramiento y virus asociados en la producción de semillas de alfalfa*. pp. 394. 4to Congreso Argentino de Fitopatología, Mendoza, 19-21/4/17. ISBN 978-987-24373-2-9.

2017. Trucco, VM.; Bejerman, N.; de Breuil, S.; Lenardon, S.; Giolitti, F. *Dispersión temporo-espacial del Alfalfa mosaic virus asociado al achaparramiento de la alfalfa en Argentina*. pp. 397. 4to Congreso Argentino de Fitopatología, Mendoza, 19-21/4/17. ISBN 978-987-24373-2-9.

2015. Trucco, V.M.; Bejerman, N.; de Breuil, S.; Lenardon, S.; Giolitti, F. *Detección y distribución del achaparramiento de la alfalfa, y virus asociados, en zonas productoras de Argentina*. pp. 137. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Santa Fe, 7-9/10/15. ISSN 2451 - 8069.

2014. V.M. Trucco, S. de Breuil, N. Bejerman, S. Lenardon, F. Giolitti. *Caracterización genómica y distribución geográfica del Bean leafroll virus en alfalfa*. 3er Congreso Argentino de Fitopatología, Tucumán, 4-6/6/14.

2012. Trucco, V.M.; N. Bejerman, S. de Breuil, S. Lenardon y F. Giolitti. *Distribución geográfica y caracterización genómica del Alfalfa mosaic virus (AMV) en alfalfa*. pp. 41. XIV Jornadas fitosanitarias Argentinas. 3-5/10/12, Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	6
RESUMEN	8
SUMMARY	10
INTRODUCCIÓN GENERAL	12
<i>EL CULTIVO DE ALFALFA</i>	12
<i>SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE ALFALFA EN ARGENTINA</i>	12
<i>ENFERMEDADES QUE AFECTAN ALFALFA EN ARGENTINA</i>	15
<i>ENFERMEDADES VIRALES EN ALFALFA EN ARGENTINA Y EL MUNDO</i>	21
<i>HIPÓTESIS</i>	25
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	25
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	25
CAPÍTULO I: DETECCIÓN Y AJUSTE DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE VIRUS PRESENTES EN ALFALFAS CON ACHAPARRAMIENTO	26
1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1. Nomenclatura y clasificación viral.....	27
1.2. Detección de virus que afectan plantas	29
1.3. Virus asociados al achaparramiento de la alfalfa	31
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
2.1. Microscopía electrónica	38
2.2. Métodos moleculares	39
2.3. Extracción de ácidos nucleicos	39
2.4. Diseño de oligonucleótidos específicos	39
2.5. RT y PCRs	41
2.6. Sondas de hibridación molecular	44
2.7. ELISAs.....	46
3. RESULTADOS	47
3.1. Identificación viral	47
3.2. Ajuste de métodos de diagnóstico	50
3.2.1. RT y PCRs.....	50
3.2.2. Sondas de hibridación.....	52
3.2.3. Detección serológica.....	54
4. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO	55
5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	57

**CAPÍTULO II: ESTUDIO DE ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL
ACHAPARRAMIENTO. 58**

1. INTRODUCCIÓN.....	59
1.1. Síntomas de las enfermedades	59
1.2. Distribución geográfica de enfermedades	60
1.3. Modos de transmisión viral	62
1.3.1. Transmisión por semilla	62
1.3.2. Transmisión por vector de virus que afectan plantas.....	63
1.4. Plantas hospedantes como reservorios de virus	67
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	68
2.1. Aislamiento de virus no transmisibles mecánicamente	68
2.2. Aislamiento de AMV	68
2.3. Obtención de plantas de alfalfa genéticamente uniformes	69
2.4. Transmisión de los virus al clon Costera	69
2.5. Evaluación del desarrollo de síntomas	70
2.6. Alteraciones histopatológicas en alfalfa y trébol blanco con síntomas virales.....	70
2.7. Distribución geográfica del achaparramiento de la alfalfa y virus asociados.....	71
2.8. Producción de semillas.....	72
2.9. Transmisión por semilla	73
2.10. Transmisión de la enfermedad mediante <i>Aphis craccivora</i>	74
2.11. Detección viral en pulgones colectados a campo	75
2.12. Transmisión de los virus asociados al achaparramiento mediante el pulgón negro	76
2.13. Análisis de reservorios naturales de los virus asociados al achaparramiento.....	77
3. RESULTADOS	78
3.1. Evaluación de la sintomatología desarrollada en infecciones simples y mixtas.....	78
3.1.1. Aislamiento de virus no transmisibles mecánicamente	78
3.1.2. Aislamiento de AMV.....	78
3.1.3. Evaluación de la manifestación de síntomas	79
3.2. Alteraciones histopatológicas en alfalfa y trébol blanco con síntomas de enaciones.....	80
3.2.1. Análisis histológico en alfalfa	80
3.2.2. Análisis histológico en trébol blanco.....	83
3.3. Distribución geográfica del achaparramiento de la alfalfa y virus asociados.....	85
3.4. Efecto de la enfermedad y virus asociados sobre la producción de semillas	90
3.5. Modo de transmisión de la enfermedad y virus asociados	93
3.5.1. Evaluación de la transmisión por semilla	93
3.5.2. Evaluación de la transmisión de la enfermedad mediante <i>Aphis craccivora</i>	94
3.5.3. Detección viral en pulgones colectados a campo.....	95
3.5.4. Evaluación de la capacidad del pulgón negro para transmitir los virus asociados al achaparramiento	96
3.6. Análisis de reservorios naturales de los virus asociados al achaparramiento.....	97

4. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO	103
5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	109
CAPÍTULO III: ESTUDIOS MOLECULARES DEL ALFALFA MOSAIC VIRUS Y BEAN LEAFROLL VIRUS	111
1. INTRODUCCIÓN.....	112
1.1. Genoma viral.....	112
1.2. Estudios filogeográficos.....	114
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	117
2.1. Secuenciaciones masivas.	117
2.2. Análisis filogenéticos y filogeográficos de aislamientos de AMV basados en el gen de la CP.....	118
2.2.1. Muestras vegetales.....	118
2.2.2. Obtención de las secuencias génicas de las cápsides proteicas.....	120
2.2.3. Análisis de las secuencias génicas de las CPs	120
3. RESULTADOS	126
3.1. Secuencias genómicas del AMV y BLRV	126
3.2. Análisis filogenéticos y filogeográficos de aislamientos de AMV basados en el gen de la CP.....	130
3.2.1. Análisis filogenéticos del AMV	130
3.2.2. Análisis filogeográficos del AMV en Argentina	133
3.2.3. Análisis filogeográfico del AMV a nivel mundial.....	136
4. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO	139
5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	143
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	144
BIBLIOGRAFÍA	150
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	162

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LA ALFALFA EN ARGENTINA	16
TABLA 2. DETALLE DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA LA DETECCIÓN DE LOS VIRUS IDENTIFICADOS EN ALFALFA, REGIÓN DEL GENOMA Y TAMAÑO DE BANDA QUE AMPLIFICAN.	41
TABLA 3. CONDICIONES DE CICLADO PARA LA DETECCIÓN DEL ADV (PCR ANIDADA).	43
TABLA 4. CONDICIONES DE CICLADO PARA LA DETECCIÓN DEL AMV, ADV (OLIGONUCLEÓTIDOS ADV-F3 Y -R3), AEV-1, ALCV, BLRV Y PEMV.....	43
TABLA 5. DETALLE DE LAS SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS, TEMPERATURA DE ANNEALING EMPLEADA Y REGIÓN DEL GENOMA QUE AMPLIFICAN PARA SU POSTERIOR MARCADO NO RADIATIVO (DIGOXIGENINA-11-UTP).....	45
TABLA 6. CONCENTRACIONES ESTIMADAS DE SONDA SEGÚN COMPARACIÓN CON EL CONTROL MARCADO-DIG (FIGURA 17).	53
TABLA 7. PROMEDIOS DE LOS VALORES DE ABSORBANCIA DE CONTROLES POSITIVOS (PROVISTOS POR EL KIT), Y MUESTRAS ENFERMAS Y SANAS UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DEL AMV Y BLRV MEDIANTE DAS- Y TAS-ELISA, RESPECTIVAMENTE.	54
TABLA 8. CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS DE PLANTA TRANSMITIDOS POR INSECTOS HEMÍPTEROS.....	65
TABLA 9. VARIEDADES Y CULTIVARES NATURALMENTE INFECTADAS, CON DIFERENTES COMBINACIONES VIRALES.	78
TABLA 10. PREVALENCIA (%) DEL ACHAPARRAMIENTO DE LA ALFALFA POR PROVINCIA Y POR REGIÓN GEOGRÁFICA RELEVADA EN EL PERÍODO 2010-2017.	87
TABLA 11. PREVALENCIAS (%) DE LOS VIRUS ASOCIADOS AL ACHAPARRAMIENTO DE LA ALFALFA POR PROVINCIA RELEVADA EN EL PERÍODO 2010-2017.	89
TABLA 12. ANÁLISIS DE LA VARIANZA NO PARAMÉTRICA MEDIANTE LA PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS	91
TABLA 13. DETECCIÓN VIRAL (%) EN LAS MUESTRAS DE PLANTAS CON Y SIN SÍNTOMAS DE ACHAPARRAMIENTO DEL ENSAYO PARA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS.....	91
TABLA 14. DETECCIÓN VIRAL EN MUESTRAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRAÍDOS DE ALFALFAS Y DE GRUPOS DE 10 PULGONES QUE SE ENCONTRABAN COLONIZÁNDOLAS.	95
TABLA 15. DETECCIÓN VIRAL EN MUESTRAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRAÍDOS A PARTIR DE PULGONES INDIVIDUALES.....	96
TABLA 16. ENSAYOS DE TRANSMISIÓN CON PULGONES NEGROS COLECTADOS A CAMPO. SE INDICA LA PROCEDENCIA Y VIRUS PRESENTES EN LAS PLANTAS DE ALFALFA CON ACHAPARRAMIENTO SOBRE LAS QUE SE COLECTARON LOS ÁFIDOS. ENTRE PARÉNTESIS SE DETALLA EL NÚMERO DE PLANTAS POSITIVAS SOBRE EL TOTAL ENSAYADO PARA CADA CASO.....	97

TABLA 17. EVALUACIÓN DE DIFERENTES ESPECIES VEGETALES COMO POSIBLES RESERVORIOS NATURALES DE LOS VIRUS IDENTIFICADOS EN ALFALFA.....	102
TABLA 18. MUESTRAS EMPLEADAS EN LOS ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y FILOGEOGRÁFICOS DEL AMV EN ARGENTINA. SE INDICA EL AÑO DE COLECTA Y ORIGEN GEOGRÁFICO.	119
TABLA 19. SECUENCIAS EMPLEADAS PARA EL ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO DEL AMV. EN CADA CASO SE INDICA EL AÑO DE COLECTA Y ORIGEN GEOGRÁFICO.....	123
TABLA 20. DETALLE DE LOS MODELOS Y PARÁMETROS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO.....	125
TABLA 21. PORCENTAJES DE IDENTIDAD A NIVEL DE NUCLEÓTIDOS (NT) Y AMINOÁCIDOS (AA) DE LA SECUENCIA GENÓMICA COMPLETA Y DE CADA REGIÓN CODIFICANTE DEL AISLAMIENTO ARGENTINO DEL AMV COMPARADO CON LOS DE CHINA, ITALIA, ESPAÑA Y ESTADOS UNIDOS (EUA).....	128
TABLA 22. PORCENTAJES DE IDENTIDAD A NIVEL DE NUCLEÓTIDOS (NT) Y AMINOÁCIDOS (AA) DE LA SECUENCIA DE LA CP DEL BLRV-ARG COMPARADO CON LAS CINCO SECUENCIAS COMPLETAS DISPONIBLES.	129
TABLA 23. PORCENTAJES PROMEDIO DE IDENTIDAD A NIVEL NUCLEOTÍDICO (NT) Y AMINOACÍDICO (AA) DEL GEN DE LA CP DE AMV.	133

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CULTIVO DE ALFALFA DESTINADO COMO FORRAJE EN VERDE (A) Y CONSERVADO EN ROLLOS (B), FARDOS (C), PELLETS (D), SILO (E) Y HENOLAJE (F).	14
FIGURA 2. TETRAEDRO DE LA ENFERMEDAD.	15
FIGURA 3. SÍNTOMAS DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LA RAÍZ Y CORONA DE ALFALFA EN ARGENTINA.	19
FIGURA 4. SÍNTOMAS DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES FOLIARES DE ALFALFA EN ARGENTINA.	20
FIGURA 5. SINTOMATOLOGÍA DEL ACHAPARRAMIENTO DE LA ALFALFA.	23
FIGURA 6. PLANTA DE ALFALFA CON SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD VIRAL DETECTADA EN FRANCIA (A) Y DETALLES DE LAS ENACIONES PRESENTES EN LOS FOLÍOLOS (B).	24
FIGURA 7. PRINCIPALES FAMILIAS Y GÉNEROS DE LOS VIRUS VEGETALES.	28
FIGURA 8. ESQUEMA DEL GENOMA (A) Y PARTÍCULAS VIRALES (B) DEL AMV.	33
FIGURA 9. ESQUEMA DEL GENOMA Y ARNs CODIFICADOS (A) Y DE LA PARTÍCULA VIRAL Y SUS COMPONENTES (B), DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA RHABDOVIRIDAE.	34
FIGURA 10. DIAGRAMA DE LA ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL AEV-1 AISLADO DE ALFALFA EN ARGENTINA (A) Y PARTÍCULAS VIRALES DE LA FAMILIA LUTEOVIRIDAE (B).	36
FIGURA 11. ESQUEMA DE LA ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE ALCV AISLADO DE ALFALFA EN ARGENTINA (A) Y PARTÍCULAS VIRALES DEL GÉNERO CAPULAVIRUS (B).	37
FIGURA 12. FOTOGRAFÍA DE LAS PARTÍCULAS VIRALES OBSERVADAS AL MET EN PREPARACIONES RÁPIDAS OBTENIDAS DESDE UN ENRIQUECIMIENTO VIRAL DE MUESTRAS DE ALFALFA CON ACHAPARRAMIENTO.	48
FIGURA 13. PARTÍCULAS VIRALES CAPTURADAS CON EL ANTISUERO ESPECÍFICO AL BLRV.	49
FIGURA 14. PARTÍCULA OBSERVADA AL MET EN CORTES ULTRAFINOS DEL CLON DE ALFALFA 340.	49
FIGURA 15. RESULTADOS OBTENIDOS POR RT-PCR.	51
FIGURA 16. RESULTADOS OBTENIDOS POR RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DIFERENCIAL DE ENAMOVIRUS.	51
FIGURA 17. COMPARACIÓN DE LAS SONDAS MARCADAS PARA AMV (A) Y ADV (B) CON LOS CONTROLES DEL KIT.	53
FIGURA 18. DETECCIÓN DEL AMV EN CUATRO PLANTAS DE ALFALFA ENFERMAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR CON SONDA DE ADN.	54
FIGURA 19. ÁREAS PRODUCTORAS DE SEMILLA DE ALFALFA EN ARGENTINA Y RESPECTIVOS RENDIMIENTOS POTENCIALES.	61

FIGURA 20. REPRESENTACIÓN DEL RECORRIDO DE LOS VIRUS NO CIRCULATIVOS (EN ROJO) Y CIRCULATIVOS (CON FLECHAS) LUEGO DE SU INGESTIÓN POR UN ÁFIDO.....	66
FIGURA 21. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CLONES DE ALFALFA.....	70
FIGURA 22. CAMPO DE ALFALFA EN GUANACACHE CON LA IDENTIFICACIÓN DE LAS PLANTAS SELECCIONADAS PARA EL ENSAYO DE PRODUCCIÓN DE SEMILLA.	73
FIGURA 23. ENSAYO DE TRANSMISIÓN POR SEMILLA EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LUZ Y TEMPERATURA.....	74
FIGURA 24. PULGONES NEGROS COLONIZANDO PLANTAS DE ALFALFA CON ACHAPARRAMIENTO (A Y B), EMPLEADOS EN EL ENSAYO DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD (C).....	75
FIGURA 25. PULGONES NEGROS COLONIZANDO PLANTAS DE ALFALFA CON ACHAPARRAMIENTO EMPLEADOS EN LOS ENSAYOS DE TRANSMISIÓN VIRAL (A Y B); ENSAYOS DE TRANSMISIÓN VIRAL (C).....	77
FIGURA 26. FOTOGRAFÍAS DE LOS SÍNTOMAS SOBRE EL CLON COSTERA INDUCIDOS POR LOS AISLAMIENTOS VIRALES Y LA ENFERMEDAD.	79
FIGURA 27. FOTOGRAFÍAS DE HOJAS DE ALFALFA SANA EN CORTES TRANSVERSALES.....	81
FIGURA 28. FOTOGRAFÍAS DE HOJAS DE ALFALFA ENFERMA EN CORTES TRANSVERSALES.	82
FIGURA 29. FOTOGRAFÍAS DE HOJAS DE TRÉBOL BLANCO SANO EN CORTES TRANSVERSALES.....	83
FIGURA 30. FOTOGRAFÍAS DE HOJAS DE TRÉBOL BLANCO ENFERMO EN CORTES TRANSVERSALES.....	84
FIGURA 31. DISTRIBUCIÓN DEL ACHAPARRAMIENTO DE LA ALFALFA EN ARGENTINA.....	86
FIGURA 32. DISTRIBUCIÓN DEL AMV (A), ADV (B), AEV-1 (C), BLRV (D) Y ALCV (E) EN MUESTRAS CON ACHAPARRAMIENTO DE LA ALFALFA EN ARGENTINA.	88
FIGURA 33. INFLUENCIA DEL ACHAPARRAMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS.....	91
FIGURA 34. ÁRBOL DE CLASIFICACIÓN EMPLEANDO EL N° ESTIMADO DE SEMILLAS/PLANTA COMO VARIABLE DEPENDIENTE Y LA PRESENCIA DE LOS VIRUS (=1: PRESENCIA; =0: AUSENCIA) COMO VARIABLES REGRESORAS.....	92
FIGURA 35. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES. GRÁFICO BILOT.	93
FIGURA 36. SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD DEL ACHAPARRAMIENTO DE LA ALFALFA (AMARILLAMIENTO Y ENACIONES, FLECHAS NEGRAS) TRANSMITIDOS POR PULGONES NEGROS COLECTADOS SOBRE PLANTAS DE ALFALFA ENFERMAS.	94
FIGURA 37. SITIOS DE COLECCIÓN DE LOS POSIBLES HOSPEDANTES ALTERNATIVOS.....	99
FIGURA 38. TRÉBOLES BLANCOS SANOS (A Y B) Y CON SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD VIRAL (C Y D).....	99
FIGURA 39. <i>DICHONDRA REPENS</i> CON SÍNTOMAS DE MOSAICO, CÁLICO, DEFORMACIÓN FOLIAR Y PAPILAS COLECTADAS A CAMPO (A Y B) Y MANTENIDAS EN INVERNADERO (C Y D).....	100

FIGURA 40. <i>MELILOTUS SPP.</i> CON DEFORMACIÓN FOLIAR Y MOSAICO CLORÓTICO COLECTADO PRÓXIMO A UN CULTIVO DE ALFALFA CON ACHAPARRAMIENTO EN SANTIAGO DEL ESTERO.	101
FIGURA 41. PLANTA DE <i>SONCHUS OLERACEUS</i> CON SÍNTOMAS DE CÁLICO COLECTADA EN UN JAULÓN DEL IPAVE PRÓXIMA A PLANTAS DE ALFALFA CON ACHAPARRAMIENTO.	101
FIGURA 42. PLANTAS DE <i>TALINUM PANICULATUM</i> COLECTADAS EN EL IPAVE, MOSTRANDO SÍNTOMAS DE MOSAICO Y ANILLOS CLORÓTICOS SUAVES.....	102
FIGURA 43. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL AMV-ARG.....	127
FIGURA 44. DIAGRAMA DE LA ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL BLRV-ARG.	127
FIGURA 45. ÁRBOL FILOGENÉTICO (NJ) BASADO EN EL GEN DE LA CP DEL BLRV-ARG CON OTRAS CINCO SECUENCIAS DE LA CP DISPONIBLES EN EL GENBANK.	129
FIGURA 46. RED DE HAPLOTIPOS CONSTRUIDA A PARTIR DE SECUENCIAS GÉNICAS DE LA CÁPSIDE PROTEICA DE AISLAMIENTOS ARGENTINOS DEL AMV.....	131
FIGURA 47. ÁRBOL FILOGENÉTICO (NJ) BASADO EN EL GEN DE LA CP DEL AMV.....	132
FIGURA 48. DINÁMICA POBLACIONAL DEL AMV EMPLEANDO SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DEL GEN DE LA CP.	134
FIGURA 49. ÁRBOL DE MÁXIMA CREDIBILIDAD DE CLADO (MCCT) OBTENIDO A PARTIR DEL GEN QUE CODIFICA LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE DEL AMV EN ARGENTINA.....	134
FIGURA 50. RESUMEN DEL ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO A DIFERENTES TIEMPOS: (A) 2005; (B) 2008; (C) 2009; (D) 2011; (E) 2015.	135
FIGURA 51. DINÁMICA POBLACIONAL A NIVEL MUNDIAL DEL AMV EMPLEANDO SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DEL GEN DE LA CP.	136
FIGURA 52. ÁRBOL DE MÁXIMA CREDIBILIDAD DE CLADO (MCCT) OBTENIDO A PARTIR DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE DEL AMV.....	137
FIGURA 53. RESUMEN DEL PROCESO DE DISPERSIÓN DEL AMV A NIVEL MUNDIAL.....	138

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

aa: aminoácido/s

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADV: *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus*

AEV: *Alfalfa enation virus*

AEV-1: *Alfalfa enamovirus-1*

ALCV: *Alfalfa leaf curl virus*

AMV: *Alfalfa mosaic virus*

ARN: ácido ribonucleico

ARNdc: ácido ribonucleico doble cadena

ARNsc: ácido ribonucleico simple cadena

BEAST: *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BLRV: *Bean leafroll virus*

BSSVS: *Bayesian stochastic search variable selection*

cADN: ADN copia

CP: proteína de la cápside

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio

dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EEA: Estación Experimental Agropecuaria (INTA)

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

ESS: *effective sample size*

FAA: solución de fijación formol-ácido acético-etanol-agua

GTR: *generalized time reversible*

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

INDEAR: Instituto de Agrobiotecnología Rosario

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IPAVE: Instituto de Patología Vegetal (INTA)

ISEM: microscopía electrónica serológicamente específica

MCCT: árbol datado de máxima credibilidad de clado (*most credibility clade tree*)

ME: microscopía electrónica

MET: microscopio electrónico de transmisión

MMLV: transcriptasa reversa del virus de la leucemia Moloney murine

MP: proteína de movimiento

NEA: Noreste Argentino

NOA: Noroeste Argentino

nt: nucleótido/s

ORF: marco abierto de lectura

pb: pares de bases

PCR: reacción de la polimerasa en cadena

PEMV-1: *Pea enation mosaic virus-1*

PLRV: *Potato leaf roll virus*

PPi: pirofosfato inorgánico

PVX: *Potato virus X*

RHT: relación hoja tallo

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

siRNAs: pequeños ARNs interferentes

TAE: tampón Tris-acetato-EDTA

tMRCA: edad del ancestro común más reciente (*time of the most recent common ancestor*)

UV: ultravioleta

RESUMEN

En el año 2010 se determinó en Argentina una nueva enfermedad viral afectando alfalfa (*Medicago sativa* L.) cuyos síntomas no habían sido reportados previamente en el Continente Americano. Los síntomas comprenden un severo achaparramiento y clorosis de la planta, y las hojas presentan disminución del tamaño, deformación, clorosis y aparición de enaciones y papilas en las nervaduras de la cara abaxial. El objetivo general de este trabajo fue caracterizar la “enfermedad del achaparramiento de la alfalfa” y de los virus que la ocasionan, abordando aspectos biológicos, epidemiológicos y moleculares. Durante el desarrollo de la tesis, se identificaron cinco virus presentes en plantas afectadas: *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus* (ADV), *Alfalfa enamovirus-1* (AEV-1), *Bean leafroll virus* (BLRV) y *Alfalfa leaf curl virus* (ALCV), y se ajustaron métodos moleculares y serológicos para su detección. Para determinar qué combinación de virus induce los síntomas descriptos, se infectaron plantas de alfalfa de un cultivar susceptible (clones de Costera SP INTA) con diferentes aislamientos y combinaciones virales. Las plantas coinfectadas con AMV y ALCV fueron las que mostraron síntomas similares a los de la enfermedad. Mediante técnicas histológicas se describieron las alteraciones ocasionadas a nivel tisular por la enfermedad en alfalfa y trébol blanco (*Trifolium repens*), donde aparentemente, la aparición de enaciones estaría causada por hipertrofia e hiperplasia y por hiperplasia celular, respectivamente. Se evaluó la distribución y prevalencia de la enfermedad y de los cinco virus en las zonas productoras de alfalfa del país. La enfermedad se detectó en las 17 provincias relevadas con una prevalencia del 86,4%. Los virus se detectaron en todas ellas, a excepción del BLRV en Chaco, con prevalencias entre el 64 y 100%. Se analizó el efecto de la enfermedad y virus asociados sobre la producción de semillas, observándose una disminución del 38% y se determinó al AMV como el virus con mayor efecto, seguido por el ALCV. Esto fue confirmado mediante análisis de componentes principales, que además mostró que estos mismos virus se correlacionan positivamente con la expresión de síntomas. Se evaluó la transmisión de la enfermedad y virus asociados por semilla y por vector (*Aphis craccivora*), donde sólo se transmitió por semilla el AMV (3,75%); los cinco virus se detectaron en áfidos colectados a campo y se registró transmisión del AMV, AEV-1, ALCV y síntomas de la enfermedad; ésta es la primera evidencia de transmisión por vector del AEV-1. Se evaluaron malezas como posibles reservorios naturales de los virus identificados: trébol blanco, *Trifolium*

pratense, *Dichondra repens*, *Melilotus spp.*, *Sonchus oleraceus* y *Talinum paniculatum*. El AMV se detectó en todas las especies analizadas, excepto en *T. paniculatum*, y además ADV y AEV-1 se detectaron en trébol blanco. Las demás malezas resultaron negativas para el resto de los virus. Se determinaron las secuencias genómicas completas del AMV y BLRV mediante secuenciaciones masivas. Los análisis de identidades y filogenéticos, para ambos virus, mostraron alto grado de relación con aislamientos ya estudiados. Estas son las primeras secuencias en ser obtenidas en Argentina para ambos virus y desde alfalfa en el mundo. Finalmente, se realizaron estudios filogeográficos con el AMV, empleando 20 secuencias argentinas de la CP, comparándolas entre sí y con las secuencias correspondientes a aislamientos disponibles. Estos estudios indicaron que el proceso de dispersión en Argentina, que dio origen a los aislamientos en estudio, habría comenzado en Manfredi (Córdoba) alrededor del año 2005, y a nivel mundial, en Australia alrededor del 1950, ingresando a Argentina en el año 1993. Los conocimientos generados en este trabajo aportarán al diseño de estrategias de manejo de esta enfermedad y a generar herramientas, que en conjunto, minimicen las pérdidas ocasionadas.

SUMMARY

In 2010, a new viral disease was detected in Argentina affecting alfalfa (*Medicago sativa* L.), with symptoms that had not been previously reported in the American continent. These include severe stunting and chlorosis of affected plants; decreased size, distortion, chlorosis, and vein enations and papillae on the abaxial surface of the leaves. The general objective of this work was to study the “alfalfa dwarf disease-ADD” and its causal agents, addressing biological, epidemiological and molecular aspects. During this thesis execution, five viruses were identified in diseased plants: *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus* (ADV), *Alfalfa enamovirus-1* (AEV-1), *Bean leafroll virus* (BLRV) and *Alfalfa leaf curl virus* (ALCV); molecular and serological methods for their detection were adjusted. To determine which virus combination induces the previously described symptomatology, alfalfa plants of a susceptible cultivar (clones of Costera SP INTA) were infected with different isolates and their combinations. AMV and ALCV-coinfected plants showed symptoms that resemble those of the alfalfa dwarf disease. Tissue alterations were observed with histological techniques in diseased alfalfa and white clover (*Trifolium repens*) plants, suggesting that the enations development could be caused by both hypertrophy and hyperplasia in alfalfa, and hyperplasia in white clover. The geographical distribution and prevalence of ADD and the five ADD-associated viruses were evaluated in alfalfa producing areas of the country. ADD was detected in all 17 surveyed provinces showing a prevalence of 86.4%. The five ADD-associated viruses were detected in all 17 surveyed provinces, except for BLRV in Chaco, with prevalence values ranging from 64 to 100%. The effect on seed production of ADD and its associated viruses was analyzed; a decrease of up to 38% was observed in plants with ADD, being AMV the virus with more negative impact, followed by ALCV. This result was confirmed by principal component analysis, which showed that both viruses positively correlate with the symptoms expression. Seed and vector (*Aphis craccivora*) transmission of both ADD and ADD-associated viruses were evaluated; only seed transmission of AMV was recorded (3.75%); all five viruses were detected on aphids collected in alfalfa fields, and AMV, AEV-1, ALCV and ADD symptoms were registered in aphid-transmitted plants; this is the first report of AEV-1 transmitted by a vector. Several species of weeds were evaluated as possible natural reservoirs of the identified viruses: white clover, *Trifolium pratense*, *Dichondra repens*, *Melilotus* spp., *Sonchus oleraceus* y *Talinum paniculatum*. Except for *T. paniculatum*,

AMV was detected in all weed species, and both ADV and AEV-1 were detected in white clover. All other weeds gave negative results for the rest of the viruses. The complete genome sequences of AMV and BLRV were obtained by deep sequencing. Identity scores and phylogenetic analysis for both viruses showed a close relationship to already studied isolates. These are the first sequences obtained in Argentina for both viruses and from alfalfa in the world. Finally, phylogeographic studies of AMV were carried out using 20 Argentine CP sequences, comparing them with each other and with those of the other available isolates elsewhere. These studies indicated that the spreading process of AMV in Argentina, which gave rise to the isolates under study, would have begun in Manfredi (Córdoba) around 2005, and globally in Australia around 1950, getting to Argentina in 1993. The knowledge generated in this thesis work will contribute to the design of the management strategies for this disease and to generate tools, which together, could minimize the losses caused by ADD.

INTRODUCCIÓN GENERAL

EL CULTIVO DE ALFALFA

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es la especie forrajera más antigua que se conoce. Su origen se centra en el actual Irán (Rodríguez 1986), desde donde se propagó hacia Europa, África, Medio Oriente y Asia Central y Norte. En el Norte y Sur de América se introdujo en el siglo XVI y en Australia en el XIX (Barnes et al. 1977). Su ingreso a Perú y Chile fue por la ruta del Pacífico, y desde Chile hacia Argentina por vía terrestre, ingresando a Mendoza en el siglo XVI. Luego, se extendió hacia la provincia de Córdoba y al resto de la región pampeana; y a fines del siglo XIX y comienzos del XX logró una gran extensión en el territorio argentino (Itria 1969). Actualmente a nivel mundial, la alfalfa se cultiva en alrededor de 45 millones de hectáreas en más de 80 países, y en un amplio rango de condiciones de suelo y clima (Mielmann 2013; Radovic et al. 2009; Tesfaye et al. 2006).

SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE ALFALFA EN ARGENTINA

Argentina se distingue por ser un país con una importante actividad agrícola. En cuanto a las especies forrajeras, la alfalfa es la más importante en el país y un elemento clave para la producción de carne y leche bovina, caracterizándose por altos rendimientos en materia seca y gran adaptabilidad a diversas condiciones de suelo, clima y manejo (Basigalup 2007). En la actualidad y teniendo en cuenta la superficie sembrada, se ubica en tercer puesto con alrededor de 4 millones de hectáreas, luego de la soja y del maíz con 20 y 5 millones de hectáreas, respectivamente (Basigalup 2014; «Bolsa de Comercio de Rosario» 2017). El destino principal de la producción de alfalfa en nuestro país es como forraje en verde para pastoreo directo y forraje conservado en rollos, fardos, pellets y en menor proporción en silo y henolaje (Figura 1) (Odorizzi 2015).

Respecto al forraje conservado, la mayor parte de la producción de heno en el país presenta deficiencias de calidad debido al uso de maquinarias de corte inapropiadas (hélice), mal manejo de lotes (cortes en el momento inapropiado, control de malezas y plagas, entre otros) y del estacionado de rollos a la intemperie. Además, en el mercado

interno el producto se cotiza por cantidad y no por calidad de forraje (Basigalup 2014). Sin embargo y como resultado de una creciente demanda por el mercado externo (megafardos en el caso del Cercano y Lejano Oriente, y de pellets para Latinoamérica), hay un aumento en la producción de heno de alfalfa de alta calidad y consecuentemente de instalación de empresas productoras en distintas regiones del país (Basigalup 2014). Debido a este panorama, y con el objetivo de explotar el potencial productor del país, se creó recientemente la Cámara Argentina de la Alfalfa, desde donde se tenderá a fortalecer el mercado nacional e internacional del cultivo («Télam» 2017).

Existe una situación promisoriosa para el cultivo de alfalfa en Argentina, con un alto compromiso para la obtención de grandes volúmenes de forraje y de mejoras en la calidad. El factor más importante que influye sobre el rendimiento y la calidad es el momento del corte (estado fenológico o de madurez de la planta), ya que si se posterga el corte hacia el estado de floración, el rendimiento por hectárea aumenta por el incremento del peso del tallo pero la calidad disminuye debido a una menor relación hoja/tallo (RHT) y menor valor proteico (Basigalup 2007). La RHT es uno de los mejores indicadores de calidad del heno y se busca que sea lo más alta posible, ya que las hojas son más digestibles y tienen un contenido superior de proteína y consecuentemente mayor valor nutritivo; el 60-75% de las proteínas totales de la planta de alfalfa se encuentra en las hojas (Buxton et al. 1985; Fick y Holthausen 1975). De esta manera, cualquier factor que afecte la RHT, como las enfermedades, afectará directamente la calidad forrajera de la alfalfa, lo que repercutirá en todos los sistemas agrícola-ganaderos en los que participe. Por otro lado, en los mercados internacionales de forraje de alfalfa, el color verde del heno es un factor de calidad importante para su comercialización. Esta cualidad del forraje conservado es afectada directamente por el proceso de henificación empleado (Ing. J. Brigante, com. pers., 2017) y también por patógenos virales que causan síntomas de clorosis y mosaico al interferir con los cloroplastos de las plantas que afectan (Zhao et al. 2016).



Figura 1. Cultivo de alfalfa destinado como forraje en verde (A) y conservado en rollos (B), fardos (C), pellets (D), silo (E) y henolaje (F).

ENFERMEDADES QUE AFECTAN ALFALFA EN ARGENTINA

Dentro de los factores que pueden afectar la productividad y persistencia del cultivo de alfalfa, las enfermedades representan uno de los factores limitantes más importantes. Afectan el cultivo provocando pérdidas económicas directas: menores rendimientos por disminución del vigor o muerte de plantas, y pérdidas de calidad por manchas foliares y/o defoliación; e indirectas: disminución del valor nutricional del forraje por presencia de micotoxinas, menor nodulación y consecuente menor fijación de nitrógeno, mayor susceptibilidad al ataque de insectos, menor capacidad competitiva frente a malezas, entre otros (Basigalup 2007).

Las enfermedades son el resultado de la interacción entre hospedantes susceptibles, patógenos virulentos y condiciones ambientales predisponentes (aspectos edáficos, prácticas culturales y aspectos climáticos como la temperatura, humedad, lluvias). La relación entre los tres componentes hospedante-patógeno-ambiente, fue inicialmente representada mediante un triángulo de la enfermedad donde cada componente se ubicaba en un vértice. Luego, se sugirió la representación de estas interacciones mediante un tetraedro donde se agregó al tiempo como un cuarto elemento (Figura 2), ya que los tres primeros componentes no sólo deben estar en condiciones favorables para la infección sino que deben permanecer así por un período de tiempo para que ocurra la enfermedad (Castaño Zapata 2002).

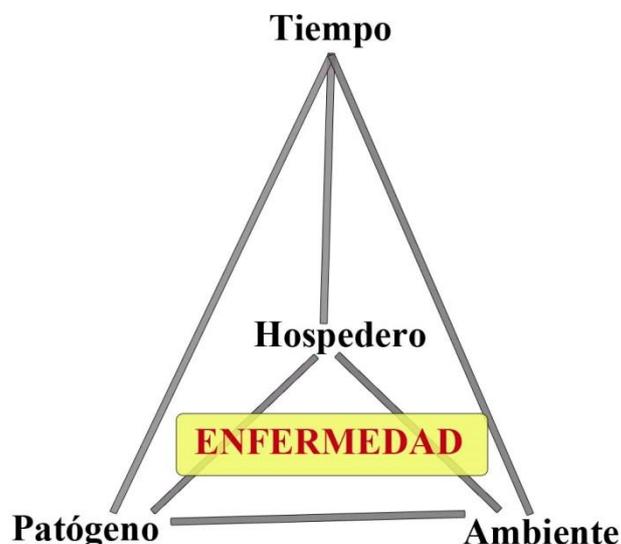


Figura 2. Tetraedro de la enfermedad.

En general, las enfermedades en alfalfa pueden clasificarse de acuerdo al órgano de la planta que afectan en mayor proporción: a) enfermedades de raíz y corona; y b) enfermedades foliares (tallo y hojas) (Tabla 1). Las principales enfermedades de raíz y corona están causadas por hongos y entre ellas se encuentran la podredumbre húmeda, marchitamiento, corchosis, complejo de podredumbre de corona y raíz, antracnosis, y manchón de los alfalfares (Figura 3). En cuanto a las enfermedades foliares, las principales provocadas por hongos son viruela, mancha ocular, roya, tallo negro (de primavera o verano), manchón foliar amarillo, mildiu; escoba de bruja (enfermedad causada por un fitoplasma) y una virosis causada por el virus del mosaico de la alfalfa (Figura 4) (Basigalup 2007).

Tabla 1. Principales enfermedades de la alfalfa en Argentina

	Agente Causal		Síntomas
Enfermedades de raíz y corona en alfalfa	Podredumbre húmeda	<i>Phytophthora megasperma</i> <i>Drechs. F. sp. medicaginis</i>	Necrosis de la raíz o base del tallo lo que provoca la muerte de plántulas durante el establecimiento. En plantas adultas, los síntomas se localizan en las raíces como lesiones pardas que provocan la muerte de las raicillas y finalmente de la raíz principal. Coloración marrón-rojiza en el follaje de las plantas afectadas y en estadios más avanzados marchitamiento y muerte de la planta.
	Marchitamiento o fusariosis	<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. F. <i>sp. medicaginis</i>	Color verde-amarillento del follaje, tallos cortos, escasos rebrotes basales y retardo de la brotación luego de un corte o pastoreo. En los cortes transversales de la raíz se observa coloración parda en forma de anillos. La enfermedad puede afectar todos los tejidos radiculares.
	Corchosis	<i>Xylaria</i> spp.	Ausencia de raíces laterales y podredumbre seca (cancro) de aspecto corchoso localizada en la raíz y corona. A medida que el cancro crece va adquiriendo una coloración pardo clara a grisácea, generalmente asociada a regiones blanquecinas del micelio del patógeno.
	Podredumbres de corona y raíz	Complejo de hongos de varias especies y géneros, entre ellos: <i>Pythium</i> spp., <i>Phoma</i> spp., <i>Colletotrichum trifolii</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>medicaginis</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> .	Áreas necrosadas de coloración parda en la corona, luego se extienden al tejido cortical de la raíz. La necrosis se expande por la corona y consecuentemente se observa disminución de brotes basales y del vigor general de la planta.
	Antracnosis	<i>Colletotrichum trifolii</i>	Lesiones elípticas de color pajizo y bordes oscuros en el tercio inferior de los tallos, donde a menudo se

		pueden observar puntuaciones negras correspondientes a los picnidios del hongo. Los tallos afectados muestran forma de bastón y luego se marchitan completamente conservando las hojas secas adheridas, y finalmente se quiebran.
	Manchón de los alfalfares	<i>Rhizoctonia croccorum</i> Se observa una típica podredumbre donde el micelio del patógeno invade la zona radical. Las hifas del hongo forman una masa compacta violácea que envuelve el exterior de la raíz, y la parte interna se torna blanda y comienza a desagregarse.
Enfermedades foliares	Viruela	<i>Pseudopeziza medicaginis</i> Manchas marrones o negras de forma circular y de márgenes lisos o dentados, distribuidos relativamente uniforme en los folíolos, y puede causar severas defoliaciones.
	Mancha ocular	<i>Leptosphaerulina briosiana</i> Pequeñas manchas de color oscuro en las hojas jóvenes que luego se agrandan y se rodean de un margen castaño oscuro y halo amarillento, similar a un ojo. A medida que la enfermedad avanza, las lesiones van cubriendo todo el folíolo hasta que éste se desprende.
	Roya	<i>Uromyces striatus</i> Pústulas de color marrón-rojizo circulares y pequeñas que rompen la epidermis, se observan en ambas caras de las hojas. Las hojas cubiertas de pústulas se encorvan y se desprenden, pudiendo ocasionar defoliaciones totales. En condiciones severas de la enfermedad es posible observar pústulas elípticas en los tallos.
	Tallo negro de primavera	<i>Phoma medicaginis</i> Manchas marrón oscuro en las hojas que luego coalescen y pueden afectar gran superficie de los folíolos. En los tallos, las manchas oscuras se desarrollan individualmente y luego crecen, convergen e invaden amplios sectores de la base. Las hojas afectadas adquieren una coloración amarillenta y finalmente se desprenden.
	Tallo negro de verano	<i>Cercospora medicaginis</i> Manchas marrones-castañas redondeadas o elípticas con márgenes difusos que aparecen primero en las hojas inferiores y luego en las superiores. Conforme la enfermedad progresa, las manchas coalescen y se rodean de un halo clorótico de forma irregular. Se puede observar una tonalidad gris clara en la parte central de las lesiones debido a la fructificación del hongo. En la base de los tallos se pueden observar manchas oscuras.
	Manchón foliar amarillo	<i>Leptotrochila medicaginis</i> Pequeñas manchas amarillentas en el haz de los folíolos que luego van creciendo e invadiendo gran

		parte de las hojas, siguiendo el recorrido de las nervaduras y formando manchones amarillos en forma de “V” con un área central pardo-clara.
Mildiu	<i>Peronospora trifoliorum</i>	Puede producir infecciones localizadas y sistémicas. En las localizadas, hay sectores cloróticos en el haz de los folíolos que se corresponden con eflorescencias grisáceas en el envés (hifas del hongo). En las infecciones sistémicas, el patógeno invade tallos, yemas y hojas completas. Los tallos adquieren mayor diámetro y presentan entrenudos más cortos, produciendo a menudo un brote terminal ramificado con hojas superpuestas en forma de roseta. Los márgenes de las hojas con infección severa se curvan hacia abajo.
Escoba de bruja	<i>Candidatus Phytoplasma fraxini</i>	Gran proliferación de tallos cortos y finos, enanismo, hojas de tamaño muy reducido, clorosis y aborto de flores.
Mosaico de la alfalfa	<i>Alfalfa mosaic virus (AMV)</i>	Mosaico (o moteado) amarillento-verde pálido que se desarrolla entre las nervaduras de los folíolos. Disminución de la altura de la planta.

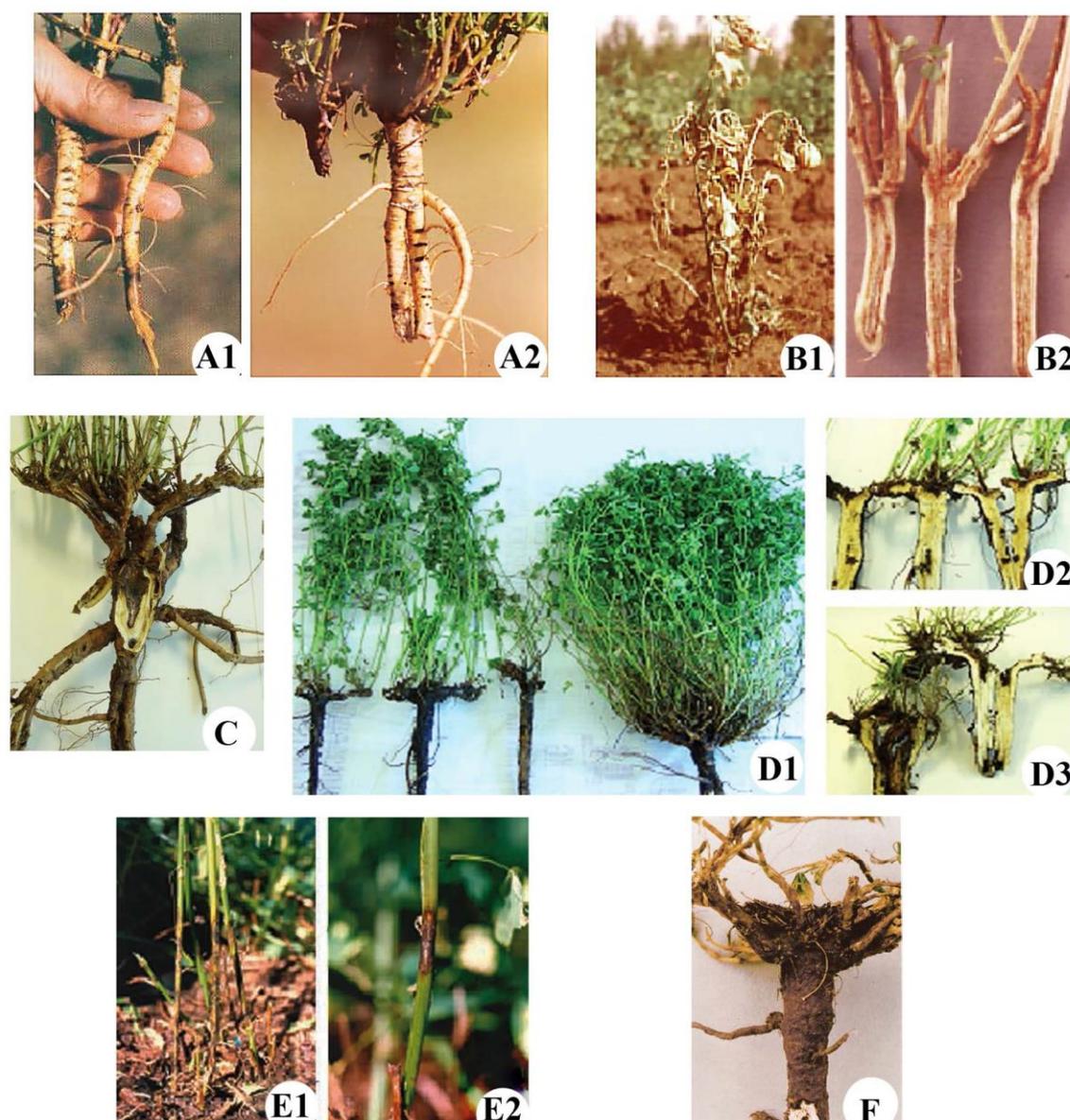


Figura 3. Síntomas de las principales enfermedades de la raíz y corona de alfalfa en Argentina. Podredumbre húmeda: lesiones típicas en raíces (A1); planta enferma (izquierda) versus planta normal (derecha) (A2). Marchitamiento: follaje afectado (B1); corte transversal de raíces y coronas afectadas (B2). Corchosis (C). Complejo de podredumbre de corona y raíz: contraste entre planta sana (derecha) y plantas afectadas (D1); corte transversal de las plantas afectadas (D2, D3). Antracnosis: lesiones en el tercio inferior de tallos (E1); detalle de una lesión (E2). Manchón de los alfalfares (F). Imágenes tomadas de Basigalup (2007).

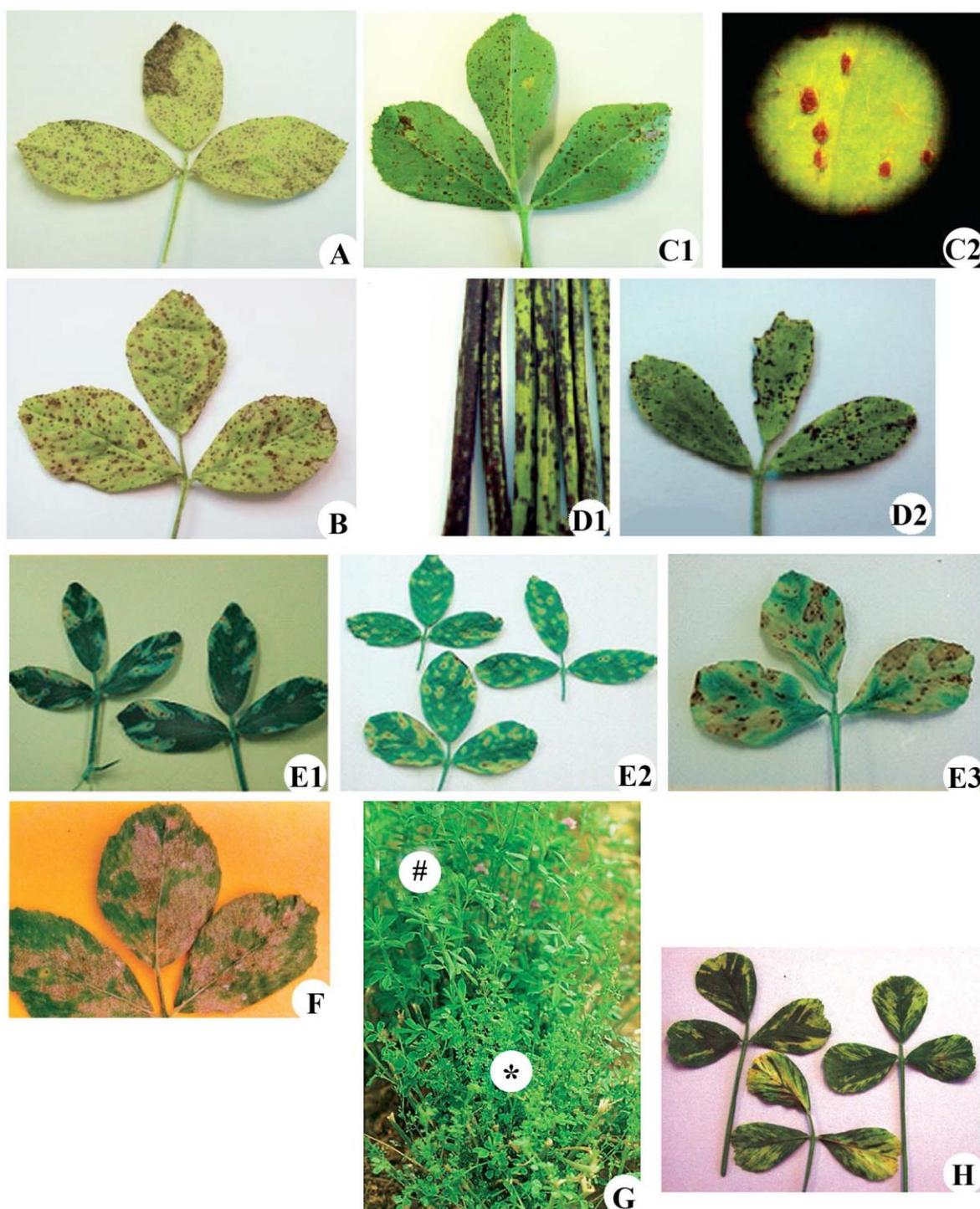


Figura 4. Síntomas de las principales enfermedades foliares de alfalfa en Argentina. Viruela (A). Mancha ocular (B). Roya en envés de una hoja de alfalfa (C1) y detalle de las pústulas (C2). Tallo negro de primavera en tallos (D1) y hoja de alfalfa (D2). Manchón foliar amarillo en hojas de alfalfa según evolución de la enfermedad (E1-E3). Mildiu (F). Escoba de bruja (G): planta de alfalfa enferma (*) en contraste con una normal (#). Mosaico de la alfalfa (H). Imágenes tomadas de Basigalup (2007).

ENFERMEDADES VIRALES EN ALFALFA EN ARGENTINA Y EL MUNDO

En el año 2010 se detectó en nuestro país una enfermedad viral, a la que se denominó achaparramiento de la alfalfa, no reportada previamente en el continente Americano. Esta enfermedad se manifiesta con un acortamiento de entrenudos, lo que ocasiona un severo achaparramiento de las plantas, disminución del tamaño y deformaciones de los folíolos, clorosis y aparición de enaciones y papilas en las nervaduras de la cara inferior de las hojas (Figura 5). Ensayos iniciales indicaron que puede presentar incidencias superiores al 50%, produciendo disminuciones en los rendimientos de masa seca de hasta un 30%, y además, reduce la vida útil de los cultivos (INTA-Infoma 2010). En los primeros trabajos sobre alfalfas con achaparramiento se detectó al AMV (Trucco et al. 2014) y al *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus* (ADV) (Bejerman et al. 2011, 2015). Posteriormente, sobre estas mismas plantas se detectaron otros tres virus *Bean leafroll virus* (BLRV), *Alfalfa enamovirus-1* (AEV-1) y *Alfalfa leaf curl virus* (ALCV) (Bejerman et al. 2016; Bejerman, Trucco, et al. 2017; Trucco et al. 2016).

Una enfermedad viral con síntomas similares fue descrita en Rumania (Blattny 1959) y posteriormente en Francia, España, Bulgaria, Portugal y Marruecos, la cual presentaba enaciones en la cara abaxial de las hojas causadas por el Alfalfa enation virus (AEV), posible miembro del género *Nucleorhabdovirus*, familia *Rhabdoviridae* (Figura 6) (Alliot et al. 1972; Leclant et al. 1973). Posteriormente fue descrita en Arabia Saudita, donde se menciona la presencia de enaciones, una menor tasa de crecimiento y pérdidas en los rendimientos, además de cambios en la coloración de plantas con infección doble entre AMV y AEV (Cook y Wilton 1984; Marble 1989). Los ensayos de transmisión realizados indicaron que el AEV no se transmite mecánicamente pero sí de manera persistente por el pulgón *Aphis craccivora* Kock (Alliot et al. 1972; Leclant et al. 1973). Los ensayos de transmisión realizados con pulgones verdes y manchados (*Acyrtosiphon pisum* y *Therioaphis trifolii*) resultaron negativos para la transmisión de AEV, al igual que los resultados de la transmisión de la enfermedad empleando chicharritas (*Calligypona pellucida* F.) (Blattny 1959).

A nivel mundial, el cultivo de alfalfa puede ser afectado por al menos 33 virus, entre los más importantes se pueden mencionar a: AMV, BLRV, *Bean common mosaic*

virus-BCMV, *Bean yellow mosaic virus-BYMV*, *Beet western yellows virus-BWYV*, *Cucumber mosaic virus-CMV*, *Peanut stunt virus-PSV*, *Soybean dwarf virus-SDV*, *Tobacco streak virus-TSV* (Al-Shahwan et al. 2016; Brunt et al. 1996; Leur y Kumari 2011). En Argentina, previo al 2010, el único antecedente de enfermedad viral en alfalfa era debido a la infección por AMV (Zabala 1952), y la mayoría de los estudios sobre este virus en nuestro país fueron realizados sobre hospedantes distintos de la alfalfa (Nome Huespe et al. 2011).

Dada la importancia económica del cultivo de alfalfa en Argentina y considerando que esta enfermedad provocaría importantes pérdidas en su producción y calidad, sumado a los escasos antecedentes de enfermedades virales en el cultivo de alfalfa en el país y América, se plantearon diferentes estudios para la caracterización de sus agentes causales, su distribución geográfica, el rol de los insectos vectores, entre otros, ya que constituyen la base para el desarrollo de estrategias de manejo de esta enfermedad.

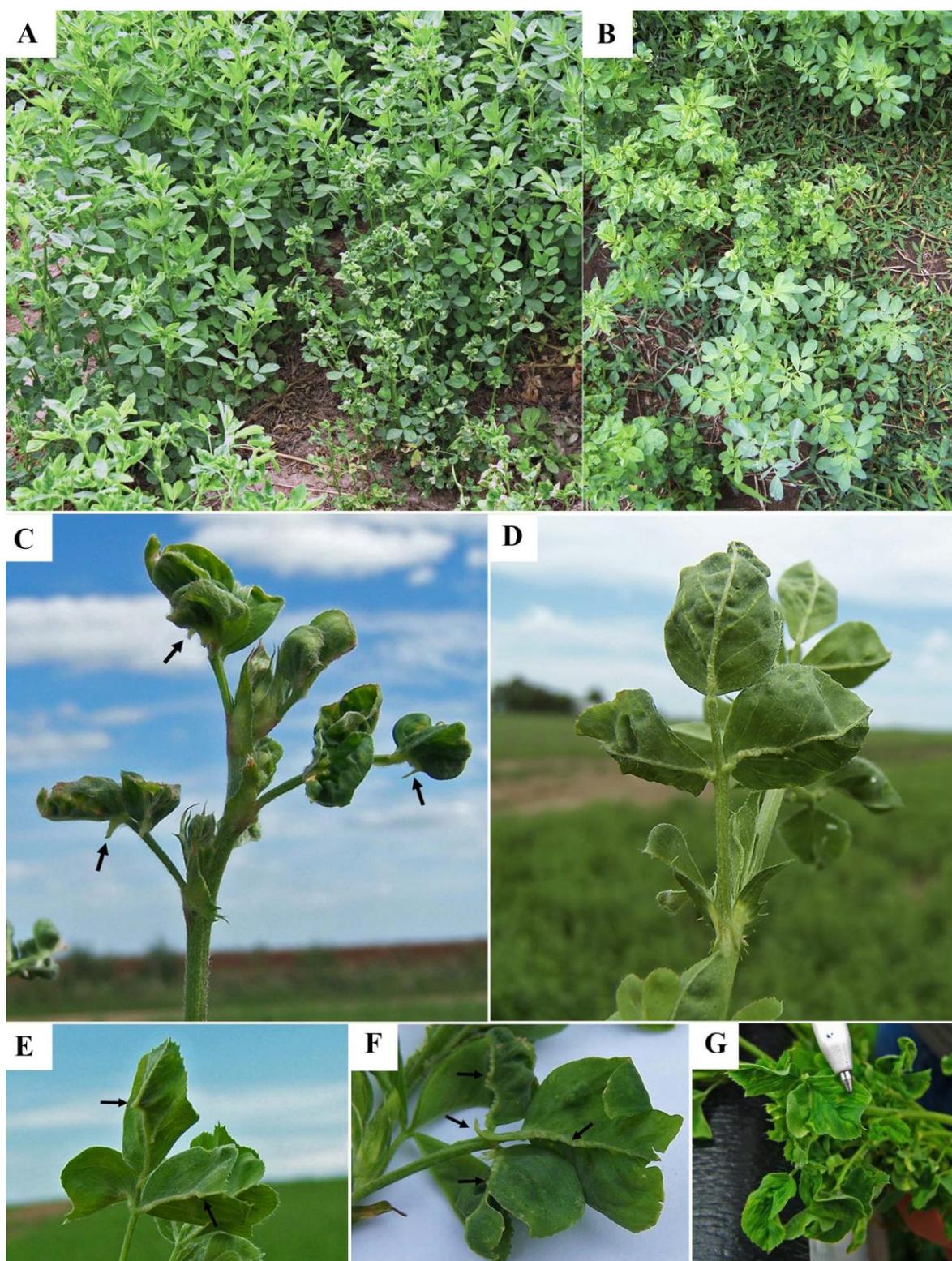


Figura 5. Sintomatología del achaparramiento de la alfalfa. Acortamiento de entrenudos y clorosis generalizada de la plana (A y B), deformaciones y disminución del tamaño de los folíolos (C-G), clorosis de nervaduras (G), y aparición de enaciones y papilas en las nervaduras de la cara inferior de las hojas (C-F).

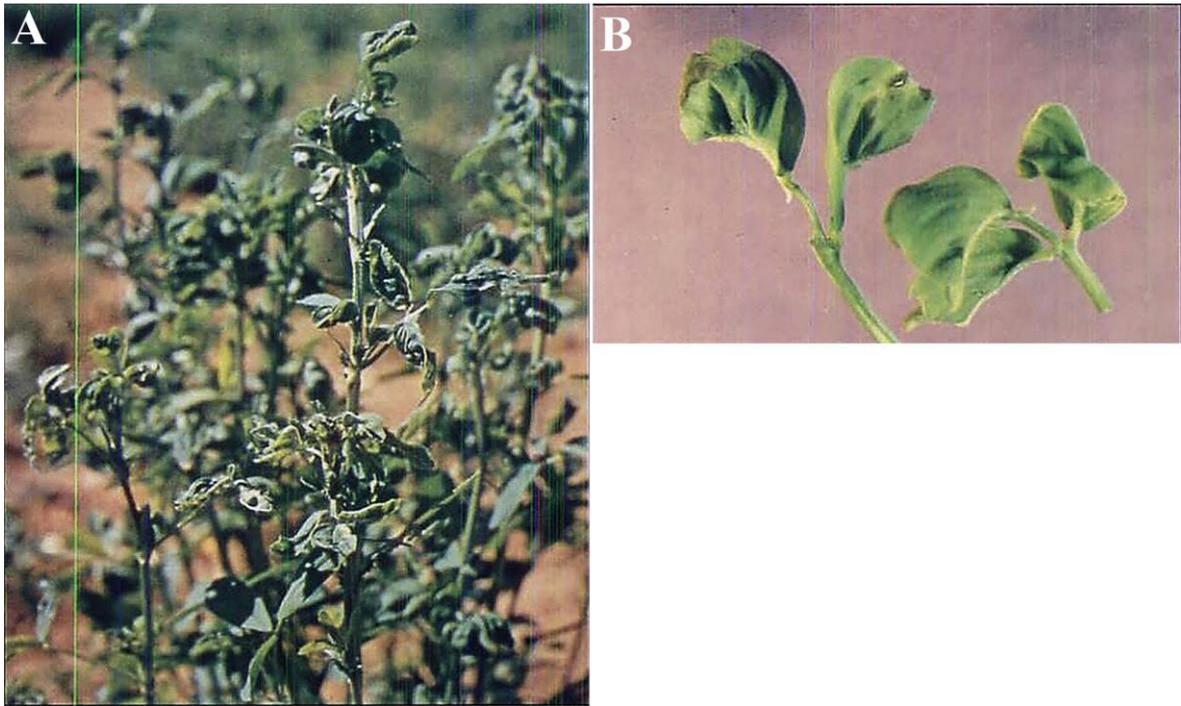


Figura 6. Planta de alfalfa con síntomas de la enfermedad viral detectada en Francia (A) y detalles de las enaciones presentes en los folíolos (B). Extraídas de (Raynal et al. 1989).

HIPÓTESIS

El achaparramiento de la alfalfa está causado por un complejo de virus, transmisible por áfidos y factible de ser caracterizado.

El AMV y el rhabdovirus son los componentes virales más importantes del complejo por su mayor distribución geográfica y mayor intervención en la expresión de síntomas.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la biología de la enfermedad del achaparramiento de la alfalfa y de los virus presentes en el cultivo, abordando aspectos epidemiológicos, filogenéticos y moleculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los virus presentes en alfalfas con sintomatología de achaparramiento y ajustar métodos de diagnóstico moleculares y/o serológicos que garanticen su correcta detección.
2. Aspectos biológicos de la enfermedad y/o virus asociados:
 - 2.1. Evaluar la sintomatología desarrollada en infecciones virales simples y mixtas.
 - 2.2. Examinar las alteraciones histopatológicas en muestras vegetales con síntomas de la enfermedad.
 - 2.3. Determinar la distribución geográfica en las zonas productoras de alfalfa de Argentina.
 - 2.4. Evaluar el efecto de la enfermedad y virus asociados en la producción de semillas.
 - 2.5. Estudiar los modos de transmisión por semilla y vector.
 - 2.6. Analizar otras especies vegetales como posibles reservorios naturales.
3. Características moleculares de virus asociados al achaparramiento de la alfalfa:
 - 3.1. Determinar la secuencia genómica completa del AMV y de otros virus presentes en alfalfas enfermas.
 - 3.2. Analizar la historia demográfica de las poblaciones del AMV.



CAPÍTULO I

Detección y ajuste de métodos de diagnóstico de virus presentes en alfalfas con achaparramiento

1. INTRODUCCIÓN

1.1. NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN VIRAL

El Comité Internacional de Taxonomía Viral (en inglés *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) aprueba y organiza la clasificación taxonómica de los virus; define a una especie viral como “una clase politética de virus que constituye un linaje replicativo y ocupa un nicho ecológico particular”. Una clase politética está formada por miembros que comparten algunas propiedades pero no otras, lo que puede aplicarse para la discriminación de especies. Por lo tanto, no existe un único criterio para identificar una especie viral. De esta manera, el análisis de características morfológicas, moleculares, serológicas, biológicas, entre otras, se deben tener en cuenta para la distinción entre especies (King et al. 2011).

La taxonomía de virus comprende:

Orden (-*virales*)

Familia (-*viridae*)

Género (-*virus*)

Especies

Dentro de los ocho órdenes virales que ha clasificado el ICTV, cuatro de ellos contienen virus que afectan plantas: *Bunyavirales*, *Mononegavirales*, *Picornavirales*, *Tymovirales*. No obstante, la mayoría de las familias y géneros de virus que afectan plantas aún no tienen un orden asignado. Existen al menos 750 especies reconocidas que afectan plantas, donde la mayoría se distribuyen en 101 géneros, pertenecientes a 22 familias. Otras especies están ubicadas en al menos 10 géneros, los cuáles no tienen familia asignada (<https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/6776>) (Ayllón et al. 2016). Muchos virus requieren una caracterización más profunda para poder ser incluidos en géneros ya establecidos, o bien la creación de nuevos géneros. En la Figura 7 se muestran las principales familias y géneros de virus de planta, con ilustraciones de las morfologías de sus partículas virales y tipos de ácidos nucleicos.

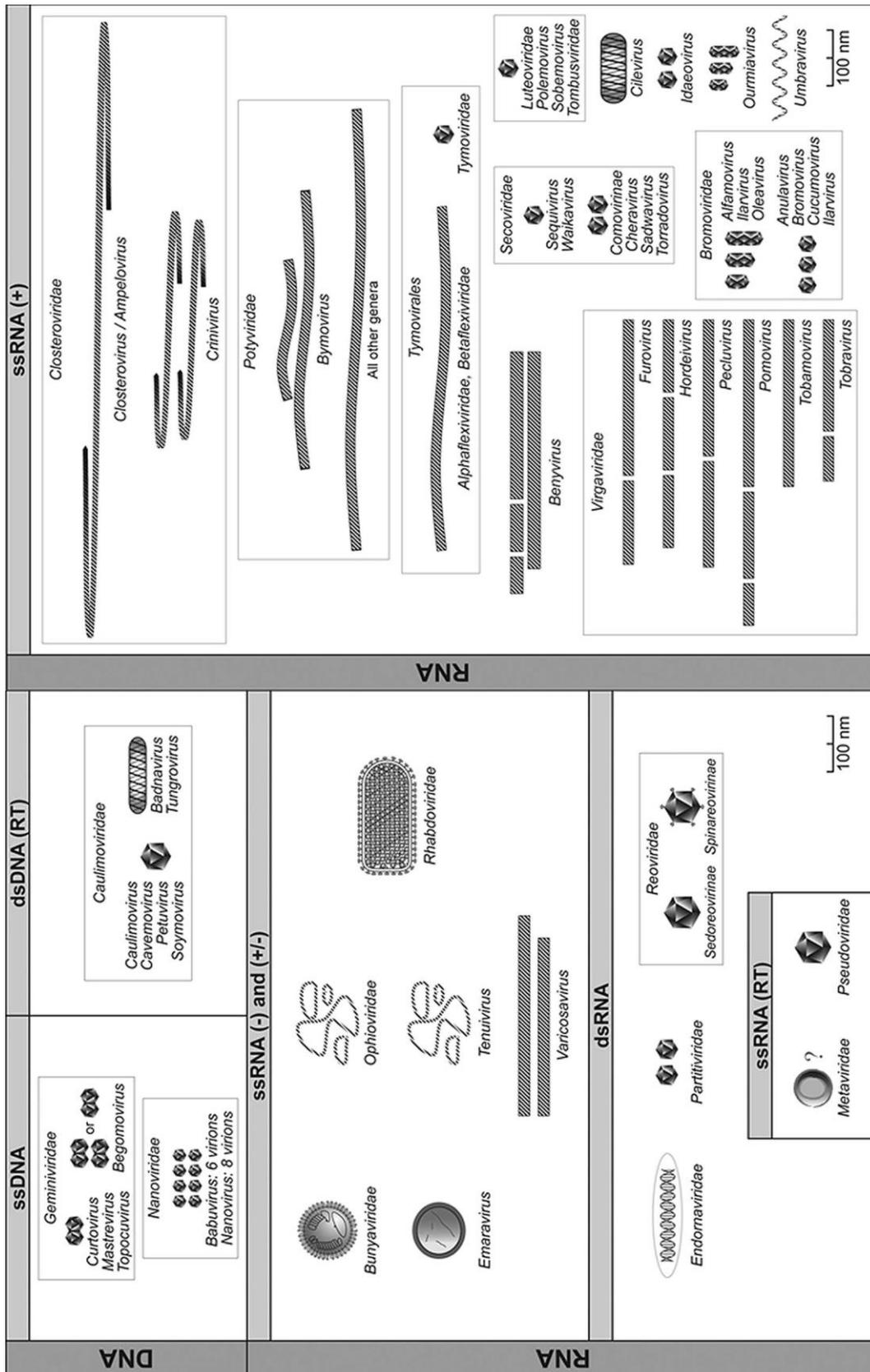


Figura 7. Principales familias y géneros de los virus vegetales. (Extraído de https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv_9th_report/introduction/w/9th_report_intro/87/virus-taxa-infecting-plants).

1.2. DETECCIÓN DE VIRUS QUE AFECTAN PLANTAS

A diferencia de otros patógenos que afectan planta, no existe un método directo, disponible comercialmente, para el control de enfermedades virales en los cultivos. Para esto se aplican estrategias indirectas de manejo tendientes a evitar la infección, como lo son la erradicación (eliminación del inóculo inicial en el agroecosistema), exclusión (aislamiento de las plantas para evitar contacto con el patógeno), evasión (manejo del cultivo para evitar la coincidencia espacio-temporal con el patógeno), protección (control químico de vectores) y resistencia (utilización de cultivares resistentes-tolerantes al virus o vector). A nivel de laboratorio existen terapias para obtener plantas libres de virus por micropropagación, como la termoterapia y la quimioterapia (empleando altas temperaturas y drogas antivirales como la ribavirina, respectivamente) (Barboza et al. 2007; March et al. 2010). Por lo tanto, los métodos de identificación y detección de virus son cruciales para el manejo de este tipo de enfermedades a campo.

En general, el diagnóstico de las enfermedades virales comienza con una evaluación visual de los síntomas, desarrollados como una reacción del metabolismo de la planta en consecuencia de la infección viral. Los síntomas pueden ser muy variables ya que su expresión está influenciada por la fisiología de la planta (como la edad, cultivar, nutrición), condiciones ambientales (temperatura, humedad, entre otros) y cepas virales (Matthews 1991). Comúnmente, los síntomas incluyen marchitamiento, necrosis, mosaicos, anillos, enrollamiento de hojas, epinastía, enaciones, entre otros (Rezende y Kitajima 2011). Sin embargo, hay que considerar que los síntomas pueden revertirse debido al fenómeno de recuperación o "*Symptom recovery*" (Bengyella et al. 2015; Ghoshal y Sanfaçon 2015) o desaparecer temporalmente por un enmascaramiento (Smith 1972); que muchas enfermedades virales son asintomáticas y que las plantas pueden manifestar síntomas semejantes a infecciones virales cuando responden ante un ambiente desfavorable, desbalances nutricionales, infecciones por otro tipo de patógenos, daños causados por pestes o agentes abióticos, entre otros (van der Want y Dijkstra 2006). Para un diagnóstico certero, es necesario combinar la inspección visual de los síntomas con métodos de microscopía electrónica, serológicos, moleculares, entre otros.

La microscopía electrónica provee información sobre las características morfológicas de las partículas virales, como el tamaño y forma, y esto es muy útil para obtener indicios sobre el género/familia al cual pertenecen (ver Figura 7). Los virus con bajas concentraciones no son fácilmente observables a menos que previamente se realice una concentración antes de la visualización. Además, la eficiencia en la visualización de los virus se puede mejorar combinando técnicas de microscopía electrónica con serología (Kitajima y Nome 1999). La combinación de estos métodos puede ser suficiente para la detección de patógenos conocidos o bien para proveer evidencias tendientes a la identificación de nuevos patógenos.

La serología ofrece considerables posibilidades y ventajas para diagnosticar la etiología de una enfermedad. Actualmente, las técnicas serológicas son unas de las más específicas, sensibles, sencillas y económicas para analizar un gran número de muestras en forma rápida y rutinaria o para caracterizar un virus mediante el empleo de anticuerpos específicos, aunque la disponibilidad de éstos es su mayor limitante (Cambra et al. 1996). La técnica denominada *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), desarrollada en la década del 70, es ampliamente usada por todo tipo de patólogos, y especialmente a los fitopatólogos les permitió incrementar notablemente la habilidad de detectar y estudiar los patógenos que afectan plantas y las enfermedades que ellos causan (Agrios 2005).

En contraste con la serología, donde generalmente el diagnóstico se basa en la proteína de la CP, las técnicas basadas en la secuencia de los ácidos nucleicos permiten la detección de algunas regiones del genoma viral. Las técnicas de hibridación molecular y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son las dos técnicas de diagnóstico molecular más ampliamente usadas. La primera, en términos generales, consiste en la detección de un ácido nucleico (ADN o ARN) utilizando una sonda compuesta por un fragmento de ADN o ARN complementario al mismo, previamente marcada con un isótopo radioactivo o alguna otra molécula no radioactiva, que permitan establecer la ocurrencia de la hibridación. En cuanto a la PCR, ésta consiste en la amplificación exponencial de una porción genómica; los extremos de esta secuencia son reconocidos por un par de fragmentos pequeños de ADN, oligonucleótidos o *primers*, que hibridan complementariamente con dichos extremos. En el caso de virus cuyo genoma es ARN, primero es necesaria una etapa de transcripción reversa (RT) en la que

el ARN es copiado a ADN, sobre el que luego se realiza la amplificación (Astier et al. 2007).

En los últimos años se produjo un nuevo abordaje mediante secuenciaciones masivas (NGS: *next generation sequencing*), el cual provee una herramienta poderosa para la detección e identificación de virus, y no requiere información previa del patógeno (Adams et al. 2013). Mediante secuenciación de ARN por NGS (*RNA-seq*) es posible no sólo detectar virus en las muestras sino también la obtención parcial o total de su genoma, ya sean virus conocidos o novedosos. Por otro lado, el ensamblaje de ARNs pequeños ha resultado ser una herramienta eficiente para la detección viral (Kreuze et al. 2009; Wu et al. 2015) y se basa en el mecanismo natural y fundamental de la defensa antiviral del hospedante, explorando los pequeños ARNs interferentes derivados del o los virus (vsiRNAs, del inglés *viral-derived small interfering RNAs*). Durante este proceso, los vsiRNAs son enriquecidos, junto con otros ARNs pequeños, y pueden ser fácilmente detectados mediante su secuenciación masiva. Comparado con *RNA-seq*, la secuenciación masiva de vsiRNAs es altamente sensible y ha sido ampliamente empleada para identificar, generalmente en simultáneo, virus con diferentes tipos de ácidos nucleicos, incluyendo ARN simple cadena de polaridad positiva y negativa, ARN doble cadena, ADN y viroides, incluso cuando presentan baja concentración y donde no serían fácilmente detectados por otros métodos (Wu et al. 2015).

1.3. VIRUS ASOCIADOS AL ACHAPARRAMIENTO DE LA ALFALFA

En plantas de alfalfa con achaparramiento, recolectadas en distintas zonas productoras de nuestro país, se identificaron cinco virus: *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus*-ADV (Bejerman et al. 2011, 2015), *Alfalfa mosaic virus*-AMV (Trucco et al. 2014), *Alfalfa enamovirus-1*-AEV-1 (Bejerman et al. 2016), *Bean leaf roll virus*-BLRV (Trucco et al. 2016) y el *Alfalfa leaf curl virus*-ALCV (Bejerman, Trucco, et al. 2017), siendo éste el último virus detectado. La identificación y detección de estos virus se realizó como parte de esta tesis (AMV y BLRV) o en colaboración con miembros del equipo de trabajo (ADV, AEV-1 y ALCV). Por tal motivo, y al estar asociados a la enfermedad en estudio, se trabajó con estos cinco virus. Cabe aclarar que: como la detección viral siempre se realizó en plantas de alfalfa con achaparramiento, en esta

tesis se empleó la expresión “virus asociados a la enfermedad/achaparramiento” sin que esto implique causalidad.

El AMV fue detectado por primera vez en 1931 en cultivos de alfalfa de Estados Unidos (Weimer 1931). Es el único miembro del género *Alfamovirus* perteneciente a la familia *Bromoviridae* («ICTV on line» 2017a; King et al. 2011). Su genoma es de ARN simple cadena sentido positivo, lineal y segmentado, compuesto por tres moléculas de ARN: ARN1 que contiene el ORF1 y codifica la proteína 1 (P1) con dominios metiltransferasa y helicasa, ARN2 que contiene el ORF2 y codifica la proteína 2 (P2) con dominio polimerasa, y ARN3 que contiene dos ORFs y codifican las proteínas de movimiento (MP) y de la cápside proteica (CP), esta última a través de un segmento subgenómico ARN4 (Bujarski et al. 2012). Las moléculas de ARN1, 2 y 3 se encapsidan en los componentes B (*bottom*), M (*middle*) y Tb (*top component b*), respectivamente, presentando formas baciliformes de diferentes tamaños con un diámetro de 18 nm (Figura 8) (Jaspars y Bos 1980). Además de alfalfa, el AMV puede infectar más de 430 especies pertenecientes, al menos, a 51 familias de dicotiledóneas, y se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo (Jaspars y Bos 1980). Se conoce que puede ser transmitido de manera no persistente por al menos 25 especies de áfidos (Cardin y Moury 2000; Crill et al. 1970; Hiruki y Hampton 1990; Jaspars y Bos 1980), además de transmitirse por semilla y polen en algunas especies vegetales, como en alfalfa (Jaspars y Bos 1980). La caracterización genómica del aislamiento argentino fue obtenida como parte de esta tesis y se describe en el Capítulo III, punto 3.1 (Figura 43).

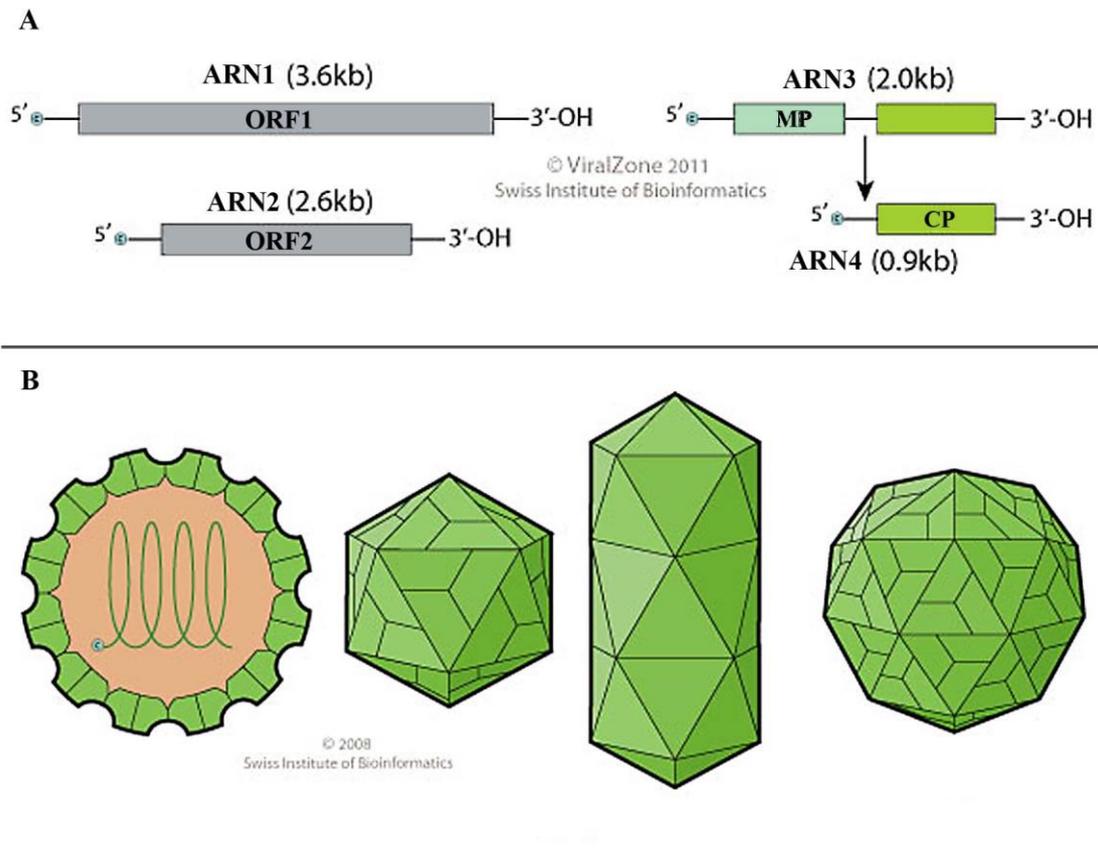


Figura 8. Esquema del genoma (A) y partículas virales (B) del AMV. Los ARNs genómicos (ARN1-3) y el subgenómico (ARN4) están representados por líneas y las cajas representan los ORFs. MP: proteína de movimiento. CP: cápside proteica. Extraído de <http://viralzone.expasy.org/133>

El ADV pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, cuyos miembros se caracterizan por sus partículas baciliformes consistentes en una nucleocápside rodeada por una envoltura lipídica. Su genoma está constituido por una única molécula lineal de ARN simple cadena de sentido negativo que codifica las proteínas de la Nucleocápside (N), Fosfoproteína (P), de la Matriz (M), Glicoproteína (G) y Polimerasa L (L) (Figura 9) (Jackson et al. 2005). Dentro de la familia *Rhabdoviridae*, hay 18 géneros (ICTV on line 2017b), dos de ellos infectan plantas: *Nucleorhabdovirus* y *Cytorhabdovirus* (Tordo et al. 2005). Las especies asignadas a ambos géneros se diferencian de acuerdo al lugar donde ocurre la replicación viral, la morfogénesis y la acumulación de viriones: el núcleo o espacio perinuclear y el citoplasma, respectivamente. Los miembros de esta familia, que afectan vegetales, no se transmiten por semilla pero sí de manera persistente por chicharritas y áfidos (Jackson et al. 2005). El ADV es un miembro del

género *Cytorhabdovirus* (Bejerman et al. 2015), se detectó en alfalfa en Argentina y no hay antecedentes de detección en otros países, u otros hospedantes distintos a alfalfa ni modos de transmisión.

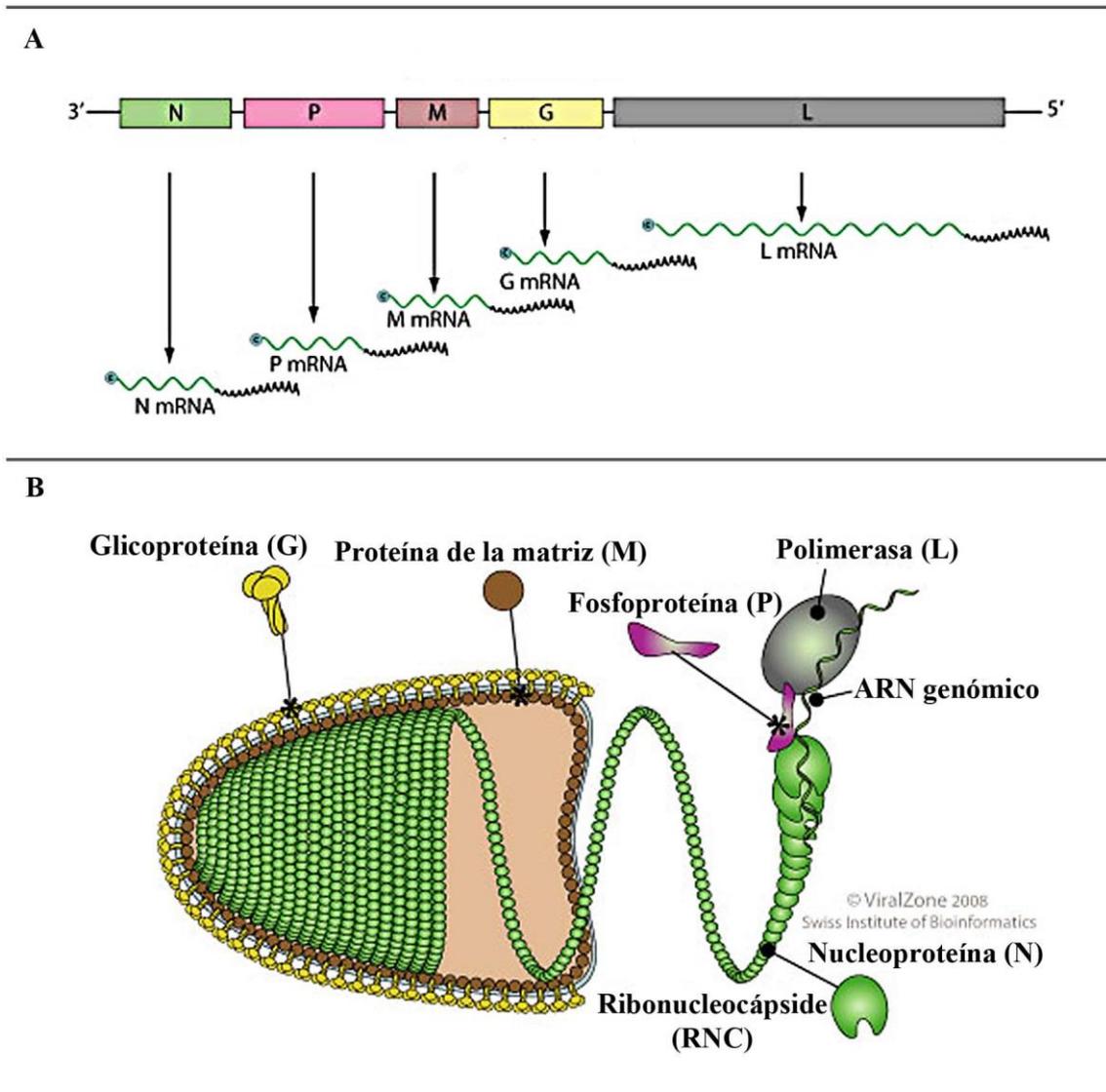


Figura 9. Esquema del genoma y ARNs codificados (A) y de la partícula viral y sus componentes (B), de los miembros de la familia *Rhabdoviridae*. Extraído de <http://viralzone.expasy.org/2>

El BLRV y el AEV-1 pertenecen a la familia *Luteoviridae*, géneros *Luteovirus* y *Enamovirus*, respectivamente. Las partículas virales de los miembros de esta familia son isométricas de 25 a 30 nm de diámetro, y los genomas son de ARN monocatenario sentido positivo conteniendo entre cinco a seis marcos abiertos de lectura (en inglés *Open Reading Frame-ORF*) los cuáles codifican supresores del silenciamiento de ARN

(ORF0), motivos helicasa o proteasa (ORF1), polimerasa de ARN dependiente de ARN (ORF1+2), proteína de la cápside (ORF3), proteína de movimiento (ORF4), posible factor de estabilidad del virión y de transmisión por áfidos (ORF3+5), y se desconoce la función del producto codificado por ORF6 (Domier 2012). Los análisis filogenéticos de las secuencias deducidas de aminoácidos de las polimerasas (ORF2) separan claramente a los miembros de esta familia en tres géneros: *Luteovirus*, *Enamovirus* y *Polerovirus*. Los luteovirus y enamovirus, se diferencian en que los primeros no contienen el ORF0, y a diferencia de los segundos, sí contienen al ORF4 y ORF6 (Domier 2012). Los virus pertenecientes a las familias *Luteoviridae* son transmitidos de manera persistente circulativa por áfidos (Hogenhout et al. 2008). El BLRV fue inicialmente informado en Alemania afectando cultivos de arveja (*Pisum sativum* L.) y habas (*Vicia faba* L.) en 1954 (Quantz y Völk 1954), infecta varias especies de leguminosas y se encuentra ampliamente distribuido en el mundo (Ashby 1984; Domier et al. 2002). La caracterización genómica del aislamiento argentino del BLRV fue obtenida como parte de esta tesis y se describe en el Capítulo III, punto 3.1 (Figura 44). El genoma de AEV-1, aislado de alfalfa en Argentina, consiste de 5726 nt y contiene cinco ORFs (Figura 10).

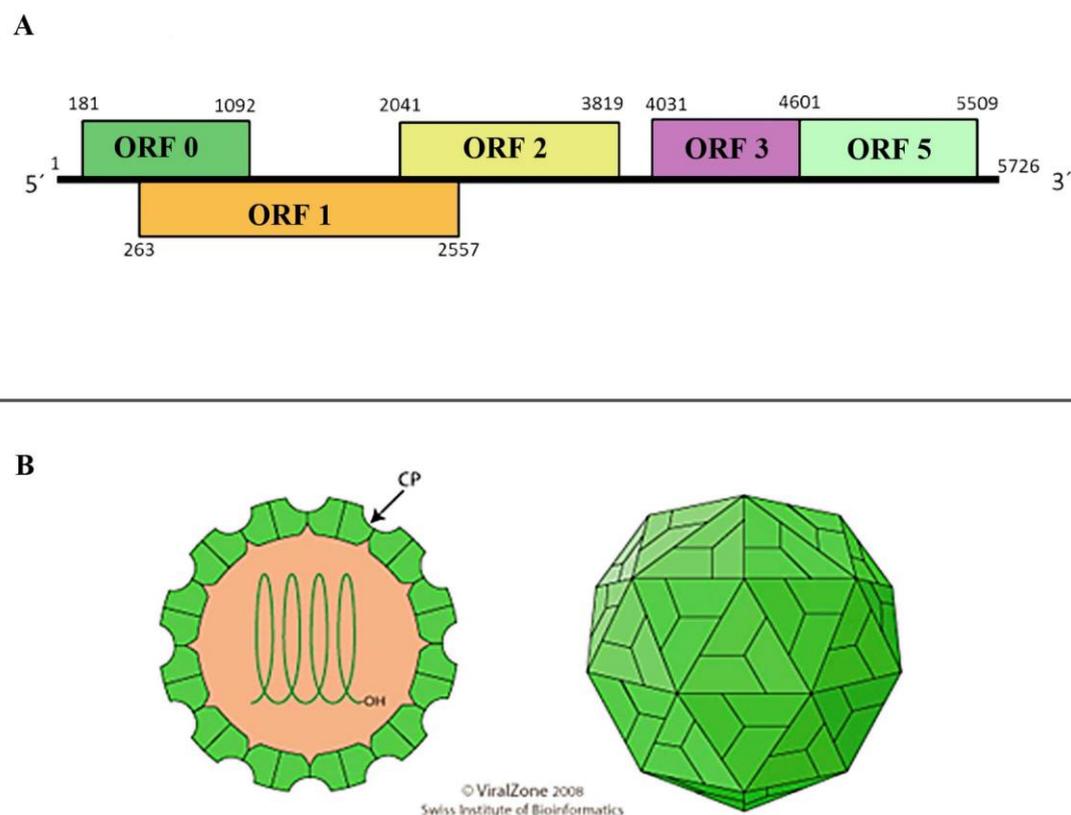


Figura 10. Diagrama de la organización genómica del AEV-1 aislado de alfalfa en Argentina (A) y partículas virales de la familia *Luteoviridae* (B). La línea sólida y las cajas representan el ARN monocatenario de sentido positivo y los marcos abiertos de lectura (ORFs), respectivamente. Las posiciones nucleotídicas donde comienza y termina cada ORF se indican con números. CP: cápside proteica. A: extraído de Bejerman et al., 2016. B: extraído de <http://viralzone.expasy.org/45>.

El ALCV pertenece a la familia *Geminiviridae* y es miembro del género recientemente creado *Capulavirus*, los que presentan características particulares como genoma monopartito, transmisión por áfidos, entre otros (Varsani et al. 2017). El genoma de ADN monopartito es simple cadena circular y ambisentido, compuesto por ~2.7 kb con siete genes (Bernardo et al. 2013). El genoma del aislamiento argentino del ALCV, codifica tres ORFs en sentido complementario superpuestos (C1, C2 y C3), dos regiones intergénicas y cuatro ORFs en sentido de la hebra del virión (V1, V2, V3 y V4) (Figura 11). Los ORFs C1 y C2 codifican proteínas involucradas en la replicación, V1 codifica para la cápside proteica (CP), V2 y V4 se sospecha que codifican proteínas involucradas en el movimiento; se desconoce la función de los productos del resto de

los ORFs. El ALCV se detectó en Francia y España, y puede infectar en condiciones naturales alfalfa y en condiciones experimentales habas (*Vicia faba*), y ser transmitido por el pulgón negro de las leguminosas (Bernardo et al. 2016; Roumagnac et al. 2015).

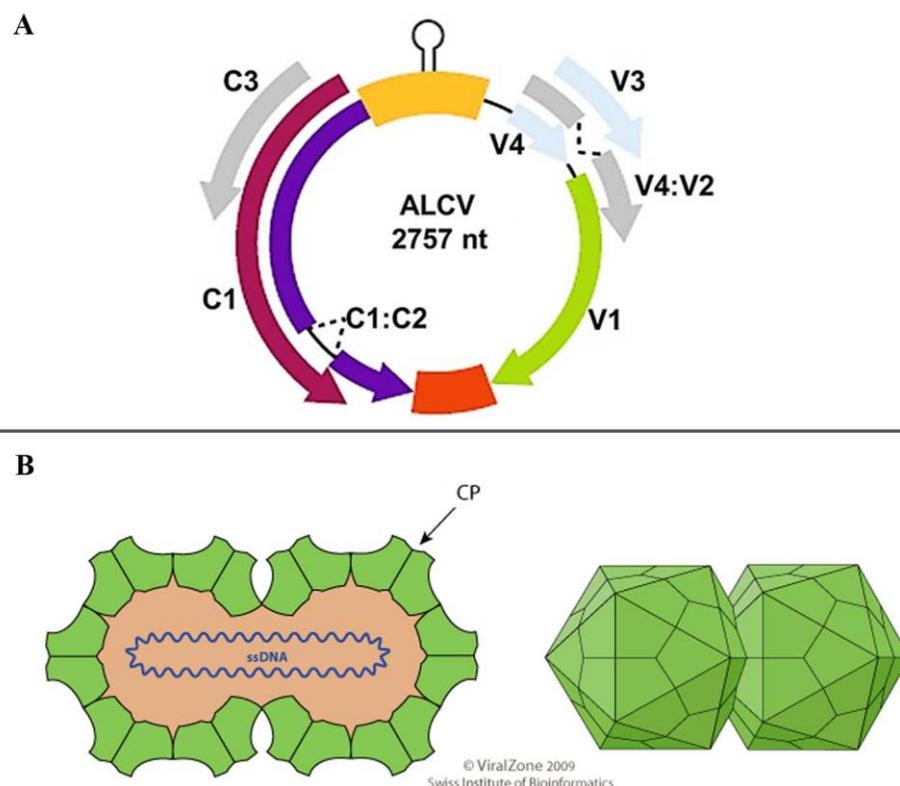


Figura 11. Esquema de la organización genómica de ALCV aislado de alfalfa en Argentina (A) y partículas virales del género *Capulavirus* (B). Las flechas indican las posiciones y sentidos de los siete ORFs (C= sentido complementario y V= sentido del virión). Las regiones intergénicas se indican en rojo y anaranjado. Además, se indica la estructura de horquilla en el origen de la replicación de la hebra del virión. CP: capsido proteico. A: extraído de (Bejerman, Giolitti, et al. 2017). B: extraído de <http://viralzone.expasy.org/7297>.

SOBRE ESTE CAPÍTULO

El presente capítulo comprende la determinación de los virus presentes en muestras de alfalfa con achaparramiento y la puesta a punto de métodos de diagnóstico para una eficiente detección de cada uno.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Preparaciones rápidas: se realizaron preparaciones rápidas tipo “*dip*” desde hojas y desde enriquecimientos virales provenientes de muestras de alfalfa enferma (cv. Costera) recolectadas en Manfredi, Córdoba. Para las primeras, el extracto se obtuvo macerando las hojas de alfalfa en tampón fosfato (0,01 M NaPO₄, pH 7,0) en relación 1/4 (p/v). Para las segundas, se obtuvo homogeneizando 50 g de tejido vegetal en Tampón Tris-Citrato (0,01 M Tris, 0,01M Citrato de Sodio pH 7,0 y 0,5% 2-Mercaptoethanol), luego se lo filtró con gasa sintética y se emulsionó con 25% de cloroformo. Al emulsionado se lo clarificó por centrifugación (10 min a 10.000 rpm). La fase acuosa fue centrifugada sobre colchón de sacarosa 20% en TC (2,30h, 26.000 rpm, rotor Beckman 45Ti). El precipitado fue resuspendido en TC. En ambos casos, las rejillas de ME fueron incubadas sobre una gota del extracto correspondiente durante 10 min, luego lavadas con 30 gotas de agua destilada, teñidas con 2% acetato de uranilo (Kitajima y Nome 1999) y finalmente observadas en un microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL JEM 1200 EX II (Jeol, Tokio, Japón).

Immuno Sorbent Electron Microscopy (ISEM): se sensibilizaron rejillas para ME con antisuero específico al virus (Leibniz-Institut DSMZ GmbH, Braunschweig, Alemania) diluido 1/100 en tampón fosfato (0,01 M NaPO₄, pH 7,0) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavaron con tampón fosfato, se secaron con papel de filtro e incubaron 15 min sobre gotas del extracto de alfalfa enferma (Manfredi, Córdoba) macerada 1/4 (p/v) en tampón fosfato. Las rejillas se lavaron con agua destilada y luego de su tinción negativa con 2% acetato de uranilo se observaron al MET (Kitajima y Nome 1999).

Cortes ultrafinos: se realizaron cortes ultrafinos de hojas de plantas de alfalfa infectadas solo con ADV (Clon 340, Capítulo II). Las muestras se fijaron por al menos 1 h en solución Karnovsky, se las enjuagó con 0,05M cacodilato pH 7,0, se las postfijo por 1-2 h en osmio al 1%, y posteriormente se contrastaron con acetato de uranilo 0,5%, para luego ser deshidratadas usando concentraciones seriadas de acetona e incluidas en resina Spurr (Spurr low viscosity embedding media kit ®. Data Sheet # 217 Polysciences, INC.) durante 48h a 60-80°C. Los cortes ultrafinos (70-90 nm) se

realizaron con el ultramicrotomo LEICA ultracut R, se contrastaron con acetato de uranilo al 2% (Kitajima y Nome 1999) y se observaron al MET.

2.2. MÉTODOS MOLECULARES

Luego de la observación de los preparados al MET, donde se visualizaron partículas virales con diversas morfologías y en base a bibliografía consultada, se realizaron ensayos de RT-PCR utilizando oligonucleótidos degenerados para las secuencias conservadas del gen de la polimerasa L de los rhabdovirus (Lamprecht et al. 2009) y específicos para el AMV y PEMV-1 empleando los iniciadores AMV-F2 y AMV-R2 (Xu y Nie 2006) y PEMV-D y PEMV-R (Tornos et al. 2008), respectivamente.

2.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las extracciones de ácidos nucleicos totales se realizaron empleando el método con CTAB (Doyle y Doyle 1987) y las de ARNs totales mediante el método fenólico del TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (Chomczynski y Sacchi 1987). La pureza y concentración de las extracciones se analizaron utilizando un espectrofotómetro (Nano Drop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Las muestras de ácidos nucleicos se almacenaron a -70°C hasta su uso.

2.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS

Se realizó manualmente y empleando el programa AmplifX v1.5.0. Los mejores pares de oligonucleótidos se seleccionaron en base a su calidad y especificidad según este mismo programa y se corroboraron con la herramienta *Primer-BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Se diseñaron oligonucleótidos para las regiones de las CPs virales del AMV, ALCV y BLRV, denominados AMV-F/AMV-R, ALCV-F/ALCV-R y BLRV-F/BLRV-R, los cuáles amplifican fragmentos de 884, 690 y 955 pb, respectivamente (Tabla 2). En el caso de los enmovirus, los oligonucleótidos específicos para AEV-1 y PEMV-1 (AEV-F/R y PEMV-F/R, respectivamente) se obtuvieron a partir de un archivo fasta con las secuencias nucleotídicas de las CPs del AEV-1 y de las cuatro secuencias del PEMV-1 (Y09099, HM439775, L04573, Y09100) con las que presentó mayores

similitudes según BLASTn (~79%). Luego, se alinearon con el programa Clustal X2 (Larkin et al. 2007), se visualizó el alineamiento con el programa BioEdit v7.0.9.0 (Hall 1999) y se diseñaron y seleccionaron los oligonucleótidos *forward* y *reverse* específicos para los genes completos de las CPs de ambos virus (Tabla 2). Para el ADV se diseñaron oligonucleótidos que amplifican parte del gen de la polimerasa L, denominados ADV-F1/R1, y un segundo juego (ADV-F2/R2) que hibridan en forma anidada a los primeros (ADV-F1/R1). Además, se diseñaron oligonucleótidos en la región del gen de la nucleocápside, el cual es altamente transcrito, denominados ADV-F3/R3 (Tabla 2).

Tabla 2. Detalle de los oligonucleótidos diseñados para la detección de los virus identificados en alfalfa, región del genoma y tamaño de banda que amplifican.

Virus	Oligonucleótido <i>Forward</i>	Oligonucleótido <i>Reverse</i>	Región que Amplifica	Tamaño de Banda
AMV	<u>AMV-F:</u> ATAGATGCCGGTTCTCCAAAGGGT-3'	5'- <u>AMV-R:</u> GACTTCATACCTTGACCTTAATCCAC-3'	Gen de la CP	884 pb
ADV	<u>ADV-F1[#]:</u> GGCATCCTATGGTCAATAGC-3'	5'- <u>ADV-R1[#]:</u> TGACCAGTGAAAGATGACG-3'	Gen de la Polimerasa L	964 pb
(PCR anidada)	<u>ADV-F2:</u> TGGCAGGCATAGTCTTGAGGATT-3'	5'- <u>ADV-R2:</u> TCCACTTCTCGAAGTCCAGTGACA-3'		549 pb
ADV	<u>ADV-F3:</u> ATCAGCTTCAGCTGCCCTTTG-3'	5'- <u>ADV-R3:</u> TCTTCCAGATGGACCCTGCTTCA-3'	Gen de la Nucleocápside	394 pb
AEV-1	<u>AEV-F:</u> CAGAGTGATAATGCCGACGAA-3'	5'- <u>AEV-R:</u> CGTTCCTCTCAGAGATTATACGG-3'	Gen de la CP	716 pb
ALCV [#]	<u>ALCV-F:</u> 5'-GAGAACGTATGGATT-3'	<u>ALCV-R:</u> 5'-GTTACATGACCATCT-3'	Gen de la CP	690 pb
BLRV	<u>BLRV-F:</u> TAGGTTCCCTTCGATTACAAG-3'	5'- <u>BLRV-R:</u> CTTCAATATTCGTCCAGTTC-3'	Gen de la CP	955 pb
PEMV	<u>PEMV-F:</u> CCCAAGACCCTCCAATAAGC-3'	5'- <u>PEMV-R:</u> GATTCCGGGTACGCCTTCATAG-3'	Gen de la CP	710 pb

Oligonucleótidos diseñados por el Dr. Nicolás Bejerman

2.5. RT Y PCRs

Se emplearon ácidos nucleicos totales extraídos de muestras de alfalfa sanas y enfermas como controles sanos y enfermos, respectivamente. En el caso del PEMV, las extracciones se realizaron a partir de un testigo enfermo comercial (LOEWE Biochemica GmbH, Alemania).

Las RTs para AMV, ADV, BLRV, AEV-1 y PEMV se realizaron a 42°C durante 60 min empleando la transcriptasa reversa MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Promega) en un volumen final de reacción de 12 µl, conteniendo ~300 ng de ácidos nucleicos (ya sean extraídos con TRIZOL o CTAB); 0,1 µM de los oligonucleótidos específicos al virus a detectar; 2,5 µl del tampón de reacción 5x; 0,5 mM de la mezcla de dNTPs y 100 U de la retrotranscriptasa.

Las PCRs se llevaron a cabo con la T-Plus ADN polimerasa (INBIO HIGHWAY, Argentina) en un volumen final de reacción de 25 µl, conteniendo 2 µl de cDNA (para las detecciones del AMV, BLRV, AEV-1, PEMV y ADV) o ~300 ng de ácidos nucleicos totales para la detección del ALCV; 0,2 µM de los oligonucleótidos específicos; 2,5 µl del tampón de reacción 10x; 0,2 mM de la mezcla de dNTPs; 3 mM de MgCl₂ y 1 U de la ADN polimerasa. El ciclado se realizó en un T3000 Thermocycler (Biometra, Goettingen, Alemania) y se ajustaron las condiciones de ciclado para cada caso (Tabla 3, Tabla 4). Los resultados se visualizaron siguiendo protocolos estándares con geles de agarosa al 1,4% en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE), tinción con GelRed™ (Biotum Inc., EUA) o bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y observación con luz UV empleando un analizador de imágenes Universal Hood II (BioRad, Hercules, US).

Tabla 3. Condiciones de ciclado para la detección del ADV (PCR anidada).

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de Ciclos
1	94	4	-
2	94	1	
3	52 ^{F1 y R1}	1	15 ciclos
4	72	1	
5	94	1	
6	56 ^{F2 y R2}	1	25 ciclos
7	72	1	
8	72	10	-
9	10	24 horas	-

Tabla 4. Condiciones de ciclado para la detección del AMV, ADV (Oligonucleótidos ADV-F3 y -R3), AEV-1, ALCV, BLRV y PEMV.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de Ciclos
1	94	4	-
2	94	1	
3	60 ^{AMV}	1	35 ciclos
	65 ^{ADV}		
	55 ^{AEV-1}		
	51 ^{ALCV}		
	52 ^{BLRV}		
	55 ^{PEMV}		
4	72	1	
5	72	10	-
6	10	24 horas	-

2.6. SONDAS DE HIBRIDACIÓN MOLECULAR

Síntesis y cuantificación de sondas no radiactivas: se sintetizaron sondas de ADN empleando el DIG DNA Labeling Kit (ROCHE Applied Science, Alemania) marcando los productos purificados de las RT-PCRs de manera no radiactiva con digoxigenina-11-UTP mediante el método de *random primed*, según especificaciones del fabricante. Las reacciones de RTs y PCRs se realizaron según lo detallado en el punto 2.5 empleando los oligonucleótidos y temperaturas de hibridación detallados en la Tabla 5. La purificación de los productos de las RT-PCRs se realizó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), según instrucciones del fabricante. La cantidad de sonda marcada se evaluó comparando cualitativamente la reacción de detección con una sonda de concentración conocida (5 ng/μl) provista en el kit de marcación ROCHE (control marcado-DIG). Se realizaron diluciones seriadas 1/10 del control positivo y de las sondas sintetizadas, y se sembraron en una membrana de nylon cargada positivamente (ROCHE) 1,5 μl y 1 μl de cada dilución para el caso del AMV y ADV, respectivamente. Luego, se fijaron las sondas a la membrana por exposición a luz ultravioleta (UV) y se realizó la detección inmunológica.

Ensayos con las sondas sintetizadas: se sembraron diferentes concentraciones de ARN total proveniente de alfalfas enfermas, sanas y de material vegetal heterólogo (*Nicotiana occidentalis* sana). La siembra (1 μl) se realizó en membranas de nylon cargada positivamente (Roche), los ácidos nucleicos se fijaron por exposición a la luz UV y luego de la hibridación de 16 h a 65°C con la sonda (20 ng de sonda/ml de solución de hibridación) y lavados de astringencia a 68°C, se realizó la detección inmunológica empleando el *DIG Nucleic Acid Detection* (Roche), utilizando anticuerpo antidioxigenina-conjugado con fosfatasa alcalina y visualizando los resultados por precipitado del sustrato NBT-BCIP, según indicaciones del fabricante.

Tabla 5. Detalle de las secuencias de los oligonucleótidos, temperatura de annealing empleada y región del genoma que amplifican para su posterior marcado no radiactivo (digoxigenina-11-UTP)

Sonda	Oligonucleótido <i>forward</i>	Oligonucleótidos <i>reverse</i>	Región del genoma que amplifica	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Tamaño amplificado (pb)
AMV	5'-CCTCTGAGTCTGAGCTCTTT-3'	5'-CGATCAAAGATCGTCAGCTTC-3'	Cápside Proteica	48	479
ADV-L1	5'-GGCATCCTATGGTCAATAGC-3'	5'-TGACCAGTGAAAGATGACG-3'	Polimerasa L	52	964
ADV-L2	5'-GGCATCCTATGGTCAATAGC-3'	5'-CTGCACTACCTTCTCCTTC-3'	Polimerasa L	49	216
ADV-G	5'-ACTCGGACTCCATCAAC-3'	5'-GTGAAGTGCCGACACAGAC-3'	Glicoproteína	50	790
ADV-N	5'-AGATACCGAAGGCATCCAGCTCAA-3'	5'-ACCCAAGCAACCCATGTTCCCTATC-3'	Nucleocápside	65	802

2.7. ELISAs

Se adquirieron antisueros comerciales para la detección de AMV por DAS-ELISA (LOEWE Biochemica GmbH, Alemania) y de BLRV por TAS-ELISA (Leibniz-Institut DSMZ GmbH, Braunschweig, Alemania) que fueron testados para emplearlos en el análisis masivo, rápido y confiable de muestras locales. Para los demás virus (ADV, AEV-1 y ALCV) no existen reactivos serológicos comerciales. ADV y AEV-1 son descritos por primera vez en el país como parte del proyecto en el que se incluye esta tesis y ALCV ha sido recientemente descrito en Europa.

3. RESULTADOS

3.1. IDENTIFICACIÓN VIRAL

Se emplearon técnicas de microscopía electrónica para una primera observación de las plantas con síntomas de achaparramiento. En las preparaciones *dip* de macerados de hojas, evaluadas al MET, se observaron partículas desde cuasiesféricas a baciliformes con diámetros de unos 18 nm y longitudes variables entre los 30 y 60 nm, similares a las descritas para el AMV (resultado no mostrado). Mientras que en las preparaciones realizadas con enriquecimientos virales, se pudieron observar las mencionadas y otros dos tipos de partículas diferentes: isométricas de unos 30 nm de diámetros y alargadas de más de 200 nm de longitud, semejantes a las que presentan miembros de las familias *Luteoviridae* y *Rhabdoviridae*, respectivamente (Figura 12).

Las observaciones de grillas sensibilizadas con antisuero al BLRV (ISEM) mostraron únicamente partículas virales de unos 30 nm de diámetro, similares a las de este virus, las que se encontraban en escasa cantidad (Figura 13). La observación de cortes ultrafinos de tejidos de alfalfa infectada con ADV, para determinar su presencia y localización intracelular, mostró una única partícula viral ubicada en el citoplasma de una célula del floema, indicando su escasa concentración en el tejido vegetal, con ~80 nm de diámetro y ~420 nm de largo y morfología similar a la de los rhabdovirus (Figura 14). No se observó ningún otro tipo de partícula de posible origen viral.

Mediante RT-PCR, y empleando iniciadores degenerados o específicos para los virus o grupo de virus de los que se sospechaba, se detectó al ADV, AMV y AEV-1/PEMV-1. Además, se detectaron serológicamente al AMV y BLRV empleando sueros comerciales.

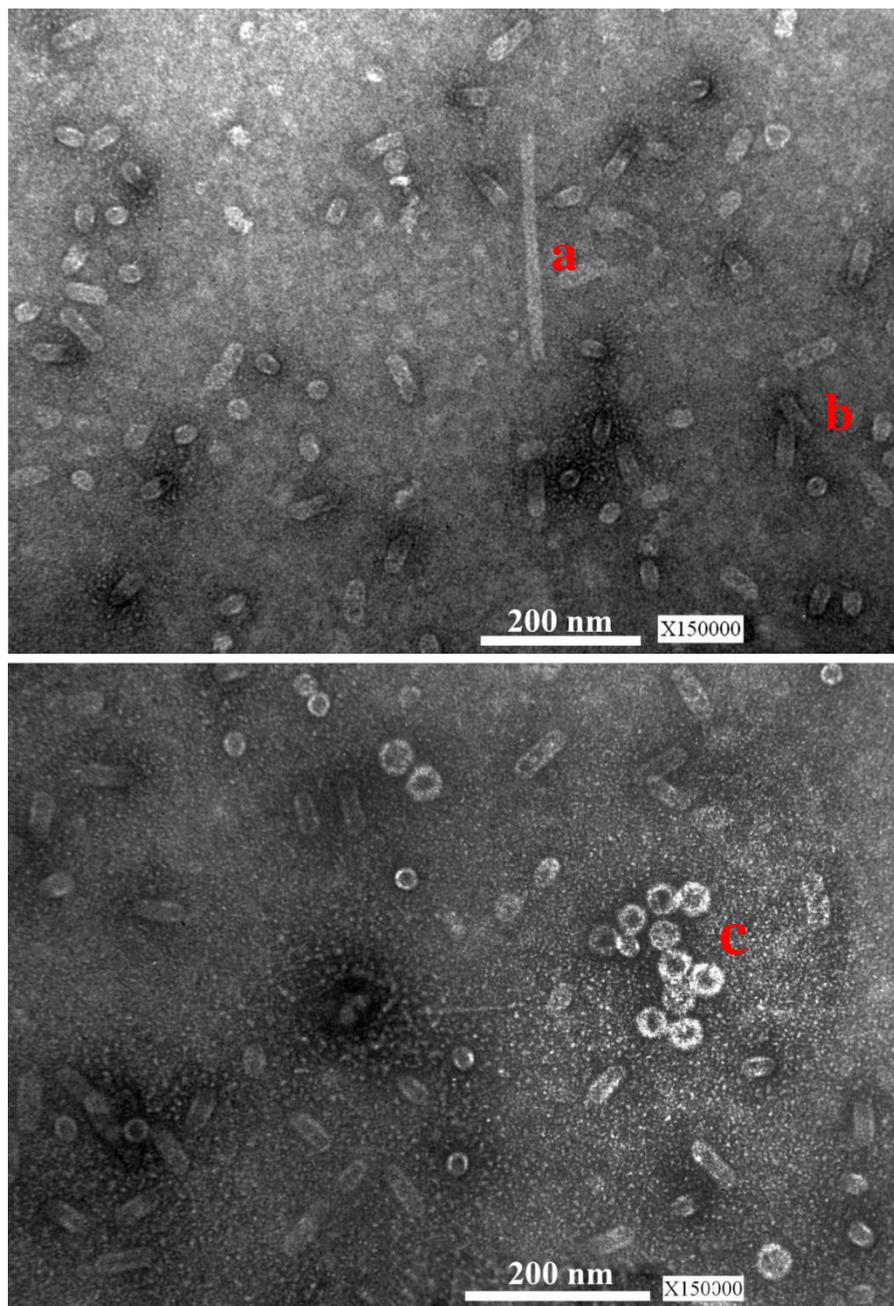


Figura 12. Fotografía de las partículas virales observadas al MET en preparaciones rápidas obtenidas desde un enriquecimiento viral de muestras de alfalfa con achaparramiento, similares a rhabdovirus (a), AMV (b) y luteovirus (c).

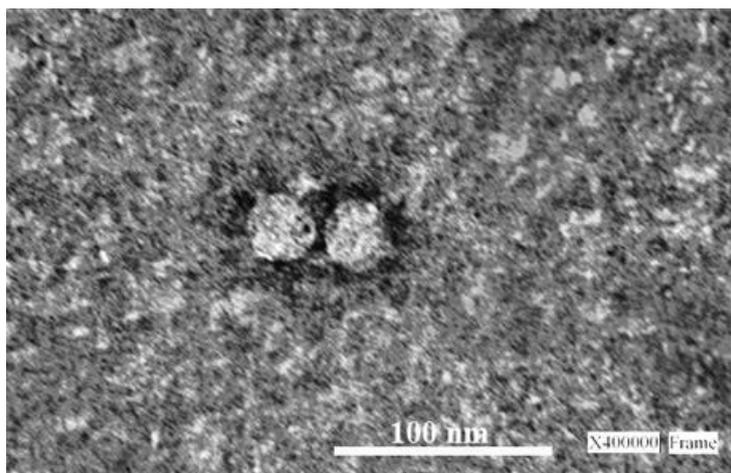


Figura 13. Partículas virales con ~ 30 nm de diámetro capturadas con el antisuero específico al BLRV.

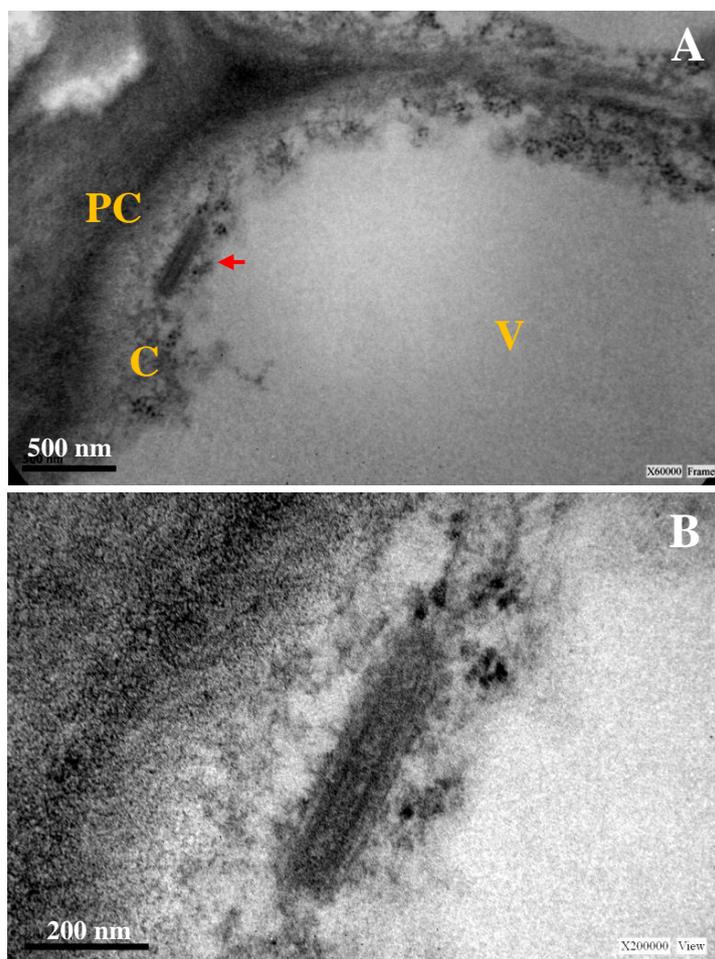


Figura 14. Partícula observada al MET en cortes ultrafinos del clon de alfalfa 340. A) Partícula baciliforme, similar a la de rhabdovirus, observada en el citoplasma de células del floema. PC: Pared Celular, C: Citoplasma, V: Vacuola. B) detalle de la partícula viral.

3.2. AJUSTE DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

3.2.1. RT y PCRs

Los oligonucleótidos diseñados junto con las condiciones de ciclado optimizadas permitieron la detección de los virus identificados en alfalfa. Se obtuvieron bandas de tamaños compatibles con los esperados al analizar muestras enfermas (884, 549/394, 716, 690 y 955 pb para AMV, ADV, AEV-1, ALCV y BLRV, respectivamente) y no se observó amplificación en las muestras sanas (Figuras 15,16). Estos resultados para los virus de ARN, se reprodujeron independientemente del método de extracción de ácidos nucleicos utilizado.

La PCR anidada para el ADV empleando los oligonucleótidos ADV-F1/ADV-R1 y ADV-F2/ADV-R2, permitió identificar al virus en muestras que previamente habían resultado negativas por PCR no anidada con ADV-F1/ADV-R1, posiblemente por la escasa acumulación de este virus en alfalfa (Figura 15).

Debido a que la detección inicial del AEV-1 se realizó con oligonucleótidos publicados para el PEMV-1 (Tornos et al. 2008), los cuáles los amplifican inespecíficamente, se diseñaron los oligonucleótidos específicos AEV-F/R y PEMV-F/R para la detección de AEV-1 y PEMV-1, respectivamente, de manera de evitar posibles confusiones de identidad. Las RT-PCRs para la detección de ambos virus resultaron específicas, permitiendo su clara discriminación (Figura 16).

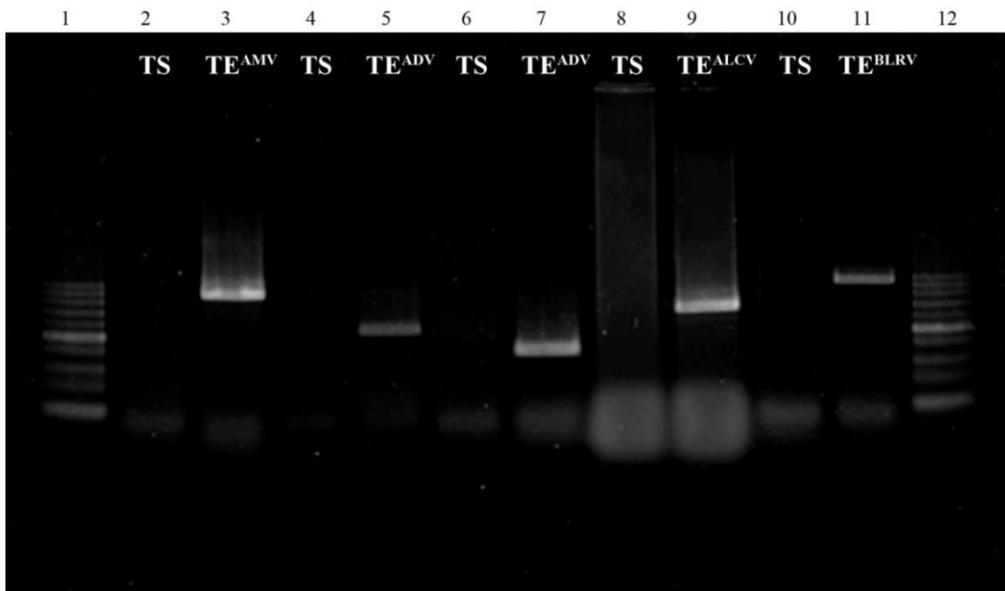


Figura 15. Resultados obtenidos por RT-PCR empleando los oligonucleótidos AMV-F/AMV-R (Calles 2 y 3), ADV-F1/ADV-R1 + ADV-F2/ADV-R2 (anidada) (Calles 4 y 5), ADV-F3/ADV-R3 (Calles 6 y 7), y BLRV-F/BLRV-R (Calles 10 y 11); y por PCR para el ALCV con los oligonucleótidos ALCV-F/ALCV-R (Calles 8 y 9). Se utilizaron ácidos nucleicos totales extraídos de muestras de plantas de alfalfa sanas (testigo sano) y enfermas (testigo enfermo). Calles: N°1 y 12: marcador de peso molecular de 100 pb (Promega); N°2, 4, 6, 8 y 10: testigos sanos (TS); N°3, 5, 7, 9 y 11: testigos enfermos (TE). Volumen de siembra: 8 μ l.

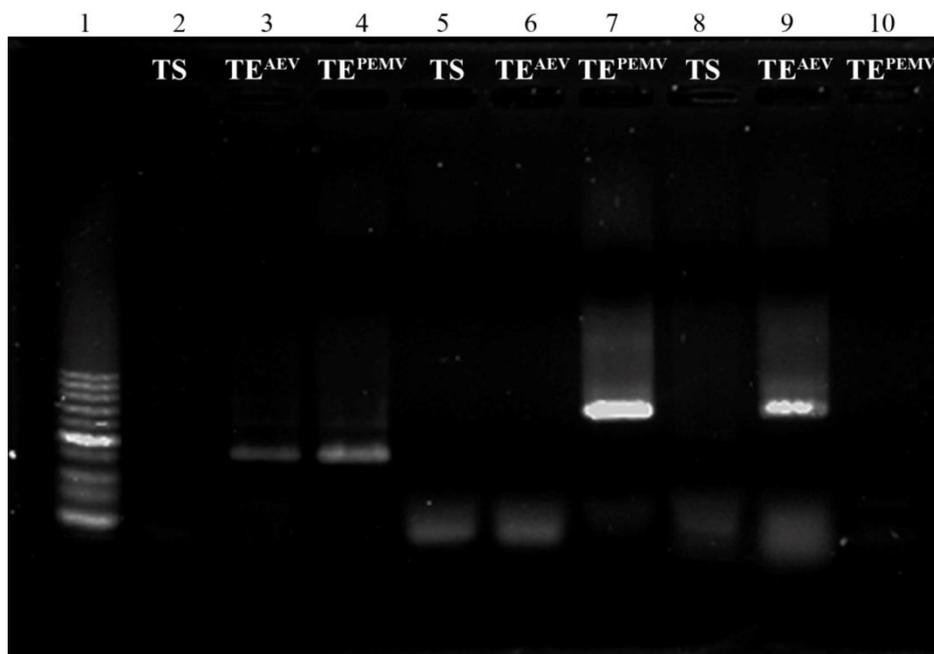


Figura 16. Resultados obtenidos por RT-PCR para la detección diferencial de enamovirus. Calles 2-4: oligonucleótidos reportados para PEMV-1; calles 5-7: PEMV-F/PEMV-R; calles 8-10: AEV-F/AEV-R. Calle N°1: marcador de peso molecular de 100 pb (Promega); calles N°2, 5 y 8: testigo sano (TS); calles N°3, 6 y 9: TE AEV-1; calles N°4, 7 y 10: TE PEMV.

3.2.2. Sondas de hibridación

Se decidió ajustar la técnica de sondas de hibridación molecular para contar con una misma técnica de detección para los dos virus identificados hasta ese momento (AMV y ADV).

Al sintetizar la sonda de ADN para el AMV, se obtuvo 7 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ de sonda marcada (Figura 17 A; Tabla 6), la cual resultó efectiva para detectar este virus en plantas enfermas (Figura 18). Se ensayaron distintas condiciones de trabajo y las determinadas como óptimas fueron: hibridación a 65 °C, 20 ηg de sonda por ml de solución de hibridación y lavados astringentes realizados a 68 °C. Bajo estas condiciones, la sonda para el AMV detectó muestras enfermas a concentraciones de 1 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$, aunque a diferentes intensidades, presentando fuertes reacciones a mayores concentraciones de siembra de ARN total (100 y 10 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$). De esta manera, se logró detectar eficientemente al AMV en ARNs totales extraídos de plantas de alfalfa enfermas, y no se obtuvo reacción con los ARNs de las muestras sanas y de *N. occidentalis* (heterólogo) (Figura 18).

Al no obtenerse los resultados esperados para el ADV se marcaron, en forma sucesiva, cuatro sondas (ADV-1 a ADV-4). Las concentraciones de sonda obtenidas variaron entre 0,4 y 50 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$, donde la menor y mayor eficiencia de marcado se obtuvo con las sondas ADV-3 y ADV-4, respectivamente (Figura 17 B; Tabla 6). Sin embargo, ninguna reaccionó eficientemente con las muestras de alfalfa enfermas, obteniéndose con las cuatro sondas, igual nivel de reacción en plantas enfermas, muestras sanas y heterólogas, aun ensayando distintas condiciones de hibridación y lavados astringentes (resultados no mostrados). Por lo tanto el empleo de sondas de hibridación molecular no resultó un método de diagnóstico eficaz para el ADV en muestras de alfalfa enfermas, posiblemente porque la concentración de los ácidos nucleicos del virus en plantas enfermas no alcance los niveles de detección de la técnica.

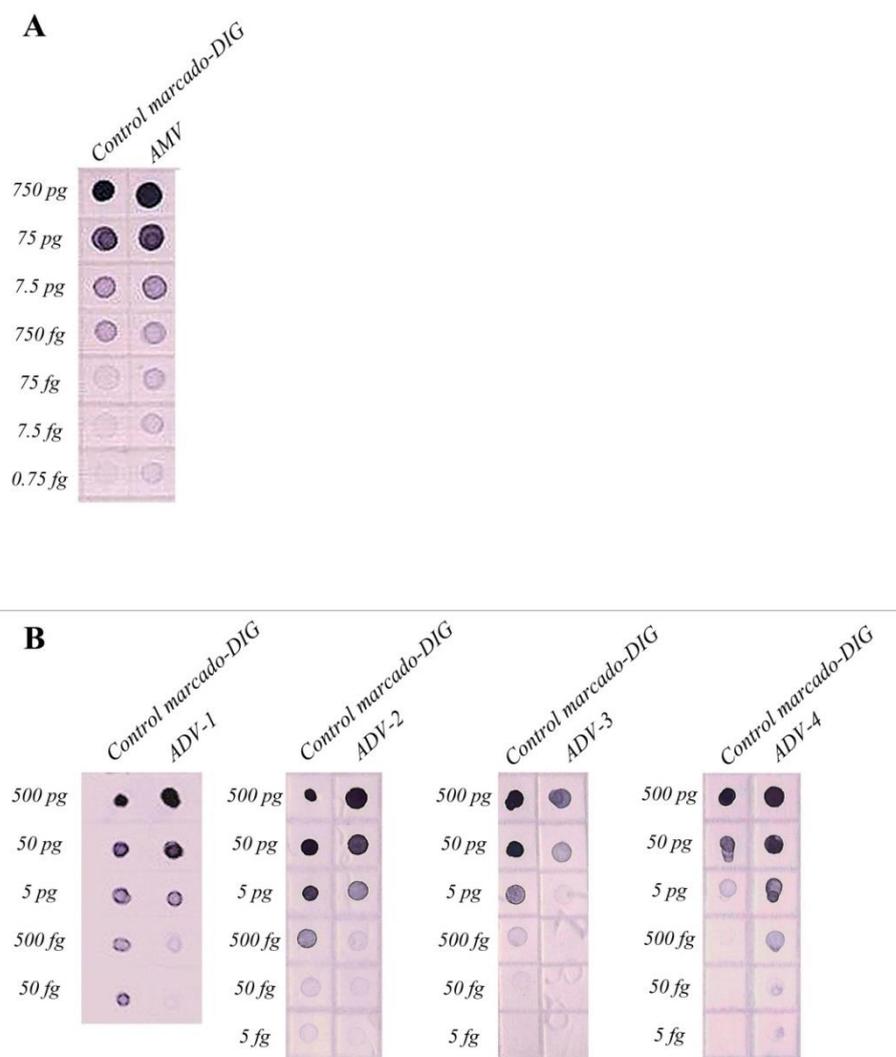


Figura 17. Comparación de las sondas marcadas para AMV (A) y ADV (B) con los controles del kit. Se sembraron diluciones seriadas del control marcado-DIG y de cada sonda sintetizada. Los volúmenes de siembra fueron de 1,5 μ l y 1 μ l para AMV y ADV, respectivamente. A la izquierda de cada membrana se indican las cantidades del control marcado-DIG sembrado.

Tabla 6. Concentraciones estimadas de sonda según comparación con el control marcado-DIG (Figura 17).

Sonda	AMV	ADV-1	ADV-2	ADV-3	ADV-4
Concentración (η g/ μ l)	7	4	0,5	0,4	50

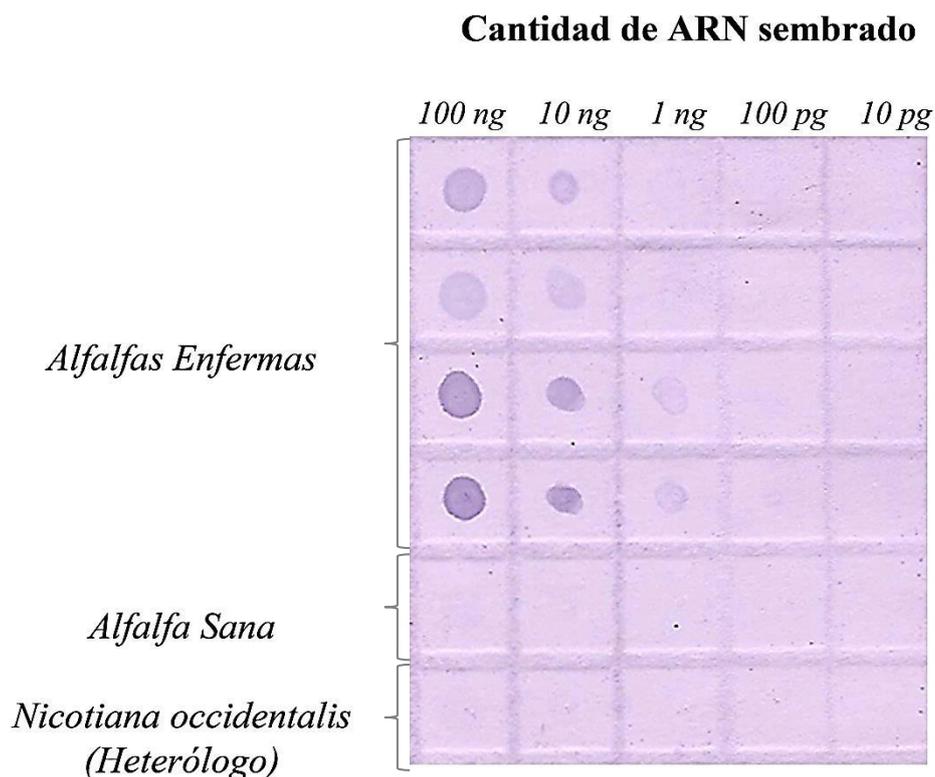


Figura 18. Detección del AMV en 4 plantas de alfalfa enfermas mediante hibridación molecular con sonda de ADN. Volumen de siembra: 1 μ l.

3.2.3. Detección serológica

Mediante las técnicas serológicas de DAS-ELISA y TAS-ELISA y empleando As comerciales para el AMV y BLRV, respectivamente, se pudo detectar a los aislamientos argentinos de estos virus (Tabla 7).

Tabla 7. Promedios de los valores de absorbancia de controles positivos (provistos por el kit), y muestras enfermas y sanas utilizados en la detección del AMV y BLRV mediante DAS- y TAS-ELISA, respectivamente.

Detección Serológica del	Promedio de absorbancias		
	Controles positivos	Muestras positivas	Muestras negativas
AMV	1,1	0,6	0,012
BLRV	1,3	0,7	0,013

4. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO

Las preparaciones rápidas y cortes ultrafinos de plantas infectadas con virus y su observación con técnicas de microscopía electrónica son particularmente útiles para obtener los primeros indicios en la detección viral (EPPO 2015; Kitajima y Nome 1999). En esta tesis, se observaron partículas virales similares a las reportadas para los miembros de las familias *Bromoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Luteoviridae* (King et al. 2011). La partícula viral similar a la de los rhabdovirus observada al MET a partir de enriquecimientos virales, presenta un tamaño menor al observado en los cortes ultrafinos, esto posiblemente se deba al empleo de cloroformo en la técnica de enriquecimiento empleada, el que pudo haber removido la envoltura glicoproteica de los viriones. En los cortes ultrafinos se localizó una partícula viral semejante a la de los rhabdovirus en el citoplasma de las células del floema, la cual correspondería al ADV. La localización de esta partícula en el citoplasma celular confirmaría que se trata de un miembro del género *Cytorhabdovirus*, como ya se determinó a través de estudios moleculares (Bejerman et al. 2011, 2015) y en contraste a lo observado para el Alfalfa enation virus en alfalfa europeas que se aloja en el núcleo (Alliot et al. 1972). En la técnica ISEM, la cual combina la microscopía electrónica con el uso de antisueros específicos, en este caso específicos al BLRV, fue posible identificar a las partículas virales con morfologías similares a las reportadas para este virus (Domier 2012). Aunque esta técnica es rápida y sencilla, la aparente escasa concentración de este virus en planta no la hace apta para su empleo rutinario.

La detección de virus de planta mediante (RT)-PCR es una de las técnicas más potentes y sensibles debido a la amplificación exponencial de las secuencias de ADN virales (Dietzgen 2002). En este trabajo, se lograron detectar eficientemente los cinco virus presentes en alfalfa en Argentina, y esto, en el caso de los virus de ARN, se logró con ambos métodos de extracción de ácidos nucleicos. El hecho de haber detectado al AEV-1 con los oligonucleótidos diseñados para el PEMV-1 por Tornos y colaboradores (2008), indica que los mismos no son específicos a este virus, problema que fue salvado al diseñar oligonucleótidos específicos al AEV-1. En el caso de la detección mediante hibridación molecular, se obtuvieron sondas con diferentes concentraciones, lo que puede deberse a que la eficiencia de marcado depende de la cantidad de ADN patrón en la reacción y/o del tiempo de incubación (ROCHE 2004). El AMV pudo detectarse

eficientemente en muestras vegetales enfermas empleando hibridación molecular con una sonda sintetizada a partir del producto de PCR de la región de la CP. Similares resultados fueron obtenidos por otros autores al realizar estudios de variabilidad del AMV en cultivos de alfalfa de Arabia Saudita (Al-saleh y Amer 2013). Los resultados de los análisis realizados mediante técnicas de ME, sonda y RT-PCR, sugieren que el ADV se concentra escasamente en el tejido de plantas de alfalfa afectadas, ya que resultó muy difícil la localización de sus partículas mediante MET, a la imposibilidad de su detección mediante hibridación molecular y debido a que su detección es más eficiente mediante PCR anidada o amplificando el gen de la nucleocápside (altamente transcrito) que empleando PCR no anidada amplificando el gen de la polimerasa L (transcrito en menor proporción). La concentración que alcanza un virus en la planta es una característica intrínseca del mismo y algunos virus pueden alcanzar concentraciones muy altas como el *Potato virus X-PVX* mientras que otros muy bajas como el *Potato leaf roll virus* (PLRV) (Salazar 1995). Finalmente, la eficiente detección serológica de los aislamientos argentinos de AMV y BLRV mediante *kits* comerciales, además de permitir contar con dos técnica de diagnóstico, indica las altas similitudes serológica entre estos aislamientos y los empleados para producir los antisueros con el aislamiento mantenido en petunia para AMV, país de procedencia desconocido (LOEWE, com. pers., 2017) y con el aislamiento alemán colectado en *Pisum sativum* y mantenido en *Vicia faba* para el BLRV (DSMZ, com. pers., 2017).

5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

- Empleando microscopía electrónica se visualizaron partículas virales similares a las del AMV, BLRV/AEV-1 y ADV.
- Mediante RT y PCR, optimizando el diseño de oligonucleótidos y condiciones de ciclado, se logró detectar eficientemente los cinco virus presentes en plantas afectadas por el achaparramiento de la alfalfa: *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus* (ADV), *Alfalfa enamovirus-1* (AEV-1), *Bean leafroll virus* (BLRV) y *Alfalfa leaf curl virus* (ALCV).
- Se desarrolló una sonda de ADN para hibridación molecular, que permite diagnosticar la presencia del AMV en plantas de alfalfa enfermas con el complejo viral.
- Los antisueros comerciales permiten detectar eficientemente a los aislamientos argentinos de AMV y BLRV mediante DAS- y TAS-ELISA, respectivamente.



CAPÍTULO II

Estudio de aspectos biológicos del achaparramiento

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SÍNTOMAS DE LAS ENFERMEDADES

El estudio de los síntomas son de gran utilidad en el diagnóstico de las enfermedades, aunque presentan algunos inconvenientes ya que pueden ser afectados por las condiciones ambientales, características genéticas de la planta, agente causal y además, es frecuente encontrar un mismo tipo de síntoma causado por diferentes organismos o hasta por agentes abióticos (Rivera Coto 2007).

Una de las clasificaciones de los síntomas los agrupa en tres categorías: morfológicos, histológicos y fisiológicos. Los síntomas morfológicos son alteraciones de forma o estructura de la planta, o partes de esta, en respuesta a la presencia del agente causal y pueden subdividirse en necróticos (halos amarillos, marchitez, pudriciones, cancos, manchas necróticas, secamiento, entre otros), hipoplásticos (enanismo, clorosis, mosaico moteado, crecimiento en roseta) e hiperplásticos (tumores, callos, enrollamiento). Los síntomas histológicos ocurren a nivel de tejido y célula, y pueden agruparse en necróticos (citólisis, vacuolosis, plasmólisis) y plásticos (hiperplasia, hipertrofia). Finalmente, los síntomas fisiológicos son alteraciones en la respiración, transpiración, síntesis, nutrición y fotosíntesis de las plantas afectadas (Rivera Coto 2007). Un procedimiento eficaz para establecer si un organismo es el agente causal de una determinada enfermedad son los postulados de Koch, y son especialmente útiles cuando ocurre presencia simultánea de varios organismos y cuando no se pueden diagnosticar a partir de la observación de las estructuras del patógeno. La verificación de los postulados de Koch comprende la asociación del síntoma con la presencia del supuesto patógeno, el aislamiento del organismo desde los tejidos enfermos, su inoculación a una planta sana, la reproducción de los síntomas y el reaislamiento del patógeno de estas plantas inoculadas experimentalmente (Rezende et al. 2011). Los virus como agentes causales de enfermedades no son fáciles de someter a estos postulados, ya que no es posible cultivarlos en medios artificiales, por lo que se han diseñado variantes de este procedimiento en las que el cultivo puro se realiza sobre plantas susceptibles, a partir de las cuales el virus se transfiere a la planta donde se pretende reproducir la enfermedad (Rivera Coto 2007). A menudo uno de los obstáculos que surge es debido al desconocimiento de las vías de transmisión de los agentes

causales para poder aislarlos y mantenerlos artificialmente en plantas, lo que dificulta y enlentece la elucidación de la etiología de la enfermedad en estudio. Otro obstáculo que suele presentarse en la determinación de cuál/es es/son el o los agentes causales de una enfermedad viral es la existencia de coinfecciones con más de un agente patogénico. Las infecciones dobles o múltiples por virus son comunes en condiciones naturales y las interacciones que ocurren entre estos patógenos pueden ser sinérgicas o antagónicas. En una interacción sinérgica se puede incrementar la multiplicación de uno o más virus, pudiendo inducir síntomas más severos que los causados individualmente, mientras que en una antagónica, uno de los virus se beneficia y su presencia disminuye la acción del/los otro/s (Mascia y Gallitelli 2016; Rentería-Canett et al. 2011; Syller 2012). En general los virus no relacionados interactúan sinérgicamente y virus relacionados son mayormente antagónicos. Algunas de las enfermedades más destructivas en cultivos vegetales son el resultado de sinergismos virales (Zhou et al. 2017).

Se han descrito muchas enfermedades virales que afectan diferentes plantas y donde la presencia de enaciones es una característica de su sintomatología (Bos y Grancini 1963; Tordable et al. 1993). Sin embargo, esta sintomatología posee varias características en común con las “agallas” producidas como efecto de la alimentación de chicharritas (Bos y Grancini 1963) por lo que se deben tener en cuenta a la hora de determinar la etiología de los síntomas observados. En la enfermedad del achaparramiento de la alfalfa, el desarrollo de enaciones en las nervaduras de la cara abaxial de los folíolos es uno de los síntomas morfológicos más característicos y diferenciales de la enfermedad (Figura 5). Se define enación como cualquier excrecencia que generalmente es perpendicular al órgano/tejido a partir del cual se origina (Font Quer 1965). El estudio de las alteraciones histológicas que conforman una enación permite un mejor entendimiento de su desarrollo, reconociendo cual/es tejido/s están siendo afectados como consecuencia de la infección viral.

1.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE ENFERMEDADES

La distribución espacial es una de las características ecológicas más importantes de los patosistemas y generalmente expresa el proceso de dispersión del patógeno causal de la enfermedad. Este proceso es determinado por los mecanismos de transmisión y su conocimiento permite una mejor comprensión del patosistema en estudio. La mayoría

de las enfermedades, y de los patógenos, poseen más de un mecanismo de dispersión que garantizan su distribución a corta y larga distancia (Hau et al. 2011). Los virus pueden llegar a un cultivo agrícola debido principalmente al uso de semillas infectadas, al comportamiento de vectores y a la presencia de hospedantes alternativos.

El cultivo de alfalfa en Argentina, como ya mencionamos en la Introducción General, se destina tanto para la producción de forraje como a la producción de semillas. En cuanto a esta última, se reconocen varias zonas de producción distribuidas en 12 provincias, donde las mejores aptitudes agrícolas y por ende los mayores rendimientos, se encuentran en las zonas áridas bajo riego (Figura 19) (Basigalup 2007). En la producción de semilla de alfalfa, se ha reportado una pérdida anual de hasta el 10% debido a enfermedades que afectan al cultivo (Leath 1981) y al ser un cultivo perenne sufre el daño acumulativo de enfermedades y además, puede albergar insectos que suelen causar pérdidas en su productividad (Odorizzi 2015).

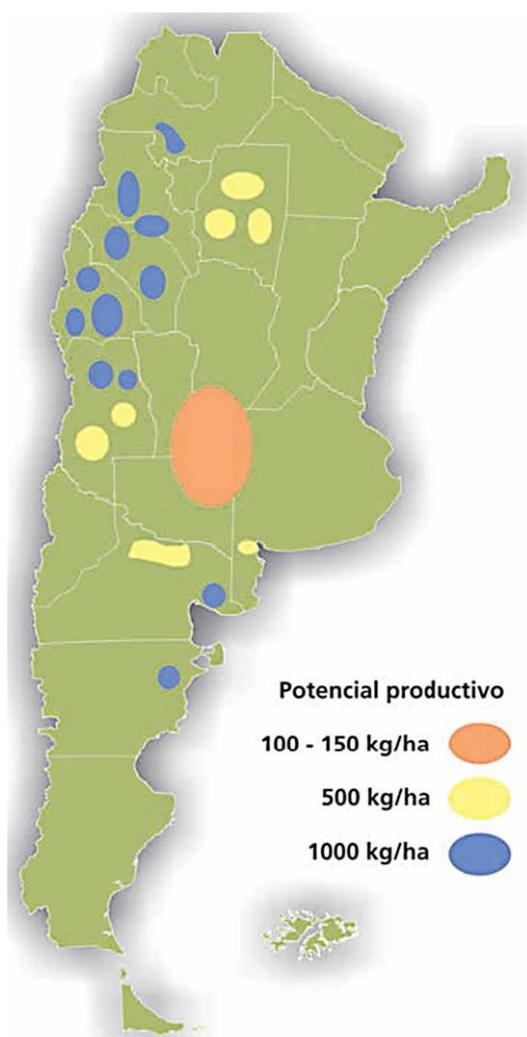


Figura 19. Áreas productoras de semilla de alfalfa en Argentina y respectivos rendimientos potenciales. Fuente: Basigalup 2007.

1.3. MODOS DE TRANSMISIÓN VIRAL

Una vía sencilla por la que un virus puede invadir una nueva planta es aprovechando sus modos de propagación, ya sea: vegetativa, por ejemplo mediante tubérculos, rizomas, bulbos, estolones, injertos, o por semilla, infectando los órganos reproductivos del huésped. También, ciertos virus pueden transmitirse de manera mecánica, es decir, aprovechando las microheridas producidas en las hojas por condiciones climáticas, roce de maquinarias agrícolas, animales, prácticas culturales del hombre, entre otros. La mayoría de los virus se dispersan mediante vectores, lo cual, a diferencia de la transmisión mecánica, es un proceso bastante específico y complejo, que depende de diferentes interacciones entre el virus, el vector y la planta (Rezende y Kitajima 2011).

1.3.1. Transmisión por semilla

La transmisión por semilla es el modo más eficiente para que un patógeno pueda perpetuarse en el tiempo, además de poder dispersarse a nuevas áreas geográficas. La siembra de semillas infectadas, dará origen a focos primarios de inóculo al inicio del ciclo del cultivo, y si además existe transmisión por vector, el virus podría dispersarse rápidamente por el cultivo pudiendo provocar importantes daños económicos en la producción (Rezende y Kitajima 2011). La eficiencia de la transmisión por semilla, como la proporción de semillas infectadas, dependen de varios factores: barreras físicas, bioquímicas y fisiológicas, de la cepa viral, de la especie del hospedero y factores ambientales (Johansen et al. 1994). Hay dos maneras de transmisión viral por semilla: externamente (sin infección del embrión), cuando los virus son capaces de contaminar las cubiertas externas de las semillas y luego transmitirse por contacto a las plántulas durante la germinación (Taylor et al. 1961); e internamente, por infección de los tejidos del embrión, generalmente infectando el ovario, aunque también hay casos donde los granos de polen infectados transmiten el virus al óvulo (Rezende y Kitajima 2011). Los virus que contaminan externamente las semillas, pueden ser inactivados por exposición a altas temperaturas durante algunas horas o sumergiendo las semillas en solución de fosfato trisódico 10% durante algunos minutos. En el segundo tipo de transmisión, la única manera de controlarlo es por medio de selección de semillas provenientes de plantas sanas (Rezende y Kitajima 2011).

1.3.2. Transmisión por vector de virus que afectan plantas.

Los insectos son los vectores más relevantes ya que pueden transmitir el 90% de los virus de plantas, siendo los pertenecientes al orden Hemiptera (pulgones, moscas blancas y chicharritas, entre otros) los más importantes (Ayllón et al. 2016). Originalmente, se habían propuesto dos tipos de transmisión para los virus de plantas teniendo en cuenta su persistencia en el vector: no persistentes y persistentes (Watson y Roberts 1939). Luego, se describieron virus de persistencia intermedia, por lo que se incorporó el modo de transmisión semipersistente (Sylvester 1958). Años después se dividió a la transmisión persistente en circulativa y propagativa, según el comportamiento del virus dentro del vector (Nault 1997). De esta manera, se pueden describir cuatro tipos básicos de mecanismos de transmisión de virus de plantas por insectos: no persistente, semipersistente, persistente circulativa y persistente propagativa. Una clasificación reciente tiene en cuenta la manera en la que los virus vegetales interactúan con sus insectos vectores: no circulativa, los virus se unen a lugares específicos de la cutícula sin ingresar en las células y sin atravesar las barreras del sistema digestivo del insecto; y circulativa, los virus ingresan al intestino y circulan y/o se replican dentro del cuerpo del insecto vector, alcanzando la hemolinfa y acumulándose en el interior de las glándulas salivales (Ayllón et al. 2016; Blanc et al. 2014). Teniendo en cuenta ambas clasificaciones, según persistencia e interacción virus-vector, se pueden agrupar a los virus en: no circulativos (no persistentes y semipersistentes) y circulativos (persistentes propagativos y persistentes no propagativos) (Tabla 8) (Dietzgen et al. 2016). En la transmisión no persistente, los insectos pueden adquirir e inocular los virus en pocos minutos, y no requieren un tiempo de latencia en el vector. La capacidad de transmisión se pierde en pocos minutos o tras la muda del insecto, ya que son retenidos en la cutícula del aparato bucal (canal de alimentación) (Figura 20). Son virus que se transmiten en pruebas de alimentación superficiales que el insecto realiza en la epidermis o parénquima de las plantas. La especificidad virus-vector es baja, por lo que existen muchas especies de insectos que pueden transmitirlos, generalmente pulgones (Hogenhout et al. 2008). En la transmisión persistente, se requieren periodos de adquisición e inoculación de muchas horas o incluso días, y es necesario un periodo de latencia de al menos varias horas. Este tipo de virus, consiguen traspasar las barreras del sistema digestivo del vector, alcanzar la hemolinfa y acumularse en el interior de las glándulas salivales, para posteriormente

poder ser inoculados a una planta durante la alimentación del insecto (Figura 20). Los virus persistentes se dividen en propagativos o no propagativos, dependiendo si se multiplican o no dentro del vector, respectivamente, y presentan alta especificidad virus-vector, pudiendo ser transmitidos tras la muda del insecto. Salvando algunas excepciones, estos virus habitan el floema de las plantas. La transmisión de tipo persistente es característica de muchos de los virus transmitidos por pulgones, trips, moscas blancas y chicharritas (Hogenhout et al. 2008). En la transmisión semipersistente, los virus pueden ser adquiridos en minutos y transmitidos por el vector a partir de unas pocas horas a pocos días de su adquisición pero se pierden tras la muda del insecto. Este tipo de transmisión combina características intermedias entre las transmisiones no persistentes y persistentes. Los virus son retenidos generalmente en el intestino anterior, aunque existen otros que son retenidos en el aparato bucal (canal de alimentación) (Figura 20) (Uzest et al. 2007). Estos virus son principalmente transmitidos por pulgones y moscas blancas (Hogenhout et al. 2008).

Teniendo en cuenta el porcentaje relativo de virus que los insectos vectores son capaces de transmitir, los pulgones son los de mayor importancia (40 %), seguido por las moscas blancas (29 %), y en menor porcentaje el resto de los insectos (Ayllón et al. 2016). Con respecto a los virus detectados en alfalfa en Argentina, el AMV puede ser transmitido de manera no persistente por al menos 25 especies de áfidos, incluyendo *Aphis craccivora* (Cardin y Moury 2000; Crill et al. 1970; Hiruki y Hampton 1990; Jaspars y Bos 1980). Los virus pertenecientes a las familias *Luteoviridae* son transmitidos de manera persistente circulativa por áfidos (Hogenhout et al. 2008). El pulgón negro (*A. craccivora*) puede transmitir al BLRV aunque su principal vector es el áfido *Acyrtosiphon pisum* (Ashby 1984). Los miembros de la familia *Rhabdoviridae* que afectan plantas (*Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus*) son transmitidos de manera persistente por chicharritas y áfidos (Jackson et al. 2005), además estudios demuestran la replicación del virus en el vector, por lo que su transmisión es de tipo persistente propagativa (Nault 1997; Sylvester y Richardson 1992). El nucleorhabdovirus detectado en alfalfa en Francia (AEV), puede ser transmitido por el pulgón negro de manera persistente (Leclant et al. 1973). No se conocen antecedentes de transmisión por vector del ADV y del AEV-1, por tratarse de dos virus recientemente descritos para los que aún no se han realizado estudios al respecto. Los miembros de la familia *Geminiviridae*, se transmiten de manera persistente circulativa por moscas blancas y chicharritas

(Hogehout et al. 2008). Recientemente se describió un grupo de geminivirus que por presentar características particulares fueron incluidos en un nuevo género (*Capulavirus*), entre ellos está el ALCV capaz de ser transmitido por el pulgón negro (Bernardo et al. 2013; Roumagnac et al. 2015). En cuanto a los pulgones detectados en alfalfa, a nivel mundial se conocen 10 especies que colonizan este cultivo, seis de ellas están presentes en Argentina, donde cuatro son consideradas plagas: *Aphis craccivora* Koch (pulgón negro), *Acyrtosiphon (A.) konkoi* Sinji (pulgón azul), *A. pisum* Harris (pulgón verde) y *Therioaphis trifolii* Monnell (pulgón manchado) (Basigalup 2007; Ortego et al. 2004), los que podrían actuar como vectores de los virus detectados en alfalfa en nuestro país, y consiguientemente, del achaparramiento de la alfalfa.

Tabla 8. Características de los virus de planta transmitidos por insectos hemípteros.

CARACTERÍSTICA BIOLÓGICA	TIPOS DE TRANSMISIONES			
	No circulativa:		Circulativa:	
	<i>No Persistente</i>	<i>Semipersistente</i>	<i>Persistente No Propagativa</i>	<i>Persistente Propagativa</i>
PAA y PAI ^a	Segundos, minutos	Minutos, horas	Horas, días	Horas, días
Período de latencia	No requiere	No requiere	Horas, días	Días, semanas
Tiempo de retención en el vector	Minutos; se pierde tras la muda del insecto	Horas; se pierde tras la muda del insecto	Días, semanas; no se pierde tras la muda del insecto	Durante toda la vida del insecto; no se pierde tras la muda del mismo
Presencia en la hemolinfa del vector	No	No	Si	Si
Multiplicación en el vector	No	No	No *	Si

^aPAA: Período de Acceso a la Adquisición, es el tiempo requerido para que un virus pueda ser adquirido por el insecto vector; ^bPAI: Período de Acceso a la Inoculación, es el tiempo necesario para que un virus pueda ser inoculado dentro de una planta por el insecto vector. *A excepción del *Tomato yellow leaf-curl virus*-TYLCV que sí se replica en su vector (mosca blanca) (Hogehout et al. 2008).

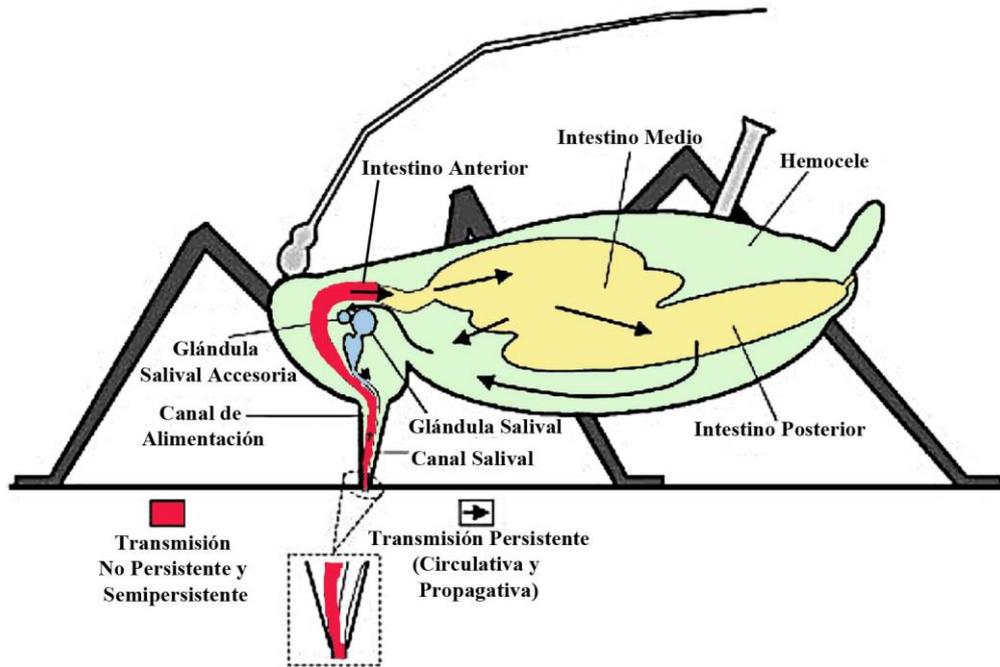


Figura 20. Representación del recorrido de los virus no circulativos (en rojo) y circulativos (con flechas) luego de su ingestión por un áfido. Los fluidos de las plantas infectadas con virus son inicialmente tomados por el canal de alimentación, que junto con el intestino anterior, son los sitios de retención de los virus no circulativos, los que posteriormente son liberados durante la inoculación. Con flechas negras se indica el recorrido de los virus transmitidos de manera persistente circulativa a través del canal de alimentación, intestino anterior, intestino medio, intestino posterior, hemocele y glándulas salivales accesorias; estos virus finalmente son inoculados a través del canal salival. Imagen adaptada de James et al. (2004).

1.4. PLANTAS HOSPEDANTES COMO RESERVORIOS DE VIRUS

En las enfermedades virales, las plantas enfermas son la forma más importante de persistencia de este tipo de patógenos. La gama de hospedantes de un virus está determinada por factores intrínsecos y extrínsecos al virus y epidemiológicos. Se ha propuesto que los virus de planta en su mayoría son generalistas de hospedante y especialistas de vector, y que la gama de hospedantes de los vectores determina la del virus (Power y Flecker 2008). Si bien esto remarca la importancia del vector en la ecología de los virus de planta, hay que tener presente que la eficacia de un virus depende del medio y variará entre distintos hospedantes. La mayoría de los virus fitopatógenos, poseen una amplia gama de hospedantes que les otorga mejores oportunidades de persistir en el tiempo y de dispersarse. Con respecto a los virus que infectan alfalfa en nuestro país, el AMV es capaz de infectar al menos 430 especies vegetales pertenecientes a más de 50 familias, y se encuentra ampliamente distribuido en el mundo (Jaspars y Bos 1980), el BLRV solo infecta leguminosos y también es cosmopolita (Ashby 1984; Domier et al. 2002), el ALCV se lo detectó infectando naturalmente alfalfa y artificialmente infecta haba (*Vicia faba*), fue detectado en Francia y España (Bernardo et al. 2016; Roumagnac et al. 2015). No existen informes previos acerca de los reservorios, distintos de alfalfa, para ADV y AEV-1.

SOBRE ESTE CAPÍTULO

Debido a que no hay antecedentes en el achaparramiento de la alfalfa y considerando la importancia de la información biológica como herramienta para el diseño de estrategias de manejo, este capítulo contempla diferentes estudios biológicos de la enfermedad y virus asociados como: la evaluación de la sintomatología desarrollada en infecciones virales simples y mixtas; descripción de las alteraciones a nivel tisular de la sintomatología del achaparramiento; distribución geográfica de la enfermedad y virus detectados; análisis del efecto en la producción de semillas; estudios de transmisión por semilla y vectores; y finalmente, el estudio de hospedantes alternativos como reservorios naturales de los virus.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. AISLAMIENTO DE VIRUS NO TRANSMISIBLES MECÁNICAMENTE

Se analizaron 50 muestras de 44 cultivares de alfalfa provenientes de un ensayo a campo del banco de germoplasma de la EEA-Manfredi, Córdoba, que no mostraban síntomas virales luego de un año de implantación. Las muestras fueron analizadas para determinar la presencia de los tres virus identificados en ese momento y que se intentaban aislar: ADV, AMV y BLRV. Además, se evaluaron plantas de alfalfa cv. WL442 con síntomas típicos de la enfermedad que se encontraban próximas al ensayo mencionado. Se realizaron clones de las plantas que resultaron positivas a uno o más virus, tomando tallos jóvenes y colocándolos en una maceta con vermiculita en condiciones de alta humedad durante al menos 15 días para favorecer el enraizamiento. Luego, se trasplantaron a tierra estéril y se llevaron al invernadero para su mantenimiento (Figura 21). Los clones obtenidos fueron evaluados para confirmar la condición de infección con los virus mencionados, y posteriormente reevaluados al AEV-1 y ALCV.

2.2. AISLAMIENTO DE AMV

Se molió una muestra de alfalfa, determinada como positiva al virus (Manfredi, Córdoba), con tampón de inoculación (0,01M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,1% Na₂SO₃, pH 7) en relación 1/5 (p/v), se agregó el abrasivo carburo de silicio de 600 mesh (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) y se inocularon mecánicamente plántulas de *Physalis pubescens* sanas de aproximadamente dos meses de edad. Cuando estas plantas mostraron síntomas de clorosis, se confirmó por serología que estuvieran infectadas por el AMV y fueron utilizadas como fuente de inóculo para retransmitir el virus mecánicamente a 23 plantas de alfalfa sanas (cv. WL442) de dos meses de edad. Estas plantas fueron mantenidas en invernáculo y posteriormente evaluadas por DAS-ELISA para determinar infección (Capítulo I, punto 2.7). Se obtuvo una única planta de alfalfa positiva al AMV, la que se multiplicó mediante clonado (Figura 21).

2.3. OBTENCIÓN DE PLANTAS DE ALFALFA GENÉTICAMENTE UNIFORMES

Se sembraron semillas del cultivar Costera SP INTA y las plantas obtenidas fueron evaluadas a los cinco virus para descartar la posibilidad de transmisión por semilla de alguno de ellos. Luego, se seleccionó una planta y se la multiplicó por clonado (Figura 21). De esta forma se obtuvo el material necesario para el ensayo, que cuenta con la misma base genética (clon Costera), evitando una posible influencia intrínseca de la planta en la expresión de síntomas.

2.4. TRANSMISIÓN DE LOS VIRUS AL CLON COSTERA

Los virus aislados (AMV y ADV) y la combinación de virus (AMV-ALCV) se transmitieron al clon Costera tomando tallos jóvenes provenientes de las plantas infectadas (obtenidos como se describió en los puntos precedentes), los cuáles fueron utilizados como púas para injertar plantas del clon Costera. Los injertos se efectuaron haciendo coincidir los haces vasculares del injerto con los del injerido, se los protegió del sol y se los cubrió durante dos días con bolsa de *nylon* para evitar que se dessequen. Se utilizaron al menos cinco plantas del clon Costera para cada tratamiento, a las que se les realizó al menos seis injertos por planta para asegurar la transmisión viral. Los injertos exitosos fueron eliminados luego de un mes. Se procedió de la misma manera con una planta de alfalfa proveniente de Manfredi (Córdoba) infectada con el complejo viral, contando de esta manera con un control positivo para el ensayo. Se empleó la metodología del injerto de púas ya que es un procedimiento eficiente para patógenos difíciles de transmitir por otros métodos o desconocidos (Ayllón et al. 2016). La infección viral de los clones Costera injertados, se analizó cuatro meses después mediante (RT)-PCR (Capítulo I, punto 2.5).

La infección mixta AMV-ADV sobre el clon Costera, se obtuvo multiplicando los clones Costera infectados con ADV y posteriormente inoculándolos mecánicamente con el aislamiento de AMV (Capítulo II, punto 2.2). Luego de 30 días, se le analizó la presencia de AMV mediante RT-PCR (Capítulo I, punto 2.5) a las plantas inoculadas y las que resultaron positivas se multiplicaron por clonado (Figura 21).

2.5. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE SÍNTOMAS

Luego de la obtención de los diferentes aislamientos virales sobre la misma base genética (clon Costera SP INTA), se realizó la multiplicación por clonado de cada tratamiento (AMV, ADV, AMV-ADV y AMV-ALCV) y de los controles (clon Costera sano y con la enfermedad), de manera de obtener como mínimo 15 plantas por tratamiento. Las plantas obtenidas fueron rotuladas, llevadas a invernáculo con condiciones semicontroladas (Temperatura: ~25°C; fotoperíodo: 16 h luz – 8 h oscuridad) donde se las ubicó sobre las mesadas en forma aleatorizada, y se observó el desarrollo de síntomas durante seis meses (Figura 21).



Figura 21. Procedimiento para la obtención de clones de alfalfa: se toman tallos jóvenes y se colocan en maceta con vermiculita (A), manteniendo condiciones de alta humedad para favorecer el desarrollo de raíces (B). Luego de al menos 15 días, se transplantaron individualmente en macetas conteniendo tierra estéril y se mantuvieron en invernadero (C).

2.6. ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN ALFALFA Y TRÉBOL BLANCO CON SÍNTOMAS VIRALES

Se tomaron hojas sanas y enfermas (con enaciones) de plantas de alfalfa (Figura 5 D) y trébol blanco (Figura 38 C y D), se seccionaron y fijaron en FAA (Formol, Ácido Acético, Etanol, Agua; 10:5:50:35). Luego se deshidrataron en una serie de alcohol

etílico-xilol en diferentes concentraciones y se incluyeron en parafina. Cortes transversales de 10 – 20 µm de espesor obtenidos por medio de un micrótopo rotativo (Accu-Cut® SRM™ 200, Sakura Finetek USA Inc.) fueron coloreados con safranina-verde rápido y se observaron en microscopios ópticos Labophot-2 (Nikon, Japón) y Eclipse Ti (Nikon, Japón).

2.7. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL ACHAPARRAMIENTO DE LA ALFALFA Y VIRUS ASOCIADOS

Muestreos: entre 2010-2017 se realizaron viajes a campo donde se colectaron muestras de alfalfa con síntomas de la enfermedad (al menos cinco plantas con achaparramiento por lote visitado). Además se recibieron muestras sintomáticas provenientes de Mendoza y de la EEA INTA Hilario Ascasubi, Buenos Aires. El número de lotes relevados suma 162, los cuales se distribuyen en 17 provincias de la Argentina: Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Neuquén, Río Negro, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán.

Detección viral: se realizó sobre un grupo de cinco muestras colectadas en cada lote empleando técnicas serológicas para la detección de AMV y BLRV, y moleculares para el ADV, AEV-1 y ALCV (Capítulo I, punto 2). En el caso de ALCV, se seleccionaron y analizaron preliminarmente 83 lotes provenientes de todas las provincias relevadas, de manera de tener un panorama general del territorio argentino (esta detección se realizó con la colaboración del Dr. Bejerman).

Análisis de datos: se determinó la prevalencia de la enfermedad como el número de lotes con al menos una planta con síntomas de la enfermedad sobre el total de lotes evaluados; mientras que la de los virus, como el número de lotes donde se los detectó sobre el total de lotes con síntomas de achaparramiento. Se utilizó el programa DIVA-GIS v 7.4.0.1 para georeferenciar los resultados obtenidos y visualizarlos gráficamente en un mapa de Argentina. Además, se realizó una tabla con las prevalencias por provincias y/o zonas geográficas como complemento de los mapas de distribución de la enfermedad y virus asociados, de manera de optimizar su interpretación.

2.8. PRODUCCIÓN DE SEMILLAS.

Se marcaron plantas de alfalfa cv. Villa con y sin síntomas de achaparramiento (enaciones) en un campo destinado a la producción de semillas de alfalfa en la localidad de Guanacache-San Juan (campo del Ing. Eduardo Echeverría). Se marcaron 55 plantas por tratamiento de manera de contar con al menos 50 plantas para cada uno (Figura 22). Simultáneamente al marcado, se tomaron muestras de cada planta, las que se liofilizaron y mantuvieron a -20°C para su posterior análisis viral. Treinta días posteriores al marcado, las plantas se cosecharon individualmente y en forma manual, luego de la aplicación de desecante, y se mantuvieron en bolsas de papel durante su traslado y hasta su procesamiento. Las semillas producidas por cada planta se obtuvieron mediante trilla manual y se registró el peso total de semillas por planta y el peso de 100 semillas por planta (obtenido como el promedio del peso de tres grupos de 100 semillas). Se realizó un análisis de varianza no paramétrica con las medias de los datos obtenidos.

La condición síntoma (presencia/ausencia) se relacionó con el número estimado de semillas producido por plantas y con la presencia viral (con las técnicas mencionadas en el punto 2.7.). Para esto último se analizaron 53 muestras con síntomas y 55 sin síntomas y estos datos fueron evaluados mediante el análisis de árboles de clasificación y análisis de componentes principales. El número estimado de semillas producido por planta se calculó considerando el peso promedio de 100 semillas y el peso total de las semillas producidas por planta.

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el paquete informático Infostat versión 2013 (Di Rienzo et al. 2013).



Figura 22. Campo de alfalfa en Guanacache con la identificación de las plantas seleccionadas para el ensayo de producción de semilla.

2.9. TRANSMISIÓN POR SEMILLA

Se emplearon semillas colectadas en Guanacache-San Juan (según ensayo anterior) provenientes de las siete plantas con síntomas que resultaron positivas para los cinco virus en estudio. Se sembraron dos terrinas de 24 vasos cada una con semillas de cada planta. Cuando las plántulas presentaban entre tres a cinco hojas verdaderas se ralearon dejando una planta por vaso. Las terrinas se distribuyeron al azar en las mesadas del invernáculo. Este ensayo se repitió dos veces, obteniéndose un total 672 plantas (Figura 23). Se realizó el seguimiento de síntomas de achaparramiento y síntomas virales durante seis meses en condiciones controladas de luz y temperatura. Luego, se tomaron al azar muestras de plantas individuales y se agruparon de a diez plantas, totalizando 56 grupos (560 plantas), de manera de evaluar al menos 500 plantas, y se analizó la presencia de los cinco virus en estudio mediante RT-(PCR) (Capítulo I, punto 2.5). La tasa de transmisión del AMV se obtuvo analizando en forma individual, por DAS-ELISA, las plantas que conformaron los grupos positivos por RT-PCR.



Figura 23. Ensayo de transmisión por semilla en condiciones controladas de luz y temperatura.

2.10. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD MEDIANTE *APHIS CRACCIVORA*

Se colectaron pulgones negros en un campo de Santiago del Estero, que estaban colonizando plantas de alfalfa GAPP 969 con síntomas de la enfermedad (Figura 24). Con estos pulgones se realizaron dos ensayos de transmisión, con cargas diferentes de insectos: 5 y 10 pulgones por planta de alfalfa sana, empleando un total de 40 y 30 plantas, respectivamente. Las plantas fueron cubiertas con botellas de plástico transparentes, conteniendo ventanas de tela antiáfido para evitar condensación de humedad (Figura 24). Luego de seis días, se retiraron los pulgones, se pulverizaron las plantas con insecticida y se llevaron a jaula antiáfido para evaluar el desarrollo de síntomas.



Figura 24. Pulgones negros colonizando plantas de alfalfa con achaparramiento (A y B), empleados en el ensayo de transmisión de la enfermedad (C).

2.11. DETECCIÓN VIRAL EN PULGONES COLECTADOS A CAMPO

Se colectaron siete muestras de pulgones negros que se encontraban colonizando plantas de alfalfa con síntomas de la enfermedad, y se conservaron en alcohol 96% y a -20°C hasta su procesamiento. Además, se tomaron muestras de cada una de las plantas colonizadas para analizar la presencia viral, las que fueron liofilizadas y conservadas a -40°C hasta su uso. Seis muestras provenían de la zona sur de la provincia de Mendoza ($-35,7894^{\circ}$; $-69,6687^{\circ}$) y la séptima de Neuquén ($-38,9556^{\circ}$; $-68,2897^{\circ}$).

La extracción de ácidos nucleicos se realizó empleando el método de CTAB tanto para las muestras vegetales como para los insectos. En el caso de los pulgones, se realizaron extracciones individuales y en grupos de 10 pulgones por muestra, y se conservaron a -70°C hasta su uso. La detección viral en pulgones y muestras de alfalfa se realizó mediante métodos moleculares, excepto en el caso del AMV y BLRV en muestras vegetales que se realizó mediante serología. Los pulgones usados en detecciones virales individuales provenían de plantas fehacientemente infectadas con el virus a evaluar.

2.12. TRANSMISIÓN DE LOS VIRUS ASOCIADOS AL ACHAPARRAMIENTO MEDIANTE EL PULGÓN NEGRO

Se realizaron, preliminarmente, tres ensayos de transmisión. Cada ensayo corresponde a una colecta de pulgones negros realizada en distintas localidades, los que se encontraban colonizando plantas de alfalfa enfermas.

ENSAYO 1: Colonia Caroya, Córdoba (-31,0409°; -64,0393°). Se colectaron pulgones negros que se encontraban colonizando cuatro plantas de alfalfa con síntomas de la enfermedad (muestras 1 a 4) (Figura 25 A-B).

ENSAYO 2: EEA-INTA Santiago del Estero (-28,023°; -64,234°). Se colectaron pulgones negros que se encontraban colonizando una planta de alfalfa con síntomas de la enfermedad.

ENSAYO 3: San Vicente, Córdoba (-31.8127°; -65.4449°). Se colectaron pulgones negros colonizando dos plantas de alfalfa enfermas (muestras 1 y 2).

En todos los casos, se tomaron muestras de las plantas enfermas sobre las que se colectaron los pulgones para su posterior análisis viral. En los ensayos de transmisión se emplearon pulgones adultos ápteros y plántulas de alfalfa sana cultivar Monarca SP INTA de menos de un mes de edad. En el caso del ensayo 1 se colocaron tres pulgones/plántula sana empleando un total de 27 plántulas; en los ensayos 2 y 3, se utilizaron cinco pulgones/plántula sana empleando un total de 10 y 7 plántulas, respectivamente. Las plántulas fueron cubiertas con tubos de acrílico conteniendo ventanas de tela antiáfido para evitar condensación de humedad (Figura 25 C) y luego de siete días fueron pulverizadas con insecticida y mantenidas en invernadero. Luego de un mes de la transmisión, se tomaron muestras de cada planta y se les analizó la presencia viral mediante (RT)-PCR (Capítulo I, punto 2.5).



Figura 25. Pulgones negros colonizando plantas de alfalfa con achaparramiento empleados en los ensayos de transmisión viral (A y B); ensayos de transmisión viral (C).

2.13. ANÁLISIS DE RESERVORIOS NATURALES DE LOS VIRUS ASOCIADOS AL ACHAPARRAMIENTO

En los viajes de muestreo (Capítulo II, punto 2.7) se examinaron visualmente las especies vegetales que se encontraban próximas a cultivos de alfalfa con achaparramiento y se tomaron muestras de aquellas que presentaron síntomas similares a los producidos por infecciones virales. Las muestras vegetales se liofilizaron y conservaron a -20°C hasta su uso. La detección de los cinco virus sobre las muestras se realizó mediante (RT)-PCR (Capítulo I, punto 2.5).

3. RESULTADOS

3.1. EVALUACIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA DESARROLLADA EN INFECCIONES SIMPLES Y MIXTAS

3.1.1. Aislamiento de virus no transmisibles mecánicamente

Para aislar los virus asociados al achaparramiento, que no se transmiten mecánicamente, se seleccionaron nueve de las 50 muestras analizadas al AMV, ADV y BLRV que presentaron infecciones simples o mixtas y una de ellas (cv. 340) presentó infección solo con el ADV (Tabla 9). Las plantas del cv. WL442 con síntomas de la enfermedad, analizadas a estos tres virus, resultaron positivas al AMV. Todas las plantas seleccionadas fueron clonadas para mantener varios ejemplares en invernáculo. Posteriormente y como consecuencia de la identificación del AEV-1 y ALCV, se analizó su presencia en los clones obtenidos, confirmando de esta manera la infección simple del aislamiento 340 con ADV y determinando la infección mixta de WL442 con AMV y ALCV.

Tabla 9. Variedades y cultivares naturalmente infectadas, con diferentes combinaciones virales.

Clones	Presencia de		
	AMV	ADV	BLRV
340	-	+	-
Mecha 16	-	+	+
Traful 20	-	+	+
Traful 27	-	+	+
Traful 47	-	+	+
Traful 48	-	+	+
Super Monarca 19	-	+	+
WL 903-36	-	+	+
241	+	-	+

Negativos: "-"; Positivos: "+"

3.1.2. Aislamiento de AMV

Se realizó mecánicamente debido a que el AMV es el único virus del complejo capaz de transmitirse de este modo. Una de las 23 plantas de alfalfa WL442 inoculadas

mecánicamente resultó positiva al AMV por DAS-ELISA, indicando una eficiencia de transmisión del 4%. Se obtuvieron 15 clones desde esta planta infectada.

3.1.3. Evaluación de la manifestación de síntomas

Para este ensayo se seleccionó el cv. de alfalfa Costera SP INTA debido a la alta susceptibilidad manifestada frente a infecciones naturales con la enfermedad. La evaluación visual de las plantas infectadas en forma simple (AMV y ADV) y mixtas (AMV-ALCV y AMV-ADV) permitió determinar que las infectadas con AMV, ADV y AMV-ADV no mostraron síntomas, comportándose como el control sano, mientras que las infectadas con AMV-ALCV mostraron síntomas de enaciones, arrugamiento foliar y achaparramiento de las plantas. La distorsión foliar y la disminución de altura fueron algo más severos en plantas con enfermedad que con infección AMV-ALCV (Figura 26).

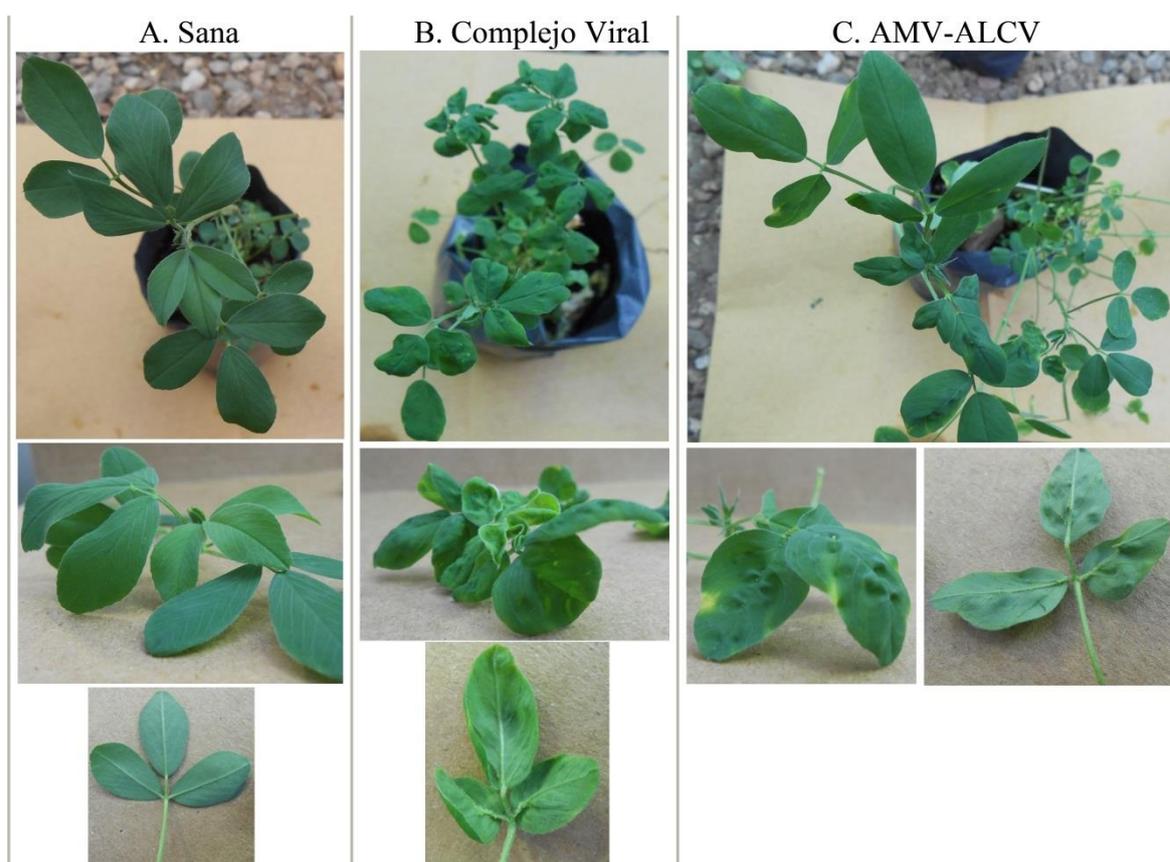


Figura 26. Fotografías de los síntomas sobre el clon Costera inducidos por los aislamientos virales y la enfermedad. A: sana. B: infectada con el complejo viral. C: infectada con AMV-ALCV. No se muestran las infectadas con AMV, ADV y AMV-ADV ya que se comportaron como la sana.

3.2. ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN ALFALFA Y TRÉBOL BLANCO CON SÍNTOMAS DE ENACIONES

Estos estudios se realizaron para conocer las alteraciones celulares que podrían dar origen a las enaciones, síntoma característico de la enfermedad viral del achaparramiento de la alfalfa. Además, se incorporó la evaluación histológica del trébol blanco (*Trifolium repens*) debido a que desarrolla síntomas (enaciones) similares a los observados en alfalfas enfermas (Figura 38).

3.2.1. Análisis histológico en alfalfa

Al comparar los cortes histológicos de las hojas de plantas de alfalfa sanas (Figura 27) con las de las enfermas (Figura 28), se observan deformaciones del haz vascular central (Figura 28, A-C), de los hacecillos laterales (Figura 28 A, D-G), y aparentes deformaciones del floema (Figura 28, B, C, G). Además, las células de la epidermis y colénquima esponjoso de las hojas enfermas presentan formas y tamaños muy irregulares, originando contornos anómalos, principalmente en la sección de la nervadura central (Figura 28, B y C).

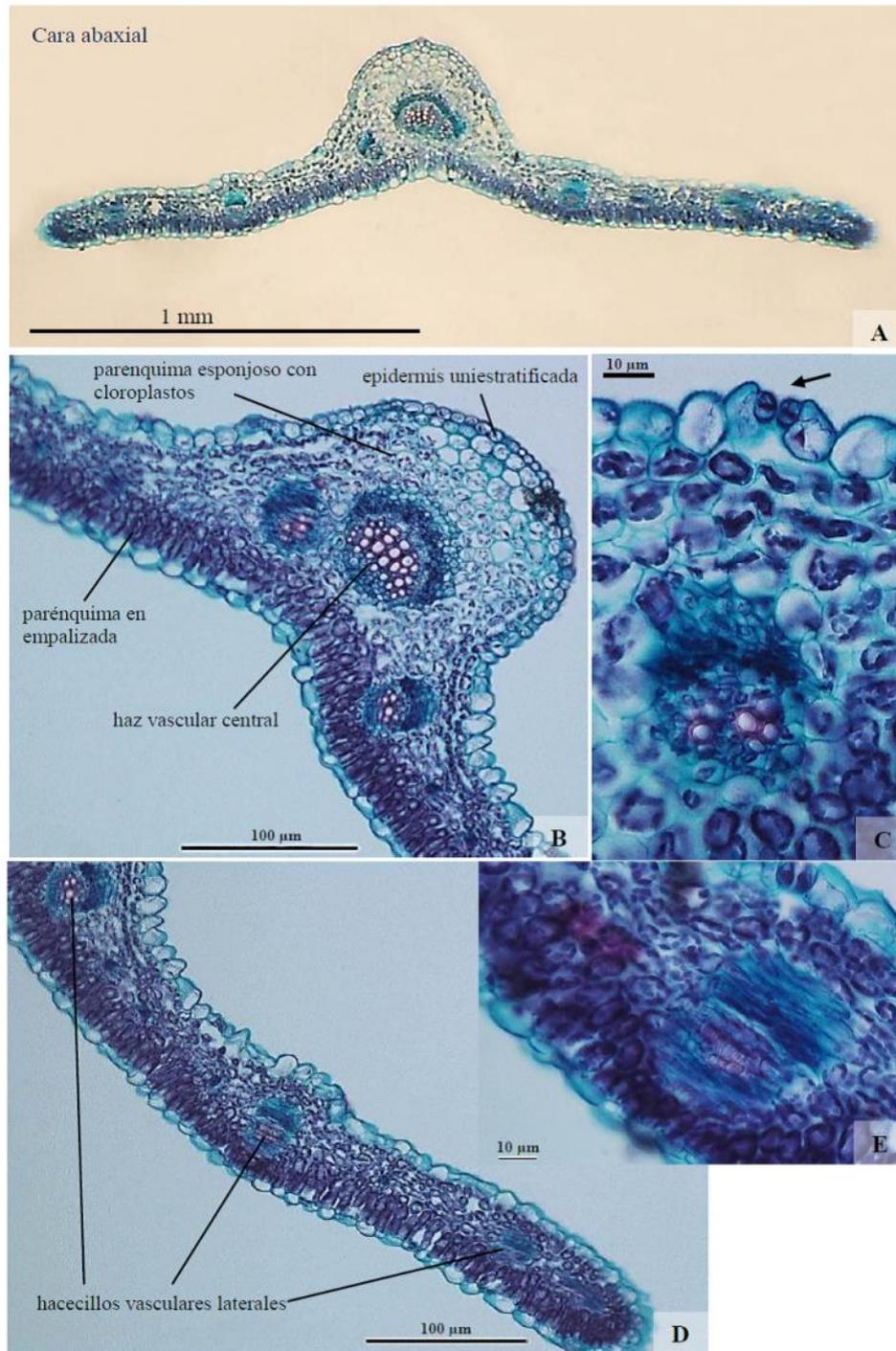


Figura 27. Fotografías de hojas de alfalfa sana en cortes transversales. Corte completo (A) y detalles de la sección de la nervadura central (B), de células oclusivas del estoma (C, flecha negra) y de los haces laterales (D) y su detalle (E).

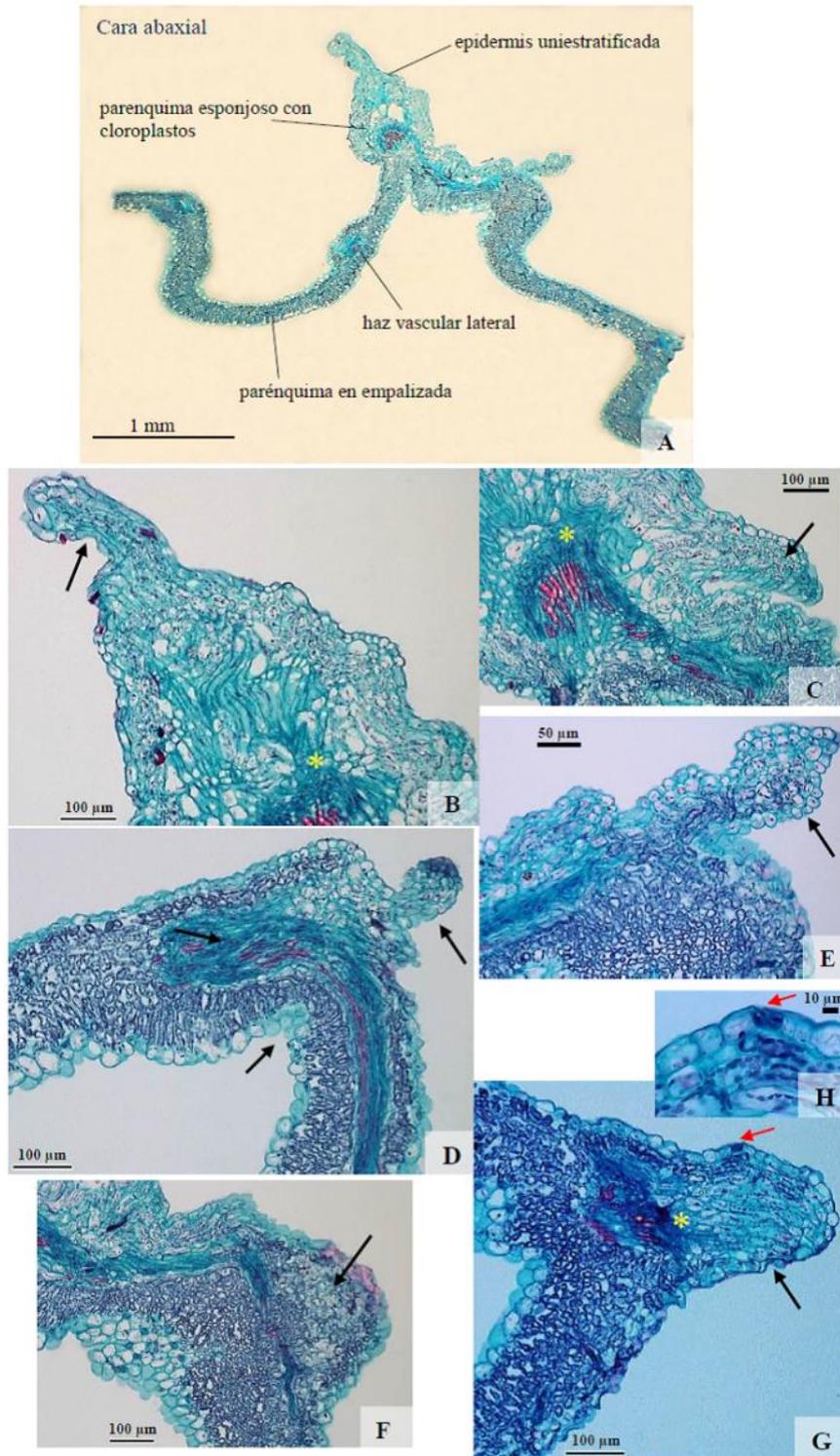


Figura 28. Fotografías de hojas de alfalfa enferma en cortes transversales. Corte completo (A) y detalles de la sección de la nervadura central (B y C), de los haces laterales (D-G) y (E) mayor detalle de (G) donde se observan las células estomáticas (flecha roja). Asteriscos amarillos: aparente alteración del floema. Flechas negras: alteraciones en el tamaño y forma de los tejidos.

3.2.2. Análisis histológico en trébol blanco

Al comparar los cortes histológicos de las hojas de plantas de tréboles blancos sanos (Figura 29) con las de los enfermos (Figura 30), se observó que las enaciones están formadas por el desarrollo de los tejidos foliares: epidermis uniestratificada con estomas, parénquima esponjoso con cloroplastos, y en el cuerpo se observa un hacesillo vascular formado por floema y xilema (Figura 30, B), con las mismas características que las de los tejidos sanos.

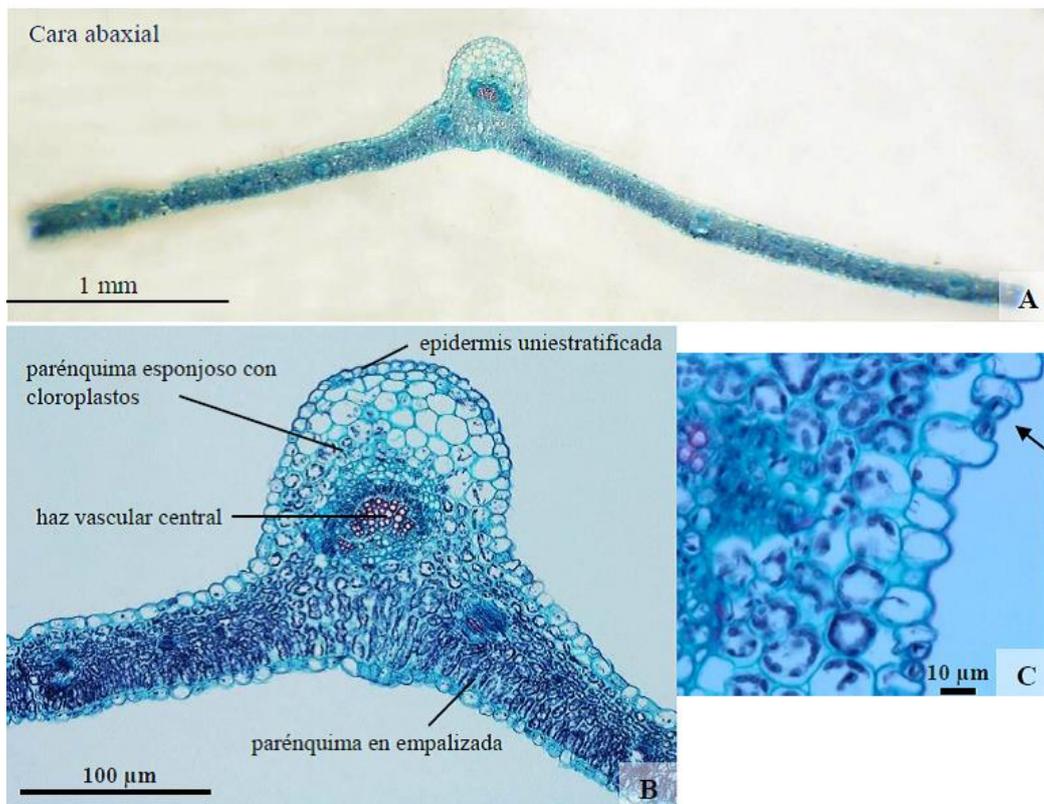


Figura 29. Fotografías de hojas de trébol blanco sano en cortes transversales. Corte completo (A) y detalles de la sección de la nervadura central (B) y de células oclusivas del estoma (C, flechas negras).

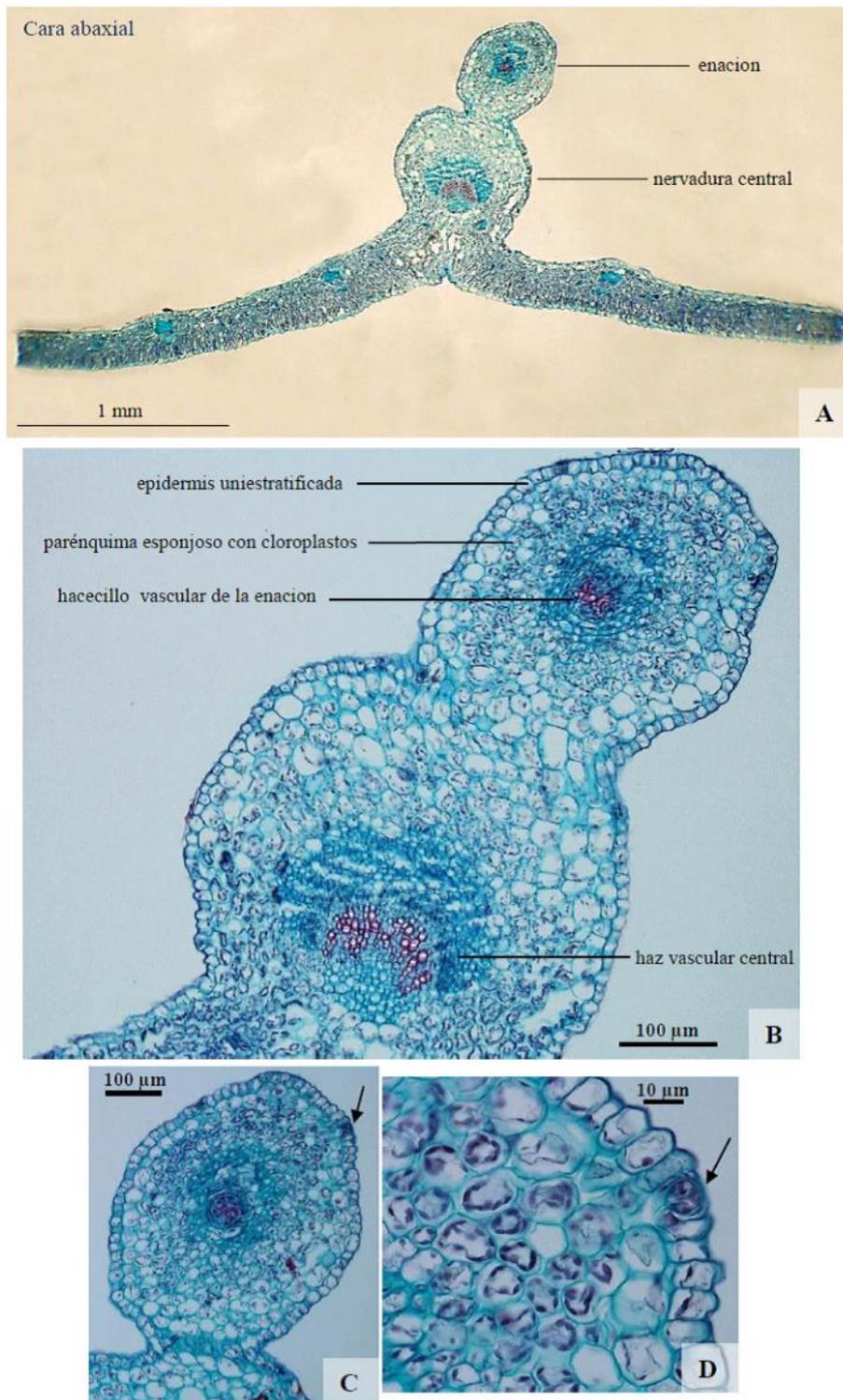


Figura 30. Fotografías de hojas de trébol blanco enfermo en cortes transversales. Corte completo (A) y detalles de: la sección de la nervadura central con la enación (B), de la enación (C) donde se observa un estoma (flecha negra) y (D) mayor detalle del corte (C) donde se observan las células oclusivas del estoma (flecha negra).

3.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL ACHAPARRAMIENTO DE LA ALFALFA Y VIRUS ASOCIADOS

Con la finalidad de determinar el área de distribución de la enfermedad y virus asociados en Argentina, se evaluaron muestras de 162 lotes provenientes de 17 provincias. La enfermedad del achaparramiento de la alfalfa se detectó en todas las provincias relevadas y alcanzó una prevalencia del 86,4% (140/162 lotes), no observándose en 22 lotes, los cuáles correspondían a alfalfas de menos de un año de implantación (Figura 31). En la Tabla 10 se detalla la prevalencia de la enfermedad detectada por provincia y por zona geográfica, oscilando en ambos casos entre el 60 y el 100%. A nivel provincia, el valor más bajo lo registró Chaco y el más alto las provincias de Entre Ríos, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Salta, San Juan, San Luis, Santiago del Estero y Tucumán (Tabla 10). Respecto a las regiones geográficas, el menor valor lo registró el NEA y el mayor valor la región Cuyana. Nótese que tanto provincias como zonas geográficas están representadas diferencialmente debido a que se trata de zonas donde se cultiva alfalfa con distintas intensidades. Por este motivo, el número de lotes monitoreados por provincias osciló entre dos (Tucumán) y 39 (Córdoba) (Tabla 10).

Con respecto a la distribución geográfica de los virus asociados al achaparramiento de la alfalfa, se detectaron los cinco virus en al menos uno de los lotes muestreados de cada provincia relevada, a excepción del BLRV en Chaco (Figura 32). Las prevalencias registradas fueron del 64,0; 64,2; 72,4; 86,7 y 100,0% para el BLRV, AEV-1, ADV, ALCV y AMV, respectivamente. Las prevalencias virales por provincias se encuentran en la Tabla 11, excepto para ALCV. A excepción del AMV que se encuentra presente en todas las provincias con una prevalencia del 100%, como ya se indicó, el resto de los virus registraron diferentes valores de prevalencias por provincias (Tabla 11). El ADV mostró un valor mínimo del 25,0% en la provincia de La Pampa y un máximo de 100,0% en las provincias de Chaco, Neuquén, Río Negro, San Juan, San Luis, Santiago del Estero y Tucumán. El AEV-1 registró un valor mínimo de 33,3% en Chaco y Entre Ríos, y el 100,0% en La Rioja, Río Negro, San Juan y Santiago del Estero. El BLRV exhibió un valor mínimo del 0,0% en Chaco y un máximo de 100,0% en La Rioja, Neuquén y Río Negro.

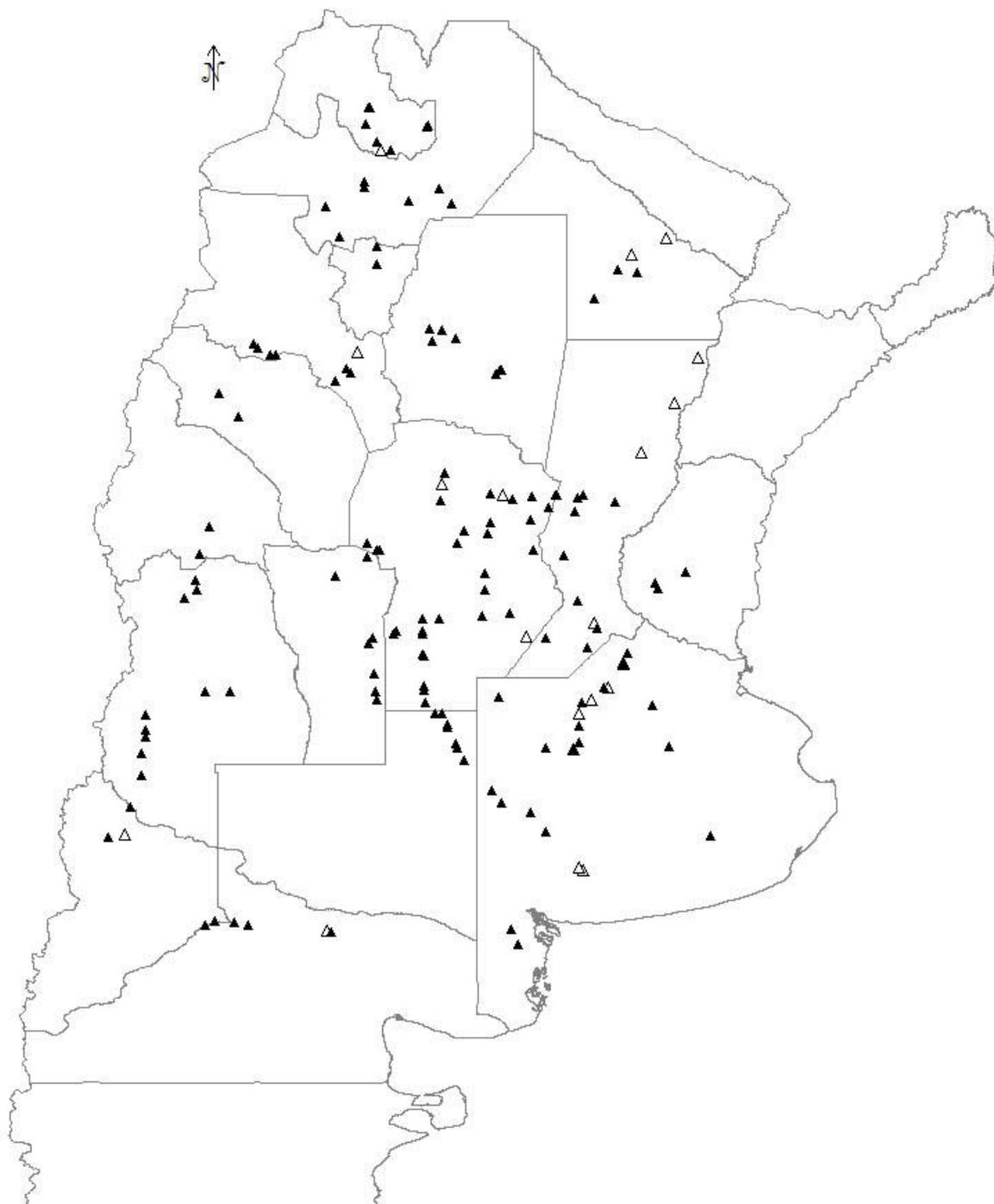


Figura 31. Distribución del achaparramiento de la alfalfa en Argentina. Los triángulos negros y blancos indican la detección de la enfermedad o la no observación de la misma, respectivamente.

Tabla 10. Prevalencia (%) del achaparramiento de la alfalfa por provincia y por región geográfica relevada en el período 2010-2017.

	N° de Lotes Monitoreados	N° de lotes con la enfermedad	Prevalencia de la Enfermedad (%)	
Provincias	Buenos Aires	28	20	71,4
	Catamarca	8	7	87,5
	Chaco	5	3	60,0
	Córdoba	39	35	89,7
	Entre Ríos	3	3	100,0
	Jujuy	8	7	87,5
	La Pampa	8	8	100,0
	La Rioja	3	3	100,0
	Mendoza	10	10	100,0
	Neuquén	5	4	80,0
	Río Negro	4	3	75,0
	Salta	7	7	100,0
	San Juan	3	3	100,0
	San Luis	7	7	100,0
	Santa Fe	14	10	71,4
	Santiago del Estero	8	8	100,0
	Tucumán	2	2	100,0
Región Geográfica	NOA	36	34	94,4
	NEA	5	3	60,0
	Región Pampeana	84	68	81,0
	Región Cuyana	28	28	100,0
	Región Patagónica	9	7	77,8

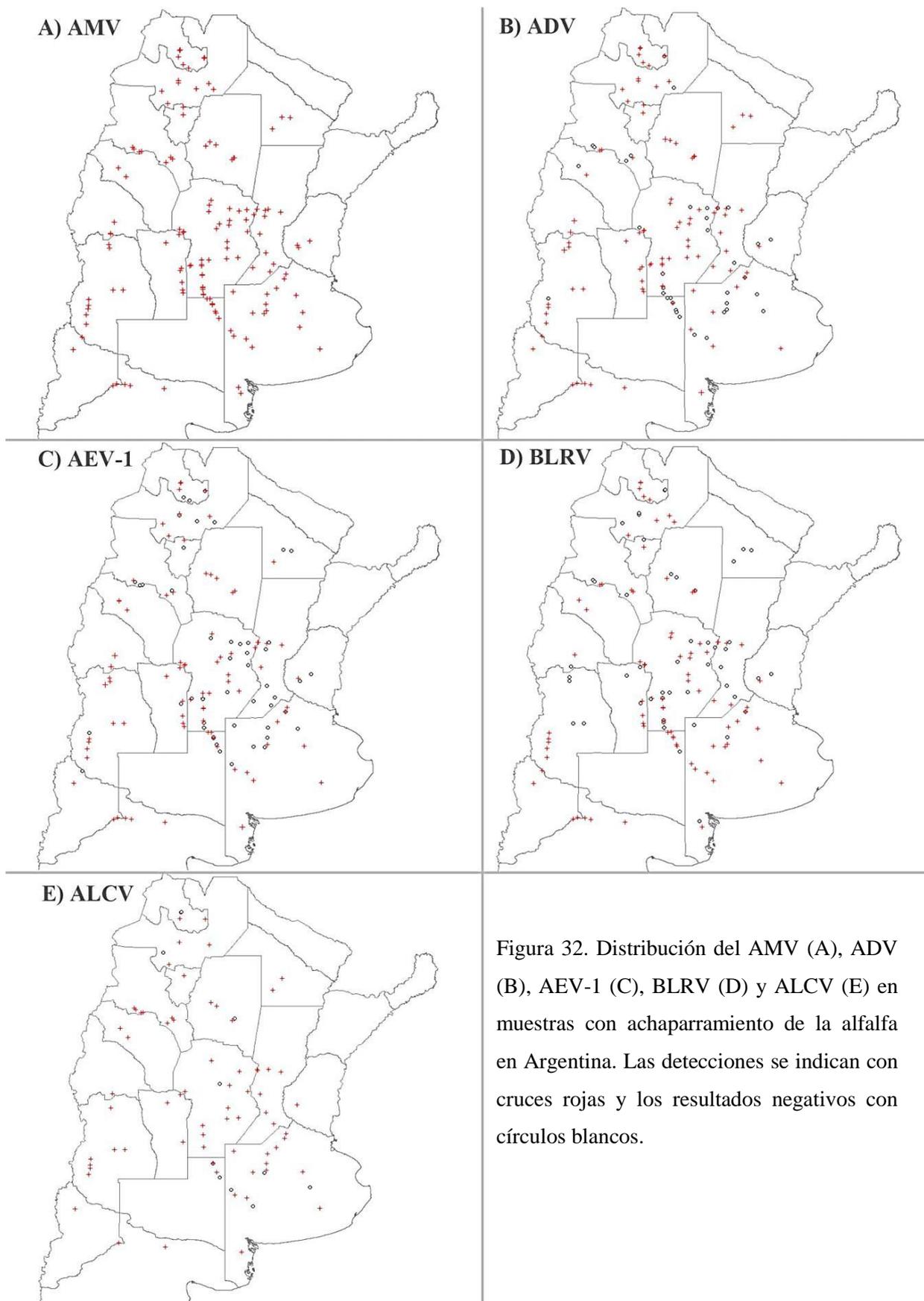


Tabla 11. Prevalencias (%) de los virus asociados al achaparramiento de la alfalfa por provincia relevada en el período 2010-2017.

PROVINCIAS	AMV			ADV			AEV-1			BLRV		
	N° lotes		PREV	N° lotes		PREV	N° lotes		PREV	N° lotes		PREV
	monitoreados	positivos		monitoreados	positivos		monitoreados	positivos		monitoreados	positivos	
Buenos Aires	19	19	100,00	18	9	50,00	18	10	55,56	19	15	78,95
Catamarca	7	7	100,00	7	3	42,86	7	3	42,86	7	4	57,14
Chaco	3	3	100,00	3	3	100,00	3	1	33,33	3	0	0,00
Córdoba	35	35	100,00	33	25	75,76	33	21	63,64	33	20	60,61
Entre Ríos	3	3	100,00	3	1	33,33	3	1	33,33	3	1	33,33
Jujuy	7	7	100,00	7	6	85,71	7	4	57,14	7	5	71,43
La Pampa	8	8	100,00	8	2	25,00	8	4	50,00	8	7	87,50
La Rioja	3	3	100,00	3	1	33,33	3	3	100,00	3	3	100,00
Mendoza	10	10	100,00	10	9	90,00	10	9	90,00	10	6	60,00
Neuquén	4	4	100,00	4	4	100,00	4	3	75,00	4	4	100,00
Río Negro	3	3	100,00	3	3	100,00	3	3	100,00	3	3	100,00
Salta	7	7	100,00	7	6	85,71	7	4	57,14	7	4	57,14
San Juan	3	3	100,00	2	2	100,00	2	2	100,00	2	1	50,00
San Luis	7	7	100,00	7	7	100,00	7	6	85,71	7	4	57,14
Santa Fe	10	10	100,00	10	7	70,00	10	4	40,00	10	5	50,00
Sgo. del Estero	8	8	100,00	7	7	100,00	7	7	100,00	8	4	50,00
Tucumán	2	2	100,00	2	2	100,00	2	1	50,00	2	1	50,00
TOTAL	139	139	100,00	134	97	72,39	134	86	64,18	136	87	63,97

3.4. EFECTO DE LA ENFERMEDAD Y VIRUS ASOCIADOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

Los análisis estadísticos mostraron una disminución significativa en el peso del total de semillas producidas por las plantas con síntomas respecto a las producidas por las sin síntomas, y no se observó diferencia significativa en los promedios de pesos de 100 semillas, lo que corresponde a un peso por semilla de 0,002 g tanto para plantas con y sin síntomas (Figura 33 y Tabla 12). Esto indicaría que la enfermedad está afectando la producción total pero no el peso de las semillas producidas por las plantas.

Los cinco virus fueron detectados tanto en muestras de plantas sintomáticas como asintomáticas de enaciones, aunque en diferentes proporciones (Tabla 13). A excepción del ADV, se observó mayor proporción de virus en muestras con síntomas respecto de las asintomáticas, siendo el AMV el que registró la mayor diferencia (34,4%), seguido por el ALCV (23,5%), AEV-1 (17,6%) y BLRV (6,0%) (Tabla 13).

Para determinar cuál/es virus tienen mayor influencia sobre la manifestación de síntomas y producción de semillas, se relacionó la condición síntoma (presencia/ausencia) con el número estimado de semillas producido por planta y con la presencia viral. El análisis de árbol de clasificación, que evalúa el efecto asociado de los virus, permitió identificar al AMV como el componente viral con más influencia negativa sobre la producción de semilla. La presencia de este virus explicaría una disminución estimada del 40% en el número estimado de semillas producido por planta, la del ALCV en un 32%, y con menor importancia el resto de los virus (Figura 34). Por otro lado, el análisis de componentes principales muestra que AMV y ALCV están fuertemente correlacionados con la expresión de síntomas de achaparramiento, y a su vez, que los síntomas se correlacionan negativamente con la producción de semillas, como lo obtenido con el análisis de árbol de clasificación. El ADV, BLRV y AEV-1 tendrían una menor influencia en la manifestación de síntomas y producción de semillas (Figura 35).

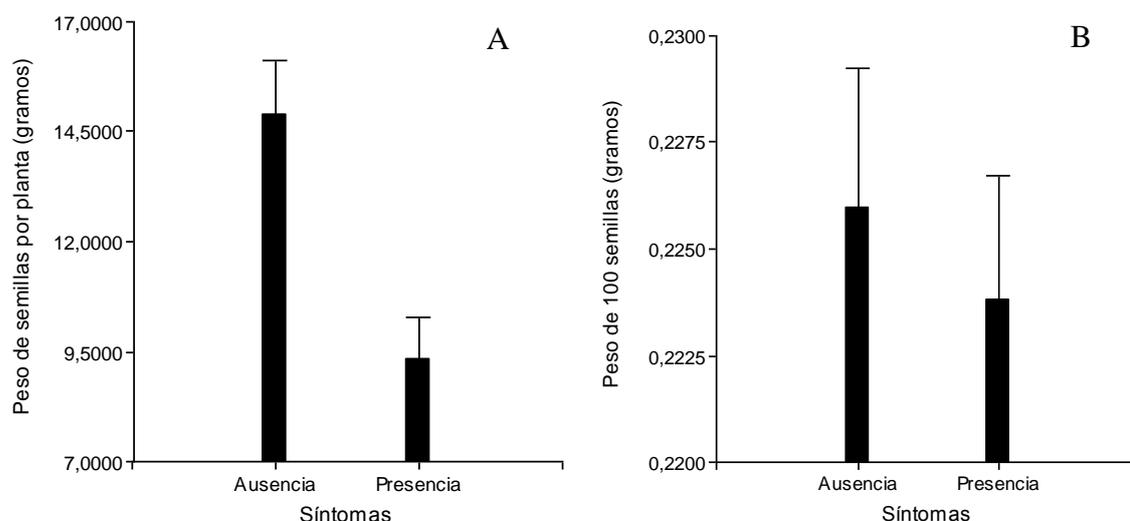


Figura 33. Influencia del achaparramiento en la producción de semillas. Pérdidas producidas por la virosis en el peso total de semillas producidas por planta (A) y media del promedio de los pesos de 100 semillas por planta (B). Las barras de error corresponden al error estándar.

Tabla 12. Análisis de la Varianza no paramétrica mediante la prueba de Kruskal Wallis

Variable	Síntomas	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Peso total de semillas por planta (g)	Ausencia	55	14,87	9,31	12,26	11,84	0,0006
	Presencia	55	9,31	7,35	7,64		
Peso de 100 semillas por planta (g)	Ausencia	55	0,23	0,02	0,22	0,09	0,7673
	Presencia	55	0,22	0,02	0,22		

Tabla 13. Detección viral (%) en las muestras de plantas con y sin síntomas de achaparramiento del ensayo para producción de semillas.

	AMV	BLRV	ADV	AEV-1	ALCV
PLANTAS SIN SÍNTOMAS	61,8%	60,0%	65,5%	18,2%	72,7%
PLANTAS CON SÍNTOMAS	96,2%	66,0%	58,5%	35,8%	96,2%

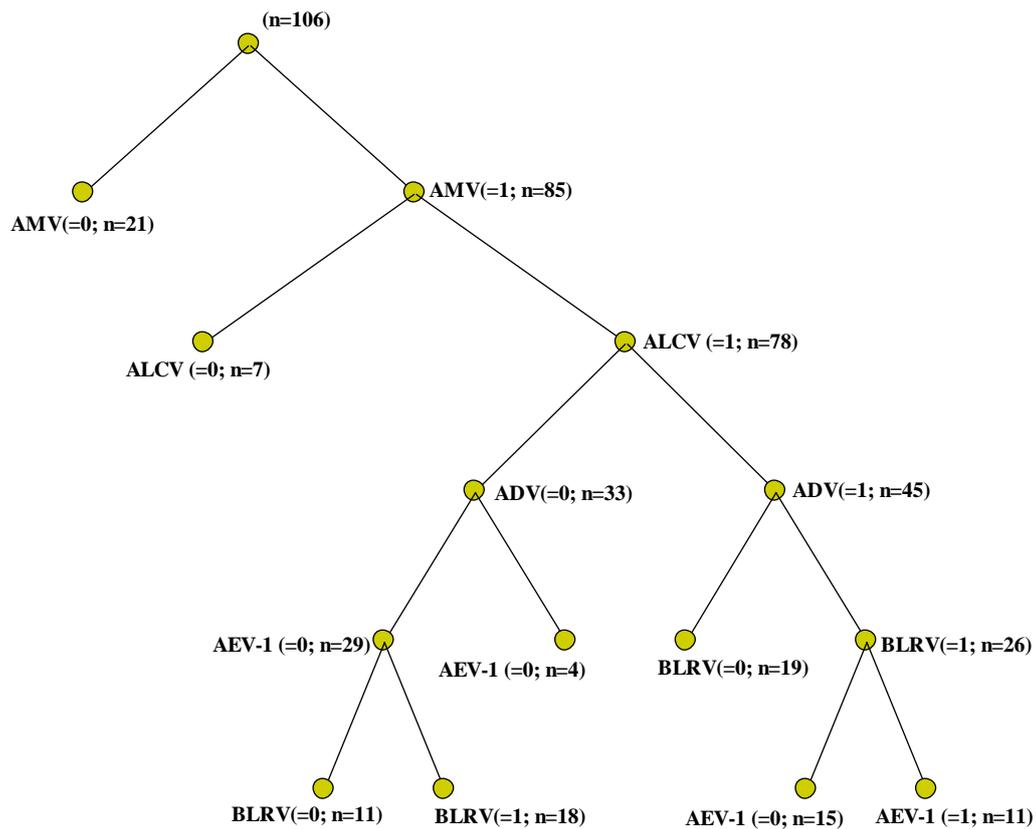


Figura 34. Árbol de clasificación empleando el N° estimado de semillas/planta como variable dependiente y la presencia de los virus (=1: presencia; =0: ausencia) como variables regresoras.

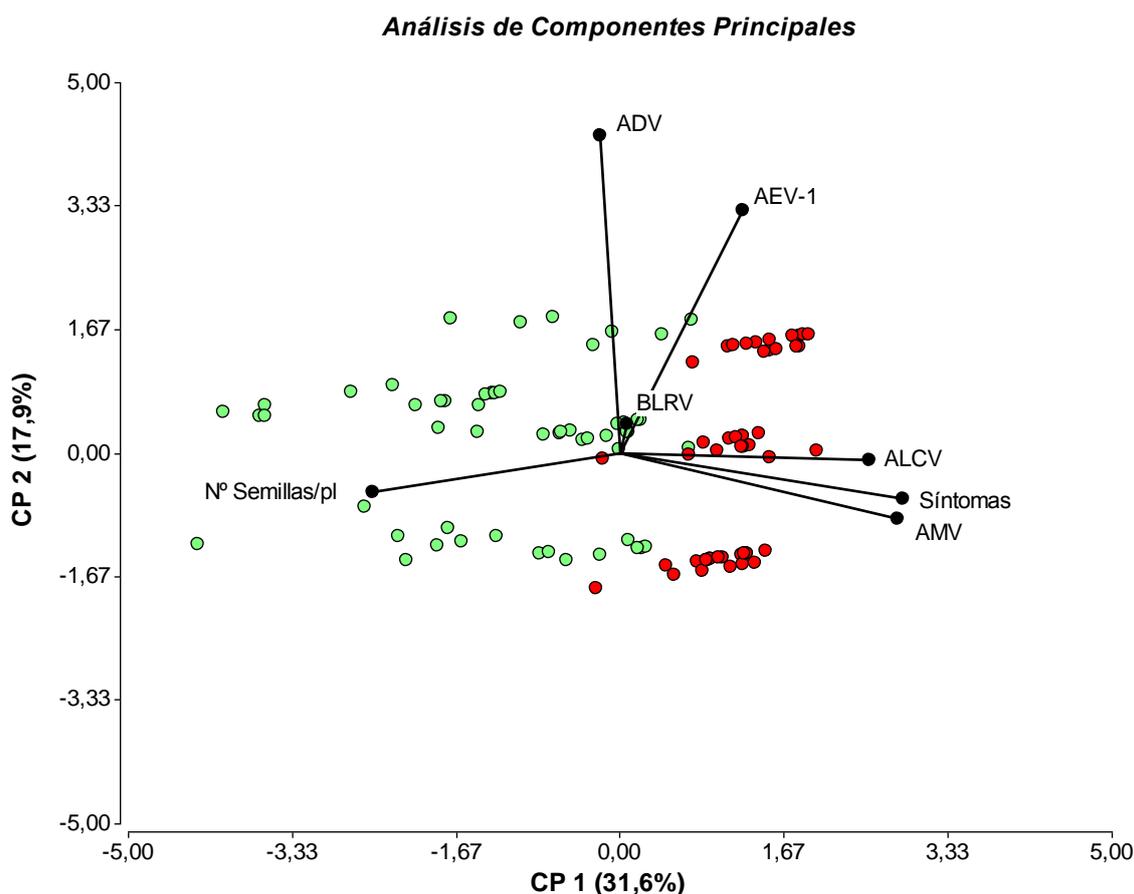


Figura 35. Análisis de Componentes Principales. Gráfico Biplot. Los datos provenientes de las muestras con y sin síntomas se ilustran en círculos rojos y verdes, respectivamente.

3.5. MODO DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD Y VIRUS ASOCIADOS

3.5.1. Evaluación de la transmisión por semilla

No se observó transmisión por semilla de los síntomas de la enfermedad del achaparramiento de la alfalfa en las 672 plántulas evaluadas visualmente. Respecto a los virus asociados, solo se registró la transmisión por semilla de AMV, con una tasa de transmisión del 3,75% (21 plantas positivas/560 plantas evaluadas). No se registró transmisión por semilla de ADV, AEV-1, ALCV y BLRV.

3.5.2. Evaluación de la transmisión de la enfermedad mediante *Aphis craccivora*

En función a los antecedentes de una enfermedad similar citada en la cuenca del Mediterráneo, donde se menciona al pulgón negro de las leguminosas (*Aphis craccivora*) como el transmisor de la enfermedad (Leclant et al. 1973), se decidió realizar ensayos para determinar qué papel desempeña esta especie de áfido en la epidemiología del achaparramiento.

En el ensayo realizado y luego de dos meses de la transmisión con los áfidos colectados a campo, se registraron síntomas de amarillamiento y el desarrollo de enaciones (Figura 36) en una de las 40 plantas transmitidas con cinco pulgones/planta, y en tres de las 30 plantas transmitidas con 10 pulgones/planta, generando una tasa de transmisión del 2,5% y 10%, respectivamente.



Figura 36. Síntomas de la enfermedad del achaparramiento de la alfalfa (amarillamiento y enaciones, flechas negras) transmitidos por pulgones negros colectados sobre plantas de alfalfa enfermas.

3.5.3. Detección viral en pulgones colectados a campo

Luego de observar que las plantas de alfalfa transmitidas con pulgones negros reproducían los síntomas de la enfermedad, se comenzaron ensayos para determinar si estos áfidos tienen la capacidad de transportar los cinco virus asociados al achaparramiento de la alfalfa, y así, la posibilidad que esta especie sea vector de los mismos. Se analizaron los pulgones colectados a campo en grupos de 10 individuos lográndose detectar los cinco virus. El AMV se detectó en una de siete muestra de insectos provenientes de alfalfa positivas a este virus (14,3%), el ADV fue detectado en 1/6 (16,7%), el AEV-1 en 5/7 (71,4%), el ALCV en 6/6 (100%) y el BLRV en 5/6 (83,3%) (Tabla 14). Por otro lado, cuando se realizó la evaluación en pulgones individuales se logró detectar a cuatro (AMV, AEV-1, ALCV y BLRV) de los cinco virus presentes en las muestras de alfalfas; no se detectó al ADV. Siete de los diez pulgones analizados resultaron positivos para alguno de los virus analizados (AMV, AEV-1, BLRV y ALCV con 10%, 10%, 60% y 70%, respectivamente), registrándose infecciones triples AEV-1:BLRV:ALCV y AMV:BLRV:ALCV, cuatro infecciones dobles BLRV:ALCV y una infección simple ALCV (Tabla 15).

Tabla 14. Detección viral en muestras de ácidos nucleicos extraídos de alfalfas y de grupos de 10 pulgones que se encontraban colonizándolas.

Muestras		1	2	3	4	5	6	7
AMV	Alfalfa#	+	+	+	+	+	+	+
	Pulgones	-	-	+	-	-	-	-
ADV	Alfalfa	+	+	+	-	+	+	+
	Pulgones	+	-	-	-	-	-	-
AEV-1	Alfalfa	+	+	+	+	+	+	+
	Pulgones	+	+	+	+	+	-	-
BLRV	Alfalfa#	-	+	+	+	+	+	+
	Pulgones	-	+	-	+	+	+	+
ALCV	Alfalfa	+	+	+	+	+	+	s/d
	Pulgones	+	+	+	+	+	+	s/d

“+” Positivo; “-” Negativo, # Detección mediante serología. s/d: sin dato

Tabla 15. Detección viral en muestras de ácidos nucleicos extraídos a partir de pulgones individuales.

	Pulgón N°									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AMV	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ADV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AEV-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BLRV	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
ALCV	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+

“+” Positivo; “-” Negativo

3.5.4. Evaluación de la capacidad del pulgón negro para transmitir los virus asociados al achaparramiento

Luego de la detección de los cinco virus en pulgones infectados naturalmente, se realizaron ensayos para determinar si el pulgón negro es capaz de transmitirlos. Al analizar las plantas transmitidas se registraron diferentes tasas de transmisión para el AMV, AEV-1 y ALCV, y no se observó, al momento, transmisión del ADV ni del BLRV (Tabla 16). En el ensayo 1, se registraron tasas de transmisión para el AMV y el ALCV del 8% (Colonia Caroya N°3) y 40% (Colonia Caroya N°1), respectivamente. En el ensayo 2, las tasas registradas para el AMV y ALCV fueron del 11% y 33%, respectivamente. En el ensayo 3, se registró transmisión de AMV del 33% (San Vicente N°1), de ALCV del 67% y 75% (San Vicente N°1 y 2, respectivamente), y además se registró la transmisión de AEV-1 del 100% y 75% (San Vicente N°1 y 2, respectivamente).

Tabla 16. Ensayos de transmisión con pulgones negros colectados a campo. Se indica la procedencia y virus presentes en las plantas de alfalfa con achaparramiento sobre las que se colectaron los áfidos. Entre paréntesis se detalla el número de plantas positivas sobre el total ensayado para cada caso.

	PROCEDENCIA	VIRUS EN LAS PLANTAS ENFERMAS	TASA DE TRANSMISIÓN VIRAL				
			AMV	ADV	AEV-1	ALCV	BLRV
ENSAYO 1	Colonia Caroya N°1	AMV, ALCV, BLRV	0% (0/5)	-	-	40% (2/5)	0% (0/5)
	Colonia Caroya N°2	AMV, ADV, BLRV	0% (0/3)	0% (0/3)	-	-	0% (0/3)
	Colonia Caroya N°3	AMV, ADV	8% (1/12)	0% (0/12)	-	-	-
	Colonia Caroya N°4	AMV, ADV, ALCV, BLRV	0% (0/4)	0% (0/4)	-	0% (0/4)	0% (0/4)
ENSAYO 2	Santiago del Estero*	AMV, ALCV, BLRV	11% (1/9)	-	-	33% (3/9)	0% (0/9)
ENSAYO 3	San Vicente N°1	AMV, AEV-1, ALCV	33% (1/3)	-	100% (3/3)	67% (2/3)	-
	San Vicente N°2	AMV, ADV, AEV-1, ALCV, BLRV	0% (0/4)	0% (0/4)	75% (3/4)	75% (3/4)	0% (0/4)

*Se perdió una planta del ensayo, quedando en evaluación 9 de las 10 plántulas inicialmente ensayadas.

3.6. ANÁLISIS DE RESERVORIOS NATURALES DE LOS VIRUS ASOCIADOS AL ACHAPARRAMIENTO

Para evaluar posibles hospedantes alternativos de los virus asociados al achaparramiento, se recolectaron las siguientes especies vegetales, con síntomas similares a los ocasionados por virus, próximas a cultivos de alfalfa con achaparramiento: trébol blanco (*Trifolium repens*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), oreja de ratón (*Dichondra repens*) y *Melilotus spp.* Además, se colectaron plantas de *Sonchus oleraceus* y de *Talinum paniculatum* en los jaulones del instituto donde se hallaban plantas de alfalfa con la enfermedad. Las muestras colectadas provenían de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y Santiago del Estero (Figura 37).

Las plantas de trébol blanco presentaban síntomas de amarillamiento, deformación foliar y enaciones en las nervaduras de la cara abaxial de las hojas (Figura 38, C y D). El trébol rojo presentaba un sutil amarillamiento en las hojas (imágenes no mostradas). Las orejas de ratón expresaban síntomas de mosaico, cálico, deformación foliar y papilas tipo quilla en las nervaduras de la cara abaxial y un marcado achicamiento de las hojas (Figura 39). Las plantas de *Melilotus spp.* colectadas en los diferentes puntos, mostraban síntomas de mosaico clorótico, deformación foliar y en algunos casos, reducción del tamaño de la planta (Figura 40). Las plantas de *Sonchus oleraceus* mostraban síntomas de cálico intenso (Figura 41) y las plantas de *Talinum paniculatum* presentaban un mosaico suave con anillos cloróticos en sus hojas (Figura 42). Las plantas de trébol blanco, rojo y dichondra se colocaron en macetas y se mantuvieron en invernadero. En el caso de las dichondras, se colectaron a campo cuatro panes de tierra conteniendo plantas con síntomas, las que se llevaron a invernáculo. Luego de un tiempo se aislaron y transplantaron cuatro tallos por maceta, que sobresalían de la misma y presentaban los mejores síntomas, para analizarlos individualmente.

En los análisis virales de las muestras colectadas como posibles hospedantes alternativos, se detectó al AMV en todas las especies vegetales analizadas, a excepción del *Talinum paniculatum* que resultó negativo para los cinco virus evaluados. El ADV y AEV-1 sólo se detectaron en trébol blanco (*Trifolium repens*), y ALCV y BLRV no se detectaron en ninguna de las muestras analizadas (Tabla 17).



Figura 37. Sitios de colección de los posibles hospedantes alternativos.



Figura 38. Tréboles blancos sanos (A y B) y con síntomas de la enfermedad viral (C y D), donde se indican con flechas las enaciones observadas en las nervaduras.



Figura 39. *Dichondra repens* con síntomas de mosaico, cálico, deformación foliar y papilas colectadas a campo (A y B) y mantenidas en invernadero (C y D).



Figura 40. *Melilotus* spp. con deformación foliar y mosaico clorótico colectado próximo a un cultivo de alfalfa con achaparramiento en Santiago del Estero.



Figura 41. Planta de *Sonchus oleraceus* con síntomas de cálico colectada en un jaulón del IPAVE próxima a plantas de alfalfa con achaparramiento.



Figura 42. Plantas de *Talinum paniculatum* colectadas en el IPAVE, mostrando síntomas de mosaico y anillos cloróticos suaves.

Tabla 17. Evaluación de diferentes especies vegetales como posibles reservorios naturales de los virus identificados en alfalfa.

Especie Vegetal	N° de plantas evaluadas	Detección Viral				
		AMV	ADV	AEV-1	ALCV	BLRV
<i>Trifolium repens</i>	2	+	+	+	-	-
<i>Trifolium pratense</i>	1	+	-	-	-	-
<i>Dichondra repens</i>	4	+	-	-	-	-
<i>Melilotus spp.</i> ^{#1}	1	+	-	-	-	-
<i>Melilotus spp.</i> ^{#2}	4	-	-	-	-	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	2	+	-	-	-	-
<i>Talinum paniculatum</i>	2	-	-	-	-	-

#1: Santiago del Estero; #2: Buenos Aires; "+" Positivo; "-" Negativo

4. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO

La alfalfa, considerando su estructura genética, es una leguminosa polimórfica con 8 cromosomas como número básico ($x=8$) y con formas diploides ($2n=2x=16$) y tetraploides ($2n=4x=32$). La alfalfa que se cultiva es autotetraploide, es decir que todos los conjuntos cromosómicos provienen de la misma especie, y esta característica ocasiona que un cultivar esté integrado por una población de plantas genéticamente heterogéneas (Basigalup 2007). El procedimiento realizado en esta tesis permitió la obtención de plantas genéticamente idénticas mediante clonado de una única planta de alfalfa del cv. Costera SP INTA. Esto, no sólo permitió el mantenimiento de los diferentes aislamientos virales, sino que fue fundamental para la evaluación de la sintomatología desarrollada en cada caso, eliminando el efecto de la genética de las plantas sobre la expresión de síntomas (Rivera Coto 2007).

La evaluación de las plantas inoculadas mostró que las infecciones simples con AMV y ADV, y mixta AMV-ADV no presentaron síntomas. No se conoce si el ADV induce síntomas en infecciones simples, pero sí que el AMV induce síntomas de clorosis, anillos, cálico en las plantas de alfalfa infectadas (Jaspars y Bos 1980), lo que no fue observado en los tratamientos que lo incluían, a pesar de haberse corroborado serológicamente la infección con el mismo. Se ha mencionado que los síntomas inducidos por este y otros virus son influidos por las condiciones ambientales y varían estacionalmente (Basigalup 2007; Delgado Enguita y Luna Calvo 1992; Jaspars y Bos 1980), posiblemente las condiciones ambientales en las que se desarrolló el ensayo no fueron óptimas para que este virus y su combinación con el ADV induzcan síntomas en las plantas infectadas. Las plantas coinfectadas con AMV y ALCV mostraron síntomas similares a los del achaparramiento de la alfalfa (incluyendo enaciones) pero con un menor grado de severidad. Como se mencionó el AMV no induce enaciones en alfalfa y lo mismo ocurre con el ALCV, el cual induce síntomas de amarillamiento y enrulado de hojas (Roumagnac et al. 2015). El desarrollo de síntomas de enaciones en las plantas coinfectadas AMV-ALCV podría deberse a un sinergismo entre estos dos virus; se ha sugerido que virus no relacionados taxonómicamente en general interaccionan sinérgicamente (Syller 2012). Además, la mayor severidad de síntomas observada en el control positivo que en el coinfectado AMV-ALCV podría deberse al efecto sinérgico

de los restantes virus presentes en el control positivo, como ocurre en muchas infecciones mixtas (Mascia y Gallitelli, 2016; Syller *et al.*, 2012).

Hiperplasia e hipertrofia son los principales desórdenes anatómicos que dan origen al desarrollo de enaciones, macroscópicamente visibles, como consecuencia de una enfermedad viral (Bos y Grancini 1963). En el caso del achaparramiento de la alfalfa, ambas alteraciones estarían ocurriendo simultáneamente dando origen a las enaciones, en cambio en trébol, las anomalías observadas se deberían básicamente a alteraciones hiperplásicas. Una enfermedad viral similar fue reportada y estudiada en trébol blanco, donde los autores describieron la anatomía de las enaciones y encontraron que su origen se debía principalmente a hiperplasia e hipertrofia del floema y parénquima adyacente y que los tejidos afectados, en su mayoría, presentaron estructura interna indiferenciada y degeneración en el floema proliferado (Ullrich y Quantz 1964). Esto muestra una diferencia a lo observado con las enaciones del trébol blanco estudiado en esta tesis, debido a que se observan haces vasculares diferenciados tanto en el haz vascular principal del foliolo como en el hacecillo propio de la enación. Las diferencias observadas en el origen de las enaciones de alfalfa y trébol podrían deberse a un efecto de las interacciones específicas hospedante/patógenos, más aun teniendo en cuenta que ambos hospedantes presentan coinfecciones con distintos virus (Capítulo II, punto 3.6). Debido a que las descripciones histológicas de la sintomatología del achaparramiento en alfalfa se realizaron con una muestra enferma con el complejo de virus asociados a la enfermedad, se propone complementar estos estudios con evaluaciones histológicas de los síntomas desarrollados por la interacción AMV-ALCV, incluyendo muestras cronológicas en el proceso de formación de enaciones, de manera de obtener una mejor comprensión del desarrollo de este síntoma tan característico del achaparramiento.

Los mapas geofitopatológicos son herramientas muy útiles para una rápida visualización de la distribución geográfica de las enfermedades o virus que afectan plantas (Weltzien 1978). Los mapas obtenidos en esta tesis muestran claramente las altas prevalencias y amplias extensiones geográficas en las que se distribuyen la enfermedad y virus asociados. El AMV se detectó en todas las muestras de alfalfa con achaparramiento, siendo el virus con mayor dispersión geográfica. Este resultado es similar a los obtenidos por otros investigadores en estudios realizados en Australia y Arabia Saudita, quienes reportan al AMV como el virus más ampliamente distribuido en

las zonas de producción de alfalfa (Al-Shahwan et al. 2016; Leur y Kumari 2011). Además estos autores, mencionan al BLRV como el segundo virus con mayor dispersión en cultivos de alfalfa, después del AMV, coincidiendo con la amplia distribución que presenta en nuestro país. El achaparramiento de la alfalfa es, posiblemente, una de las enfermedades virales actuales de mayor relevancia que afecta los cultivos extensivos en Argentina, si se tiene en cuenta su alta prevalencia, amplia distribución geográfica y, además, considerando que no se la detectó únicamente en lotes con menos de un año de implantación. Por otro lado, la alfalfa puede actuar como reservorio de estos virus, que no solo infectarían nuevos cultivos de alfalfa sino también pueden afectar otros cultivos de importancia agrícola, como ejemplos: el AMV a soja (*Glycine max*), poroto (*Phaseolus vulgaris*), papa (*Solanum tuberosum*), pimiento (*Capsicum annuum*) (Nome Huespe et al. 2011; PLANTWISE 2017); el ALCV a haba (*Vicia faba*) (Roumagnac et al. 2015); el BLRV a soja, lenteja (*Lens culinaris*), haba, arveja (*Pisum sativum*) (Brunt et al. 1996; Kumari y Makkouk 2003; Vemulapati et al. 2010). En general, los resultados obtenidos son consistentes con las características perennes del cultivo, la amplia distribución y presencia de áfidos vectores, presencia de especies vegetales que actúan como reservorios de los virus (Delfino 1991; Hijano y Basigalup 1995; Imwinkelried et al. 2013; Nome Huespe et al. 2011), y además, en el caso del AMV por su transmisión por semilla (Jaspars y Bos 1980).

Al evaluarse las plantas del ensayo de pérdidas en la producción de semillas, todas las plantas de alfalfa evaluadas presentaron infección con más de un virus. Los cinco virus fueron encontrados tanto en plantas asintomáticas como las sintomáticas, aunque en diferentes proporciones, lo cual es consistente con la edad del cultivo (cinco años), tiempo suficiente para su infección. Las plantas con síntomas presentaron una disminución significativa en el rendimiento de producción de semillas. Los pesos promedios de 100 semillas, tanto en presencia o en ausencia de síntomas de la enfermedad, se encuentran dentro de los valores normales reportados para alfalfa (Formoso 2011). Cuando se evaluó el efecto asociado de los virus, se observó que el AMV y ALCV tuvieron la mayor influencia en la reducción del rendimiento de semillas, provocando una disminución estimada del 40 y 32%, respectivamente, de la pérdida total. Existen antecedentes que indican que el AMV, en condiciones de invernadero y sobre cultivares susceptibles, provoca pérdidas en el rendimiento de semillas de al menos un 45%, dependiendo del cultivar de alfalfa evaluado (Hemmati y

Mclean 1977). En esta tesis se evaluó la influencia conjunta de los virus sobre la producción de semillas, estimándose que la enfermedad estaría influyendo en alrededor del 38% de las pérdidas. Esta diferencia en las pérdidas podría deberse a que se trabajó con infecciones mixtas bajo condiciones naturales de infección y a que se comparó plantas de alfalfa sintomáticas con asintomáticas, y no con plantas sanas como en el reporte mencionado. Por otro lado, los resultados del análisis de componentes principales asociaron a AMV y ALCV con la manifestación de síntomas del achaparramiento. Este resultado confirmaría que estos dos virus son los más relevantes en la manifestación de síntomas, revalidando los resultados obtenidos en la evaluación biológica de expresión de síntomas.

Las interacciones virus-hospedante que resultan en la transmisión por semilla del patógeno no son frecuentes (Stace-Smith y Hamilton 1988); sin embargo son ecológicamente importantes para la sobrevivencia y dispersión del virus que la posee. No obstante, las tasas de transmisión por semilla no son necesariamente, por si solas, un buen indicador de su importancia epidemiológica. Bajas tasas de transmisión, combinadas con la dispersión por insectos vectores, pueden resultar en el desarrollo de una enfermedad viral con graves implicancias económicas. En esta tesis, de los cinco virus evaluados, solo se registró transmisión por semilla del AMV, cuya tasa se encuentra dentro del rango reportado por otros autores (Hemmati y Mclean 1977). Para los restantes virus, o no se ha mencionado su capacidad de transmisión por semilla o aún no existen estudios por tratarse de virus recientemente descritos.

Cuando inicialmente se evaluó la capacidad transmisora del pulgón negro, se observó que es capaz de transmitir la enfermedad del achaparramiento de la alfalfa, como se había determinado para una enfermedad similar descrita en Europa (Leclant et al. 1973). Posteriormente, se evaluó si el pulgón negro en condiciones naturales es portador de los cinco virus detectados en alfalfas de nuestro país, resultando positivo para todos los casos. Esto mostraría la posibilidad que este áfido actúe como vector de los cinco virus, aunque cuando se analizó su capacidad transmisora, solo se registró transmisión de tres de ellos: AMV, AEV-1 y ALCV. La capacidad del pulgón negro de transmitir al AMV y al ALCV ya ha sido mencionada (Cardin y Moury 2000; Roumagnac et al. 2015) y en el caso del AEV-1, no se conocen estudios al respecto, por tratarse de un virus recientemente descrito. Los porcentajes de transmisión del AMV y

ALCV obtenidos en este trabajo (entre un 8-33% y 33-40%, respectivamente) están dentro de los rangos ya informados (Bao et al. 2005; Roumagnac et al. 2015).

En este trabajo no se logró transmitir al BLRV y ADV, esto se contrapone con resultados obtenidos por otros autores donde demuestran que el pulgón negro tiene la capacidad de transmitir al BLRV (Ashby 1984). Existen reportes de transmisión por el pulgón negro del Alfalfa enation virus (AEV), otro rhabdovirus que infecta alfalfa en Europa (Leclant et al. 1973), pero esto no es concluyente ya que se trata de un virus de la misma familia pero no de la misma especie viral. La no transmisión de ADV podría deberse a que el pulgón negro no es el transmisor del mismo, dándose la imposibilidad del virus de superar alguna/s de las barreras físicas/biológicas en el insecto; pero también a que no se cumplió el período de latencia (Hogehout et al. 2008), o a que la eficiencia de transmisión es muy baja por lo que se necesitaría un mayor número de repeticiones del ensayo para poder registrar transmisión, entre otras posibilidades. Esto último, también podría aplicarse para el caso del BLRV, ya que el pulgón negro tiene la capacidad de transmitirlo pero no es su principal vector (Ashby 1984). Otra posibilidad de la no detección de BLRV y ADV podría ser un tiempo de observación insuficiente de las plantas ensayadas, que les permita acumular los virus y así poder ser detectados mediante las técnicas empleadas. Un aspecto interesante a abordar es si la presencia simultánea de más de un virus en el pulgón, podría interferir en los mecanismos de transmisión, sobre todo considerando que se detectaron comúnmente dos e incluso tres virus en un único pulgón.

De los cinco virus evaluados en las muestras de los posibles hospedantes alternativos, se detectó al menos uno de ellos en cinco de las seis especies vegetales analizadas. El AMV fue detectado en *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Melilotus spp.* y *Sonchus oleraceus* lo que ya fuera reportado (Al-Shahwan et al. 2016; VIDE 2017). Sin embargo, en Argentina no hay antecedentes de la infección de *T. pratense* con este virus, por lo que sería el primer reporte para el país. El AMV también fue detectado en *Dichondra repens*, para lo cual no conocemos reportes en el mundo al respecto, y esta sería la primera mención de esta especie como hospedante natural del AMV. El BLRV no se detectó en ninguna de las muestras analizadas a pesar que tiene la capacidad de infectar, entre otros a *T. repens*, *T. pratense* y *S. oleraceus* (Al-Shahwan et al. 2016; VIDE 2017); probablemente, se deba al escaso número de plantas evaluadas, máximo teniendo en cuenta la alta prevalencia determinada en este trabajo

para BLRV en Argentina. Un caso similar podría ser el de *S. oleraceus*, que solo se lo determinó infectado con AMV, ya que en un relevamiento realizado en Arabia Saudita de malezas próximas a cultivos de alfalfa, fue mencionado como hospedante de todos los virus que identificaron en el cultivo, por lo que los autores manifestaron la importancia epidemiológica de esta especie (Al-saleh y Amer 2013). Además, en los muestreos se debería tener en cuenta que las infecciones virales son frecuentemente asintomáticas en plantas silvestres (Ayllón et al. 2016) y en este trabajo solo se evaluaron posibles hospedantes alternativos con síntomas similares a los virales. ADV y AEV-1, fueron detectados únicamente en *T. repens*, este es el primer reporte de esta especie vegetal como reservorios para ambos virus. Las plantas de *Talinum paniculatum* resultaron negativas para los cinco virus que afectan alfalfa; los síntomas desarrollados podrían deberse a la infección con alguna otra especie viral.

5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

- Las plantas de alfalfa infectadas con la combinación AMV-ALCV fueron las que mostraron síntomas similares a los de la enfermedad, indicando que la sintomatología del achaparramiento de la alfalfa podría estar ocasionada por el sinergismo de estos dos virus.
- Los demás virus (ADV, BLRV y AEV-1) no serían necesarios para inducir los síntomas de achaparramiento en alfalfa, aunque no se descarta que su presencia pudiera influir en la expresión final de la severidad de síntomas cuando se encuentran en coinfección con el par AMV-ALCV.
- Se deberían ensayar los restantes virus en forma aislada y otras combinaciones virales. De esta manera se podría determinar que síntomas inducen aquellos virus para los que aún no se conocen y determinar si algún otro sinergismo podría inducir los síntomas de achaparramiento al igual que el par AMV-ALCV.
- Las enaciones en alfalfa, aparentemente, estarían causadas por hipertrofia e hiperplasia celular, mientras que en trébol blanco por hiperplasia celular. Estas son las primeras descripciones de las alteraciones a nivel tisular que originan las enaciones inducidas por esta enfermedad.
- La enfermedad viral y los virus evaluados son altamente prevalentes y presentan amplias distribuciones geográficas en los alfalfares del territorio argentino.
- La enfermedad del achaparramiento ocasiona pérdidas en la producción de semillas por planta pero no afecta el peso de las mismas. El AMV y ALCV son los componentes virales que mayor influencia tienen sobre la producción de semillas y la expresión de síntomas, mostrando su mayor importancia como integrantes del complejo viral de las plantas de alfalfa con achaparramiento.
- De los cinco virus asociados a la enfermedad del achaparramiento de la alfalfa, solo se transmitió por semilla el AMV, por lo que tampoco se registró transmisión de los síntomas de la enfermedad.

- Se detectó la presencia de los cinco virus en estudio en pulgones negros (*Aphis craccivora*) naturalmente infectados, indicando la posibilidad que este áfido actúe como vector de todos ellos.
- El pulgón negro de las leguminosas no sólo transmite la enfermedad del achaparramiento de la alfalfa, sino tres (AMV, AEV-1 y ALCV) de los cinco virus asociados a la enfermedad. Ésta es la primera evidencia la transmisión por vector del AEV-1.
- El trébol blanco que presentó una sintomatología muy similar a la observada en plantas de alfalfa con achaparramiento, es un hospedante natural del AMV, ADV y AEV-1.
- Trébol rojo, dichondra, *Melilotus spp.* y *Sonchus oleraceus* son reservorios naturales del AMV.
- Esta es la primera mención del trébol blanco como hospedante natural de ADV y AEV-1, y de *Dichondra repens* como hospedante natural de AMV.



CAPÍTULO III

*Estudios moleculares del Alfalfa
mosaic virus y Bean leafroll virus*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENOMA VIRAL

Los genomas de los virus que afectan plantas poseen al menos una cadena de ácido nucleico, de ADN o ARN, que codifican proteínas estructurales (como la proteína de la cápside) y proteínas no estructurales (como la replicasa, transcriptasa reversa, proteasa), implicadas en el proceso de infección, movimiento de corta y larga distancia dentro de la planta, transmisión por vectores, entre otros (Rezende y Kitajima 2011). Los virus presentan diferentes estrategias para la traducción de los diferentes genes codificados en su genoma, cuyo tamaño varía entre 2500 a 19000 nucleótidos, donde la mayoría presenta entre 4000 a 6000 nt, y pueden ser lineales o circulares y estar compuestos, básicamente, por:

- **ARN simple cadena de sentido positivo**, la mayoría de los virus poseen este tipo de genoma, el cuál actúa directamente como un ARN mensajero para la síntesis de las proteínas virales. Entre ellos se encuentran los miembros de la familia *Luteoviridae*, como el Alfalfa enamovirus 1 (AEV-1) y *Bean leafroll virus* (BLRV), y *Bromoviridae*, como el *Alfalfa mosaic virus* (AMV).
- **ARN simple cadena de sentido negativo**, que mediante la enzima viral ARN polimerasa dependiente de ARN (presente en el virión), transcribe el ARN genómico en ARN mensajero. Este tipo de genoma lo tienen, entre otros, los miembros de la familia *Rhabdoviridae*, como el *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus* (ADV).
- **ARN doble cadena**, la polimerasa viral sintetiza el ARN mensajero a partir de una de las dos cadenas del ARN genómico. Se presenta en virus de las familias *Reoviridae*, *Partiviridae*, entre otros.
- **ADN doble cadena**, en su ciclo de replicación hay una etapa de transcripción inversa con la ARN polimerasa del hospedante. Lo presentan los virus de la familia *Caulimoviridae*.
- **ADN simple cadena**, emplean las enzimas del hospedante y poseen una etapa de ADN doble cadena donde la transcripción es bidireccional. Entre otros, los

miembros de la familia *Geminiviridae*, como el *Alfalfa leaf curl virus* (ALCV), presentan este tipo de genoma (Ayllón et al. 2016).

El AMV, como ya se ha mencionado, es el único miembro del género *Alfamovirus* de la familia *Bromoviridae*; presenta un genoma de ARN simple cadena, tripartito (ARN1-3) y sentido positivo (Figura 8; Capítulo I). Inicialmente sólo se conocían las secuencias genómicas completas de cuatro aislamientos del AMV provenientes de EUA (L00163/X01572/K03542), Italia (FN667965-67), España (FR715040-42) y China (HQ316635-37) aislados de trébol blanco, lavanda (*Lavandula* sp.), madreSelva (*Lonicera* sp.) y papa, respectivamente, y ninguna proveniente de alfalfa, hospedante en el que fue identificado originalmente (Weimer 1931). En Argentina, a pesar que ya habían transcurrido 62 años desde su primera mención (Zabala 1952), no había información sobre la secuencia genómica de aislamientos locales, ni de cómo ellos se relacionan entre sí o con los descritos en otras partes del mundo (Trucco et al. 2014). Información sobre su variabilidad génica puede brindar el conocimiento necesario para estudiar la evolución de la población residente en Argentina. Específicamente, las comparaciones de las secuencias de las CPs son sumamente útiles para establecer sus relaciones filogenéticas (Parrella et al. 2000). El BLRV, como se indicó en el Capítulo I, es un miembro del género *Luteovirus* de la familia *Luteoviridae*; su genoma es de ARN simple cadena de sentido positivo y contiene cinco ORFs, típicos de los miembros de este género (Domier et al. 2002). Previo a este trabajo, solo se conocían dos genomas completos de BLRV provenientes de EUA, aislados de haba (AF441393) y arveja (HM439776), y no había antecedentes de su detección en Argentina.

En la actualidad existen tecnologías que permiten obtener la/las secuencia/s completa de los genomas de los virus presentes en una muestra vegetal, comúnmente denominadas como secuenciaciones masivas. Entre las más generalizadas están la pirosecuenciación y la secuenciación HiSeq (Barba et al. 2014). La tecnología de pirosecuenciación (Roche 454) se basa en la detección de la molécula de pirofosfato inorgánico (PPi) liberada durante la polimerización debido a la incorporación del nucleótido complementario. El PPi activa una cascada enzimática, en la que intervienen las enzimas luciferasa y sulfurilasa, generando una señal fluorescente cuya intensidad es proporcional a la cantidad de PPi liberado (o nucleótido incorporado). En la tecnología Illumina HiSeq, la reacción de secuenciación se realiza con los cuatro nucleótidos marcados con un fluoróforo de un color en particular, de manera de detectar e

identificar la incorporación de cada uno durante la polimerización. El método de amplificación del ADN molde es mediante PCR en emulsión y en puente, para 454 e Illumina, respectivamente. La tecnología Roche 454 genera lecturas más largas que la de Illumina pero es más costoso y genera menor volumen de datos. Una herramienta eficiente para la detección y obtención del genoma de virus en mezclas y con diferentes tipos de ácidos nucleicos, es la secuenciación masiva Illumina de ARN pequeños interferentes (siRNAs) (Kreuze et al. 2009; Wu et al. 2015), como se mencionó en la Introducción del Capítulo I. La elección de la tecnología de secuenciación a emplear dependerá de varios factores como el tamaño esperado del genoma en estudio, su complejidad, la profundidad o *coverage* que se desee, la exactitud en la secuenciación que se necesite, los costos, entre otros (Barba et al. 2014).

1.2. ESTUDIOS FILOGEOGRÁFICOS

Los estudios filodinámicos se basan en la relación que existe entre la evolución de una secuencia nucleotídica y el tiempo, y pueden proveer estimaciones de la estructura de una población en el pasado (Drummond et al. 2005). La gran mayoría de las especies en la naturaleza, presentan cierto grado de asociación entre su estructura genética y la geografía, por lo que si a los estudios filodinámicos se les incorpora información espacial, se puede reconstruir la dispersión geográfica del organismo. Estos tipos de estudios se basan en la premisa que los procesos epidémicos, como el crecimiento de la población viral y sus subdivisiones, dejan una huella cuantificable en los genomas virales a través del paso del tiempo. En los virus que evolucionan rápidamente, la evolución de la secuencia nucleotídica ocurre simultáneamente con la dispersión geográfica, y de esta manera el proceso espacio-filodinámico puede ser inferido a través de los datos genómicos y análisis filogeográficos (Faria et al. 2011). Las relaciones intraespecíficas entre las variantes genéticas de una secuencia nucleotídica (haplotipos), se pueden representar gráficamente mediante una red, lo que permite observar de manera rápida si existe relación entre ellos y su distribución espacial (Vázquez-Domínguez et al. 2009). A su vez, los haplotipos pueden agruparse en haplogrupos cuando comparten una o más sustituciones características.

Los virus cuyos genomas están compuesto por ARN, poseen una alta variabilidad genética como consecuencia de la rápida replicación viral y de las altas tasas mutacionales, esto debido a la falta de mecanismos de corrección de errores de las ARN

polimerasas (García-Arenal et al. 2001). La variabilidad genética que posean dependerá básicamente de tres fuerzas evolutivas: la deriva génica, selección natural y el flujo génico (Moya et al. 2004). La primera es un proceso aleatorio donde algunos de los caracteres de la población se mantendrán en las futuras generaciones. En el caso de los virus que afectan plantas, el número de individuos que efectivamente se reproducirá y transmitirá su material genético a la descendencia, es mucho menor al tamaño de la población dentro de la planta. La selección natural es un proceso direccional en el cual aumentará la frecuencia en la población de aquellos caracteres que le otorguen ventajas a sus portadores. Estos eventos pueden tener lugar en el movimiento del virus a otras células del hospedante, en la transmisión por vectores a otra planta o en interacciones con otros virus en coinfecciones (García-Arenal et al. 2001; Moya et al. 2004). El flujo génico, o sea la transferencia de genes de una población a otra, puede presentarse a diferentes escalas durante el movimiento viral a otras partes de la planta, otras plantas y otras regiones geográficas (Moya et al. 2004).

Los estudios filogeográficos se basan en la teoría de la coalescencia, la cuál considera que dos o más muestras tomadas en un tiempo (t) van a converger en un ancestro común (genealogía ancestral) (Lemey, Salemi, et al. 2009). Actualmente, predomina el empleo de métodos estadísticos para el análisis de la filogeografía, especialmente los métodos bayesianos, con los cuáles se determina la probabilidad de obtener la tipología del árbol según nuestros datos. En estos métodos se utilizan técnicas computacionales como las cadenas de simulación de Markov-Montecarlo (MCMC) (Li et al. 2000) que permiten trabajar sobre filogenias utilizando como datos previos (*priors*) distintos modelos demográficos, y seleccionar el que mejor se ajusta a nuestros datos según el Factor de Bayes. Además, permiten calibrar el reloj molecular considerando que la evolución de los taxones puede seguir un reloj molecular estricto o relajado (Lemey, Rambaut, et al. 2009). Normalmente, los datos de localización de las muestras están caracterizados por datos continuos o discretos. La elección entre modelos filogeográficos continuos o discretos depende del objetivo de estudio y tipo de información que se tenga; si la dispersión involucra variables complejas o grandes distancias se suele emplear los discretos, en cambio, si la dispersión ocurre en áreas circunscritas se suelen elegir los continuos. En los modelos discretos, el proceso de dispersión se modela considerando tasas de transición entre las localizaciones geográficas y se suelen elegir aquellas que mejor explican nuestros datos mediante un

procedimiento de selección por búsqueda estocástica Bayesiana (BSSVS, del inglés *Bayesian stochastic search variable selection*) (Faria et al. 2011). De esta manera, los estudios de evolución molecular son herramientas útiles para estimar la dispersión geográfica de un virus, su adaptación a nuevos hospedantes, y para diseñar mejores estrategias de control de la enfermedad que causan (Elena et al. 2011; Jones 2009).

SOBRE ESTE CAPÍTULO

El presente capítulo comprende la determinación de las secuencias genómicas completas del AMV y BLRV mediante secuenciaciones masivas y sus respectivos análisis, incluyendo estudios de variabilidad genética y filogenéticos de los genes de sus cápsides proteicas. Además, y debido a la importancia del AMV en el cultivo de alfalfa, se profundizaron estudios moleculares de las secuencias génicas de las CPs, incorporando diferentes aislamientos del AMV a nivel país y mundial, y abordando análisis filogenéticos y filogeográficos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. SECUENCIACIONES MASIVAS.

Se realizaron extracciones de ARN total a partir de una muestra de alfalfa enferma (cv. Costera) colectada en Manfredi, Córdoba, empleando el *RNeasy Plant Minikit* (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), según indicaciones del fabricante. El procedimiento se realizó desde material vegetal y desde enriquecimientos virales (obtenidos desde el mismo material, CAPÍTULO I) y los ARNs totales fueron enviados para su secuenciación a FASTERIS SA-Suiza (secuenciación de ARNs pequeños) e INDEAR-Argentina (pirosecuenciación), respectivamente.

Los datos crudos, provenientes de las secuenciaciones masivas, se procesaron con el programa pipeline *ngs_backbone* 1.4.0 (Blanca et al. 2011) y se removieron los adaptadores y las regiones de baja calidad. Las secuencias limpias fueron ensambladas *de novo* utilizando el programa *iAssembler* v1.30 (Zheng et al. 2011) y la identidad de los *contigs* individuales se analizó empleando la secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos con las herramientas BLASTn y BLASTx, respectivamente (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Luego, las lecturas limpias fueron mapeadas contra los genomas más relacionados (FN667965/6/7 para el AMV y HM439776 para el BLRV) empleando el programa pipeline *ngs_backbone* 1.4.0. Las secuencias consensos de los genomas se determinaron con el comando SAMtools *mpileup* y los archivos obtenidos se visualizaron y analizaron con el programa Tablet (Milne et al. 2013).

Los ORFs de las secuencias consenso de ambos virus y las identidades de las proteínas que codifican se analizaron empleando el programa Geneious v 4.8.3 (disponible en <https://www.geneious.com/>) y las herramientas ORF *finder* y BLAST (disponibles en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> y <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, respectivamente). La secuencia genómica completa y cada región codificante del AMV argentino fue comparada con las disponibles provenientes de China (HQ316635-37; papa), Italia (FN667965-67; lavanda), España (FR715040-42; madreSelva) y EUA (L00163, X01572, K03542; trébol blanco). La secuencia genómica completa del BLRV argentino se comparó con las dos disponibles de EUA aisladas de arveja (HM439776) y haba (AF441393), y la secuencia

completa de la cápside proteica con las cinco secuencias completas, de este gen, provenientes de Alemania (X53865) y de EUA (U15978; GQ404380; AF441393-haba; HM439776-arveja). Las secuencias seleccionadas en cada caso se alinearon con el programa ClustalX 2.1 y se determinaron los porcentajes de identidad nucleotídica y aminoacídica con el programa BioEdit 7.0.9.0. Además, se realizó el análisis filogenético basado en el gen completo de la CP del BLRV-Arg empleando un método de distancia, *neighbor-joining* (NJ), y uno probabilístico, *maximum likelihood* (ML), y los programas MEGA 5.0 y PhyML 3.0, respectivamente. Ambos métodos se realizaron con un *bootstrap* de 1000.

2.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y FILOGEOGRÁFICOS DE AISLAMIENTOS DE AMV BASADOS EN EL GEN DE LA CP

2.2.1. Muestras Vegetales

De manera de contar con al menos 15 secuencias génicas de las CPs, se seleccionaron 19 muestras de alfalfa colectadas en diferentes momentos y espaciadas geográficamente, contemplando diversas regiones del país productoras de este cultivo y con distintas características agroecológicas. Además se incluyó la secuencia de la CP del aislamiento AMV-Arg previamente secuenciado proveniente de Manfredi, Córdoba (Trucco et al. 2014), aquí denominado “AMan” (Tabla 18).

Tabla 18. Muestras empleadas en los análisis filogenéticos y filogeográficos del AMV en Argentina. Se indica el año de colecta y origen geográfico.

Muestra (ID)	Provincia	Año Colecta	Ubicación	
			Latitud	Longitud
ASdE	Santiago del Estero	2010	-27,784°	-64,267°
Raf	Santa Fe		-31,250°	-61,559°
Treb	La Pampa		-35,611°	-63,785°
AMan[#]	Córdoba	2011	-31,833°	-63,751°
Gua	San Juan		-32,047°	-68,568°
Vic	Entre Ríos		-32,574°	-60,065°
Whee	Santa Fe		-33,810°	-61,318°
SJ	Mendoza		-32,543°	-68,653°
BSdE	Santiago del Estero	2012	-28,651°	-63,048°
ACat	Catamarca		-28,237°	-65,637°
PS	Jujuy		-23,969°	-64,298°
Tuc	Tucumán		-26,243°	-65,262°
Sal	Salta		-25,149°	-64,097°
Cha	Chaco		-26,736°	-60,386°
BCat	Catamarca	2013	-28,635°	-65,757°
Neuq	Neuquén	2014	-37,384°	-70,273°
RioN	Río Negro		-39,162°	-66,121°
Men	Mendoza		-35,789°	-69,669°
BMan	Córdoba		-31,832°	-63,752°
HAsc	Buenos Aires		2015	-39,393°

(#) AMan=AMV-Arg

2.2.2. Obtención de las secuencias génicas de las cápsides proteicas

RT-PCRs: se les extrajo el ARN total a las 19 muestras seleccionadas, empleando el reactivo TRIZOL, según se indicó en el Capítulo I, punto 2.1. Los genes de las CPs se obtuvieron empleando los oligonucleótidos AMV-F y AMV-R, los cuáles amplifican un fragmento de 884 pb que incluye el gen completo de la CP (Capítulo I, punto 2.4). Las RTs se realizaron con ~600 ng de ARN total, la enzima MMLV y el juego de oligonucleótidos mencionado. Las PCRs se desarrollaron con la enzima de alta fidelidad KAPA HiFi Hot Start (KAPA Biosystems, EUA), según indicaciones del fabricante, el par de oligonucleótidos mencionados y 2 µl de cADN. Las restantes condiciones para las RTs y PCRs están descriptas en el Capítulo I, punto 2.5.

Purificación y secuenciación: los productos amplificados en las PCRs se purificaron empleando el *ZYMO CLEAN™ Gel DNA Recovery Kit* (ZYMO RESEARCH, Irvine, EUA), según especificaciones del fabricante, fueron cuantificados por espectrofotometría (Nano Drop, Thermo Fisher Scientific, EUA) y enviados a Ruralex (Buenos Aires) para que cada muestra sea secuenciada dos veces, utilizando los oligonucleótidos específicos AMV-F y AMV-R (Capítulo I, punto 2.4), mediante el método de Sanger.

Determinación de los genes de las CPs: los resultados obtenidos en las secuenciaciones se analizaron con programas del paquete informático Staden 2.0.0b10. Los cromatogramas y la calidad de cada secuencia se visualizaron con el programa Trev 1.9-r y se eliminaron las regiones de baja confianza. La secuencia consenso de cada muestra se obtuvo ensamblando las dos secuencias con los programas Pregap4 1.6-r y GAP v4.11.2-r. Finalmente, cada secuencia consenso se analizó con la herramienta *ORF finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) para obtener la secuencia del gen de la CP (desde el codón de inicio al de stop), la cual se confirmó con la herramienta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

2.2.3. Análisis de las secuencias génicas de las CPs

Red de haplotipos: la red de variantes (haplotipos) de las secuencias génicas de las CPs de los diferentes aislamientos del AMV de Argentina (Tabla 18), se obtuvo alineando las 20 secuencias de las CPs con el programa ClustalX2 (Larkin et al. 2007). Luego, se empleó el programa DnaSP versión 5.10.01 (Librado y Rozas 2009) y el

archivo nexus para generar el archivo de datos de haplotipos con los sitios informativos (se removieron los sitios invariables). La red de haplotipos se construyó con el método *median-joining* y el programa Network versión 5 (Bandelt et al. 1999), y finalmente se editó para su visualización con el programa Inkscape versión 0.91 (<https://inkscape.org/es/>).

Análisis filogenético: se realizaron empleando las 20 secuencias de Argentina (Tabla 18) junto con las disponibles en la base de datos del GenBank, totalizando 76 secuencias génicas completas de las CPs. Se utilizó el programa ClustalX2 para realizar el alineamiento de las secuencias y el programa MEGA 5.05 para la selección del mejor modelo de sustitución nucleotídica (modelo K2+G+I) y obtención de los árboles filogenéticos empleando los métodos *Neighbor-Joining* (NJ) y *Maximum-Likelihood* (ML), ambos con un *bootstrap* de 10000.

Análisis filogeográfico: se determinó el proceso de dispersión del AMV a nivel de país y a nivel mundial. A nivel país se determinó con las secuencias completas del gen de la CP del AMV de los 20 aislamientos argentinos obtenidos desde alfalfa (Tabla 18). Para evaluar el proceso de dispersión a nivel mundial, las secuencias argentinas se agruparon por año y se incorporaron las secuencias completas disponibles en GenBank provenientes de otros países y hospedantes, que cuentan con la información necesaria para este análisis (fecha y localización), totalizando en este caso 55 secuencias génicas de la CP del AMV (Tabla 19).

Las secuencias se alinearon con el programa Clustal X2 (Larkin et al. 2007) y se seleccionó el mejor modelo de sustitución nucleotídica con el criterio de información Akaike implementado en el programa jModelTest v 2.1.6 (Darriba et al. 2012). Luego, se empleó el programa BEAUti v1.7.5 para generar los archivos de entrada para correr el programa BEAST, en los cuales se consideró diferentes parámetros y modelos demográficos, así como también condiciones del análisis (método de MCMC) (Tabla 20). Finalmente, estos archivos se corrieron con el programa BEAST v1.7.5 (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*), el cual realiza un muestreo de los árboles y parámetros de los modelos seleccionados mediante métodos Bayesianos (Drummond et al. 2012).

La confianza de los resultados arrojados por el programa BEAST se evaluó con el programa Tracer v 1.5 (Rambaut et al. 2014), comprobando su convergencia mediante

un valor de tamaño efectivo de muestra (*Effective Sample Size*, ESS) superior a 200 (Drummond et al. 2006) y por inspección visual de la estacionalidad de cada parámetro. La tasa de evolución, la edad del ancestro común más reciente (*time of the Most Recent Common Ancestor*, t_{MRCA}) y la reconstrucción demográfica se analizaron con el programa Tracer v 1.5. El árbol de máxima credibilidad de clado (*Maximun clade credibility tree*, MCCT) se generó con el programa Tree Annotator v 1.7.5, el cual está incluido dentro del paquete BEAST, y se visualizó con el programa FigTree v 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) donde se analizó la localización más probable para el t_{MRCA} con su respectiva probabilidad. Para la visualización del proceso de dispersión viral, se empleó el programa SPREAD v 1.0.6 (Bielejec et al. 2011), empleando el MCCT y los árboles muestreados con el método MCMC. El programa Google Earth (Google Inc., 2015) se utilizó para observar la dispersión del AMV temporalmente en el mapa de la República Argentina y en el mapa mundial, según corresponda.

Tabla 19. Secuencias empleadas para el análisis filogeográfico del AMV. En cada caso se indica el año de colecta y origen geográfico.

País	N° Acceso GenBank	Año Colecta	N° Secuencias empleadas	Ubicación del País			
				Latitud	Longitud		
ARGENTINA (*)	-	2010	3	-31,832°	-63,752°		
	-	2011	4				
	-	2012	7				
	-	2013	1				
	-	2014	4				
	-	2015	1				
AUSTRALIA	HM807305	1985	3	-35,294°	149,294°		
	HM807304						
	HM807307						
	JX112757					1986	1
	JX112758					2001	1
CANADÁ	DQ314750	2003	1	45,421°	-75,696°		
CHINA	HQ316637	2009	1	39,894°	116,401°		
	JQ281522	2010	1				
	LK937168	2013	1				
EGIPTO	HQ288892	2010	1	26,949°	30,757°		
EUA	AY340070	2002	1	35,516°	-86,580°		
	HQ185569	2006	1				
	HQ185568	2009	1				
ESPAÑA	HE591387	2011	2	40,489°	-3,747°		
	HE591386						

	JQ685859					
	JQ685860	2008	4			
	JQ673587					
	JQ685858					
IRAN	KM655876	2010	1			
	KM655878			30,244°	57,061°	
	KM655875					
	KM655873					
	KM655871	2011	7			
	KM655874					
	KM655872					
	JX853610					
	ITALIA	FR854391	2011	1		
		HF570950	2012	1	44,298°	8,465°
KP233749		2014	1			
NUOVA ZELANDA	KC767662					
	KC767661	2010	3	-43,542°	171,364°	
	KC767660					
SERBIA	FJ527748	2008	2	44,819°	20,472°	
	EU925642					

(*) Los números de accesos GenBank para las 19 muestras argentinas secuenciadas para este análisis están en trámite.

Tabla 20. Detalle de los modelos y parámetros empleados en el análisis filogeográfico

DISPERSIÓN DE AMV		
	ARGENTINA	MUNDO
Modelo de Sustitución	GTR+I+G	GTR+I+G
Modelo de Reloj Molecular	Lognormal Relaxed Clock (uncorrelated): Distribución uniforme (valor inicial: 1,0E-3; valor máximo: 1,0E-2; valor mínimo: 1,0E-5).	Lognormal Relaxed Clock (uncorrelated): Distribución uniforme (valor inicial: 1,0E-3; valor máximo: 1,0E-2; valor mínimo: 1,0E-5).
Modelos Demográficos	Constante y Bayesian Skyline	Constante, Exponencial y Bayesian Skyline
Método de Cadenas de Markov Montecarlo (MCMC)	Número de generaciones: 1×10^8 Frecuencia de muestreo: cada 50.000	Número de generaciones: 2×10^8 Frecuencia de muestreo: cada 100.000

3. RESULTADOS

3.1. SECUENCIAS GENÓMICAS DEL AMV Y BLRV

Con las técnicas de secuenciación masiva empleadas en esta tesis, se obtuvieron las secuencias genómicas completas de los aislamientos del *Alfalfa mosaic virus* (AMV) y *Bean leafroll virus* (BLRV) provenientes de Manfredi (Córdoba), y en forma parcial con escasa representación, secuencias genómicas del resto de los virus detectados en alfalfa con achaparramiento: ADV, AEV-1 y ALCV. Los genomas completos de estos tres virus se fueron obteniendo en colaboración con el grupo de trabajo.

La secuencia del AMV argentino (AMV-Arg), compuesta por 3643 nucleótidos (nt) del ARN1, 2593 nt del ARN2 y 2038 nt del ARN3, fue depositada en la base de datos del GenBank (KC881008/09/10). El ARN1 codifica la proteína 1 (P1) de 1126 aminoácidos (aa), el ARN2 la proteína 2 (P2) de 790 aa y el ARN3 codifica la proteína de movimiento (MP) y la de la cápside (CP) de 300 aa y 218 aa, respectivamente (Figura 43). La secuencia genómica y cada región codificante del AMV-Arg se comparó con las cuatro secuencias completas de los aislamientos provenientes de China, Italia, España y Estados Unidos (EUA). El AMV-Arg presentó identidades a nivel de nucleótidos del 97,0-99,1% para el ARN1, 95,9-98,1% para el ARN2 y 96,0-98,0% para el ARN3. Los porcentajes de identidades de nucleótidos para los genes P1, P2, MP y CP estuvieron entre el 93,7 y 99,0%, y los correspondientes a la secuencia deducida de amino ácidos entre el 93,4 al 99,5% (Tabla 21).

El genoma completo del aislamiento argentino del BLRV (BLRV-Arg) está compuesto por 5884 nucleótidos conteniendo cinco marcos de lectura abiertos (ORF1 al 5), los cuáles codifican las proteínas implicadas en la replicación (P1 y P2 de 368 y 542 aa, respectivamente), cubierta (P3: 196 aa), movimiento (P4: 142 aa), y transmisión por áfidos (P5: 525 aa) (Figura 44); fue depositada en la base de datos del GenBank (KR261610). El genoma presentó identidades del 98,5% y 96,3% con los genomas virales provenientes de EUA y aislados de arveja y haba, respectivamente. La longitud del genoma del BLRV-Arg fue igual que la proveniente de arveja y presentó 80 nt menos que el de haba en regiones no codificante. El análisis de la secuencia de la CP reveló valores de identidades entre 98,6 y 99,6% a nivel de nucleótidos y 98,9 al 100% a nivel de aminoácidos, cuando se la comparó con las cinco secuencias completas de CP

disponibles en el GenBank (Tabla 22). Además, los estudios filogenéticos basados en el gen de la CP muestran que el aislamiento de Argentina está estrechamente relacionado con el de EUA (HM439776), proveniente de arveja (Figura 45).

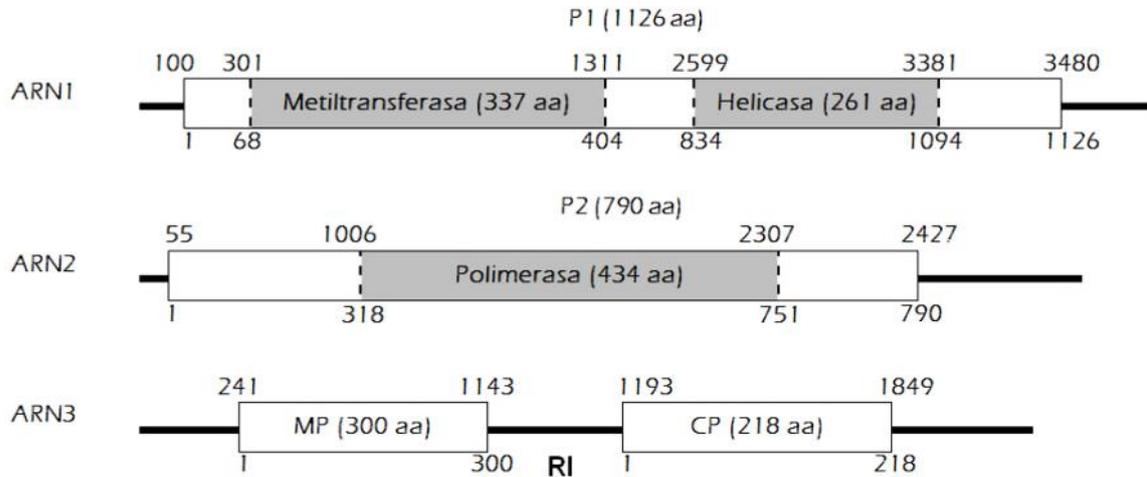


Figura 43. Representación esquemática de la organización genómica del AMV-Arg. Las líneas en negrita representan los ARNs y las cajas los marcos abiertos de lectura. Los dominios semejantes a metiltransferasa, helicasa y polimerasa están destacados y entre paréntesis se muestra el número de amino ácido que compone cada dominio y cada proteína. Las posiciones nucleotídicas (arriba) y aminoacídicas (abajo) donde comienza y termina cada proteína, están indicados. RI: región intergénica.

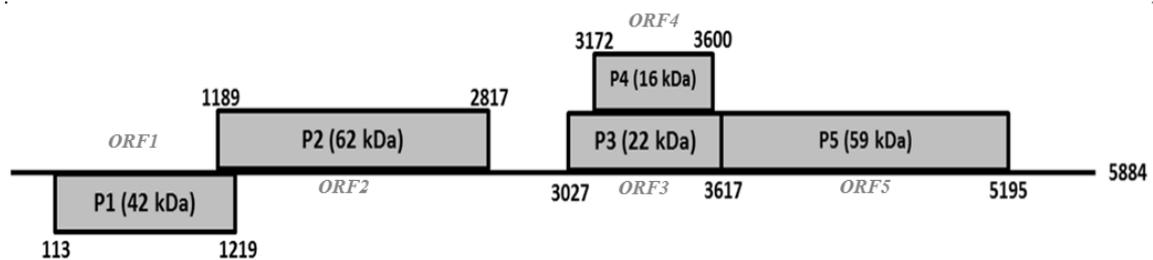


Figura 44. Diagrama de la organización genómica del BLRV-Arg. La línea central en negrita representa el ARN y las cajas los cinco marcos de lectura abierta (ORFs), con las posiciones de nucleótidos donde comienzan y terminan cada uno. Entre paréntesis se muestra el peso molecular de las proteínas codificadas por cada ORF.

Tabla 21. Porcentajes de identidad a nivel de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) de la secuencia genómica completa y de cada región codificante del aislamiento argentino del AMV comparado con los de China, Italia, España y Estados Unidos (EUA).

	Secuencia Comparada	ARN 1		Gen P1		
		nt	nt%	nt	nt%	aa%
Origen del Aislamiento	Argentina	3643	-	3381	-	-
	China	3643	<u>99,1</u>	3381	<u>99,0</u>	<u>99,5</u>
	Italia	3643	98,8	3381	98,9	98,8
	España	3643	<u>97,0</u>	3381	<u>96,9</u>	98,5
	EUA	3644	97,7	3381	97,8	<u>98,4</u>

	Secuencia Comparada	ARN 2		Gen P2		
		nt	nt%	nt	nt%	aa%
Origen del Aislamiento	Argentina	2593	-	2373	-	-
	China	2595	<u>95,9</u>	2373	<u>95,6</u>	94,8
	Italia	2593	<u>98,1</u>	2373	<u>98,1</u>	<u>98,8</u>
	España	2594	97,0	2373	96,8	98,1
	EUA	2593	96,1	2373	95,9	<u>93,4</u>

	Secuencia Comparada	ARN 3		Gen MP			Gen CP		
		nt	nt%	nt	nt%	aa%	nt	nt%	aa%
Origen del Aislamiento	Argentina	2038	-	903	-	-	657	-	-
	China	2041	97,9	903	97,3	<u>99,0</u>	657	<u>98,3</u>	<u>98,6</u>
	Italia	2038	<u>98,0</u>	903	97,5	97,3	657	97,9	<u>98,6</u>
	España	2037	<u>96,0</u>	903	<u>94,8</u>	<u>96,7</u>	666	<u>93,7</u>	<u>94,6</u>
	EUA	2141	96,7	903	<u>97,7</u>	97,0	666	96,7	95,9

La longitud en bases de los tres ARNs y de cada región codificante para todos los aislamientos del AMV está indicada. Los porcentajes de identidad más altos están sombreados y los más bajos subrayados.

Tabla 22. Porcentajes de identidad a nivel de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) de la secuencia de la CP del BLRV-Arg comparado con las cinco secuencias completas disponibles.

Aislamiento	X53865	U15978	GQ404380	AF441393	HM439776	
Gen CP	nt %	99,3	99,3	98,6	98,8	99,6
	aa %	100	99,4	98,9	99,4	100

País de origen de los aislamientos: Alemania (X53865) y EUA (U15978, GQ404380, AF441393, HM439776).

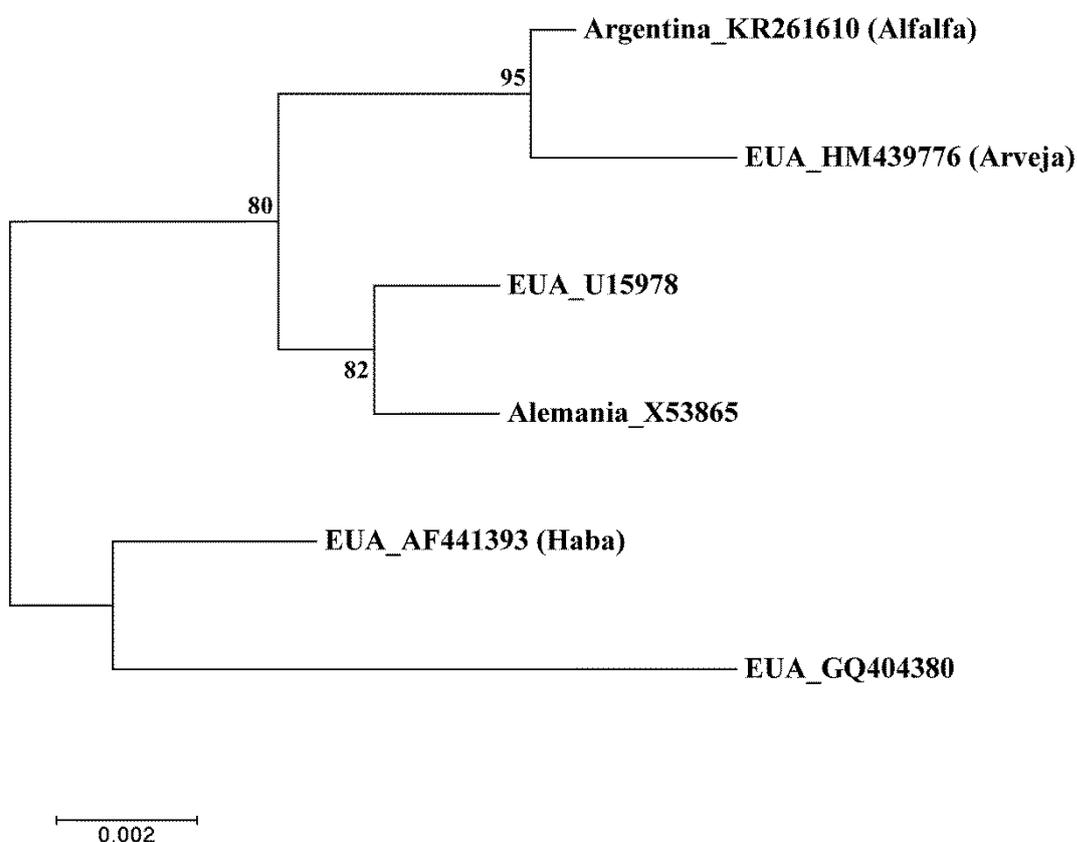


Figura 45. Árbol filogenético (NJ) basado en el gen de la CP del BLRV-Arg con otras cinco secuencias de la CP disponibles en el GenBank. Los valores de bootstrap se muestran como porcentajes de 1000 replicaciones (los valores menores al 40% están ocultos). La escala representa las distancias nucleotídicas, sustituciones por sitio. Se indican los datos disponibles correspondientes al país de origen, número de acceso y hospedante.

3.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y FILOGEOGRÁFICOS DE AISLAMIENTOS DE AMV BASADOS EN EL GEN DE LA CP

Para estos estudios se empleó el gen de la CP debido a que desempeña un importante rol en la adaptación del virus a los hospedantes, suele ser el gen más diverso y mejor estudiado, y consecuentemente hay disponibilidad de secuencias para el análisis (Al-saleh y Amer 2013; Callaway et al. 2001; Parrella et al. 2000, 2011).

3.2.1. *Análisis filogenéticos del AMV*

En el análisis de las 20 CPs de los aislamientos argentinos del AMV mediante red de variantes de secuencias génicas, se identificaron 19 haplotipos y dos haplogrupos principales (I y II), separados por al menos cinco pasos mutacionales del haplotipo central de Córdoba (AMan 2011). En el haplogrupo I se encuentran ocho aislamientos (representados por ocho haplotipos) de las provincias de: Tucumán (Tuc 2012), Catamarca (ACat 2012), Salta (Sal 2012), San Juan (Gua 2011), Neuquén (Neuq 2014), Santiago del Estero (ASdE 2010), Chaco (Cha 2012) y Entre Ríos (Vic 2011). En el haplogrupo II se encuentran 11 aislamientos (representados por 10 haplotipos) de las provincias de: Santa Fe (Raf 2010, Whee 2011), La Pampa (Treb 2010), Río Negro (RioN 2014), Santiago del Estero (BSdE 2012), Mendoza (SJ 2012, Men 2014), Jujuy (PS 2012), Córdoba (BMan 2014), Catamarca (BCat 2013) y Buenos Aires (HAsc 2015); los aislamientos Men2014 y BMan2014 están representados por el mismo haplotipo (Figura 46). La variabilidad genética observada entre los haplotipos dentro de cada haplogrupo, se originó mediante uno a seis pasos mutacionales de sus secuencias nucleotídicas. Además, se observan hasta cinco haplotipos hipotéticos (variantes que estarían presentes en la población pero que no fueron muestreados) o que se encuentran extintos (ya no existen en la población), necesarios en la red para explicar la variabilidad observada (Figura 46). No se observa asociación geográfica de haplogrupos, ya que ambos contienen haplotipos distribuidos ampliamente en Argentina.

Los aislamientos argentinos de AMV comparados entre sí, presentaron identidades nucleotídicas y aminoacídicas del gen de la CP entre 95,6% al 100% y 96,3% al 100%, respectivamente. El análisis filogenético de la secuencia de la CP arrojó similar topología de árbol tanto con el método NJ (Figura 47) como ML (no mostrado),

observándose los subgrupos I, IIA y IIB. Todos los aislamientos argentinos de AMV se agruparon con los miembros del subgrupo I (Figura 47). De los 76 aislamientos analizados, 64 se encuentran en el subgrupo I, provenientes de Irán, Brasil, Italia, Korea, EUA, Inglaterra, China, Australia, Países Bajos, Nueva Zelanda, Serbia, Canadá y Egipto. En el subgrupo IIA se agruparon 10 provenientes de Nueva Zelanda, España, Francia e Inglaterra y finalmente, el subgrupo IIB está formado por dos aislamientos españoles. Los porcentajes promedio de identidades nucleotídica y aminoacídica entre los miembros de cada subgrupo estuvo en el rango del 96,9 al 98,7%, y entre los subgrupos en el rango de 93,5 al 95,4% (Tabla 23).

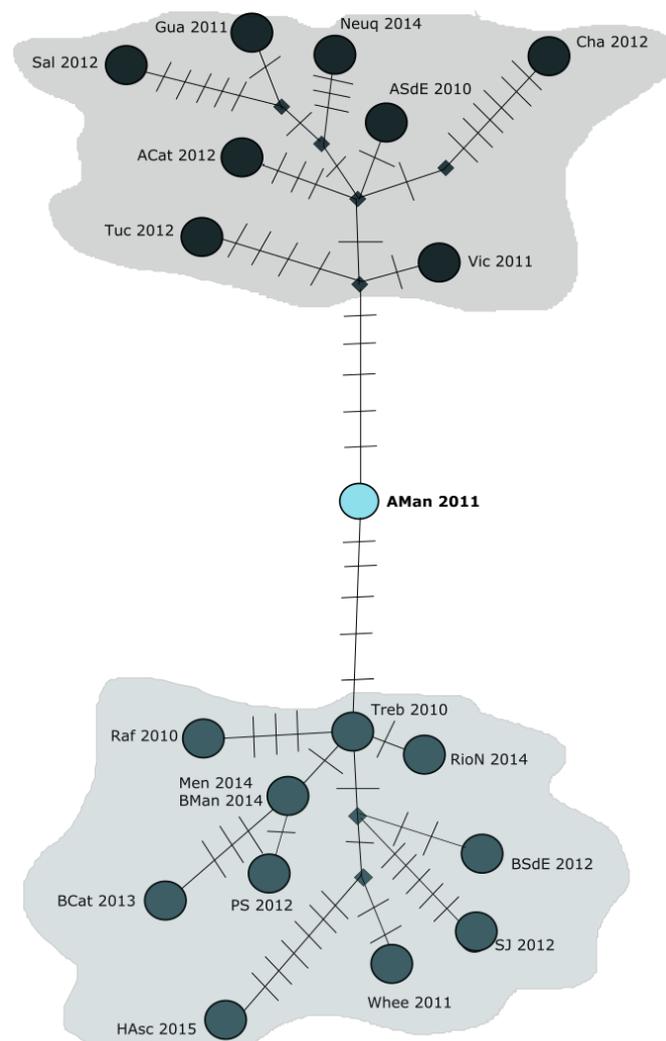


Figura 46. Red de haplotipos construida a partir de secuencias génicas de la cápside proteica de aislamientos argentinos del AMV. En celeste se encuentra el haplotipo central (AMan 2011), en negro y gris se indican los haplotipos pertenecientes a los haplogrupos I y II, respectivamente. Los círculos representan los haplotipos identificados y los cuadrados indican los haplotipos hipotéticos o extintos. Los pasos mutacionales se ilustran con líneas perpendiculares a las líneas de unión entre haplotipos.

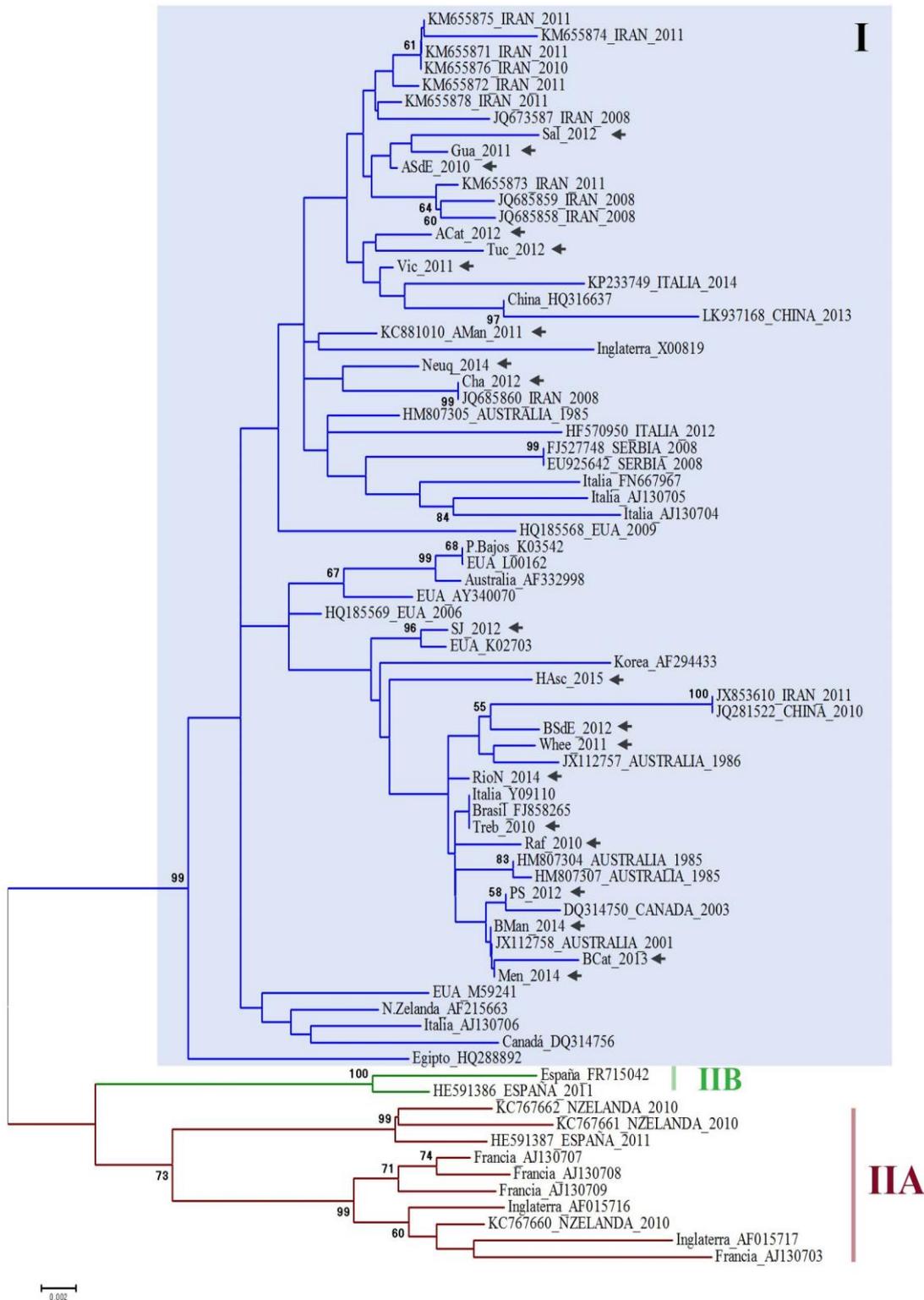


Figura 47. Árbol filogenético (NJ) basado en el gen de la CP del AMV. Los subgrupos del AMV se indican con los números I, IIA y IIB. Los valores de bootstrap se muestran como porcentajes de 10000 replicaciones (los valores menores al 40% están ocultos). La escala representa las distancias nucleotídicas en sustituciones por sitio. Además, se indica el origen y el número de acceso de las secuencias obtenidas del GenBank y con flechas los aislamientos argentinos.

Tabla 23. Porcentajes promedio de identidad a nivel nucleotídico (nt) y aminoacídico (aa) del gen de la CP de AMV.

Promedio del porcentaje (%) de identidades			
	nt	aa	
Dentro del Subgrupo	I	97,7	98,0
	IIA	97,1	96,9
	IIB	98,7	98,6
Entre los subgrupos	I-IIA	94,2	93,5
	I-IIB	94,6	95,4
	IIA-IIB	95,2	95,1

3.2.2. Análisis filogeográfico del AMV en Argentina

Estos estudios se realizaron para reconstruir la dispersión en el tiempo y espacio de los aislamientos en estudio del AMV, los cuales permiten inferir la localización y edad del ancestro común más reciente del AMV asociado al achaparramiento de la alfalfa. La tasa de evolución del AMV se estimó en $1,97E-3$ sustituciones/sitio/año (s/s/a) en un intervalo del 95% de confianza que oscila entre $1,46E-4$ a $3,25E-3$ s/s/a. La edad estimada del ancestro común más reciente (t_{MRCA}) para estos aislamientos del AMV es de 10 años, lo que corresponde en año calendario a 2005, en un intervalo entre 6 a 16 años. La dinámica poblacional del AMV en Argentina se evaluó considerando al modelo poblacional Constante (Figura 48), mejor modelo según el Factor de Bayes. El Árbol de máxima credibilidad de clado (MCCT) muestra que los aislamientos del AMV de Argentina forman dos grupos, designados como AMV-1 y AMV-2, donde ocho de las veinte secuencias se ubican en el grupo AMV-1 y doce en el AMV-2 (Figura 49). El proceso de dispersión del AMV en el tiempo y espacio, que dieron origen a los aislamientos asociados al achaparramiento, habría comenzado en Manfredi (Córdoba) en 2005 (Figura 50 A), y luego se dispersó hacia Santiago del Estero y Rafaela en el 2008 (Figura 50 B), luego hacia las provincias de Entre Ríos y La Pampa en el 2009 (Figura 50 C), hacia Chaco, Mendoza, San Juan, Tucumán y Jujuy en el 2011 (Figura 50 D) y finalmente alcanzando las provincias de Salta, Catamarca, Buenos Aires, Río Negro y Neuquén (Figura 50 E).

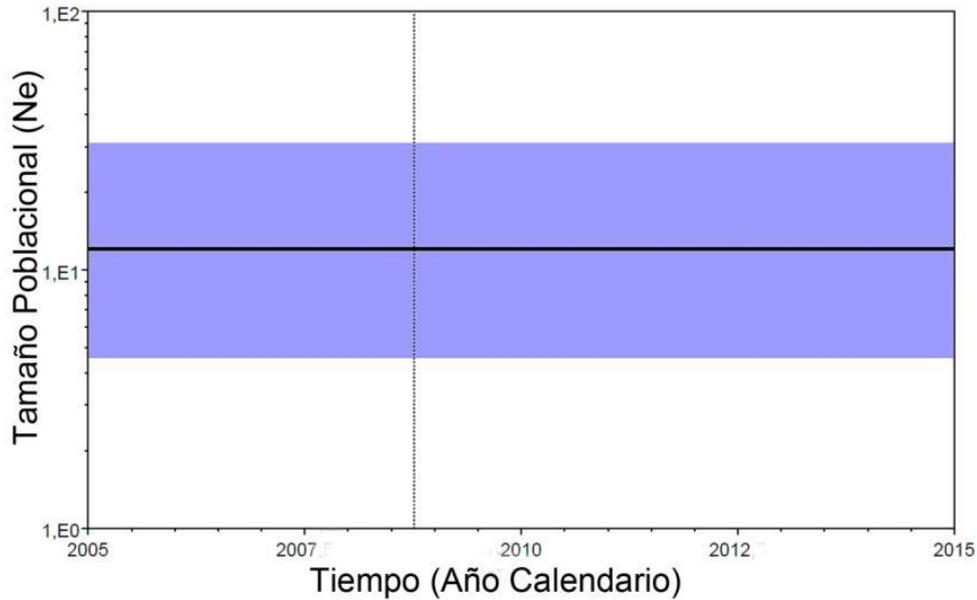


Figura 48. Dinámica poblacional del AMV empleando secuencias nucleotídicas del gen de la CP. Ne: número efectivo por generación de tiempo. Línea completa: mediana poblacional. Área coloreada: intervalo de confianza del 95% del tamaño poblacional estimado.

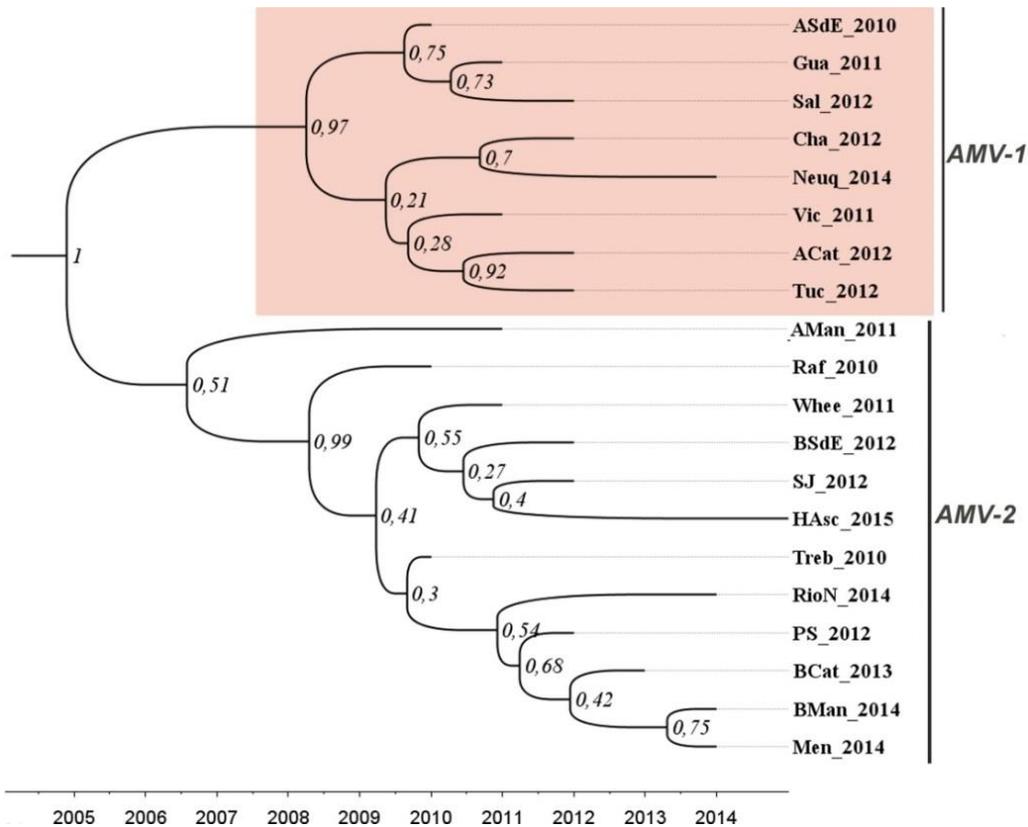


Figura 49. Árbol de máxima credibilidad de clado (MCCT) obtenido a partir del gen que codifica la proteína de la cápside del AMV en Argentina. Los valores *posterior* se indican en los nodos del árbol y el eje x representa el tiempo en año calendario.

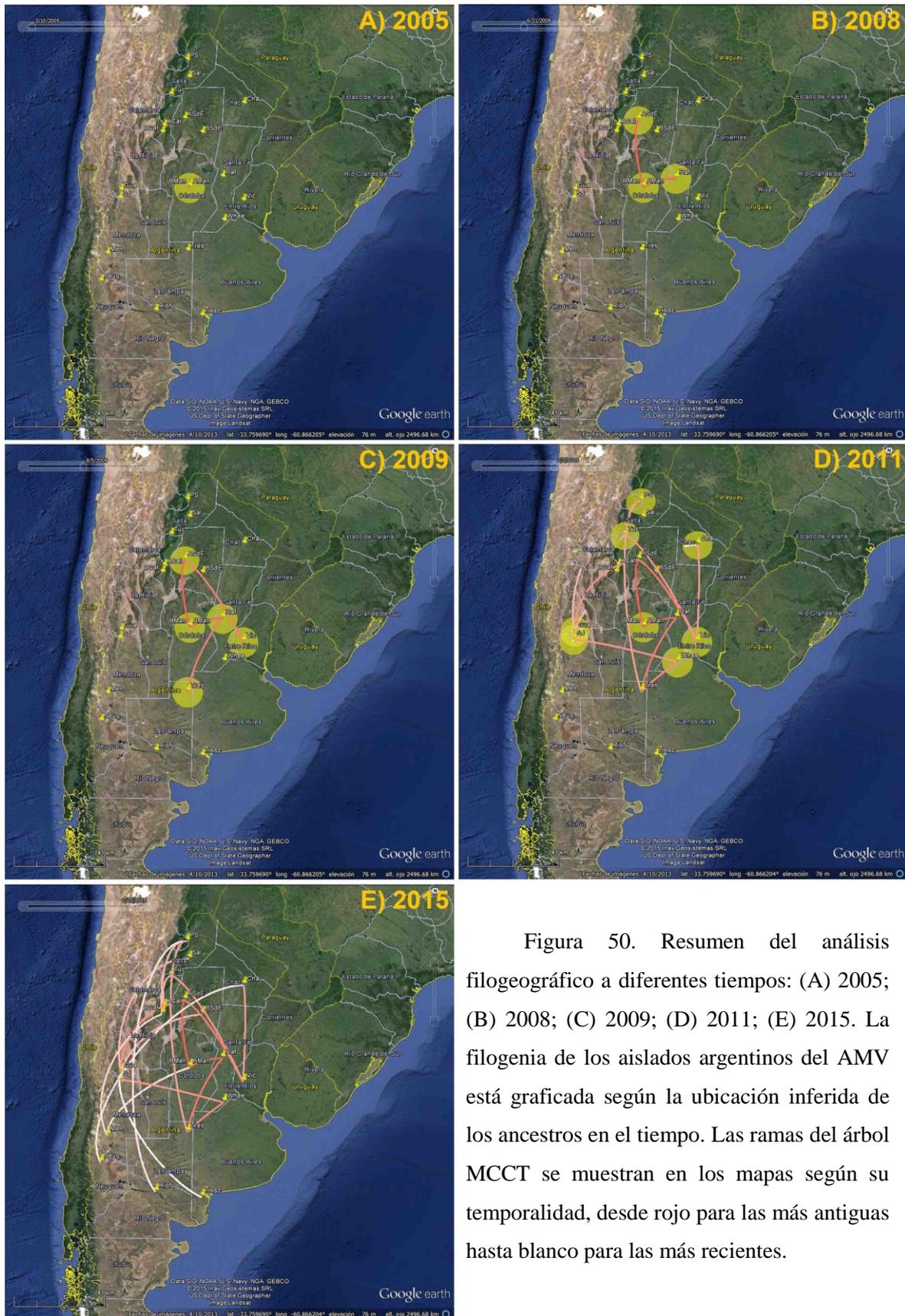


Figura 50. Resumen del análisis filogeográfico a diferentes tiempos: (A) 2005; (B) 2008; (C) 2009; (D) 2011; (E) 2015. La filogenia de los aislados argentinos del AMV está graficada según la ubicación inferida de los ancestros en el tiempo. Las ramas del árbol MCCT se muestran en los mapas según su temporalidad, desde rojo para las más antiguas hasta blanco para las más recientes.

3.2.3. Análisis filogeográfico del AMV a nivel mundial

En este caso, el objetivo fue estimar el proceso de dispersión de los aislamientos secuenciados del AMV en el mundo, infiriendo las posibles vías y años de ingreso a nuestro país. La tasa de evolución del AMV a nivel mundial se estimó en $1,17E-3$ sustituciones/sitio/año (s/s/a) con un intervalo del 95% de confianza que oscila entre $5,5E-5$ a $2,5E-3$ s/s/a. La edad estimada del ancestro común más reciente (t_{MRCA}) para estos aislamientos es de 65 años, lo que corresponde en año calendario a 1950, en un intervalo entre 34 a 187 años. La dinámica poblacional del AMV se evaluó considerando al modelo poblacional Constante (Figura 51), mejor modelo según el Factor de Bayes. El árbol de máxima credibilidad de clado (MCCT) muestra el proceso de diversificación donde los aislamientos del AMV de Argentina (en azul) se agrupan con los de Irán, Italia, China, Serbia, EUA, Egipto, Australia y Canadá, formando el grupo más heterogéneo, mientras que los de Nueva Zelanda y España forman grupo aparte (Figura 52). El proceso de dispersión del AMV en tiempo y espacio (Figura 53) habría iniciado en Australia en 1950 (Figura 53 A) y luego se diseminó hacia Nueva Zelanda en 1989 (Figura 53 B), Estados Unidos en 1992 (Figura 53 C), Argentina en 1993 (Figura 53 C) y Canadá en 2003 (Figura 53 G). Desde Argentina se dispersó hacia Irán y desde aquí hacia China, Serbia y Argentina nuevamente (Figura 53 D-F). Desde EUA hacia Egipto en el año 2010 (Figura 53 H).

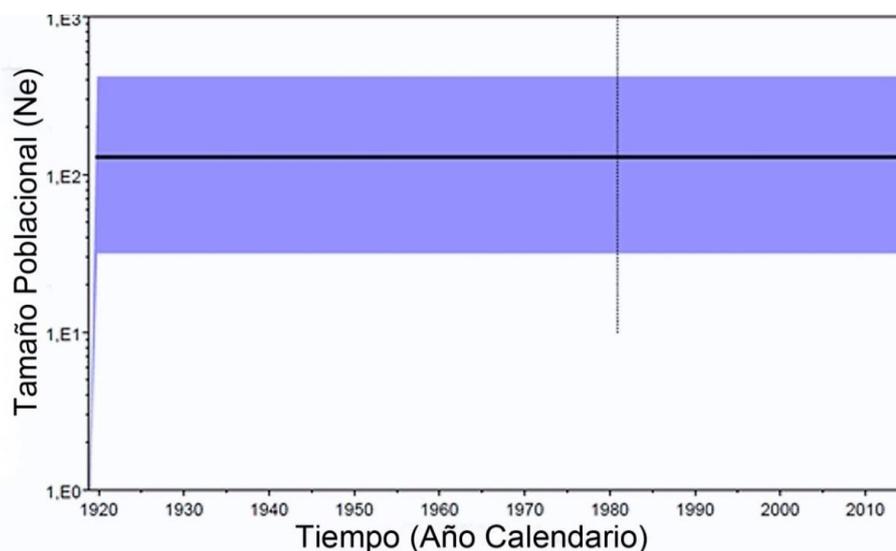


Figura 51. Dinámica poblacional a nivel mundial del AMV empleando secuencias nucleotídicas del gen de la CP. Ne: número efectivo por generación de tiempo. Línea completa: mediana poblacional. Área coloreada: intervalo de confianza del 95% del tamaño poblacional estimado.

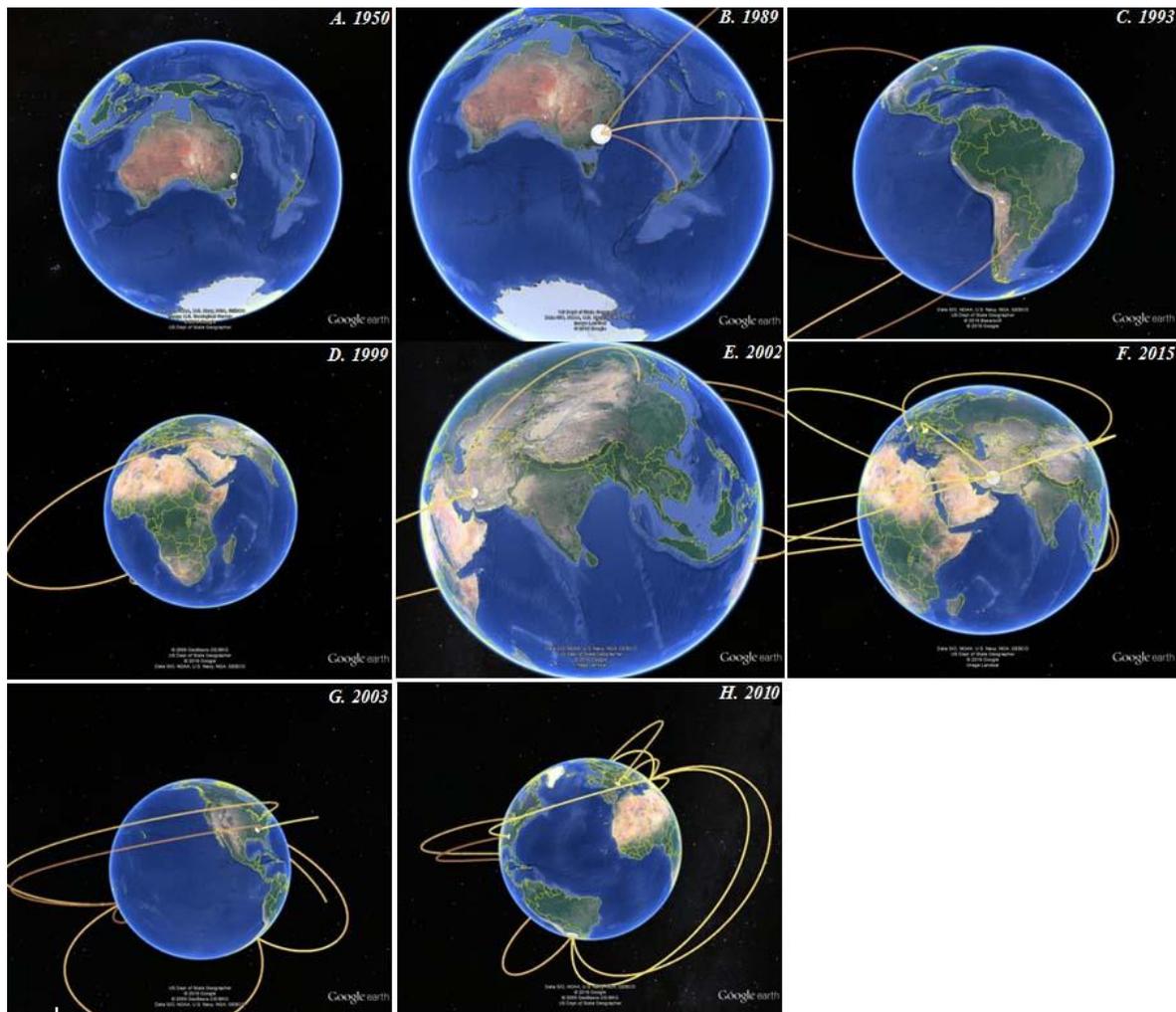


Figura 53. Resumen del proceso de dispersión del AMV a nivel mundial. El ancestro común más reciente para los aislamientos en estudio se localiza en Australia (A) iniciándose el proceso de dispersión hacia Nueva Zelanda (B), EUA y Argentina (C), y Canadá (G). Desde Argentina se dispersó hacia Irán y desde Irán hacia China, Serbia y Argentina nuevamente (D-F). Desde EUA hacia Egipto (H). La filogenia del AMV está graficada según la ubicación inferida de los ancestros en el tiempo. Las ramas del árbol MCCT se muestran según su temporalidad, desde rosado para las más antiguas hasta amarillo para las más recientes.

4. DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO

El genoma del BLRV-Arg presentó una organización similar a la ya reportada para otros aislamientos de este virus (Domier et al. 2002) y altas identidades nucleotídicas con los genomas completos provenientes de EUA (superiores al 96%). El tamaño del genoma corresponde al descrito para el aislamiento de arveja de EUA (Vemulapati et al. 2010), aunque resultó 80 nt menor que el de haba en regiones no codificantes (Domier et al. 2002). El BLRV-Arg presentó las relaciones filogenéticas más cercanas y las mayores identidades nucleotídicas y aminoacídicas, tanto a nivel de genoma como del gen de la CP, con el aislamiento obtenido de arveja. Relaciones similares para el gen de la CP entre aislamientos de este virus, fueron observadas por Vemulapati en el 2010. Los resultados obtenidos en esta tesis indican claramente que el virus secuenciado a partir de muestras de alfalfa de Manfredi (Córdoba) es un nuevo aislamiento de BLRV.

El AMV-Arg presentó una organización genómica como la esperada para los miembros de la familia *Bromoviridae* (Bujarski et al. 2012). Además, presentó altos porcentajes de identidad de su secuencia completa y de cada región codificante con las de otros aislamientos estudiados. Similares niveles de identidades han sido registrados para aislamientos del AMV por Parrella y colaboradores (Parrella et al. 2010, 2011), lo que permite considerarlo un nuevo aislamiento de este virus, el cual no había sido previamente secuenciado en nuestro país. Los estudios de variabilidad genética realizados en base a la secuencia de la CP mostraron altas identidades nucleotídicas y aminoacídicas entre los aislamientos argentinos del AMV, como ya fue observado entre aislamientos del mismo país (Al-saleh y Amer 2013; Bergua et al. 2014; Xu y Nie 2006). En la red de haplotipo construida con las secuencias argentinas de la CP se observa que, a excepción de una, las secuencias génicas de cada aislamiento conforma haplotipos individuales, lo que posiblemente se deba a la generación de muchas variantes genéticas por la alta tasa de mutación de los virus de ARN (Duffy et al. 2008), al bajo número de aislamientos analizados por ubicación geográfica y a la grandes distancias entre ellos. En este trabajo, la red de haplotipo se construyó con el objetivo de tener una primera observación de las relaciones entre las secuencias de la CP y su relación con la distribución geográfica del virus en el país; no se observó dicha

asociación ya que los haplogrupos presentaron haplotipos ampliamente distribuidos en el país y sin una relación clara con su ubicación geográfica.

Los estudios filogenéticos basados en el gen de la CP de todos los aislamientos disponibles y los 20 argentinos del AMV, reproducen las relaciones evolutivas previamente reportadas para este virus, observándose la misma división en tres subgrupos I, IIA y IIB (Parrella et al. 2000, 2011). Todos los aislamientos de Argentina provenientes de alfalfa se agruparon con los miembros del subgrupo I, el cual es el más heterogéneo en cuanto a variabilidad génica y país de origen, confirmando lo ya observado para uno de los aislamientos argentinos (Trucco et al. 2014). Comparando las identidades promedio de todos los aislamientos del AMV dentro y entre cada subgrupo se observan valores en los rangos de 96,9-98,7 % y 93,5-95,4%, respectivamente, semejantes a los observados por otros autores (Parrella et al. 2000, 2011; Xu y Nie 2006).

Los análisis de coalescencia permitieron la obtención de diferentes parámetros referidos a la evolución del AMV considerando la secuencia del gen de la CP, a nivel país y mundial. De esta manera se pudo inferir la tasa de evolución del AMV, se reconstruyó la demografía de las poblaciones virales y se obtuvo la genealogía ancestral (topología y tiempos de coalescencia, t_{MRCA}). La tasa de evolución del AMV, tanto a nivel país como mundial, fue del orden de $1E-3$ sustituciones/sitio/año (s/s/a). Esta tasa de evolución se encuentra dentro del rango de la observada para la mayoría de los virus con genoma de ARN, cuyo rango se encuentra entre $1E-2$ y $1E-5$ s/s/a (Duffy et al. 2008). La demografía presentada por los aislamientos del AMV, tanto para los aislamientos argentinos como los estudiados del resto del mundo, fue constante, indicando que no hubo cambio en el número de individuos, es decir en el tamaño de la población, en función del tiempo. Esto mostraría que la población de AMV es genéticamente estable, independientemente del gran número de haplotipos que puedan ocurrir en la población (García-Arenal et al. 2001; Lemey, Salemi, et al. 2009). Las edades inferidas de los ancestros comunes más recientes (t_{MRCA}) para los aislamientos estudiados en Argentina y a nivel mundial fueron de 10 y 65 años, respectivamente. El hecho que estas edades sean más recientes que las primeras menciones del AMV en Argentina (Zabala 1952) y en el mundo (Weimer 1931), es debido a que no existen secuencias del virus con datación previa a las incluidas en el estudio coalescente, de manera que permitan aproximar los ancestros más recientes, aquí obtenidos, a las

primeras menciones del virus. El modelo empleado solo infiere según la datación de las secuencias que se incorporaron al análisis, como se menciona en el trabajo. Las localizaciones más probables de los ancestros fueron en Manfredi (Córdoba) para los aislamientos argentinos, y Australia para los aislamientos mundiales. Las ubicaciones de los ancestros en estas localizaciones, a partir de donde se produjeron los procesos de diversificación, que dieron origen a los aislamientos evaluados en esta tesis, podrían deberse a sus antecedentes en comercialización de semillas de alfalfa como a las evaluaciones de cultivares con fines de investigación (Hijano y Basigalup 1995).

Incorporando los modelos filogeográficos a los análisis coalescentes, se logró en este capítulo inferir el proceso de dispersión del AMV en Argentina y en el mundo, en base a la secuencia del gen de la CP; región génica elegida por otros autores para estudios filogeográficos de virus que afectan plantas, como potyvirus (Cuevas et al. 2012) y geminivirus (Vaghi Medina 2015). El árbol de máxima credibilidad de clado (MCCT), muestra el proceso de diversificación a partir del ancestro común más reciente (t_{MRCA}) que dio origen a los aislamientos de AMV incorporados a este estudio. El proceso de dispersión en Argentina se habría iniciado a partir del ancestro común más reciente (para los aislamientos en estudio) ubicado en Manfredi, confirmando lo observado en la red de haplotipos. Desde Manfredi, se dispersó en el 2008 hacia Santiago del Estero y Rafaela, a partir de donde continuaron los procesos de diversificación que dieron origen a los agrupamientos AMV-1 y AMV-2, respectivamente. El patrón de dispersión observado para el AMV en Argentina podría deberse a que se trata de un virus que presenta transmisión por semilla (Jaspars y Bos 1980) y en nuestro país existe un gran movimiento comercial de las mismas (Basigalup et al. 2007; Echeverría et al. 1995). En cuanto al proceso de dispersión del AMV a nivel mundial, el ancestro común más reciente se localizó en Australia y desde allí unos seis años después comenzó la diversificación, generando los aislamientos de AMV que se ubican dentro del subgrupo I (Parrella et al. 2000). Por otro lado, desde Australia ingresó a Nueva Zelanda en 1989, donde comenzó la diversificación que dio origen a los aislamientos de AMV pertenecientes al subgrupo II (Parrella et al. 2000). El primer ingreso en Argentina fue en 1993 a partir de Australia; luego se observaron otros ingresos en 2002 y 2005 provenientes del mismo país e Irán, respectivamente. Si bien se conoce la comercialización de alfalfa entre estos países, no es posible explicar estos resultados basándonos en ese conocimiento debido a que los aislamientos aquí

considerados provienen de diferentes hospedantes, incluida alfalfa; además, AMV afecta a muchos cultivos de importancia agrícola (como soja), por lo que también su comercialización podría estar participando en esta dispersión. Sin embargo, es importante mencionar que ninguno de los modelos disponibles en los estudios filogeográficos contemplan *per se* el análisis de las posibles infecciones virales desde hospedantes alternativos, por lo que no sería posible inferir en este aspecto.

En esta tesis se demostró que el AMV es altamente prevalente en cultivos de alfalfa, presenta una amplia distribución en el país y un nuevo hospedante natural (*Dichondra repens*), además de ser el virus de mayor importancia en el desarrollo de la sintomatología y en la disminución de la producción de semillas. Por estos motivos, se priorizó la generación de conocimiento sobre su genoma y sobre la población residente en el país, abordando aspectos filogenéticos y filogeográficos. Se propone realizar los mismos estudios para el ALCV de manera de complementar los aquí obtenidos para el AMV y obtener una mirada más abarcadora de la enfermedad del achaparramiento ya que, en base a toda la evidencia generada en este trabajo de tesis, su coinfección induciría los síntomas de la enfermedad. Estos datos podrían ser importantes para la toma de decisiones al momento de intentar generar fuentes de tolerancia/resistencia genética a la enfermedad basada en estos virus.

5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

- Se determinaron los genomas completos del AMV y del BLRV que afectan al cultivo de alfalfa en Argentina. Los análisis genéticos realizados, para ambos virus, muestran altas relaciones de identidad y filogenéticas con aislamientos ya estudiados, confirmando la identidad de los aislamientos.
- Estas son las primeras secuencias completas para AMV y BLRV, determinadas en nuestro país y, además, las primeras obtenidas desde alfalfa como hospedante natural. Esta es la primera mención del BLRV en Argentina. Los resultados obtenidos fueron publicados en revistas internacionales: AMV [*Virus Genes* (Trucco et al. 2014)] y BLRV [*European Journal of Plant Pathology* (Trucco et al. 2016)]
- El AMV-Arg está incluido en el subgrupo I, en los que se divide a los aislamientos de este virus, que es el más diversificado y ampliamente distribuido. Los aislamientos argentinos del AMV de alfalfa que comparten uno o más polimorfismos característicos se agruparon en dos grupos (haplogrupos) sin asociación geográfica.
- El proceso de dispersión del AMV en alfalfa en Argentina, que dio origen al linaje en estudio, habría comenzado en Manfredi (Córdoba) alrededor del año 2005 y desde allí hacia Santa Fe y Santiago del Estero, generando los dos grupos AMV-1 y AMV-2, distribuidos en el resto del país.
- El estudio de aislamientos del AMV a nivel mundial sugiere que el proceso de dispersión, en base a los aislamientos analizados, comenzó en Australia alrededor del año 1950 y desde allí hacia el resto del mundo, ingresando a Argentina en el año 1993 desde este mismo país.



CAPÍTULO IV

Discusión y Conclusiones Generales

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es la especie forrajera por excelencia en las cadenas de producción de carne y leche de Argentina, y si además, consideramos su crecimiento como producto exportable, su función en la recuperación de la fertilidad y estabilidad de los suelos (Basigalup 2007; Hijano y Basigalup 1995), podemos tener un panorama mejor acabado de la importancia real del cultivo. Una de las limitantes más importantes que presenta actualmente su producción y persistencia en nuestro país es la enfermedad del achaparramiento, la cual venía siendo observada por productores de distintas regiones pero fue reportada como de origen viral en el año 2010 (INTA-Inforna 2010). Esta enfermedad ha sido el punto focal de este trabajo de tesis.

En Argentina, los únicos antecedentes de infección viral en alfalfa, previos al 2010, eran sobre el *Alfalfa mosaic virus*-AMV (Basigalup 2007; Nome Huespe et al. 2011; Zabala 1952). Al momento de plantearse este proyecto de tesis, se había confirmado la existencia del AMV e identificado al *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus*-ADV (Familia *Rhabdoviridae*) (Bejerman et al. 2011) en las plantas de alfalfa con achaparramiento, por lo tanto las hipótesis y objetivos se centraron en estos dos patógenos. Posteriormente, a medida que avanzaba el desarrollo de la tesis, se detectaron otros tres virus en plantas de alfalfa con achaparramiento, los que fueron incorporándose al desarrollo de la misma: *Alfalfa enamovirus*-1-AEV-1 y *Bean leafroll virus*-BLRV (Familia *Luteoviridae*), y *Alfalfa leaf curl virus*-ALCV (*Geminiviridae*) (Bejerman et al. 2015, 2016; Bejerman, Trucco, et al. 2017; Trucco et al. 2014, 2016). Estas fueron las primeras menciones de estos virus en alfalfa en Argentina, y además, las primeras descripciones del ADV y AEV-1. Recientemente se han mencionado primeras detecciones de virus conocidos para nuevas regiones, como también, descripciones de virus novedosos sobre alfalfa. Por ejemplo, en relevamientos realizados en Arabia Saudita se ha detectado por primera vez la presencia de 10 virus en los cultivos de alfalfa, entre ellos el BLRV; además del AMV que ya había sido reportado (Al-Shahwan et al. 2016). En Sudan se reportó un virus novedoso, el Alfalfa virus S (AVS) (Familia *Alphaflexiviridae*), y una variante del AEV-1 designado como Alfalfa enamovirus 2 (AEV-2) (Nemchinov et al. 2017a, 2017b). El análisis de un *set* de datos del genoma de alfalfa, provenientes de China, permitió identificar tres virus nuevos: *Medicago sativa alphapartitivirus* 1 (MsAPV1), *Medicago sativa deltapartitivirus* 1 (MsDPV1) y *Medicago sativa marafivirus* 1 (MsMV1), los dos primeros pertenecientes a la familia *Partitiviridae* y el tercero a *Marafivirus* (Kim et al. 2018). Los grandes

avances en la detección e identificación de nuevos virus es el resultado de la aplicación de técnicas de secuenciación de nueva generación, que no requieren del conocimiento previo del virus o del hospedante (Adams et al. 2009). Teniendo en cuenta los reportes de nuevos virus en alfalfa, se propone ampliar los estudios aquí presentados con la búsqueda de los mismos en las muestras de alfalfa de las diferentes zonas de Argentina.

En la evaluación de la manifestación de síntomas de plantas de alfalfa, por diferentes aislamientos e infecciones mixtas, se observó que la coinfección entre el AMV y ALCV reproducían los del control positivo con achaparramiento, aunque con menor severidad. La mayor severidad de síntomas en el control podría deberse a un posible sinergismo entre este par de virus con alguno/s o todos los virus restantes (BLRV, ADV y AEV-1). En los estudios iniciales de la “enfermedad de las enaciones” descrita en Europa, se mencionó al Alfalfa enation virus-AEV (tentativo nucleorhabdovirus) como su agente causal (Alliot et al. 1972), aunque algunos investigadores hipotetizaron que otro virus podría estar en coinfección con el AEV (Rodríguez Sardiña y Novales Lafarga 1973) incluso se mencionó como segundo virus al AMV (Cook y Wilton, 1984). Recientemente, estudios realizados en muestras de alfalfas de España, con síntomas de enrulamiento de hojas y enaciones, mencionan la coinfección entre el AMV, ALCV y el rhabdovirus, e indican que los síntomas serían causados por dos o incluso tres de los virus presentes (Bernardo et al. 2016). Por otro lado, en plantas de alfalfa con los mismos síntomas, provenientes de España y Francia, encontraron infección solo entre AMV y ALCV y los autores atribuyen los síntomas a esta coinfección (Roumagnac P., com. pers.). Esto estaría indicando que la presencia del par AMV-ALCV sería suficiente para la manifestación de los síntomas descritos en Europa, que son similares a los del achaparramiento de nuestro país, reafirmando los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, es necesario ampliar estos resultados con más estudios que permitan confirmarlos; entre otras pruebas, se debería aislar al ALCV en la misma base genética (clones Costera SP INTA), estudiar la participación del resto de los virus asociados al achaparramiento (por ejemplo, infecciones simples y dobles no probadas, infecciones triples) y evaluaciones a campo para la observación de los síntomas en interacción con el ambiente.

En cuanto a los ensayos realizados para evaluar los modos de transmisión, solamente se logró transmitir por semilla al AMV, como ya se ha reportado (Jaspars y Bos 1980). La transmisión por semilla de la enfermedad no sería probable ya que los síntomas de la

misma serían el resultado de una coinfección viral. Por otro lado, es posible la transmisión de la enfermedad mediante el pulgón negro, al igual que la enfermedad similar descrita en Europa (Leclant et al. 1973). Este pulgón puede ser portador de los cinco virus asociados al achaparramiento y tiene la capacidad de transmitir a tres de ellos AMV, ALCV y AEV-1, coincidiendo con lo ya reportado para los dos primeros (Jaspars y Bos 1980; Roumagnac et al. 2015), mientras que para el AEV-1 es el primer reporte de su transmisión por vector. No se logró transmitir al ADV y al BLRV, aunque se ha demostrado que el segundo puede ser transmitido por este áfido (Ashby 1984). Posiblemente se deban realizar más ensayos para demostrar concluyentemente estos resultados. En esta tesis se priorizó el estudio del pulgón negro debido a los antecedentes disponibles para la enfermedad similar Europea y se propone continuar estos estudios para analizar la posibilidad de que otras especies de pulgones, que colonizan el cultivo de alfalfa en Argentina, actúen como vectores de la enfermedad y/o virus asociados. Si bien no se planteó un ensayo para estudiar la transmisión de la enfermedad por injerto, en esta tesis se observó su alta eficiencia, al igual que en otros trabajos (Ayllón et al. 2016; Rezende y Kitajima 2011) por lo que fue el método elegido para transmitir los virus y la enfermedad en los distintos ensayos. Esta técnica también fue usada con eficiencia con la enfermedad similar descrita en Europa (Blattny 1959).

La prevalencia y distribución de las enfermedades y virus que se transmiten por insectos fitófagos como los pulgones, está altamente influenciada por la ecología y preferencias de hospedero del vector (Jackson et al. 2005). El achaparramiento de la alfalfa se extiende ampliamente en todas las zonas productoras de alfalfa del país, remarcando la preocupación sobre su impacto en las cadenas productivas (de carne-leche vacuna, producción de semillas, heno para exportación, etc.). Se registró una prevalencia del 86,4% y una pérdida en la producción de semillas en las plantas de alfalfa afectadas de hasta un 38%, determinándose al AMV seguido por el ALCV como los principales virus que afectan la producción de semillas e inducen la manifestación de síntomas. El AMV ha sido detectado con una prevalencia del 100% en el territorio argentino, incluyendo zonas destinadas para forraje y para producción de semilla. Teniendo en cuenta los daños que puede ocasionar por sí solo en la producción de alfalfa (Hemmati y Mclean 1977), sumado a su influencia en la enfermedad del achaparramiento, es importante alertar sobre la importancia de la producción y uso de semillas libre de virus. Las semillas infectadas juegan un importante rol en la epidemiología del virus y de la

enfermedad del achaparramiento, actuando como su fuente primaria de dispersión, que junto a la acción de los pulgones vectores, pueden ocasionar una rápida diseminación de la infección. En cuanto al ALCV, si bien presentó una alta prevalencia y distribución geográfica, no se detectó en todos los puntos evaluados. Teniendo en cuenta la evidencia generada en este trabajo de tesis que lo vinculan al AMV como inductores de los síntomas del achaparramiento, se esperaría haberlo detectado en el 100% de las muestras evaluadas. Esto hace suponer que el método de detección no sería lo suficientemente sensible, conduciendo a falsos negativos, o bien, podría haber otro virus aún no identificado que cumpla el mismo rol, o alguna otra combinación viral no ensayada que también reproduzca los síntomas de la enfermedad.

Las enfermedades virales en cultivos perennes, como el achaparramiento, pueden ser especialmente serias, ya que los cultivos permanecerán infectados a lo largo de todo su ciclo productivo y, además de los efectos económicos directos sobre el cultivo, actúan como fuente de inóculo a partir del cual la enfermedad se puede transmitir a otras plantas del mismo cultivo u otros cultivos (Leur y Kumari 2011). Debido a que el modo de transmisión de los virus que ocasionan una enfermedad condiciona las medidas de control para su manejo, una de las estrategias que podría emplearse en el manejo del achaparramiento para reducir su incidencia, sería la utilización de semillas certificadas libre de virus, elección de cultivares de alfalfa que presenten resistencia a los pulgones/enfermedad, control químico determinado por un eficiente monitoreo de las poblaciones de pulgones y la eliminación de las malezas que actúan como reservorios virales, entre otros. En Argentina, se ha evaluado la resistencia al pulgón negro (Descamps et al. 2015) y la severidad del achaparramiento (Odorizzi et al. 2017) en diferentes cultivares comerciales de alfalfa; datos de gran utilidad para combinar las estrategias de manejo.

Finalmente, para concluir, podemos decir que los resultados de esta tesis rechazarían parcialmente la hipótesis ya que los componentes virales más importantes del achaparramiento serían el AMV junto con el ALCV, y no con el rhabdovirus (ADV) como se planteó. Se comprobó que la transmisión de la enfermedad en condiciones naturales puede ocurrir mediante el pulgón negro y se demostró que la enfermedad es altamente prevalente en las zonas productoras de alfalfa del país, pudiendo ocasionar una pérdida de hasta un 38% en la producción de semillas. Debido a la importancia del AMV en el cultivo de alfalfa, se generó conocimiento molecular y filogenético sobre la

secuencia genómica completa de un aislamiento argentino y las secuencias génicas de la CP de aislamientos ampliamente distribuidos en el país. Los resultados de esta tesis aportan al conocimiento de la enfermedad del achaparramiento y de virus presentes en el cultivo de alfalfa de nuestro país, y pueden ser bases para el desarrollo de estrategias de manejo del cultivo tendientes a mejorar su calidad forrajera y producción, considerando el promisorio panorama de su comercialización en el mercado interno y externo.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., et al. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis : a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 537-545. doi:10.1111/J.1364-3703.2009.00545.X
- Adams, I. P., Miano, D. W., Kinyua, Z. M., Wangai, A., Kimani, E., Phiri, N., et al. (2013). Use of next-generation sequencing for the identification and characterization of Maize chlorotic mottle virus and Sugarcane mosaic virus causing maize lethal necrosis in Kenya, 741-749. doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02690.x
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (5th ed.). Elsevier Academic Press.
- Al-saleh, M. A., & Amer, M. A. (2013). Biological and Molecular Variability of Alfalfa mosaic virus Affecting Alfalfa Crop in Riyadh Region. *The plant pathology journal*, 29(4), 410-7. doi:10.5423/PPJ.OA.05.2013.0050
- Al-Shahwan, I. M., Abdalla, O. A., Al-Saleh, M. A., & Amer, M. A. (2016). Detection of new viruses in alfalfa , weeds and cultivated plants growing adjacent to alfalfa fields in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1-8. doi:10.1016/j.sjbs.2016.02.022
- Alliot, B., Giannotti, J., & Signoret, P. A. (1972). Mise en evidence de particules bacilliformes de virus associes a la maladie a enations de la luzerne (Medicago sativa L.). *C.R. Acad. Aci. Serie D, Paris*, 274, 1974-1976.
- Ashby, J. W. (1984). Bean leafroll virus N°286. *Description of plant viruses*. New Zealand, Plant Diseases Division, DSIR, Private Bag. <https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=286>
- Astier, S., Albouy, J., Maury, Y., Robaglia, C., & Lecoq, H. (2007). *Principles of plant virology, genome, pathogenicity, virus ecology*. New Hampshire: Science Publishers.
- Ayllón, M., Cambra, M., LLave, C., & Moriones, E. (2016). *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides*. Dubok Publishing.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Bao, L., Maeso, D., & Altier, N. (2005). *Enfermedades virales del trébol rojo en Uruguay. Avances de la investigación en el período 1994-2004*. INIA.
- Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. (2014). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6(1), 106-136. doi:10.3390/v6010106
- Barboza, A. A. L., Silva Júnior, H. M., Souto, E. R., Silva, C. M., Marcuz, F. S., & Vieira, R. A. (2007). Detecção do Sugarcane mosaic virus no Paraná e limpeza somaclonal por cultura de tecidos. *Fitopatologia Brasileira*, 32(4), 345-348.

doi:10.1590/S0100-41582007000400010

- Barnes, D. K., Bingham, E. T., Murphy, R. P., Hunt, O. J., Beard, D. F., Skrdla, W. H., & Teuber, L. R. (1977). Alfalfa germplasm in the United States: Genetic vulnerability, use, improvement, and maintenance. USDA-ARS Tech.Bull. 1571. Whashington, DC.
- Basigalup, D. H. (2007). El cultivo de alfalfa en Argentina (pp. 176-185). Eds. INTA.
- Basigalup, D. H. (2014). Situación de la alfalfa en Argentina. 5° Jornada Nacional de Forrajes Conservados. *Ediciones INTA*, 95-99.
- Basigalup, D. H., Rossanigo, R., & Ballario, M. V. (2007). Panorama actual de la alfalfa en la Argentina. En D. H. Basigalup (Ed.), *El cultivo de la alfalfa en la Argentina* (pp. 13-25). Eds. INTA.
- Bejerman, N., Giolitti, F., De Breuil, S., Trucco, V., Nome, C., Lenardon, S., & Dietzgen, R. G. (2015). Complete genome sequence and integrated protein localization and interaction map for alfalfa dwarf virus, which combines properties of both cytoplasmic and nuclear plant rhabdoviruses. *Virology*, 483, 275-283. doi:10.1016/j.virol.2015.05.001
- Bejerman, N., Giolitti, F., Trucco, V., de Breuil, S., Dietzgen, R. G., & Lenardon, S. (2016). Complete genome sequence of a new enamovirus from Argentina infecting alfalfa plants showing dwarfism symptoms. *Archives of Virology*, 161(7), 2029-2032. doi:10.1007/s00705-016-2854-3
- Bejerman, N., Giolitti, F., Trucco, V., De Breuil, S., Rodriguez Pardina, P., & Lenardon, S. (2017). Caracterización genómica del Alfalfa leaf curl virus, un capulavirus que infecta el cultivo de alfalfa en Argentina. 19-21/04/17, Mendoza, Argentina: 4° Congreso Argentino de Fitopatología.
- Bejerman, N., Nome, C., Giolitti, F., Kitajima, E., de Breuil, S., Pérez Fernández, J., et al. (2011). First Report of a Rhabdovirus Infecting Alfalfa in Argentina. *Plant Disease*, 95(6), 771-771. doi:10.1094/PDIS-10-10-0764
- Bejerman, N., Trucco, V., de Breuil, S., Pardina, P. R., Lenardon, S., & Giolitti, F. (2017). Genome characterization of an Argentinean isolate of alfalfa leaf curl virus. *Archives of Virology*, 1-5. doi:10.1007/s00705-017-3673-x
- Bengyella, L., Waikhom, S. D., Allie, F., & Rey, C. (2015). Virus tolerance and recovery from viral induced-symptoms in plants are associated with transcriptome reprogramming. *Plant Molecular Biology*, 89(3), 243-252. doi:10.1007/s11103-015-0362-6
- Bergua, M., Luis-Arteaga, M., & Escriu, F. (2014). Genetic Diversity, Reassortment, and Recombination in Alfalfa mosaic virus Population in Spain. *Phytopathology*, 104(11), 1241-50. doi:10.1094/PHYTO-11-13-0309-R
- Bernardo, P., Golden, M., Akram, M., Naimuddin, Nadarajan, N., Fernandez, E., et al. (2013). Identification and characterisation of a highly divergent geminivirus: Evolutionary and taxonomic implications. *Virus Research*, 177(1), 35-45. doi:10.1016/j.virusres.2013.07.006

- Bernardo, P., Muhire, B., François, S., Deshoux, M., Hartnady, P., Farkas, K., et al. (2016). Molecular characterization and prevalence of two capulaviruses: Alfalfa leaf curl virus from France and Euphorbia caput-medusae latent virus from South Africa. *Virology*, *493*, 142-153. doi:10.1016/j.virol.2016.03.016
- Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M. A., & Lemey, P. (2011). SPREAD: Spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*, *27*(20), 2910-2912. doi:10.1093/bioinformatics/btr481
- Blanc, S., Drucker, M., & Uzest, M. (2014). Localizing Viruses in Their Insect Vectors. *Annual Review of Phytopathology*, *52*(1), 403-425. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045920
- Blanca, J. M., Pascual, L., Ziarsolo, P., Nuez, F., & Cañizares, J. (2011). ngs_backbone: a pipeline for read cleaning, mapping and SNP calling using next generation sequence. *BMC genomics*, *12*, 285. doi:10.1186/1471-2164-12-285
- Blattny, C. (1959). Virus papillosity of the leaves of lucerne. *Folia Microbiologica*, *4*, 212-215.
- Bolsa de Comercio de Rosario. (2017). *Estimaciones de producción*. <https://www.bcr.com.ar/Pages/gea/estimaProd.aspx>. Accedido 19 de julio de 2017
- Bos, L., & Grancini, P. (1963). Peculiar Histoid Enations in White Clover and their Relationships to Virus Diseases and Toxic Effects of Leafhopper Feeding. *Phytopathology Z.*, *61*, 253-272.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., & Zurcher, E. J. (eds). (1996). Plant viruses online: descriptions and lists from the VIDE Database. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Bujarski, J., Figlerowicz, M., Gallitelli, D., Roossink, M. J., & Scott, S. W. (2012). Family Bromoviridae. En A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy 9th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses* (pp. 965-976). Academic Press.
- Buxton, D. R., Horstein, J. S., Wedin, W. F., & Marten, G. C. (1985). Forage quality in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot trefoil, and red clover. *Crop Science*, *25*, 273-279.
- Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E. T., Sit, T. L., & Lommel, S. A. (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology*, *39*, 419-460.
- Cambra, M., Gorris, M. T., & Terrada, M. E. (1996). Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus. En G. Llácer, M. M. López, A. Traperó, & A. Bello (Eds.), *Patología Vegetal* (Vol. I., pp. 207-254). Phytoma-España.
- Cardin, L., & Moury, B. (2000). First Report of Alfalfa mosaic virus in *Pachysandra terminalis* in Europe. *Plant Pathology*, *84*(5), 594. doi:10.1094/PDIS.2000.84.5.594B
- Castaño Zapata, J. (2002). *Principios básicos de fitoepidemiología*. Manizales: Universidad de Caldas, Centro Editorial.

- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2
- Cook, A. A., & Wilton, A. C. (1984). Alfalfa enation virus in th Kingdom of Saudi Arabia. *FAO Plant Prot. Bull.*, 32, 139-140.
- Crill, P., Hagedom, D. J., & Hanson, E. W. (1970). *Alfalfa mosaic, the disease and its incitant*. College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin.
- Cuevas, J. M., Delaunay, A., Rugar, M., Jacquot, E., & Elena, S. F. (2012). Molecular evolution and phylogeography of potato virus Y based on the CP gene. *The Journal of general virology*, 93(Pt 11), 2496-501. doi:10.1099/vir.0.044347-0
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772. doi:10.1038/nmeth.2109
- Delfino, M. A. (1991). Reconocimiento de los áfidos (homoptera:aphidoidea) encontrados en alfalfares (*Medicago sativa* L.) de la Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 66/67, 11-21.
- Delgado Enguita, I., & Luna Calvo, L. (1992). INCIDENCIA DE LAS VIROSIS MOSAICO Y «ENATIONS» EN PLANTAS AISLADAS DE ALFALFA. *PASTOS XXII, 1*, 85-92.
- Descamps, L. R., Sánchez-Chopa, C., & Bizet-Turovsky, J. (2015). Resistance in alfalfa to *Aphis craccivora* Koch. *Chilean journal of agricultural research*, 75(4), 451-456. doi:10.4067/S0718-58392015000500010
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzales, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2013). InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dietzgen, R. G. (2002). Application of PCR in Plant Virology. En J. A. Khan & J. Dijkstra (Eds.), *Plant Viruses as Molecular Pathogens* (pp. 471-500). NY: Food Products Press.
- Dietzgen, R. G., Mann, K. S., & Johnson, K. N. (2016). Plant virus-insect vector interactions: Current and potential future research directions. *Viruses*, 8(11), 1-21. doi:10.3390/v8110303
- Domier, L. L. (2012). Family Luteoviridae. En A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy 9th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses* (pp. 1045-1053). Elsevier Academic Press, San Diego. <http://www.ictvonline.org/>
- Domier, L. L., McCoppin, N. K., Larsen, R. C., & D'Arcy, C. J. (2002). Nucleotide sequence shows that Bean leafroll virus has a Luteovirus-like genome organization. *The Journal of general virology*, 83(Pt 7), 1791-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12075101>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4(5), 699-710. doi:10.1371/journal.pbio.0040088
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B., & Pybus, O. G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1185-1192. doi:10.1093/molbev/msi103
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969-1973. doi:10.1093/molbev/mss075
- Duffy, S., Shackelton, L. A., & Holmes, E. C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, 9(4), 267-276. doi:10.1038/nrg2323
- Echeverría, E. M., Moschetti, C., & Martínez, E. M. (1995). Producción de semillas de alfalfa. En E. Hijano & A. Navarro (Eds.), *La alfalfa en la Argentina* (pp. 207-238). INTA Enc. Agro de Cuyo, Manuales N°11. Editar.
- Elena, S. F., Bedhomme, S., Carrasco, P., Cuevas, J. M., de la Iglesia, F., Lafforgue, G., et al. (2011). The Evolutionary Genetics of Emerging Plant RNA Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 287-293. doi:10.1094/MPMI-09-10-0214
- EPPO. (2015). PM 7/126 (1) Electron microscopy in diagnosis of plant viruses. *EPPO Bulletin*, 45(3), 450-453. doi:10.1111/epp.12260
- Faria, N. R., Suchard, M. A., Rambaut, A., & Lemey, P. (2011). Toward a quantitative understanding of viral phylogeography. *Current Opinion in Virology*, 1(5), 423-429. doi:10.1016/j.coviro.2011.10.003
- Fick, G. W., & Holthausen, R. S. (1975). Significance of parts other than blades and stems in leaf-stem separations of alfalfa herbage. *Crop Science*, 15, 259-262.
- Font Quer, P. (1965). Diccionario de Botánica. 2º reimpresión, VII-XXXII. Ed. Labor S.A. Barcelona.
- Formoso, F. (2011). *Producción de semillas de especies forrajeras*. INIA Serie Técnica (Vol. 190).
- García-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J. M. (2001). Variability and Genetic Structure of Plant Virus Populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 157-186. doi:10.1146/annurev.phyto.39.1.157
- Ghoshal, B., & Sanfaçon, H. (2015). Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*, 479-480, 167-179. doi:10.1016/j.virol.2015.01.008
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
- Hau, B., Amorim, L., & Bergamin Filho, A. (2011). Epidemiologia: Análise Espacial. En *Manual de Fitopatologia* (pp. 667-695). Sao Paulo: Editora Agronomica Ceres

Ltda.

- Hemmati, K., & Mclean, D. L. (1977). Gamete-Seed Transmission of Alfalfa Mosaic Virus and Its Effect on Seed Germination and Yield in Alfalfa Plants. *Phytopathology*, 67(11), 576-579.
- Hijano, E., & Basigalup, D. H. (1995). El cultivo de la alfalfa en la República Argentina. En E. Hijano & A. Navarro (Eds.), *La alfalfa en la Argentina* (pp. 11-18). INTA Enc. Agro de Cuyo, Manuales N°11. Editar.
- Hiruki, C., & Hampton, R. O. (1990). Disease caused by viruses and viruses infectious to alfalfa. En D. L. Stuteville & D. C. Erwin (Eds.), *Compendium of Alfalfa Diseases* (pp. 51-58). St. Paul, MN.: American Phytopathological Society.
- Hogenhout, S. A., Ammar, E.-D., Whitfield, A. E., & Redinbaugh, M. G. (2008). Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 327-359. doi:10.1146/annurev.phyto.022508.092135
- ICTV on line. (2017a). <https://talk.ictvonline.org/>. Accedido 15 de septiembre de 2017
- ICTV on line. (2017b). International Committee on Taxonomy of Viruses. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/introduction/w/9th_report_intro/87/virus-taxa-infecting-plants. Accedido 25 de agosto de 2017
- Imwinkelried, J. M., Fava, F. D., & Trumper, E. V. (2013). Pulgones (Hemiptera : Aphidoidea) de la alfalfa. INTA.
- INTA-Informa. (2010). Descubren una nueva enfermedad en alfalfa. <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=2693>. Accedido 29 de octubre de 2015
- Itria, C. (1969). La alfalfa en la R. Argentina. I: Factores que disminuyen el rendimiento y duración de los cultivos. II: Contribución a la bibliografía nacional sobre alfalfa. IDIA Supl. 21.
- Jackson, A. O., Dietzgen, R. G., Goodin, M. M., Bragg, J. N., & Deng, M. (2005). Biology of plant rhabdoviruses. *Annual review of phytopathology*, 43, 623-60. doi:10.1146/annurev.phyto.43.011205.141136
- Jaspars, E. M., & Bos, L. (1980). Alfalfa mosaic virus. N°229. En *Description of plant viruses*. Kew, England, England: Commonwealth Mycology Institute/Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=229>.
- Johansen, E., Edwards, M. C., & Hampton, R. O. (1994). Seed Transmission of Viruses: Current Perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, 32(1), 363-386. doi:10.1146/annurev.py.32.090194.002051
- Jones, R. A. C. (2009). Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research*, 141(2), 113-130. doi:10.1016/j.virusres.2008.07.028
- Kim, H., Park, D., & Hahn, Y. (2018). Identification of novel RNA viruses in alfalfa (*Medicago sativa*): an Alphapartitivirus, a Deltapartitivirus, and a Marafivirus.

- Gene*, 638(September 2017), 7-12. doi:10.1016/j.gene.2017.09.069
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2011). *Virus taxonomy. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic Press.
- Kitajima, E. W., & Nome, C. F. (1999). Microscopía electrónica en virología vegetal. En D. M. Docampo & S. L. Lenardón (Eds.), *Métodos para detectar patógenos sistémicos* (pp. 59-87). Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) INTA-JICA.
- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., & Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1), 1-7. doi:10.1016/j.virol.2009.03.024
- Kumari, S. G., & Makkouk, K. M. (2003). Differentiation among Bean leafroll virus susceptible and resistant lentil and faba bean genotypes on the basis of virus movement and multiplication. *J. Phytopathology*, 151, 19-25.
- Lamprecht, R. L., Pietersen, G., Kasdorf, G. G. F., & Nel, L. H. (2009). Characterisation of a proposed Nucleorhabdovirus new to South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 123(1), 105-110. doi:10.1007/s10658-008-9339-5
- Larkin, M. a., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. a., McWilliam, H., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
- Leath, K. T. (1981). Pest managements systems for alfalfa diseases. En D. Pimentel (Ed.), *Handbook of pest management in agriculture* (pp. 293-302). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Leclant, F., Alliot, B., & Signoret, P. . (1973). Transmission et épidémiologie de la maladie a énéations de la luzerne (LEV). *Ann. Phytopathol*, 5(4), 441-445.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A. J., & Suchard, M. A. (2009). Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS computational biology*, 5(9), e1000520. doi:10.1371/journal.pcbi.1000520
- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A. M. (2009). *The Phylogenetic Handbook* (2nd ed.). Cambridge University Press.
- Leur, J. a. G., & Kumari, S. G. (2011). A survey of lucerne in northern New South Wales for viruses of importance to the winter legume industry. *Australasian Plant Pathology*, 40(2), 180-186. doi:10.1007/s13313-011-0028-z
- Li, S., Pearl, D. K., & Doss, H. (2000). Phylogenetic Tree Construction Using Markov Chain Monte Carlo. *Journal of the American Statistical Association*, 95(450), 493-508.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452. doi:10.1093/bioinformatics/btp187

- Marble, V. L. (1989). Fodders for the Near East: Alfalfa. En *FAO Plant Production and Protection Paper. N°97/1. Ed.:FAO Roma.*
- March, G. J., Oddino, C. M., & Marinelli, A. D. (2010). *Manejo de enfermedades de los cultivos según parámetros epidemiológicos.* Córdoba, Argentina: INTA.
- Mascia, T., & Gallitelli, D. (2016). Synergies and antagonisms in virus interactions. *Plant Science*, 252, 176-192. doi:10.1016/j.plantsci.2016.07.015
- Matthews, R. E. F. (1991). Induction of disease. En *Plant Virology* (3rd ed., pp. 423-469). Academic Press Inc.
- Mielmann, A. (2013). The utilisation of lucerne (*Medicago sativa*): a review. *British Food Journal*, 115(4), 590-600. doi:10.1108/00070701311317865
- Milne, I., Stephen, G., Bayer, M., Cock, P. J. a, Pritchard, L., Cardle, L., et al. (2013). Using tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), 193-202. doi:10.1093/bib/bbs012
- Moya, A., Holmes, E. C., & González-Candelas, F. (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2(4), 279-288. doi:10.1038/nrmicro863
- Nault, L. R. (1997). Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 90, 521-541.
- Nemchinov, L. G., Grinstead, S. C., & Mollov, D. S. (2017a). Alfalfa virus S , a new species in the family Alphaflexiviridae. doi:10.1371/journal.pone.0178222
- Nemchinov, L. G., Grinstead, S. C., & Mollov, D. S. (2017b). First Report and Complete Genome Sequence of Alfalfa Enamovirus from Sudan. *American Society for Microbiology*, 4-5.
- Nome Huespe, S. F., Docampo, D. M., & Conci, L. R. (2011). *INTA - Atlas Fitopatológico Argentino.* <http://rian.inta.gov.ar/atlas/#/Inicio>. Accedido 3 de noviembre de 2015
- Odorizzi, A. S. (2015). *Parámetros genéticos, rendimiento y calidad forrajera en alfalfas (Medicago sativa L.) extremadamente sin reposo con expresión variable del carácter multifoliado obtenidas por selección fenotípica recurrente.* Universidad Nacional de Córdoba.
- Odorizzi, A. S., Cornacchione, M. V., Arolfo, V., Basigalup, D. H., Mijoevich, M. L., & Balzarini, M. (2017). Evaluación de la virosis del achaparramiento de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) en dos ambientes contrastantes de Argentina, 34(II), 69-81.
- Ortego, J., Difabio, M. E., & Mier DUarte, M. P. (2004). Nuevos registros y actualización de la lista faunística de los pulgones (Hemiptera: Aphididae) de la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 63, 19-30. <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0373-56802004000100004&scr>
- Parrella, G., Acanfora, N., & Bellardi, M. G. (2010). First Record and Complete Nucleotide Sequence of Alfalfa mosaic virus from *Lavandula stoechas* in Italy. *Plant Disease*, 94(7), 924-924. doi:10.1094/PDIS-94-7-0924A

- Parrella, G., Acanfora, N., Orílio, A. F., & Navas-Castillo, J. (2011). Complete nucleotide sequence of a Spanish isolate of alfalfa mosaic virus: evidence for additional genetic variability. *Archives of Virology*, 156(6), 1049-1052. doi:10.1007/s00705-011-0941-z
- Parrella, G., Lanave, C., Marchoux, G., Finetti Sialer, M. M., Di Franco, a., & Gallitelli, D. (2000). Evidence for two distinct subgroups of alfalfa mosaic virus (AMV) from France and Italy and their relationships with other AMV strains: Brief report. *Archives of Virology*, 145(12), 2659-2667. doi:10.1007/s007050070014
- PLANTWISE. (2017). Alfalfa mosaic virus. <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=4346>. Accedido 3 de octubre de 2017
- Power, A. G., & Flecker, A. S. (2008). The role of vector diversity in disease dynamics. En R. S. Ostfeld, F. Keessing, & V. T. Eviner (Eds.), *Infectious Disease Ecology: The Effects of Ecosystem on Disease and of Disease on Ecosystems* (pp. 30-47). Princeton: Princeton University Press.
- Quantz, L., & Völk, J. (1954). Die blattrollkrankheit der ackerbohne und erbsen, eine neue viruskrankheit bei leguminosen. *Nachrichtenbl. dtsh. PflSchDienst., Braunschweig*, 6, 177-182.
- Radovic, J., Sokolovic, D., & Markovic, J. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6-1), 465-475. doi:10.2298/BAH0906465R
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D., & Drummond, A. J. (2014). Tracer v1.5. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Raynal, G., Gondran, J., Bournoville, R., & Courtillot, M. (1989). *Ennemis et maladies des prairies*. (INRA, Ed.).
- Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., & Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology journal*, 8(1), 104. doi:10.1186/1743-422X-8-104
- Rezende, J. A. M., & Kitajima, E. W. (2011). Virus E Viróides. En L. Amorin, J. A. M. Rezende, & A. B. Filho (Eds.), *Manual de Fitopatologia* (4th ed., pp. 227-254). Sao Paulo: Editora Agronomica Ceres Ltda.
- Rezende, J. A. M., Massola Jr., N. S., Bedento, I. P., & Krugner, T. L. (2011). Conceito de Doença, sintomatologia e diagnose. En *Manual de Fitopatologia* (pp. 37-58). Sao Paulo: Editora Agronomica Ceres Ltda.
- Rivera Coto, G. (2007). *Conceptos introductorios a la fitopatología*. EUNED.
- ROCHE. (2004). DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I. Alemania: ROCHE DIagnostics GmbH.
- Rodriguez, J. A. (1986). Mejoramiento genético de la alfalfa. En C. Bariggi, V. L. Marble, C. D. Itria, & J. M. Brun (Eds.), *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa* (INTA, Cole., pp. 251-323).

- Rodriguez Sardiña, J., & Novales Lafarga, J. (1973). Una virosis de la alfalfa con producción de «enations». *An. INIA Ser. Port. Veg.*, 3, 132-146.
- Roumagnac, P., Granier, M., Bernardo, P., Deshoux, M., Ferdinand, R., Galzi, S., et al. (2015). Alfalfa Leaf Curl Virus: an Aphid-Transmitted Geminivirus. *Journal of Virology*, 89(18), 9683-9688. doi:10.1128/JVI.00453-15
- Salazar, L. F. (1995). *Los virus de la papa y su control*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Smith, K. (1972). *A textbook of plant virus diseases* (3rd ed.). New York and London: Academic Press.
- Stace-Smith, R., & Hamilton, R. I. (1988). Inoculum thresholds of seedborne pathogens. *Viruses. Phytopathology*, 78, 875-80.
- Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology*, 13(2), 204-216. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00734.x
- Sylvester, E. S. (1958). Aphid transmission of plant viruses. Presented at Int. Congr. Entomol. 10th, Montreal.
- Sylvester, E. S., & Richardson, J. (1992). Aphid-borne rhabdoviruses-relationships with their vectors. En *Advances in disease and vector research* (pp. 313-341). New York: Springer-Verlag.
- Taylor, R. H., Grogan, R. G., & Kimble, K. A. (1961). Transmission of tobacco mosaic virus in tomato seed. *Phytopathology*, 51, 837-842.
- Télam. (2017). *Se conformó la Cámara Argentina de la Alfalfa*. <http://www.telam.com.ar/notas/201704/186595-se-conformo-la-camara-argentina-de-la-alfalfa-en-la-provincia-de-la-pampa.html>. Accedido 19 de julio de 2017
- Tesfaye, M., Silverstein, K. A. T., Bucciarelli, B., Samac, D. A., & Vance, C. P. (2006). The Affymetrix Medicago GeneChip (R) array is applicable for transcript analysis of alfalfa (Medicago sativa). *Funct. Plant Biol.*, 33, 783-788. doi:10.1071/FP06065
- Tordable, M., Vigliocco, A., Boito, G., Lorenzo, E., & Abdala, G. (1993). Estudio morfológico e identificación de giberelinas endógenas en raíces de maíz (*Zea mays* L.) afectado por el Mal de Río Cuarto. *Agriscientia*, X, 11-19.
- Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, C., Dietzgen, R. G., Fang, R. X., Jackson, A. O., et al. (2005). Family Rhabdoviridae. En C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, & L. A. Ball (Eds.), *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses* (pp. 623-644). San Diego: CA: Elsevier Academic Press.
- Tornos, T., Cebrián, M. C., Córdoba-Sellés, M. C., Alfaro-Fernández, A., Herrera-Vásquez, J. A., Font, M. I., & Jorda, M. C. (2008). First Report of Pea enation mosaic virus Infecting Pea and Broad Bean in Spain. *Plant Disease*, 92(10), 1469-1469. doi:10.1094/PDIS-92-10-1469C
- Trucco, V., de Breuil, S., Bejerman, N., Lenardon, S., & Giolitti, F. (2014). Complete

- nucleotide sequence of Alfalfa mosaic virus isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) in Argentina. *Virus Genes*, 48(3), 562-565. doi:10.1007/s11262-014-1045-0
- Trucco, V., de Breuil, S., Bejerman, N., Lenardon, S., & Giolitti, F. (2016). Bean leafroll virus (BLRV) in Argentina: molecular characterization and detection in alfalfa fields. *European Journal of Plant Pathology*, 146(1), 207-212. doi:10.1007/s10658-016-0899-5
- Ullrich, J., & Quantz, L. (1964). Morphologische und anatomische Untersuchungen über pathologische Veränderungen durch das Scharfe Adernmosaik (Pea enation mosaic virus) an *Vicia faba* und *Pisum sativum* und durch eine Virose an *Trifolium repens*. *Phytopathology Z.*, 51, 1-18.
- Uzest, M., Gargani, D., Drucker, M., Hébrard, E., Garzo, E., Candresse, T., et al. (2007). A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46), 17959-17964. doi:10.1073/pnas.0706608104
- Vaghi Medina, C. G. (2015). Filogeografía del Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) en América del Sur. En *Diversidad Genética, Recombinación y Filogeografía de Begomovirus que Infectan Tomate en Argentina* (pp. 169-194). Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba.
- van der Want, J. P. H., & Dijkstra, J. (2006). A history of plant virology. *Archives of Virology*, 151, 1467-1498.
- Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A., et al. (2017). Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. *Archives of Virology*, 162(6), 1819-1831. doi:10.1007/s00705-017-3268-6
- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T., & Gutiérrez-García, T. A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82, 277-297. doi:10.4067/S0716-078X2009000200009
- Vemulapati, B., Druffel, K. L., Eigenbrode, S. D., Karasev, a., & Pappu, H. R. (2010). Molecular characterization of pea enation mosaic virus and bean leafroll virus from the Pacific Northwest, USA. *Archives of virology*, 155(10), 1713-5. doi:10.1007/s00705-010-0767-0
- VIDE. (2017). Plant Viruses Online - Alphabetical List of Hosts. <http://sdb.im.ac.cn/vide/hostlist.htm#T>. Accedido 5 de septiembre de 2017
- Watson, M. A., & Roberts, F. M. (1939). A comparative Study of the Transmission of Hyoscyamus Virus 3, Potato Virus Y and Cucumber Virus 1 by the Vectors *Myzus persicae* (Sulz.), *M. circumflexus* (Buekton), and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proceedings of the Royal Society*, 127(849), 543-76. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19400500547>
- Weimer, J. L. (1931). Alfalfa mosaic. *Phytopathology*, 21, 122-123.
- Weltzien, H. C. (1978). Geophytopathology. En J. G. Horsfall & E. B. Cowling (Eds.), *Plant Disease, an advanced treatise* (Vol II., pp. 339-360). New York: Academic

Press.

- Wu, Q., Ding, S.-W., Zhang, Y., & Zhu, S. (2015). Identification of Viruses and Viroids by Next-Generation Sequencing and Homology-Dependent and Homology-Independent Algorithms. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 425-444. doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120030
- Xu, H., & Nie, J. (2006). Identification, Characterization, and Molecular Detection of Alfalfa mosaic virus in Potato. *Phytopathology*, 96(11), 1237-1242. doi:10.1094/PHYTO-96-1237
- Zabala, S. (1952). El mosaico de la alfalfa. *IDIA (Inf. Invest. Agric.) INTA Bs As*, 49, 5.
- Zhao, J., Zhang, X., Hong, Y., & Liu, Y. (2016). Chloroplast in plant-virus interaction. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-20. doi:10.3389/fmicb.2016.01565
- Zheng, Y., Zhao, L., Gao, J., & Fei, Z. (2011). iAssembler: a package for de novo assembly of Roche-454/Sanger transcriptome sequences. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 453. doi:10.1186/1471-2105-12-453
- Zhou, C.-J., Zhang, X.-Y., Liu, S.-Y., Wang, Y., Li, D.-W., Yu, J.-L., & Han, C.-G. (2017). Synergistic infection of BrYV and PEMV 2 increases the accumulations of both BrYV and BrYV-derived siRNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific Reports*, 7, 45132. doi:10.1038/srep45132



***PUBLICACIONES
DERIVADAS DE LA TESIS***