

Tesis de Licenciatura

Caracterización molecular del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz

Distefano, Ana Julia

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Distefano, Ana Julia. (). Caracterización molecular del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000598_Distefano

Cita tipo Chicago:

Distefano, Ana Julia. "Caracterización molecular del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000598_Distefano

EXACTAS
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS
DEL MAL DE RÍO CUARTO (MRCV) DEL MAÍZ**

ANA JULIA DISTÉFANO

DIRECTOR: DR. H. ESTEBAN HOPP
CO-DIRECTORA: DRA. MARIANA DEL VAS

TESIS DE LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

№ 0591

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
CICV INTA - CASTELAR

1998

**ESTA TESIS DE LICENCIATURA FUE REALIZADA GRACIAS A
UNA BECA DE ENTRENAMIENTO PARA ALUMNOS
UNIVERSITARIOS DE LA CIC**

1. INDICE

1. INDICE	1
2. ABREVIATURAS	2
3. INTRODUCCIÓN	
3.1. Importancia del Mal de Río Cuarto del maíz en la Argentina	4
3.2. Sintomatología de la enfermedad	6
3.3. Modo de transmisión del MRCV	11
3.4. Manejo de la enfermedad	12
3.5. Reovirus: clasificación y organización molecular	14
3.6. Trabajos previos realizados en el MRCV	23
4. OBJETIVOS	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1. Material de partida	26
5.2. Cepas bacterianas	26
5.3. Preparación de DNA plasmídico para secuenciación	26
5.4. Secuenciación de los segmentos clonados	26
5.5. Estudio de la organización genómica	28
5.6. Expresión de partes de proteínas del MRCV en bacterias	28
5.7. Análisis de las proteínas de fusión por Westrn blot	33
5.8. Purificación de las proteínas de fusión	33
5.9. Corte de las proteínas de fusión con el factor Xa	33
5.10. Obtención de anticuerpos	34
5.11. Preabsorción de sueros con proteínas DH5 α	35
6. RESULTADOS	
6.1. Secuenciación de clones de una genoteca de cDNA del MRCV	37
6.2. Expresión de partes de proteínas del MRCV en bacterias	45
6.3. Purificación de la proteína de fusión MBP-cápside MRCV	53
6.4. Obtención e anticuerpos contra la proteína de fusión MBP-CpMRCV	55
6.5. Obtención de anticuerpos contra la proteína His-RNA pol del MRCV	59
6.6. Evaluación de los antisueros	61
7. DISCUSIÓN	63
8. BIBLIOGRAFÍA	71

2. ABREVIATURAS

2.1. Abreviaturas utilizadas para virus vegetales

FDV	Fiji Disease Virus
MRCV	Mal de Río Cuarto Virus
MRDV	Maize Rough Dwarf Virus
NLRV	Nilaparvata Lugens ReoVirus
OSDV	Oat Sterile Dwarf Virus
PSV	Pongola Stunt Virus
RBSDV	Rice Black Streaked Dwarf Virus
RDV	Rice Dwarf Virus
RGDV	Rice Gall Dwarf Virus
RRSV	Rice Ragged Stunt Virus
WTV	Wound Tumor Virus

2.2. Otras abreviaturas

H ₂ O BD	agua bidestilada
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato
cDNA	DNA copia
csp	cantidad suficiente para
ddNTPs	dideoxinucleótidos trifosfato
dNTP	deoxinucleótido trifosfato
dsDNA	DNA cadena doble
dsRNA	RNA cadena doble
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etildiaminotetracético
Et Br	bromuro de etido
g	gramos
hs	horas
IPTG	isopropil-β-tiogalactopiranósido
KDa	kilodaltons
LB	medio de Luria-Delbrück
M	molaridad
mA	miliamper
MBP	proteína de unión a maltosa
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
PM	marcador de peso molecular
mRNA	RNA mensajero
NBT	nitrobluetetrasolium
ng	nanogramos
nm	nanometros
ORF	marco abierto de lectura
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio

seg	segundos
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
μ g	microgramos
μ l	microlitros
U	unidades enzimáticas
UV	ultra violeta
vol.	volumen

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Importancia del Mal de Río Cuarto del maíz en la Argentina

El “Mal de Río Cuarto”, debido a su creciente difusión y severidad, es considerado en la actualidad la principal enfermedad que afecta al maíz en la República Argentina; debe su nombre a la zona donde fue detectado por primera vez hace aproximadamente 30 años. Es una enfermedad de etiología viral, causada por el Virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) (Nome y col. 1980 y 1981).

En 1967, miembros de la Agencia de Extensión Rural del INTA Río Cuarto, Córdoba, encontraron plantas de maíz con síntomas desconocidos, que fueron asociados a problemas fisiológicos inducidos por condiciones climáticas o bien producidos por un hongo o algún tipo de virosis.

El primer indicio de que esta enfermedad es de origen viral fue presentado por Nome y col. en 1980, asociando partículas del virus del enanismo rugoso del maíz (MRDV) con el “Mal de Río Cuarto”. Un año más tarde el mismo grupo publicó un trabajo más detallado en donde por primera vez se logró transmitir el virus a un no-hospedante sano por injerto (Nome y col. 1981). En un principio, Milne y Nome postularon a una variante del MRDV como el causante de la enfermedad. Hasta hace poco tiempo se consideró al MRCV como un serotipo del MRDV. Hoy en día se considera al MRCV como una especie distinta del MRDV ya que no se encontró hibridación cruzada entre ambos genomas (Conci, 1997). Tanto el MRCV como el MRDV pertenecen al género Fijivirus, uno de los 9 géneros que conforman la familia Reoviridae (ver más adelante).

Hasta hace algunos años esta patología estaba circunscripta a la región sur de la provincia de Córdoba, pero actualmente se extiende a toda el área maicera argentina, encontrándose también casos en Uruguay, Paraguay y sur del Brasil.

Durante la campaña agrícola 76/77 esta enfermedad adquirió por primera vez características de epifitía, extendiéndose gradualmente, hasta que en la campaña 81/82 causó la pérdida de 55.000 de las 360.000 hectáreas de maíz en la localidad de Río Cuarto. Hoy en día, el Mal de Río Cuarto se encuentra extendido en toda la zona

maicera de Argentina en donde afecta 1.000.000 de las 4.400.000 hectáreas sembradas.

En la campaña agrícola 96/97, la enfermedad causó pérdidas de un 28.50% en la producción total de maíz, registrándose una pérdida del 22.62% en la provincia de Buenos Aires y elevándose a un 32.47% en la provincia de Córdoba (Diario La Nación suplemento campo, 15/12/97).

Provincia	Superficie afectada (ha)	Superficie perdida (ha)	Superficie a cosechar (ha)	Producción probable de la superficie afectada (t)	Producción normal de la superficie afectada (t)	Diferencia absoluta (t)	Variación (%)
Buenos Aires	106.183	14.110	92.073	437.797	565.775	127.979	-22,62
Córdoba	197.758	33.862	163.896	437.299	647.532	210.232	-32,47
La Pampa	11.480	3.401	8.079	21.109	40.808	19.700	-48,27
Santa Fe	27.438	3.833	23.605	126.690	175.620	48.930	-27,86
Total	342.859	55.205	287.654	1.022.895	1.429.736	406.841	-28,50

Tabla 1: Áreas afectadas y pérdidas ocasionadas en la producción de maíz en la campaña 96/97 debido a la incidencia del Mal de Río Cuarto. (Diario “La Nación”suplemento Campo, 15/12/97).

Desde el punto de vista epidemiológico se ha establecido como zona endémica una extensa área del sur de la Provincia de Córdoba. Sin embargo en los últimos años se han introducido modificaciones en el mapa de distribución de la enfermedad, debido a la severa epidemia de la campaña 96/97 y los cambios climáticos producidos en los últimos años. (Figura:1)

En la zona no endémica la incidencia de la enfermedad y la severidad aumentaron considerablemente en la campaña 96/97 con respecto a años anteriores, lo que ha determinado que adquiera características de epidemia en áreas donde la enfermedad era poco conocida (Lenardón S., Diario Clarín Sección Rural, 18/01/97). La enfermedad causó la pérdida total de la cosecha en zonas del centro-oeste de la provincia de Buenos Aires (Trenque Lauquen, Bolívar y General Villegas). También causó severas pérdidas en el norte de La Pampa, en el sur de Santa Fe y en el este-sudeste de la provincia de Córdoba (Diario Clarín, suplemento Rural 18/01/97).

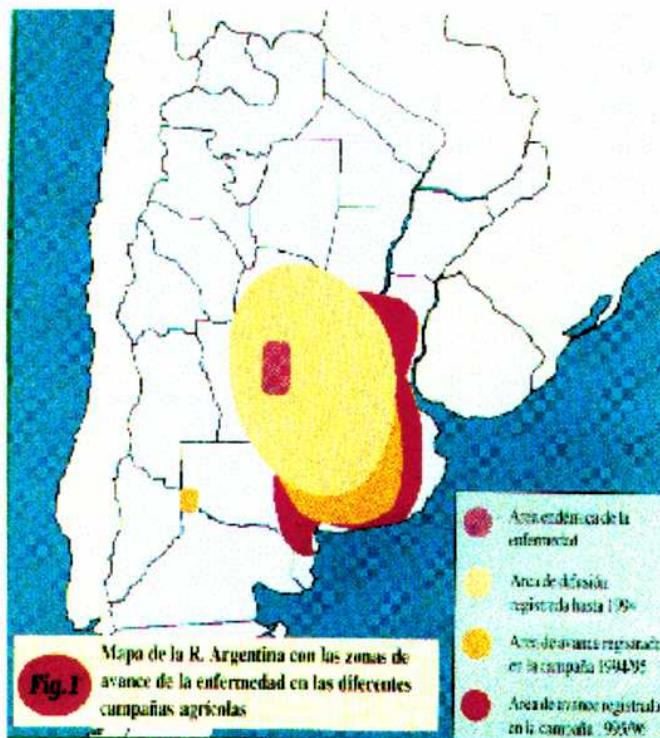


Figura 1: Expansión del “Mal de Río Cuarto” registrada en la Argentina a lo largo de las campañas agrícolas 1994, 1995, 1996 y 1997.

3.2. Sintomatología de la enfermedad

El ataque del Mal de Río Cuarto se produce normalmente de mediados de octubre a noviembre, en siembras tardías, mostrando el cultivo la mayor susceptibilidad durante los primeros 15 días desde la emergencia de las plántulas.

Los síntomas producidos dependen fundamentalmente del estadio de desarrollo de la planta de maíz en el momento de la infección. Cuando la infección ocurre en los primeros estadios de desarrollo (etapa de plántula), la altura de la planta se ve marcadamente reducida, variando entre 20 y 60 cm, con espigas malformadas (Figura 7) y por lo general muere como consecuencia de una necrosis que comienza en el ápice. (Figura 2)

Si la infección se produce en los estadios más avanzados de desarrollo, se observa una disminución en la altura de las plantas, que no supera 1.20 m, mostrando entrenudos basales de longitud normal y superiores notablemente acortados; además presenta

otros síntomas como tallos achatados (Figura 3), hojas inferiores aparentemente normales y superiores con la lámina foliar poco desarrollada y a veces cortada transversalmente, o incluso reducidas a la vaina foliar. Las espigas son numerosas (hasta ocho), deformes, pequeñas y generalmente estériles, llegando incluso a no formarse. (Figura 6)

Si por el contrario la planta se enferma hacia el final de su desarrollo, presenta una altura normal; las hojas del tercio superior se encuentran acartuchadas y erguidas y las mazorcas, si bien están formadas, presentan escasa producción de granos (Figura 7 y 8). Como la sintomatología es variada y pueden, en determinadas situaciones, presentarse dudas acerca de su origen, se considera que las enaciones (proliferación de tejidos con forma de verruga) formadas a partir de las nervaduras en el envés de la hoja son el síntoma distintivo que identifican al Mal de Río Cuarto (Lenardón y col., 1985). (Figuras 4 y 5)



Figura 2: Síntomas del MRCV. Se observa en las hileras centrales plantas de maíz con grado severo de enanismo.



Figura 3: Síntomas del MRCV. Tallos engrosados y chatos. Síntomas de infección severa.



Figura 4: Síntomas del MRCV. Enaciones sobre las nervaduras del envés de una hoja de maíz infectada con MRCV.



Figura 5: Síntomas del MRCV. Detalle de una enación sobre la nervadura en el envés de una hoja de maíz infectada con MRCV.



Figura 6: Síntomas del MRCV. Espigas múltiples y pequeñas.

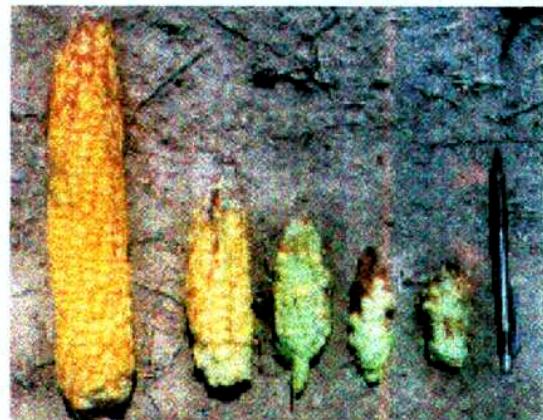


Figura 7: Síntomas del MRCV. Se observa el efecto sobre la producción de granos en el cultivo de maíz. Dependiendo del estadio de desarrollo en que fue infectada la planta de maíz y del genotipo, se puede encontrar desde la disminución en el tamaño de la mazorca hasta la atrofia total de la misma sin la formación de granos. A la izquierda se muestra la mazorca de una planta sana.

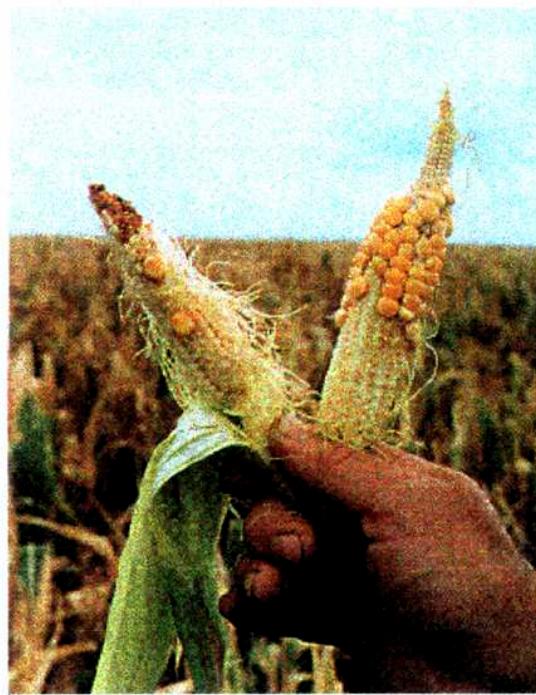


Figura 8: Síntomas del MRCV. Se observan espigas con fallas en la formación de granos.

3.3. Modo de transmisión del MRCV

En el país el MRCV es transmitido por un insecto vector: la chicharrita *Delphacodes kuscheli* Fennah (Planthopper, Homóptera delphacidae) (Remes Lenicov y col 1985; Ornaghi y col. 1993) aunque no se descarta la posibilidad de que otras especies de delfácidos puedan ser capaces de actuar como transmisores de la enfermedad.

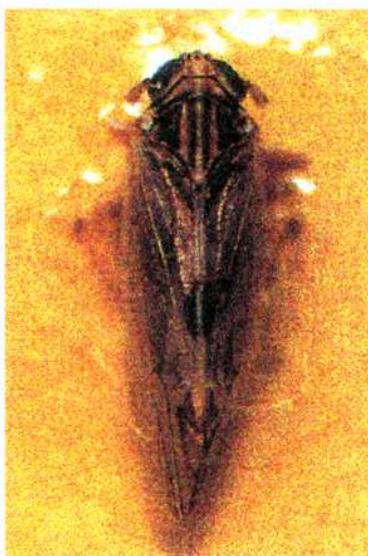


Figura 9: Insecto vector del MRCV *Delphacodes kuscheli* Fennah.

Estudios llevados a cabo de las fluctuaciones poblacionales del insecto vector sobre las plantas de maíz, otras gramíneas cultivadas y malezas, permitieron comprobar que la avena (*Avena sativa L*) y el trigo (*Triticum aestivum L*), aparecen como los cultivos donde la chicharrita vector se desarrolla principalmente para luego migrar al maíz (Dagoberto y col, 1985; Ornaghi, J, 1993).

El MRCV presenta un amplio rango de hospedadores naturales además del maíz (*Zea mays L*); se lo ha encontrado infectando naturalmente especies de gramíneas silvestres como *Digitaria sanguinalis L* (“pata de gallina”; Luisoni y col. 1970), *Setaria verticillata* (Klein. 1967), *Sorghum halepense L* (“sorgo de Alepo”; Lenardón, S. Comunicación personal), *Echinochloa crus-galli L* (“capín arroz”; Vidano y col. 1966), *Echinochloa colonum L* (Conci y col. 1992), *Eleusine indica L* (cola de zorro; Conci y col. 1992), *Cynodon dactylon L* (“gramón”; Klein. 1967). En general son

malezas del maíz y constituyen un reservorio natural del virus, siendo además espacios aptos para el desarrollo del insecto vector. Además se ha logrado establecer que el virus infecta naturalmente a otras gramíneas cultivadas, entre ellas, *Avena sativa* (Giménez Pecci y col., 1997), *Sorghum bicolor* (Giorda y col., 1993), *Triticum aestivum* (Rodríguez Pardina y col., 1994), cebada, centeno y mijo (Laguna, comunicación personal). En todas estas especies los síntomas son variables, pero mantienen como constante la reducción en la altura de la planta, las malformaciones de las hojas y panojas, y las enaciones en las nervaduras de las hojas.

El virus se encuentra en muy bajas concentraciones en la planta ya que sólo es capaz de replicar en floema.

El modo de transmisión del MRCV es circulatoria. El virus puede replicar en la planta que infecta como así también en el insecto vector, lo cual implicaría el uso por parte del virus de mecanismos celulares muy conservados para su multiplicación. El virus es ingerido cuando el vector se alimenta de savia de plantas enfermas, y luego de un período de incubación de entre 1 a 3 semanas, durante el cual replica e invade la mayoría de los tejidos, llega a las glándulas salivales del vector. Como la infección que el virus establece en el vector es subclínica y persistente, una vez infectado, el vector es capaz de transmitir el virus a plantas sanas durante toda su vida. Incluso el virus puede ser transmitido a la progenie a través de los huevos (pasaje transovarial. Milne y col. 1986). Debido a que el virus no se transmite por las semillas (Harpaz, 1972), podemos descartar la introducción del mismo al país por esta forma; lo más probable es que a semejanza de lo acontecido en Italia (Grancini, 1962) el virus haya estado presente en nuestro país, actuando algunas malezas e insectos como reservorios naturales, adquiriendo carácter epidémico cuando se dieron las condiciones predisponentes para la enfermedad en presencia de los híbridos que reemplazaron las variedades tradicionales (Lenardón y March, 1983).

3.4. Manejo de la enfermedad

Existe un conjunto de factores que determinan la severidad y la incidencia de la enfermedad del “Mal de Río Cuarto”. Como ya se ha mencionado la edad en la cual la

planta es infectada, el genotipo de la planta hospedante y las condiciones climáticas que favorecen el desarrollo del insecto vector, son algunos de los factores que afectan el desarrollo de la enfermedad.

En 1995 March y col., publicaron un modelo predictivo para la intensidad del Mal de Río Cuarto. Tomando en consideración las características climáticas entre los períodos 81-82 a 89-90, llegaron a la conclusión de que el promedio de las temperaturas máximas en los meses de Junio, Julio y Agosto y la lluvia total caída en Julio y Agosto influían significativamente en la intensidad de la enfermedad. Los autores postularon que los inviernos suaves (con altas temperaturas y lluvias) podrían tener una influencia directa sobre el desarrollo de las poblaciones de la chicharrita *Delphacodes kuscheli*, como así también una influencia indirecta sobre el vector porque favorecerían el crecimiento de la avena y el trigo, que es dónde se reproduce y cría el vector.

Debido a que no se cuenta con cultivares de maíz resistentes al virus, una de las principales estrategias implementada por los productores para el manejo de la enfermedad consiste en realizar una siembra temprana de las semillas, de manera de que las plantas estén lo suficientemente desarrolladas en el momento del año en que la chicharrita vector del MRCV es más abundante en el campo (Lenardón y March, 1983; March, 1995). Esto no siempre es posible debido a que en las épocas de sequía no se puede sembrar el maíz tempranamente. Otra estrategia es la siembra muy tardía de las semillas de maíz. Con ambas estrategias se evita que las etapas más susceptibles del cultivo coincidan con el pico de densidad poblacional del vector, sugiriendo que la incidencia de la enfermedad depende del grado de superposición del pico poblacional del vector con las tres primeras semanas del cultivo (Lenardón y col., 1985).

Para el manejo del cultivo, March y colaboradores (cátedra de Terapéutica Vegetal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, U.N. de Río Cuarto) ensayaron diferentes tipos de labranza comprobando que el tratamiento sin laboreo anticipado, labranza cero y aplicación de insecticidas a la semilla disminuye la incidencia del Mal de Río Cuarto. El control de enfermedades mediante la resistencia genética es una de las mejores alternativas para cultivos extensivos. Algunas compañías semilleras, cuentan con híbridos de maíz tolerantes en mayor o menor medida al Mal de Río Cuarto. Sin

embargo, a pesar de que la incidencia del Mal de Río Cuarto puede ser atemperada mediante el empleo de estos cultivares tolerantes, estos híbridos son infectados por el virus, que es acumulado en la planta y la tolerancia se ve ampliamente sobrepasada cuando la carga viral es alta, en años de ataque severo de la enfermedad, como ocurrió en la campaña 96/97 en la que campos sembrados con híbridos tolerantes fueron también afectados por el MRCV. Además, si bien la tolerancia no está bien caracterizada aún a nivel de genética clásica, se cree que es producida por un conjunto de genes. A través del mejoramiento genético es posible aumentar el nivel de tolerancia de los híbridos comerciales, pero los intentos de introgresar estos genes a líneas de mayor rendimiento son difíciles (Daniel Presello, comunicación personal).

3.5. Reovirus: clasificación y organización molecular

La familia Reoviridae incluye una gran cantidad de virus que infectan humanos, ganado, pájaros, peces, moluscos, insectos y plantas.

La familia Reoviridae posee nueve géneros (Tabla 2), tres de los cuales infectan tanto plantas como insectos.

Genero	Miembro tipo	Huésped
<i>Phytoreovirus</i>	Wound Tumor Virus	Plantas superiores, "Leafhoppers"
<i>Fijivirus</i>	Fiji Disease Virus	Plantas superiores, "Planthoppers"
<i>Oryzavirus</i>	Rice Ragged Stunt Virus	Plantas superiores, "Planthoppers"
<i>Orthoreovirus</i>	Reovirus tipo I	Vertebrados
<i>Orbivirus</i>	Bluetongue Virus	Vertebrados y artrópodos
<i>Coltivirus</i>	Colorado Tick Fever Virus	Vertebrados y artrópodos
<i>Rotavirus</i>	Rotavirus humanos	Mamíferos y aves
<i>Aquareovirus</i>	Golden Shiner Virus	Peces, cefalópodos
<i>Cytopivirus</i>	Cytoplasmic Poliedrosis Virus	Insectos

Tabla 2: Géneros incluidos en la familia Reoviridae. En negritas se señalan aquellos géneros que atacan tanto plantas como insectos.

La mayoría de los estudios sobre reovirus de plantas son realizados por la importancia económica que representa su infección, pero además porque esta familia posee características muy interesantes. Los viriones son partículas esféricas de 60-70 nm de diámetro. Consisten en una doble capa de proteínas que forman una cápside icosahédrica. Pueden tener o no espículas protruyentes (según el género) de cada uno de los 12 vértices del icosahedro. En el interior de las partículas, se encuentra una copia de cada uno de los 10 ó 12 segmentos genómicos (según el género) de RNA de doble cadena (dsRNA), que en general son monocistrónicos y la enzima RNA polimerasa RNA dependiente que transcribe RNA de simple cadena a partir de RNA de doble cadena. Puede haber otras proteínas dentro de la cápside pero ninguna está asociada estrechamente al genoma. Poseen la capacidad de multiplicarse en plantas e insectos, pueden inducir la producción de tumores o neoplasias en los tejidos infectados y en la mayoría de los casos están localizados solo en el floema.

Los segmentos se numeran de S1 a S10 ó de S1 a S12 según su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida, desde el más lento al más rápido respectivamente.

Los reovirus de plantas son transmitidos en la naturaleza, de manera persistente y circulatoria (Harris, K y col, 1980), por dos grupos de insectos diferentes denominados “*Leafhoppers*” (suborden *Auchenorrhyncha*; superfamilia *Cicadelidae*) y “*Planthoppers*” (suborden *Auchenorrhyncha*; superfamilia *Fulgoroidea*; familia *Delphacidae*) y tienen la particularidad de replicar tanto en el insecto vector como en la planta huésped; esto implicaría el uso, por parte de los virus, de mecanismos celulares muy conservados para su multiplicación.

La clasificación de los reovirus de plantas se basa principalmente en la morfología de las partículas virales, número y tamaño de los segmentos genómicos, serología del virión o subpartícula viral, rango de hospedador y tipo de vector que transmite el virus (Uyeda y col, 1995a; Holmes y col., 1995).

Los Reovirus de plantas están incluidos en tres géneros: *Phytoreovirus*, *Fijivirus* y *Oryzavirus* (clasificación según el 6^{to} reporte del comité internacional de taxonomía de virus).

En la Tabla 3 se detallan los distintos integrantes de estos tres géneros y algunas de sus características.

Género	Especie	Localización geográfica	Planta huésped	Insecto vector	Nº de segmentos genómicos
<i>Phytoreovirus</i>	Wound Tumor Virus (WTV)	N. América	Dicotiledónea	<i>Leafhoppers</i>	12
	Rice Dwarf Virus (RDV)	S.E. Asia	Gramíneas	<i>Leafhoppers</i>	12
	Rice Gall Dwarf (RGDV)	S.E. Asia	Gramíneas	<i>Leafhoppers</i>	12
<i>Fijivirus</i>	Fiji Disease Virus (FDV)	Australia, Oceanía	Gramíneas	Planthoppers	10
	Maize Rough Dwarf virus (MRDV)	Europa	Gramíneas	Planthoppers	10
	Mal de Río Cuarto Virus (MRCV)	S. América	Gramíneas	Planthoppers	10
	Rice Black Streaked Dwarf Virus (RBSV)	S.E. Asia	Gramíneas	Planthoppers	10
	Pangola Stunt Virus (PSV)	América central, Australia	Gramíneas	Planthoppers	10
	Oat Sterile Dwarf Virus (OSDV)	N. y centro de Europa	Gramíneas	Planthoppers	10
<i>Oryzavirus</i>	Rice Ragged Stunt Virus (RRSV)	S:E: Asia	Gramíneas	Planthoppers	10
	Echinochloa Ragged Stunt Virus (ERSV)	S.E. Asia	Gramíneas	Planthoppers	10

Tabla 3: Características de los miembros de la familia Reoviridae que infectan plantas.

Los ***Phytoreovirus*** incluyen al WTV (“Wound Tumor Virus”) y el RDV (“Rice Dwarf Virus”), que son los dos virus más estudiados (miembros tipo). Su genoma está

compuesto por 12 segmentos de RNA de doble cadena y son transmitidos por leafhoppers.

Los *Fijivirus* incluyen entre otros al MRDV (“Maize Rough Dwarf Virus” o virus del enanismo rugoso del maíz), al FDV (“Fiji Disease Virus” , que infecta la caña de azucar), al RBSDV (“Rice Black Streaked Dwarf Virus” o virus del rayado negro enano del arroz), al OSDV (“Oat Sterile Dwarf Virus”) y al MRCV (“Mal de Río Cuarto Virus”), que nos ocupa. Su genoma consiste en 10 segmentos de RNA de doble cadena y son transmitidos por planthoppers.

Los *Oryzavirus* difieren de los *Fijivirus* por la morfología de las partículas virales y por la movilidad de sus 10 segmentos genómicos. El miembro tipo es el RRSV (“Rice Ragged Stunt Virus”).

3.5.1. Género *Fijivirus*

El estudio de la organización genómica primaria de los virus del género *Fijivirus* está menos avanzado que la de otros grupos debido, en parte, a que sus partículas son menos estables y en consecuencia más difíciles de purificar (Francki y col 1985).

Los *Fijivirus*, como ya se ha mencionado, poseen un genoma de 10 segmentos de RNA de doble cadena y son transmitidos por planthoppers delfácidos (Milne y col., 1973; Hatta y Francki, 1977). Se han reconocido tres grupos sobre la base de la asociación de los antígenos con las partículas del “core” (Milne y Lovisolo, 1977) y por la ausencia de reacción serológica entre ellos (Holmes y col., 1995). El grupo 1 esta formado únicamente por el “Fiji Disease Virus” (FDV). El grupo 2 incluye al “Maize Rough Dwarf Virus” (MRDV), al “Rice Black Streaked Dwarf Virus” (RBSDV), al Pangola Stunt Virus (PaSV) y al Mal de Río Cuarto Virus (MRCV). El grupo 3 tiene un único miembro el “Oat Sterile Dwarf Virus” (OSDV).

Este género incluye además al Nilaparvata lugens Reo Virus (NLRV), un miembro atípico ya que sólo replica en el insecto *Nilaparvata lugens* y se transmite a través de las plantas de arroz, pero no replica ni causa enfermedad en las mismas. Más adelante

se considerarán aspectos moleculares de este virus, el único miembro del género que ha sido completamente secuenciado (Nakashima y col., 1996).

3.5.1.1. Organización molecular de los Fijivirus:

Las partículas virales son isométricas de aproximadamente 65-70 nm de diámetro. Consisten en una doble capa de proteínas que forman una cápside icosaédrica, con espículas A localizadas en cada uno de los 12 vértices de la superficie externa. Las partículas “core” internas, de unos 51-55 nm de diámetro, tienen espículas B protruyendo de los vértices (Figura 10).

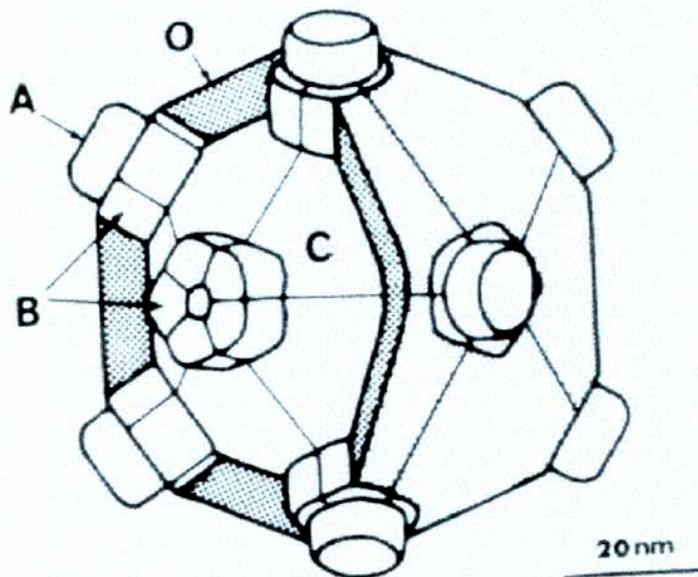


Figura 10: Modelo a escala de una partícula de *Fijivirus*, mostrando las espículas A y B. Parte de la cobertura externa (O) y una espícula tipo A fueron removidas para exponer el “core” (C) y la estructura de la espícula B. Barra= 200 nm (Francki y col., 1985).

En el interior de las partículas, se encuentra una copia de cada uno de los 10 segmentos genómicos de dsRNA y la enzima RNA polimerasa RNA dependiente que transcribe RNA de simple cadena a partir de RNA de doble cadena. Hay otras proteínas dentro de la cápside pero ninguna está asociada estrechamente al genoma.

Hasta el momento han sido secuenciados completamente los segmentos 7, 8, 9 y 10 del RBSDV (Uyeda y col 1990; Azuhata y col., 1993; Isogai y col., 1998b), los segmentos 6, 8 y 10 del MRDV (Marzachi y col 1991 y 1995) y los segmentos 7, 8, 9 y 10 del OSDV (Isogai y col. 1998a). También se ha secuenciado parcialmente el segmento 3 del RBSDV, que codifica para una proteína de la cápside.

En la Figura 11 se muestra la correspondencia de las proteínas homólogas codificadas por estos *fijivirus*.

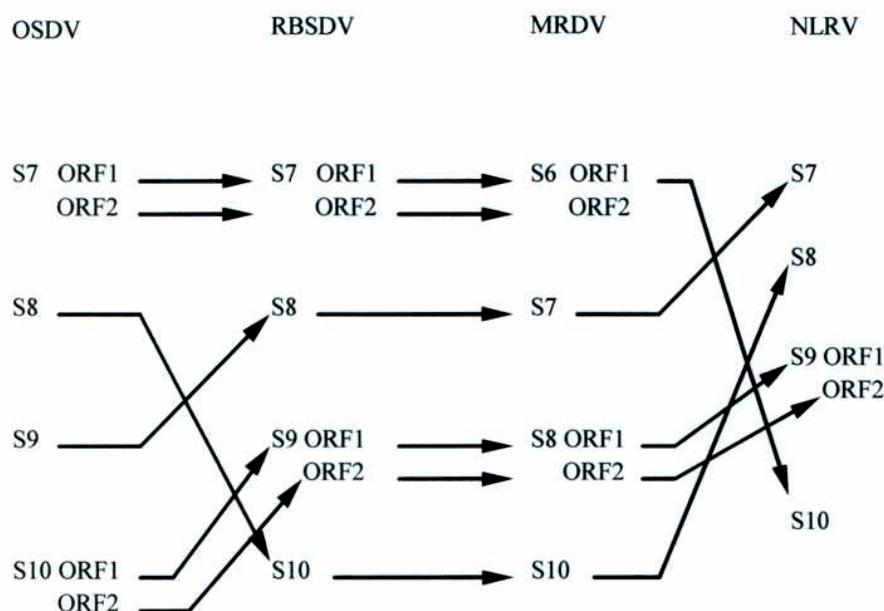


Figura 11: Correspondencia entre las distintas proteínas homólogas (codificadas por los segmentos secuenciados en forma completa) de los virus del género *Fijivirus*: OSDV, RBSDV, MRDV, NLRV.

Analizando las secuencias terminales conservadas entre los miembros de los géneros *Phytoreovirus*, *Fijivirus* y *Oryzavirus*, se observa que los miembros del mismo género poseen secuencias similares o idénticas, mientras que los miembros de diferentes géneros poseen secuencias terminales no relacionadas. Estas secuencias terminales representarían una característica género-específica. En el caso de los virus RBSDV y MRDV (*Fijivirus* grupo 2), todos los segmentos secuenciados hasta el momento contienen secuencias terminales conservadas en los extremos 5' y 3' (Marzachi y col.,

1991; Azhuta y col., 1992): (+) 5'AAGUUUUU....//.... GUC3'. Sin embargo estos dos virus están muy relacionados, y parte de esta secuencia podría no ser específica del género.

Por otro lado el NLRV posee las secuencias terminales 5'AGU...//...GUUGUC3' conservadas en sus diez segmentos genómicos. Estas secuencias son similares, pero no idénticas, a las secuencias terminales del RBSDV y del MRDV (Noda y col., 1994).

En los segmentos 7, 8, 9 y 10 secuenciados del OSDV, se encontró que las secuencias de los extremos 5' y 3' conservadas son similares, pero no idénticos, a los extremos del RBSDV y MRDV: 5'AACGAAAAA..//..UUUUUUUAGUC 3' (Isogai y col., 1998).

Analizando las secuencias terminales conservadas del OSDV (*Fijivirus* grupo3) Isogai y col. (1998) postularon que la secuencia género-específica de los *Fijivirus* sería: 5'AA...//...GUC3'. Aparentemente los *Fijivirus* tendrían una secuencia género-específica mucho más corta con respecto a los *Phytoreovirus* y los *Oryzavirus* (Uyeda y col., 1995).

El hecho de que dentro de cada cápside haya una (y sólo una) copia de cada segmento genómico viral fue objeto de gran interés. En general, y para todos los géneros de Reovirus de plantas, se propone que la conservación de las secuencias nucleotídicas de los extremos de los segmentos genómicos está ligada al mecanismo de replicación y empaquetamiento viral. Anzola y col. (1987) postularon que los extremos de los segmentos funcionarían como una señal que permite la distinción entre el RNA del huésped y del virus. Describieron la existencia de un S5 defectivo del WTV (*Phytoreovirus*) que contenía una gran delezión interna pero conservaba los bordes intactos. Este segmento defectivo competía por su encapsidación sólo con el S5 salvaje parental y no con los otros segmentos que contenían los mismos extremos 5' y 3'. Luego de estudiar los extremos de todos los segmentos del WTV, encontraron secuencias repetidas invertidas en ambos extremos de los segmentos genómicos (además de los bordes iguales para todos los segmentos ya descriptos). Estas secuencias, de 6 a 14 nt. son distintas para cada segmento, lo que los llevó a postular que servirían para el reconocimiento de cada segmento individual durante el empaquetamiento. Mediante interacciones proteína/RNA ó RNA/RNA, estas

secuencias permitirían la encapsidación de una copia de cada segmento por partícula viral.

Mediante estudios de fitopatología clásica se observó que el género *Fijivirus* es más homogéneo que los *Phytoreovirus* en cuanto a las funciones biológicas de sus miembros. No sorprendió entonces cuando al analizar los segmentos secuenciados se encontraron altas homologías entre los segmentos correspondientes.

A diferencia de lo observado en otros géneros de *Reovirus* de plantas, se ha demostrado que al menos dos de los diez segmentos del RBSDV y del MRDV son bicistrónicos (Azhuta y col., 1993; Marzachi y col., 1991, 1996). Por ejemplo, los segmentos 6 del MRDV y 7 del RBSDV (homólogos entre sí) contienen dos marcos abiertos de lectura no superpuestos (Marzachi y col., 1991; Azhuta y col., 1993). Los segmentos 6 del MRDV y 7 del RBSV presentan una homología del 85% a nivel de nucleótidos y las dos proteínas codificadas por cada uno de ellos presentan una homología a nivel de aminoácidos del 91% en el ORF 1 y del 85% en el ORF 2. La proteína codificada por el ORF 1 del segmento 7 del RBSDV se acumula aparentemente en estructuras tubulares, involucradas en el movimiento del virus de célula a célula (Isogai y col., 1998).

De la misma manera, el análisis de la secuencia nucleotídica del segmento 8 del MRDV y del segmento 9 del RBSV (homólogos entre sí) mostró que contienen, cada uno, dos marcos abiertos de lectura no superpuestos (Marzachi y col., 1996; Isogai y col., 1998). Presentan una homología del 85% a nivel de nucleótidos y las dos proteínas codificadas por cada uno de ellos presentan una homología a nivel de aminoácidos de un 87% para el ORF 1 y de un 93% para el ORF 2. Isogai y col. (1998) determinaron que el ORF 1 del segmento 9 del RBSDV codifica para una proteína de 40 KDa que se acumula en el viroplasma.

La transcripción tanto del segmento 9 como del segmento 7 del RBSDV, que poseen dos ORFs, dan lugar a un único RNA mensajero (Isogai y col., 1998).

La proteína codificada por el segmento 8 del RBSDV es una proteína de la cápside interna (“core” capsid) de 65 KDa, mientras que la proteína codificada por el segmento 10 del RBSDV de 56 KDa es la proteína mayoritaria de cápside externa (Isogai y col., 1998). Estos resultados se refuerzan dado que el segmento 7 del NLRV

que codifica para una proteína del “core” es homóloga a la proteína codificada por el segmento 8 del RBSDV y el segmento 8 del NLRV que codifica para la proteína mayoritaria de la cápside externa es homóloga a la proteína codificada por el segmento 10 del RBSDV (Nakashima y noda, 1994; Isogai y col., 1998b)

Como ya se ha mencionado el *Nilaparvata lugens* Reo Virus (NLRV) es el único miembro de este género cuyo genoma ha sido secuenciado enteramente (Nakashima y col. 1996). Se ha asignado la función de varias de las proteínas codificadas por sus segmentos. El segmento 1 codifica para la RNA polimerasa RNA dependiente. En esta proteína se encuentran los motivos consensos para las RNA polimerasas RNA dependientes descriptos por Poch y col (1989) (motivos A, B y C), Bruenn (1991) (motivos 1, 2 y 3) y Koonin (1992) (motivos IV, V y VI), que están fuertemente conservados en los Reovirus.

El segmento 2 codifica para la proteína que forma las espículas B y el segmento 3 codifica para una proteína estructural mayoritaria del “core”

El NLRV tiene muchas propiedades similares al RBSDV, que incluyen la morfología, la secuencia de nucleótidos terminales de los segmentos (Nakashima y Noda, 1994), la manera de transmisión a través de las plantas de arroz y la capacidad de multiplicar en el Planthopper *Laodelphax Striatellus* (Nakashima y Noda, 1995). La mayor diferencia radica en que el RBSDV tiene la habilidad de multiplicar en plantas de arroz mientras que NLRV no la tiene.

De todas las secuencias reportadas del RBSDV solo la secuencia de aminoácidos deducida del ORF 2 del RBSDV segmento 7 no muestra similitud con alguna secuencia del NLRV. Se postula entonces que el producto del ORF 2 del segmento 7 puede ser el responsable de la multiplicación en las plantas de arroz (Noda y Nakashima, 1995).

Análogamente al caso del RBSDV y del MRDV, dos segmentos (S7 y S10) del OSDV resultaron ser bicistrónicos. Estos resultados sugieren que la naturaleza bicistrónica de ciertos segmentos es característico de los *Fijivirus*.

En los últimos años se ha propuesto que los reovirus de plantas se han originado de virus de insectos (Nault, 1994). Esta hipótesis se deriva de la observación de que los reovirus de plantas inducen síntomas severos en las plantas pero no en los insectos

vectores y también se basa en que hay varios reovirus no patogénicos en insectos vectores de reovirus de plantas. Noda y Nakashima (1995) proponen que el NLRV es un antecesor de los Reovirus porque no multiplica y no es patogénico en las plantas de arroz, que son las únicas hospedantes naturales del NLRV.

El árbol filogenético derivado del alineamiento de múltiples secuencias de cada una de las proteínas homólogas del OSDV, RBSDV, MRDV y NLRV sugiere que el NLRV no evolucionó de los Fijivirus del grupo 2 (RBSDV o MRDV) ó del grupo 3 (OSDV) y perdió su capacidad de amplificar en las plantas. Aún no está claro si el ancestro de los *Fijivirus* es un virus de insectos y los *Fijivirus* actuales fueron adquiriendo la habilidad de amplificar en las plantas, o si el ancestro es un virus de plantas y el NLRV fue perdiendo la habilidad de multiplicar en las plantas. Es necesario realizar más estudios para dilucidar el origen de los *Fijivirus* (Isogai y col, 1998).

3.6. Trabajos previos realizados en el MRCV

Como ya se ha mencionado, Milne y Nome postularon en un principio a una variante del MRDV como el causante de la enfermedad. Hasta hace poco tiempo se consideró al MRCV como un serotipo del MRDV. Como consecuencia de una colaboración establecida entre el Dr. Boccardo (Instituto de Fitovirologia Applicata del CNR, Turin, Italia) y el Dr. Conci del Instituto de Fitovirología de INTA-Córdoba, se determinó en ensayos de hibridación molecular, utilizando dos sondas del MRCV y seis pertenecientes al MRDV, que no hubo reacción cruzada entre ácidos nucleicos de ambos virus ni tampoco con el RBSDV (Rice Black Streaked Dwarf Virus), lo que permitió sugerir que el MRCV es una entidad muy poco relacionada o distinta al MRDV y al RBSDV (Conci y Marzachí, 1993). Además los datos de secuencia del MRCV con los que se cuenta (alguno de ellos descriptos en esta Tesis de Licenciatura y otros en Conci, 1997) indican que el MRCV debería ser considerado como una especie.

Teniendo en cuenta las relaciones de migración de los diferentes segmentos genómicos del MRCV con respecto a los segmentos genómicos de dsRNA del RDV (que pertenece al género *Phytoreovirus* y cuyo genoma esta totalmente secuenciado, se han

se han determinado los tamaños aproximados de todos los segmentos del MRCV (Conci, 1997) (Figura 32 de discusión). El tamaño aproximado del genoma del MRCV es de 27.450 pb.

Para continuar con el estudio del MRCV, resulta esencial la secuenciación completa de su genoma. Para ello es necesario clonar los diferentes segmentos genómicos del MRCV a los fines de determinar su secuencia nucleotídica y proteica, analizar los diferentes mecanismos de expresión génica, marcos de lectura en cada segmento, replicación y morfogénesis del virus.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos generales

Profundizar los conocimientos básicos que se tienen sobre el virus del MRCV, para poder, en un futuro, desarrollar una estrategia efectiva de control de la enfermedad mediante técnicas de ingeniería genética. Se profundizará sobre todo, el estudio de genes virales cuya disruptión teóricamente causaría la abolición o disminución de la replicación viral dentro de la planta o del insecto vector, o la disminución de la severidad de los síntomas causados por el virus en la planta.

4.2. Objetivos particulares

- 1) Secuenciación de clones de una biblioteca genómica conteniendo genes de interés, y estudio de la organización molecular de los segmentos genómicos.
- 2) Identificación de la posible función por comparación de las secuencias obtenidas con las de otros miembros del género Fijivirus.
- 3) Expresión de proteínas virales en un sistema bacteriano y obtención de anticuerpos policlonales para la caracterización posterior de las proteínas virales presentes en plantas de maíz infectadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material de partida

Se cuenta con parte de una genoteca de cDNA del MRCV, realizada en el vector de clonado pcDNA II (Invitrogen, EEUU) a partir de RNA viral de doble cadena purificado de raíces de maíz infectadas. La genoteca fue obtenida por el Dr. Luis Conci en el marco de una colaboración entre el Instituto de Biotecnología CICV, INTA- Castelar y el IFFIVE-INTA, Córdoba.

5.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se utilizaron dos cepas de la bacteria *Escherichia coli*: DH5 α y BL21.

Todos los cultivos fueron realizados en medio LB (medio de Luria-Delbrück) (triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 10g/l, pH: 7,5 con NaOH). En el caso de medio sólido se agregó agar (1.5g/100ml).

La temperatura de crecimiento fue de 37 °C y en los casos de cultivo líquido la agitación fue alrededor de 200 rpm. Los cultivos bacterianos se realizaron en tubos o erlenmeyers conteniendo un volumen de cultivo no mayor al 10% de su capacidad total.

En el caso de que las cepas bacterianas estuvieran transformadas con un vector plasmídico, se agregó el antibiótico de selección adecuado al medio de cultivo.

5.3. Preparación de DNA plasmídico para secuenciación y clonado

Para preparaciones de DNA plasmídico en pequeña escala, se partió de 1,5 ml de cultivo bacteriano saturado.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación en microcentrífuga a 6000 rpm.

Para obtener DNA plasmídico de alta calidad para secuenciación y clonado se utilizaron columnas de Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las especificaciones del fabricante.

5.4. Secuenciación de los segmentos virales clonados

Se secuenciaron varios clones de la biblioteca de cDNA del MRCV utilizando un kit de secuenciación comercial (Fentomol de Promega Biotech, EEUU) basado en el método de

Sanger (Sanger y col, 1977). Para la secuenciación se utilizaron los primers T7 (5'[d TAATACGACTCACTATAGGG]3') y Reverso (5'[CAGGAAACAGCTATGAC]3'), además de oligonucleótidos internos diseñados mediante la ayuda del programa OLIGO 2.1.

El DNA de los clones utilizados para la secuenciación se purificó mediante el uso de columnas de Qiaprep Spin Plasmid (Qiagen, Alemania) siguiendo las especificaciones de los fabricantes. Se cuantificó el DNA obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8% (TAE 1x, 5 V/cm, 2 hs) teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ 100ml) y visualizados con luz UV.

Reacción de secuenciación:

DNA	1.5	µg
Primer	25	ng
ATP S ³⁵	1.5	µl
Buffer (10x)	5	µl
H ₂ O	x	µl
	16	µl

ATP S³⁵ (1000-5000 Ci/mmol, 12,5 mCi/ml, New England Biolabs)

Se agregó 1 µl de Taq polimerasa (5 U/µl, Promega Biotech, EEUU), y se colocaron 4 µl de reacción a cada uno de cuatro tubos conteniendo 2 µl de cada ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Se agregó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación.

Las reacciones de secuencia se llevaron a cabo en un termociclador TC 480 (Perkin Elmer Cetus, EUA) usando el siguiente programa:

1 ciclo de:	35 ciclos de:	1 ciclo de:
94 °C 2 min.	94 °C 30 seg.	70 °C 10 min.
	52 °C 30 seg.	
	70 °C 1 min.	

Se agregaron 3 µl de buffer de siembra (0.25 % azul de bromo fenol, 0.25 % Xylene cyanol FF, 30% glicerol en H₂O) a cada tubo y se calentaron durante 10 min. a 70 °C.

Los productos de secuenciación se separaron en geles de acrilamida-bisacrilamida (28:1) 6% a 45 Volts entre 2 y 6 horas según se trate de corridas cortas, medias o largas. Los geles se fijaron con fijador (20 % etanol, 5 % ac. acético glacial) durante 20 min. y se secaron sobre papel Whatman 3MM durante 1 hora a 80 °C (secador de geles Bio-Rad, modelo 583).

Los geles se expusieron durante 48 horas a temperatura ambiente con placas autoradiográficas Kodak (Biomax). Las placas se revelaron dejando 3 min. en fijador (AGFA G334), 1 min. en H₂O, y 1 min. en revelador (AGFA G150).

5.5. Estudio de la organización genómica viral

Las secuencias obtenidas se ingresaron a la computadora y se analizaron con el programa DNAsis (Hitachi Software Engineering) y se identificaron los marcos abiertos de lectura (ORFs), los sitios de corte de enzimas de restricción y se dedujo la secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en las bases de datos EMBL, Genbank EBI Fasta Secuence Search (www.ebi.ac.uk/searches/searches.html).

Para la búsqueda de homología entre las secuencias obtenidas del MRCV y las secuencias de reovirus depositadas en los bancos de genes se usó el programa Lasergene navigator.

Los perfiles de plegamiento, hidrofilicidad y antigenicidad de las proteínas deducidas se analizaron mediante el programa Lasergene navigator (Edit sequences, Meg align, Protean) en una computadora Power MacIntosh.

5.6. Expresión de partes de proteínas del MRCV en bacterias

5.6.1. Vectores utilizados

pMAL-c2: vendido comercialmente por la empresa New England Biolabs (EEUU), contiene el promotor *ptac* inducible que transcribe el gen de fusión *malE-LacZα*; posee el gen *lacI* que codifica el represor *Lac* y mantiene inactiva la transcripción hasta el agregado del inductor IPTG (0.4 mM). El sitio de clonado múltiple permite clonar el gen de interés que queda fusionado con el extremo 3' del gen *malE*.

Este vector permite la expresión y la purificación de la proteína codificada por el gen clonado, como proteína de fusión con la MBP (proteína de unión a maltosa) codificada por el gen *malE*. Posee una delesión en el péptido señal del gen *malE* permitiendo la expresión citoplasmática de la proteína de fusión. Además codifica para una secuencia de cuatro aminoácidos que es reconocida por la proteasa específica Xa, que sirve para clivar la proteína de interés de la MBP.

pRSETa,b,c: contiene el promotor T7 inducible por IPTG (0,4 mM). Los plásmidos a, b y c permiten clonar el inserto de interés en los tres marcos de lectura posibles.

Este vector permite la expresión y purificación de la proteína codificada por el gen clonado, como proteína de fusión con una región de seis histidinas. Esta zona de seis histidinas es reconocida por anticuerpos comerciales de la empresa proveedora del sistema (Invitrogen).

5.6.2. Subclonado de los insertos de la biblioteca genómica en vectores de expresión

Los insertos secuenciados de los clones del MRCV se subclonaron en los vectores de expresión pMALc y/o pRSET a, b o c (según el marco de lectura deseado), usando las enzimas de restricción adecuadas. Para las digestiones del DNA plasmídico purificado por columnas de Qiagen, se utilizaron entre 3 y 5 U de enzima por μ g de DNA. Las digestiones se realizaron durante 3 hs a 37°C.

Reacción de restricción:

DNA	2 μ l
Buffer 2 (10x)	2 μ l
Enzima	3-5 U/ μ g
BSA (10x)	2 μ l
H ₂ O	csp 20 μ l

Después de la digestión de 3 hs, las enzimas se inactivaron durante 10 min. a 72 °C.

Para eliminar los fosfatos del extremo 5' y disminuir por lo tanto la cantidad de vector religado, se trató el DNA digerido de los distintos vectores con fosfatasa alcalina (Promega Biotach, EEUU) durante 2 hs a 37°C.

Reacción de CIP:

DNA	20 μ l
Buffer (10x)	5 μ l
Buffer de dilución (10x)	5 μ l
Fosfatasa alcalina	1 μ l
H ₂ O	csp 20 μ l

La enzima se inactivó a 75 °C durante 10 min. y se precipitó (0.3 M Ac Na, 2.5 vol de etanol 100%) durante toda la noche a -20°C. Luego se centrifugó a 13000 rpm durante 25 min. a 4

°C. El pellet se lavó con 200 µl de etanol al 70 %, centrifugando 10 min. a 13000 rpm, se secó y resuspendió en 15 µl de H₂O o TE.

Las restricciones de los insertos y las reacciones de CIP de los vectores de expresión se corrieron en geles de agarosa 0.8%. El DNA se observó al UV, y se cortaron los trozos de gel conteniendo las bandas correspondientes al inserto del MRCV y al vector de expresión linealizado.

Los distintos fragmentos a ligar se purificaron utilizando el kit comercial Gene Clean (Bio 101 INC, EEUU); se cuantificaron corriendolos en geles de agarosa 0,8% y comparándolos con cantidades conocidas de DNA. En general se obtuvo entre 20 y 100 ng/µl.

Se realizaron reacciones de ligación entre los insertos y los vectores de expresión a 16°C durante 16 horas, utilizando DNA ligasa del fago T4 (New England Biolabs). La relación inserto-vector fue aproximadamente de 3:1. Luego de la ligación se transformaron células competentes de la cepa *E. coli* DH5α.

5.6.3 Preparación de bacterias *E.coli* competentes

Se inoculó 5 ml de medio LB de cultivo con una colonia aislada de la bacteria *E.coli* cepa DH5α o BL21, y se permitió que llegue a saturación mediante agitación a 37°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se diluyó este cultivo 1/100 en medio LB (1 ml en 100ml de LB) y se colocó a 37°C con agitación (alrededor de 200 rpm) hasta que la DO₆₀₀ del cultivo llegó a 0,48.

Se enfrió 5 min en hielo y se centrifugó a 4000 rpm, a 4°C. El precipitado se resuspendió en el 40% del volumen inicial con la solución TFB I fría (AcK 0,5 M, KCl 1 M, CaCl₂ 0,5 M, MnCl₂ 0,5 M, pH 5,8 con ac. acético 0,2 M) y se dejó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. a 4°C. El pellet se resuspendió en 4 ml de TFB II frío (MOPS o PIPES 0,1 M, CaCl₂ 0,5 mM, KCl 0,1 M, glicerol 15%, pH 6,5 con KOH) y se dejó durante 15 min. en hielo.

Las células competentes se dividieron en alícuotas de 250 µl en tubos Eppendorf, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a - 70 °C.

5.6.4 Transformación de bacterias *E.coli* competentes

Se mezcló en un tubo Eppendorf 2 µl de reacción de ligación o 1 µl de una dilución 1/100 de DNA plasmídico obtenido de una minipreparación (según sea el caso) con 50 µl de células

bacterianas competentes (DH5 α o BL21) descongeladas en hielo, se homogeneizó suavemente y se dejó 30 min. en hielo. Se colocó el tubo en un baño de agua a 42 °C durante 1 min. 30 seg. y luego se enfrió en hielo durante 2 min. Se agregaron 250 μ l de medio LB sin antibiótico y se incubó en cámara de 37 °C con agitación suave durante 30 min. Se centrifugó durante 1 min. en microcentrífuga a 6000 rpm, se descartó el sobrenadante.

Luego se resuspendieron las células en 50 μ l de LB, se rastillaron en una placa de Petri conteniendo el medio selectivo LB-Ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó durante 16 hs en cámara de 37 °C.

5.6.5. Preparación de DNA plasmídico para confirmar clonados (minipreparación)

Para preparaciones de DNA plasmídico en pequeña escala, se inoculó una colonia en 1,5 ml de medio LB/antibiótico (ampicilina: 100 μ g/ml) y se creció toda la noche en cámara de 37 °C con agitación. Las bacterias se cosecharon por centrifugación en microcentrífuga a 6000 rpm y se resuspendió el pellet en 100 μ l de solución I (TEG: glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8). Se agregaron 200 μ l de solución II (NaOH 0,2M, SDS 1%) para la lisis celular. Se mezcló suavemente por inversión y se dejó 5 min. en hielo. Luego se agregaron 150 μ l de solución III (AcK 3 M frío), se mezcló por inversión y se dejó en hielo 5 min. Se centrifugó en microcentrífuga a 14000 rpm durante 20 min. a 4°C. Se transfirió el sobrenadante obtenido a un nuevo tubo (aproximadamente 450 μ l) y se realizó una extracción con un volumen de fenol-cloroformo (1:1v/v). Se centrifugó 10 min. a 12000 rpm a temperatura ambiente. Se colectó la fase acuosa y se realizó una extracción con cloroformo-octanol (24:1) saturado en H₂O; se centrifugó durante 5 min. a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregaron 2.5 volúmenes de Etanol absoluto frío (aproximadamente 1.1 ml). Se dejó una hora a -20 °C para precipitar el DNA plasmídico. Se centrifugó a 13000 rpm durante 25 min. a 4 °C. Se lavó el precipitado con 200 μ l de etanol 70%, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. a 4 °C. Se secó el precipitado durante 5 min. en evaporador (Savant, EEUU) y se resuspendió en 30 μ l de H₂O ó de TE (HClTris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

5.6.6. Confirmación de los clones recombinantes

Para confirmar la obtención de clones recombinantes, se extrajo DNA plasmídico de varios clones según el protocolo descripto (5.6.5) y se digirió con las enzimas de restricción adecuadas (3 U/μg) durante dos horas a 37 °C. Se utilizaron 0.2 μl de RNAsa (stock 10 g/ml) en la mezcla de reacción.

Los fragmentos se separaron en geles de agarosa 0.8% - TAE 1x a 100 Volts.

Las construcciones obtenidas se secuenciaron para confirmar que no se modificó el ORF durante el clonado.

5.6.7. Expresión en bacterias de las proteínas de fusión

Con las construcciones obtenidas en el vector pMALc se transformaron células competentes de *E.coli* cepa DH5α y con las construcciones en el vector pRSET células competentes de *E.coli* cepa BL21. Las proteínas de fusión resultantes de ambos sistemas (pMALc y pRSET) quedaron bajo el control de un promotor inducible por IPTG. Para obtener las proteínas de fusión, se partió de un cultivo saturado; se hizo una dilución de 1/100 (7 ml finales) y cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,6 se realizó la inducción con 0.4mM de IPTG durante 2 horas. Se dejó una parte del cultivo sin inducción creciendo durante dos horas.

Luego de la inducción se centrifugó durante 10 min. a 5000 rpm. Se resuspendió el pellet en 150 μl de H₂O. Se extrajeron las proteínas con un buffer de extracción (SDS 4%, 30% glicerol, 125 mM TrisHCl pH 6.7, 0.002% de azul de bromo fenol; antes de usar se agrega 2% de β-mercaptoetanol). Se calentaron las proteínas a 100 °C durante 3 min. y por último se sonicaron durante 15 seg. en sonicador (Branson, modelo 250/450).

Para analizar las proteínas se utilizaron geles de Acrilamida-Bisacrilamida (30:0.8) entre 8 y 12 % en SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Los geles se corrieron durante la noche a 12 mA o durante el día a 120 volts.

La tinción de las proteínas se realizó con Coomassie Blue (0.5% Coomassie Blue, 10% ac. acético y 30% etanol) durante 15 min., luego se destiñó (10% ac. acético y 30% etanol) durante 1 h. Los geles se secaron durante dos horas a 80 °C sobre papel Whatman 3MM en secadoras Bio-Rad (modelo 543).

5.7. Análisis de las proteínas de fusión por Western blot

Las proteínas de fusión obtenidas se analizaron mediante la técnica de Western blot (Maniatis y col. 1982). Para ello, se separaron extractos proteicos totales por SDS-PAGE 8 a 12%; las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (MSI: EP4HY00010) durante 75 min. a 0.20 mA a 4 °C (buffer de transferencia: 39 mM glicina, 48 mM Trizma base, 20% etanol).

Las membranas se bloquearon con una solución de TBS-leche descremada 5% (1 M Tris pH:8, 5 M Na Cl) durante una hora con agitación suave. Se descartó la solución bloqueante y se agregó el primer anticuerpo en la dilución adecuada en PBS-leche 5% (anticuerpos comerciales anti-MBP y anti-His de Invitrogen) durante 90 min. con agitación suave. Luego se realizaron tres lavados con TBS-Tween 20 (0,05 % v/v) de 10 min. cada uno. Se agregó el segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina en la dilución adecuada con PBS-leche 5% (anticuerpos comerciales anti-conejo y anti-ratón de Promega) durante 90 min. con agitación suave. Luego se realizaron dos lavados con TBS y se equilibró la membrana con buffer fosfatasa (100 mM Tris-HCl pH: 9,5, 100 mM NaCL pH: 8,8, 5 mM Mg CL₂). Para revelar la reacción se agregaron en 10 ml de buffer fosfatasa 33 µl de BCIP y 44 µl de NBT y se dejó hasta la aparición del precipitado.

5.8. Purificación de las proteínas de fusión

Las proteínas de fusión obtenidas de las construcciones en el vector pMALc se purificaron utilizando columnas con una resina de agarosa derivatizada con amilosa (un polisacárido consistente en subunidades de maltosa). La proteína de fusión se unió a la columna debido a la afinidad de la MBP por la amilosa; el resto de las proteínas del extracto celular se lavaron de la columna con buffer (20 mM TrisHCl pH: 7,4, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA). Luego la proteína se eluyó con maltosa libre (10mM) colectándose fracciones de 0,5 ml cada una (Current Protocols in Molecular Biology, 1997).

5.9. Corte de las proteínas de fusión con el factor Xa

Se trató la fracción que contenía mayoritariamente la proteína de fusión con el Factor Xa. Esta proteasa corta la proteína de fusión en el sitio de unión entre la MBP y la proteína derivada del inserto. Se cortaron 20 µl de la fracción con 1µl del Factor Xa (200 µg/ml, New England

Biolabs), durante una noche a temperatura ambiente (Current Protocols in Molecular Biology, 1997).

Los péptidos resultantes se separaron mediante la técnica de SDS-PAGE en geles 15%. Se electrotransfirieron a una membrana de Nitrocelulosa durante 75 min. a 0,20 mA.

5.10. Obtención de antisueros

Las proteínas de fusión resultantes, se separaron mediante la técnica de SDS-PAGE en geles 8% y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 75 min. a 0,20 mA. Las proteínas electrotransferidas fueron teñidas con rojo punzó. En el caso que la proteína deseada sea mayoritaria, se corta la parte de la membrana que contiene la banda de interés (fácilmente identificable por estar teñida fuertemente de rojo). En el caso que la proteína de fusión no sea mayoritaria, luego de la electrotransferencia se corta una porción de la membrana y se hace un ensayo previo de Western blot con anticuerpos comerciales específicos para localizar la proteína de fusión (MBP-X y HIS-X). Una vez localizada, se corta la región de la membrana que contiene la proteína de interés. Se disuelve la nitrocelulosa con 400 µl de DMSO y se mezcla en partes iguales con adyuvante incompleto de Freund. Para que se forme una buena emulsión se agregó la disolución de la membrana-DMSO de a gotas en el adyuvante y se mezcló con vortex.

Las proteínas se inyectaron en conejos. El esquema de inmunización consistió en una primera dosis de la proteína de fusión MBP- inserto 26d del MRCV o MBP- inserto 2d del MRCV, con aplicaciones subcutáneas en al menos cuatro zonas del lomo e inyecciones intramusculares en las patas traseras; con la misma proteína de fusión y de igual forma se realizaron refuerzos (“boosters”) a los 15, 30, 45, 60 y 75 días. Los “boosters” de los días 105, 120 y 135 se realizaron con la proteína de fusión His-26d (el mismo inserto del MRCV pero esta vez clonado en el vector pRSET en vez de pMALc).

A otro conejo se le aplicó directamente la proteína de fusión His-inserto 8c del MRCV en la primera dosis. El esquema de inmunización consistió en aplicaciones subcutáneas en al menos cuatro zonas del lomo e inyecciones intramusculares en las patas traseras; con la misma proteína de fusión y de igual forma se realizaron refuerzos (“boosters”) a los 15, 30, 45, 60, 75, 105, 120 y 135 días.

Se tomaron muestras de 20 ml de sangre mediante punción cardíaca; una previa a la primera inmunización (suero preinmune), otra a los 30 días (primer sangrado) a los 60 días (segundo

sangrado), a los 90 días (tercer sangrado), a los 135 días (cuarto sangrado), a los 165 días (quinto sangrado) y a los 180 días (sexto sangrado) después de la primera inmunización.

Las muestras de sangre se colocaron una hora a 37°C, luego se dejaron a 4°C durante una noche para que se forme el coágulo de sangre. Por último se centrifugó a 2000 rpm, durante 20 minutos a 4°C para separar el suero.

5.11. Preabsorción de los sueros con proteínas DH5α

Los sueros obtenidos en los distintos sangrados se preabsorbieron con una preparación de proteínas DH5α. Para ello se mezclaron 4.5 ml de TBS con 0.5 ml de extracto proteico de DH5α y se agregó una cantidad de suero tal para obtener la dilución deseada del mismo. Se dejó durante toda la noche a 4°C con agitación suave y luego se colocó 30 min. a 37 °C con agitación. Por último se agregaron 5 ml de TBS-leche 10%

5.11.1. Preparación de extracto proteico de *E.coli* cepa DH5α

Para la preparación del extracto proteico se inoculó una colonia de la bacteria *E.coli* DH5 en 3 ml de medio LB de cultivo y se creció durante todo el día a 37 °C con agitación. Luego se agregaron los 3 ml a 1 l de medio LB de cultivo y se creció durante toda la noche a 37 °C con agitación. Se centrifugó durante 20 min. a 4000 rpm y se resuspendió el pellet en 0,1 % de SDS. Se alicuotó en fracciones de 500 µl y se calentaron a 100 °C durante 30 min. Las alicuotas se guardaron a -20 °C.

Para la preparación del extracto proteico contenido la proteína MBP, se inoculó una colonia de la bacteria *E.coli* DH5 transformada con el vector pMALc en 4 ml de medio LB de cultivo con ampicilina (100 µg/ml) y se creció durante toda la noche a 37 °C con agitación. Luego se hizo una dilución 1:50 en medio LB de cultivo con ampicilina y se creció a 37 °C con agitación hasta una DO₆₀₀ de 0,6 y se indujo la expresión de la proteína de fusión mediante el agregado de 0.3 mM de IPTG y de incubó durante 3 horas a 37 °C. Se centrifugó durante 20 min. a 4000 rpm y el pellet se resuspendió en 0.1% de SDS. Se alicuotó en fracciones de 500 µl y se calentaron a 100 °C durante 30 min. Las alicuotas se guardaron a -20 °C.

5.12. “Dot blot”

Los ensayos de “Dot blot” se realizaron en membranas de nitrocelulosa en el caso de muestras de la partícula viral del MRCV.

6. RESULTADOS

6.1. Secuenciación de clones de una biblioteca de cDNA del MRCV

Se cuenta con parte de una genoteca de cDNA del MRCV, realizada en el vector de clonado pcDNA II (Invitrogen, EEUU) a partir de RNA viral de doble cadena purificado de raíces de maíz infectadas. La genoteca fue obtenida por el Dr. Luis Conci en el marco de una colaboración entre el Instituto de Biotecnología CICV, INTA-Castelar y el IFFIVE-INTA, Córdoba.

Por ensayos de hibridación molecular se sabía que los clones 2d y 26d pertenecen al segmento genómico 4 (S4) del MRCV y que los clones 8c y 92d pertenecen al segmento genómico 1 (S1) del MRCV (Conci, 1997).

Con el objetivo de obtener información sobre los segmentos genómicos del MRCV se secuenciaron los clones 2d, 26d, 8c y 92d de la genoteca de cDNA, mediante el método de Sanger.

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa DNAsis, se identificaron los marcos abiertos de lectura (ORFs), la superposición existente entre los distintos clones y se dedujo la secuencia proteica codificada en los segmentos secuenciados.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en las bases de datos EMBL, Genbank (EBI Fasta Secuence Search).

6.1.1. Análisis de los clones 2d y 26d

Cuando se analizó la secuencia de los clones 2d (inserto de 474 pb) y 26d (inserto de 387 pb), se observó que el extremo 5' del clon 2d se superponía con el extremo 3' del clon 26d en 192 pb. La superposición de ambos clones determinó una secuencia final de 669 pb (de aquí en más llamada 2d+26d).

Las secuencias mostraron 4 diferencias en el área de superposición entre ambos clones, donde en todos los casos una T en el clon 26d fue sustituida por una C en el clon 2d. Ninguna de las cuatro sustituciones representó un cambio en la secuencia de aminoácidos.

Cuando se dedujo la secuencia de aminoácidos se encontró un marco abierto de lectura (ORF) en el tercer marco de lectura posible, sin codones de terminación, codificando teóricamente una proteína de 222 aminoácidos (Figura 12).

```
5' SSYYKQMLNLKTKENVIFLDTYNEVKYAMNYLSKFNKILYTNGSGRKFKVKLPSFGTLGFTFDKVRVI
KNIGNDLQYWTLWPLNNEFIQYDINRPNHANILRNLNQFTNELVSIHYYPTFFYEHYLYFESVSQLI
LHQIYNVVVRTYRAQLKLQDNLGTNRLERRGYYLTVYSPFYELFMSEVKQEFGDIYLYXQLFGSLPFD
SGSIESIPTSYQEFDSYYQSR 3'
```

Figura 12: Secuencia de aminoácidos derivada de los clones 2d + 26d del MRCV.

Se comparó la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos obtenida con las secuencias depositadas en la base de datos EBI Fasta Secuence Search por Internet, encontrándose homología con el segmento 3 (S3) del RBSDV.

La secuencia del S3 del RBSDV depositada en la base de datos no corresponde al segmento completo; están depositadas 939 pb.

Se obtuvo la secuencia depositada del S3 del RBSDV y utilizando el programa Meg Aling e información correspondiente a las secuencias de otros *Fijivirus*, se analizó la homología de la secuencia nucleotídica del MRCV con la secuencia del RBSDV. De la misma forma se analizó la homología de la secuencia proteica codificada por el segmento secuenciado.

Se observó que los clones 2d + 26d presentan una homología del 71% a nivel de nucleótidos y del 74,1% a nivel de aminoácidos con el gen que codifica para la proteína mayoritaria de cápside del virus RBSDV, (Rice Black Streaked Dwarf Virus, miembro del género *Fijivirus* al igual que el MRCV). En la Figura 13 se comparan las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas homólogas.

La misma región presenta una homología del 32,4% con la proteína codificada por el segmento 4 (S4) del NLRV. A su vez la homología de la proteína codificada por el S4 del NLRV y el S3 del RBSDV fue del 33,9%.

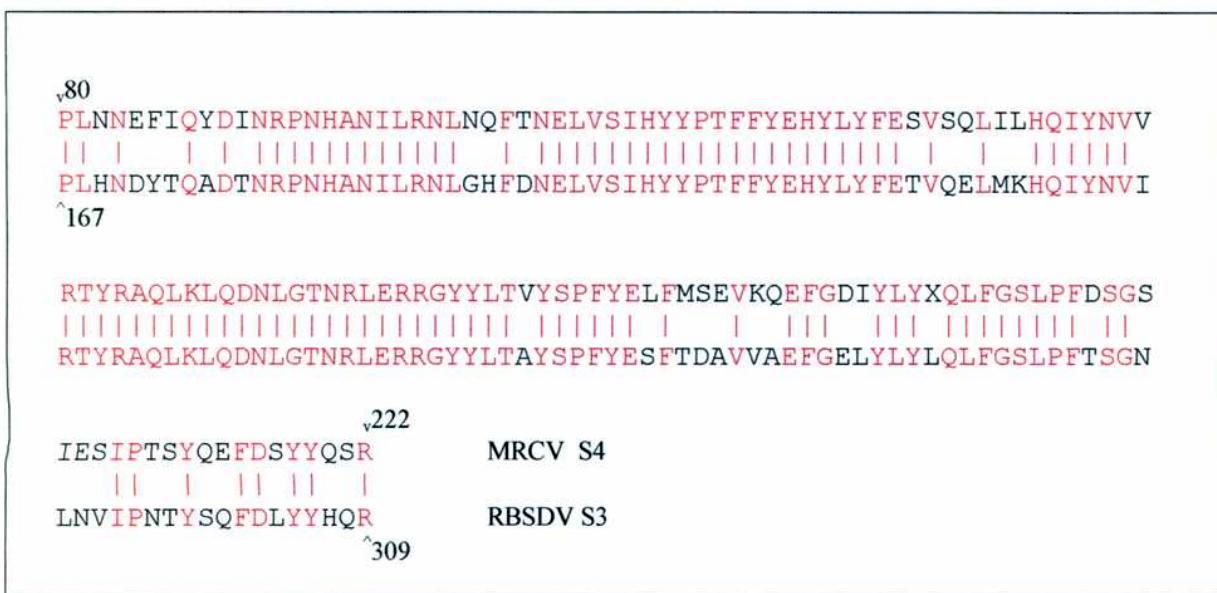


Figura 13: Comparación de la secuencia de aminoácidos de parte del gen de cápside del MRCV (S4) con parte del gen de cápside del RBSDV (S3).

Teniendo en cuenta las relaciones de migración de los diferentes segmentos genómicos del MRCV con respecto a los segmentos genómicos de dsRNA del RDV, que pertenece al género *Phytoreovirus* y cuyo tamaño es conocido, se ha determinado que el S4 del MRCV tiene aproximadamente 3400 pb (Conci, 1997). Por lo tanto el fragmento de 669 pb secuenciado representa el 20% del mismo.

Utilizando el programa Protean, que permite analizar y predecir características de una proteína a partir de los datos de la secuencia primaria, se obtuvo un gráfico de perfiles de plegamiento, hidrofilicidad, e índice antigenico de parte de la proteína de cápside del MRCV. En las figuras 14 y 15 se grafican los clones 2d y 26d por separado.

El programa analiza la hidrofilicidad de las proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos, asignándole un valor a cada aminoácido y luego haciendo un promedio por zonas. Por otro lado también predice las zonas que potencialmente podrían ser determinantes antigenicos, pudiendo o no ser determinantes inmunogénicos.

La parte de la proteína de cápside del MRCV deducida de la región secuenciada es teóricamente una proteína altamente hidrofílica y con un alto índice de antigenicidad. Estos datos permitirían especular que la secuencia de la proteína 26d y 2d será potencialmente adecuada para la obtención de anticuerpos.

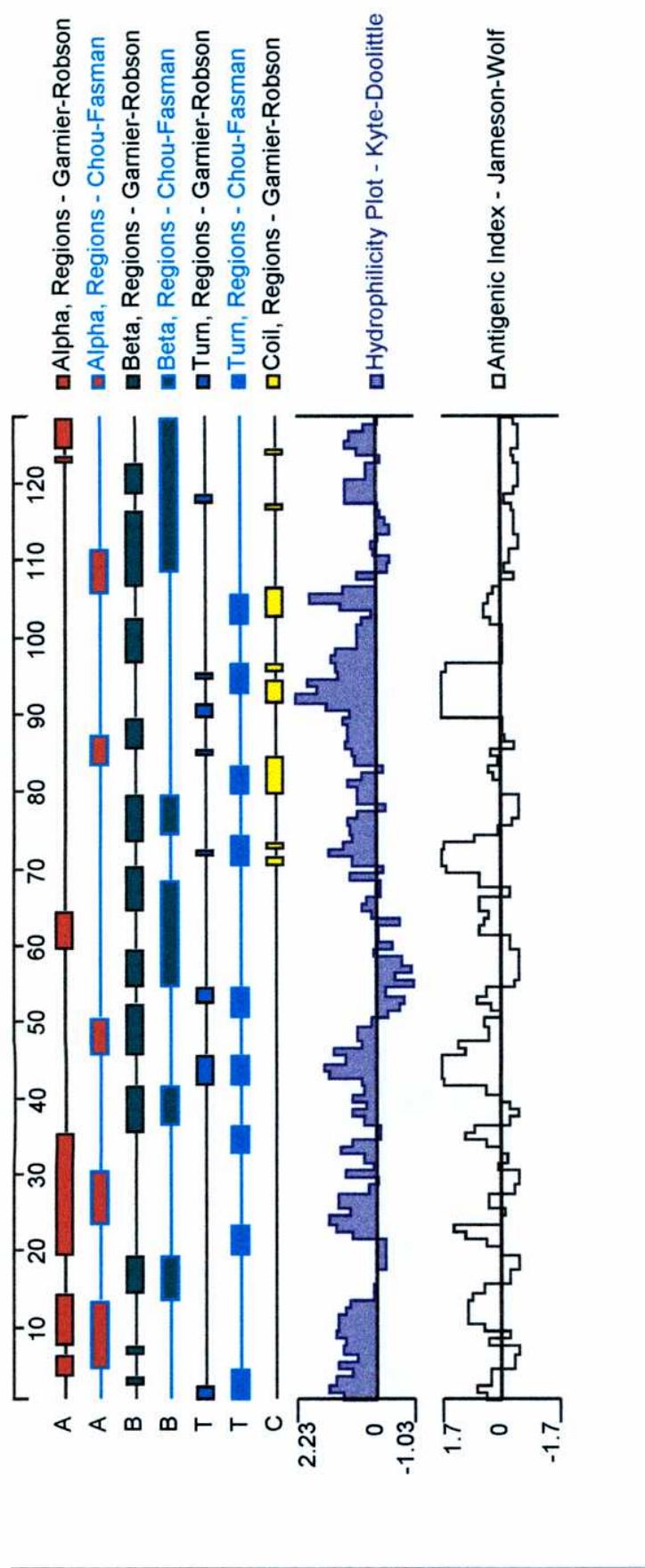


Figura 14: Gráfico de plegamientos, hidrofильidad, e índice antígenico de parte de la proteína de cápside del MRCV. Se grafica la proteína codificada en el clon 26d.

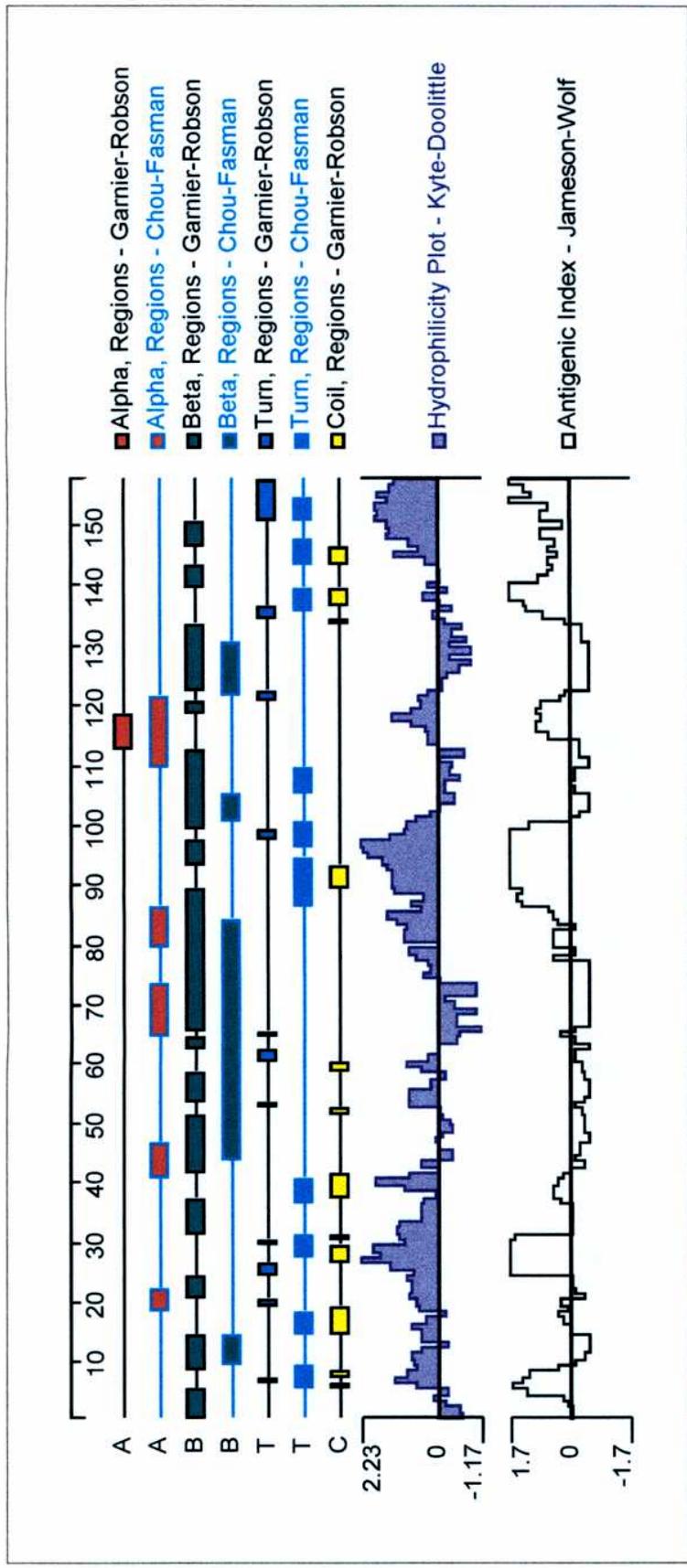


Figura 15: Gráfico de plegamientos, hidrofilicidad, e índice antigenico de parte de la proteína de cápside del MRCV. Se grafica la proteína codificada en el clon 2d.

6.1.2. Análisis de los clones 92d y 8c

Cuando se analizó la secuencia del clon 92d (inserto de 727 pb), se observó que el extremo 3' del mismo se superponía con el extremo 5' del clon 8c (inserto de 834 pb) en 284 pb. La superposición de ambos clones determinó una secuencia total de 992 pb. Cuando se dedujo la secuencia de aminoácidos se encontró ORF en el tercer marco de lectura posible, sin codones de terminación, codificando teóricamente una proteína de 330 aminoácidos (Figura 16).

```

5' SIPLINDWTKVPILNEMSELF DYNWKSDLIKEFESIDDFEKRFVTFLTNKSGGQKSDEPTLSKEL
KGISNARVIAFALNRNDYHDESKFLKMLMTYGKCAIRFQIDRRARVIVIVPNAIQSSELFLLGF
NSLKKDKKHNSKIAVGKQIGNLLDARLQMSTTGDVSSIKNSGDMKGMDAHTIPNLTLFLRNKMIE
VLYELDPSKKCTRYFFSEDKDYILKEHDKEFEMYTRKLRGVVIAAKCLYYMFSMNMFLDDHFF
ADSLTVSDQTFQSGFFATSAQHTLFLNLFLNLERKFFASQDNKMISVMHSVMGDDVLEVIKNGV
KFPDIVRKWLLLKQDLTKLNYYEEELSLSRIFGVFLQQAAILGVYVPPYPSRMSLFCDERSDTTKR
HVLDMMKIVMDVISAKSQRSYGIDNGLGIGYAIW 3'

```

Figura 16: Secuencia de aminoácidos derivada de los clones 92d + 8c del MRCV.

De la misma manera ya descripta, se comparó la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos obtenida con las secuencias depositadas en las bases de datos EMBL, Genbank (EBI Fasta Secuence Search) encontrándose homología con el S1 del NLRV. La secuencia del S1 del NLRV depositada en la base de datos corresponde al segmento completo que tiene 4391 nt. y codifica para una proteína de 1442 aminoácidos (165,9 kDa).

Se obtuvo la secuencia completa depositada del S1 del NLRV y utilizando el programa Meg Aling e información correspondiente a las secuencias de otros *Fijivirus*, se analizó la homología de la secuencia nucleotídica del MRCV con la secuencia del NLRV. De la misma forma se analizó la homología de ambas secuencias proteicas.

Se observó que los clones 92d y 8c presentan una homología del 42% a nivel de nucleótidos y del 43,4% a nivel de aminoácidos con el gen que codifica para la proteína RNA polimerasa RNA dependiente del Nilaparvata Lugens (NLPV). Este gen se encuentra ubicado en el S1 del NLRV. En la Figura 17 se comparan las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas homólogas.

Figura 17: Comparación de la secuencia de aminoácidos de parte del gen de la RNA polimerasa del MRCV con parte del gen de la RNA polimerasa de NLPV, ambas codificadas en el S1. Se subraya el motivo GDD.

En la secuencia obtenida se observa el motivo GDD, que fue descripto como zona fundamental para la actividad RNA polimerasa RNA dependiente (“core”) (Suzuki y col. 1992b) (Figura 17)

Diferentes autores han descripto en diferentes tipos de virus secuencias consensos para las RNA polimerasas RNA dependientes que están fuertemente conservadas en reovirus (Nakashima, 1996).

En la secuencia proteica derivada de los clones 92+8 también conservados los motivos I, IV, V y VI definidos por Koonin y col. (1992), los motivos A, B y C definidos por Poch y col. (1989) y los motivos 1, 2 y 3 definidos por Bruenn y col. (1991) también parecen estar bien conservados. En la Figura 18 se muestra el alineamiento de aminoácidos de la RNA polimerasa RNA dependiente codificada por el S1 del MRCV con las secuencias de virus relacionados como el NLRV (Nakashima y col., 1996), el RDV (Suzuki y col., 1992b), el Rotavirus SA11 (Mitchell y Both, 1990), el Reovirus serotipo 3 (Weiner y Joklik, 1989) y BTV-10 (Roy y col., 1988), donde se muestran las áreas conservadas descriptas por los distintos autores.

			A	B	C
(i)	-				
(ii)	-	1		2	3
(iii)	I	IV		V	VI
		(*) * *	* * *	** * *	* ***
MRCV		IDRRARVI 60	DMKGMDAH 92	SGFFATSAQHTLFL 23	HSVMGDDVL
NLRV	(646)	IDRRGRII 60	DMSGMDAH 90	SGLFATSGQHTMFL 21	NYVMGDDIF
RDV	(643)	AWRPVRPI 73	DCSSWDQT 76	SGRLDTFFMNSVQN 22	FQVAGDDAI
Rotavirus SA11(455)		PGRRTRII 57	DVSQWDSS 63	SGEKQTKAANSIAN 21	IRVDGDDNY
Reovirus tipo3 (521)		VQRRPRSI 56	DISACDAS 89	SGSTATSTEHTANN 33	YVCQGDDGL
BTV-10	(515)	PIKATRTI 72	DYSEYDTH 119	SGENSTLIANSMHN 23	EQYVGDDTL

Figura 18: Aminoácidos conservados en las RNA polimerasas RNA dependientes de diferentes Reovirus. Motivos conservados presentados por: (i) Poch y col. (1989), (ii) Bruenn (1991) y (iii) Koonin (1992). Con * se indican los aminoácidos altamente conservados y con (*) aminoácidos usualmente conservados. Se destaca el motivo GDD. Los números al comienzo de cada secuencia determinan la posición en donde se encuentran cada una de las áreas de comparación dentro de la secuencia completa. Los números entre cada grupo de motivos indican el espacio que existe entre ellos.

Teniendo en cuenta las relaciones de migración de los diferentes segmentos genómicos del MRCV con respecto a los segmentos genómicos de dsRNA del RDV, que pertenece al género *Phytoreovirus* y cuyo tamaño es conocido, se ha determinado que el S1 del MRCV tiene aproximadamente 4200 pb (Conci, 1997). Por lo tanto el fragmento de 992 pb secuenciado representa el 20,63% del mismo.

Utilizando el programa Proteam, que permite analizar y predecir características de una proteína a partir de los datos de la secuencia primaria, se obtuvo un gráfico de perfiles de plegamiento, hidrofilicidad, e índice antigenico de parte de la proteína RNA polimerasa RNA dependiente del MRCV. En la figura 19 se grafica el clon 8c.

Estos datos permitirían especular que la proteína codificada por el clon 8c será teóricamente adecuada para la obtención de anticuerpos.

6.2 Expresión de parte de proteínas del MRCV en bacterias

6.2.1 Obtención de proteínas de fusión en el sistema de expresión pMALc

Con el objetivo de expresar parte del gen de cápside del MRCV en bacterias, se subclonaron los insertos de los clones 2d y 26d, por separado, en el vector de expresión pMALc.

DNA de los clones 2d y 26d se digirieron con las enzimas de restricción *Xba* I y *Hind* III. Los cortes producidos liberaron los insertos de los clones 2d y 26d de aproximadamente 514 pb y 427 pb respectivamente (474 pb del inserto 2d y 40 pb del sitio de clonado múltiple; 387 pb del inserto 26d y 40 pb del sitio de clonado múltiple). Estos fragmentos fueron eluidos de un gel de agarosa y clonados en el vector de expresión pMALc, que previamente había sido digerido con las enzimas *Xba* I y *Hind* III y tratado con fosfatasa alcalina para eliminar los fosfatos del extremo 5' y disminuir, por lo tanto, la cantidad de vector religado que daría lugar a falsos positivos. Las secuencias de interés quedaron clonadas en el extremo 3' del gen Mal E que codifica para la proteína de pegado a maltosa (MBP).

Luego de realizar las reacciones de ligación, se transformaron bacterias DH5 α

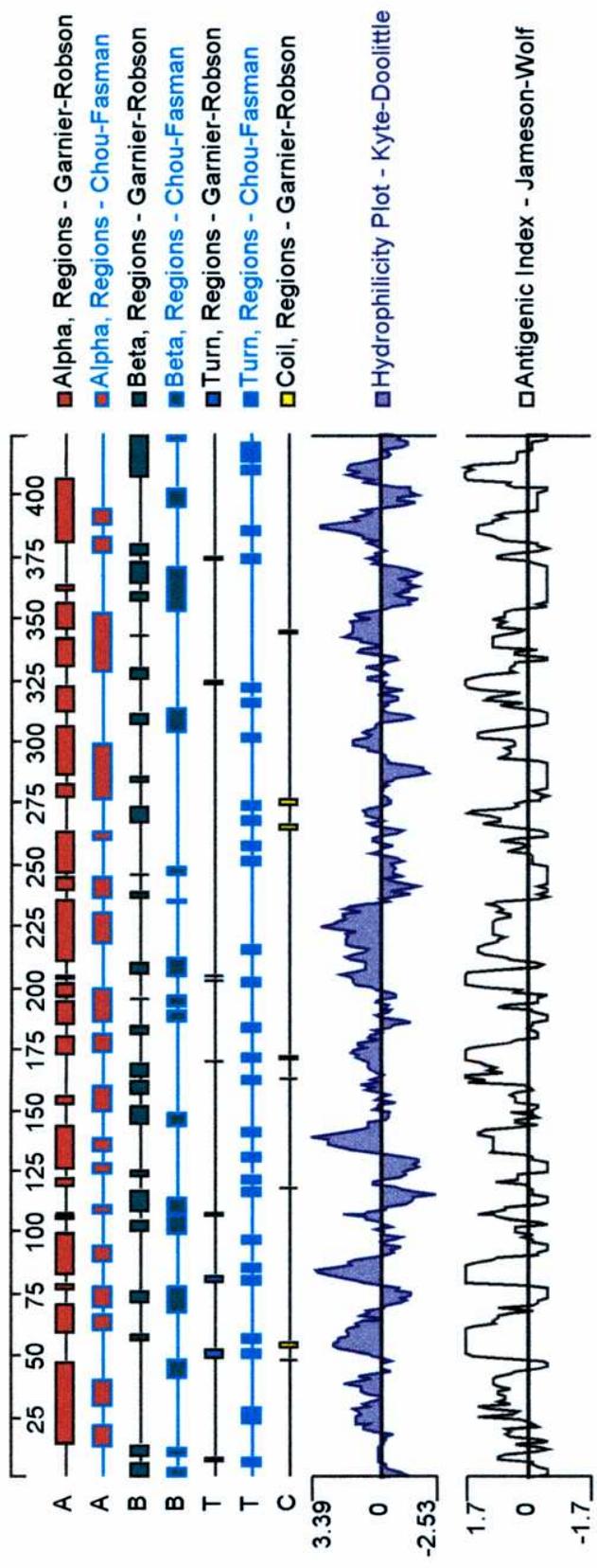


Figura 19: Gráfico de plegamientos, hidrofilicidad, e índice antígenico de parte de la RNA polimerasa del MRCV. Se grafica la proteína codificada por los clones 92d+8c.

competentes y se crecieron en medio de cultivo LB-agar, con ampicilina como agente de selección.

Para detectar qué colonias contenían plásmidos recombinantes se extrajo DNA plasmídico de varias colonias crecidas en el medio de selección y se digirió con las enzimas de restricción

Xba I y *Hind* III, observándose la liberación de un inserto del tamaño esperado.

Los clones recombinantes se secuenciaron con oligonucleótidos internos diseñados para la secuenciación, para comprobar que no se produjeron cambios en el marco abierto de lectura durante el subclonado.

Para obtener las proteínas de fusión se realizó la inducción de la transcripción del gen que codifica para la proteína de fusión MBP-26d ó MBP-2d mediante el agregado de 0.4 mM de IPTG al cultivo bacteriano. Luego de la inducción se deberían obtener proteínas de fusión entre la proteína de unión de maltosa (MBP) de 390 aminoácidos (46.8 KDa) con la proteína codificada por el inserto 26d ó por el inserto 2d.

A las proteínas de fusión se las nombró MBP-X, siendo X el nombre del clon de la genoteca de donde proviene el inserto que codifica para una parte de una proteína del MRCV.

Se extrajeron las proteínas bacterianas totales, se separaron mediante SDS-PAGE 8% y se tiñeron con Coomassie blue.

La Figura 20 muestra las proteínas totales de bacterias transformadas con la construcción pMAL-2d (calles 1 y 2), con la construcción pMAL-26d (calles 3 y 4), con el vector pMALc (calles 5 y 6) y sin transformar (calles 7 y 8). La expresión de estas proteínas fue inducida (calles pares) o no inducida (calles impares) con IPTG. Se señalan las proteínas de fusión MBP-2d y MBP-26d y a modo de comparación la proteína MBP.

La proteína de fusión MBP-2d tiene un peso molecular teórico de 65.64 KDa, la proteína MBP-26 tiene un peso molecular teórico de 62.19 KDa, y la proteína MBP un peso molecular de 46.8 KDa. Como se observa en la figura, los niveles de expresión de las proteínas de fusión fueron muy altos, alcanzando aproximadamente a un 35-45% de las proteínas bacterianas totales y muestran un patrón de migración acorde con los

tamaños teóricos esperados. Además se observa que el control de la expresión por parte del promotor *ptac*, fue muy eficiente ya que no hay expresión detectable por tinción de azul de coomasie cuando no se induce la transcripción a partir de este promotor con IPTG.

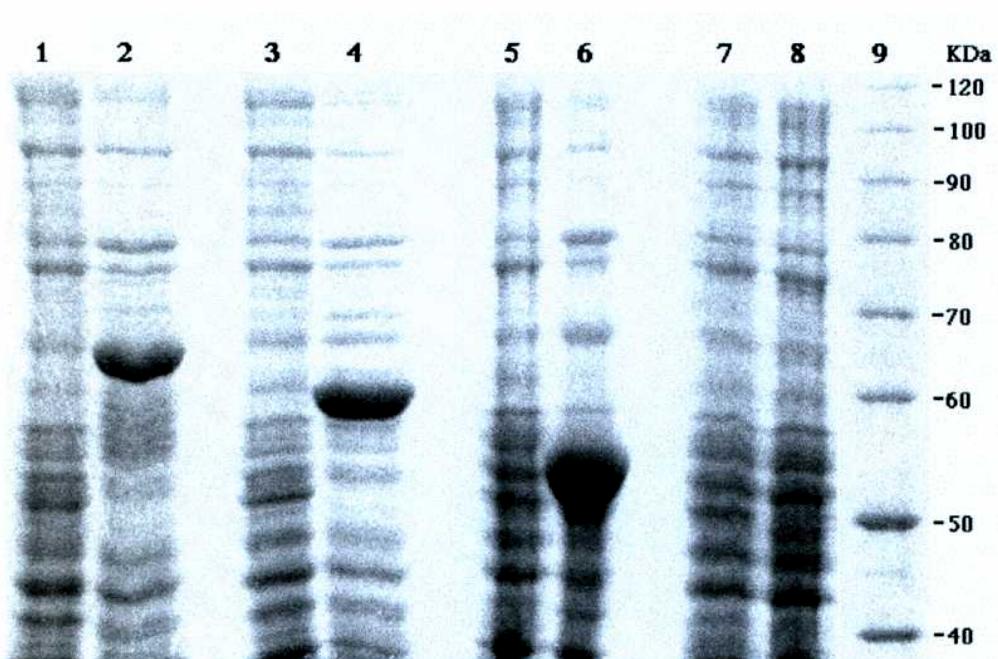


Figura 20: SDS-PAGE 8% de extractos proteicos totales, teñido con Coomassie blue. Se observa la proteína MBP (calle 6), las proteínas de fusión MBP-26 (calle 4) y MBP-2 (calle 2), y extractos proteicos sin transformar (calles 7 y 8). Cultivo no inducido con IPTG (calles impares); Cultivo inducido con 0.4 mM de IPTG durante 2 hs (Calles pares). A la derecha se indica la migración de un marcador de peso molecular.

Para confirmar que las proteínas observadas son efectivamente las proteínas de fusión, se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo comercial obtenido en conejo contra la región MBP de la proteína de fusión, y un suero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo (Figura 21).

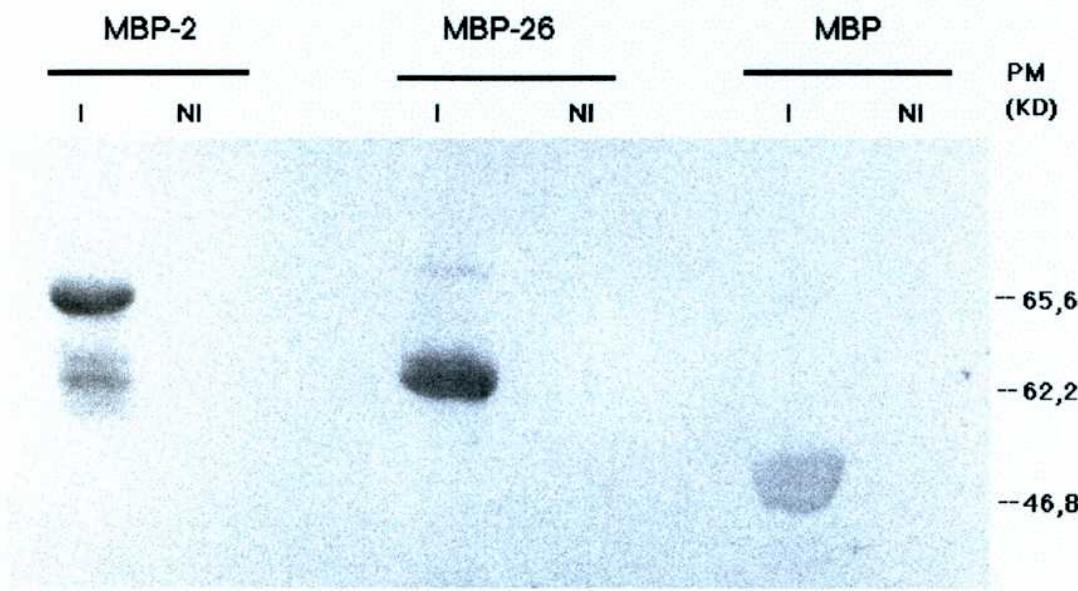


Figura 21: Detección por Western blot de las proteínas de fusión. Se revelan las proteínas MBP-2d, MBP-26d y MBP, con un antisuero comercial anti-MBP (dilución 1/2500), usando como anticuerpo secundario un suero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1/7500).

6.2.2 Obtención de proteínas de fusión en el sistema de expresión pRSET

Con el objetivo de expresar parte del gen de la RNA polimerasa RNA dependiente del MRCV en bacterias, se subclonó el inserto del clon 8c en el vector de expresión pRSETb.

Cabe destacar que el clon 8c contiene la secuencia que codifica para el motivo GDD típico de las RNA polimerasas RNA dependientes de Reovirus.

DNA del clon 8c se digirió con las enzimas de restricción *Xho* I y *Hind* III. Los cortes producidos liberaron el inserto del clon 8c de aproximadamente 906 pb (834 pb del inserto 8c y 72 pb del sitio múltiple de clonado). Este fragmento fue eluido de un gel de agarosa y clonado en el vector de expresión pRSETb, que previamente había sido digerido con las mismas enzimas *Xho* I y *Hind* III y tratado con fosfatasa alcalina para eliminar los fosfatos del extremo 5' y disminuir, por lo tanto, la cantidad de vector

religado que daría lugar a falsos positivos.

La secuencia de interés quedó clonada en el extremo 3' de la región del vector que codifica para seis histidinas de manera que se produce una proteína de fusión que contiene 43 aminoácidos que están codificados por el vector y 278 aminoácidos codificados por el inserto 8c.

Luego de realizar las reacciones de ligación, se transformaron bacterias DH5 α competentes y se crecieron en medio de cultivo LB-agar, con ampicilina como agente de selección.

Para detectar que colonias tenían plásmidos recombinantes se extrajo DNA plasmídico de varias colonias crecidas en el medio de selección y se digirió con las enzimas de restricción *Xho* I y *Hind* III, observándose la liberación de un inserto del tamaño esperado.

Para comprobar que no se produjeron cambios en el marco abierto de lectura durante el subclonado se secuenciaron los clones recombinantes con el primer T7 (que es igual a parte del promotor T7 del plásmido pRSETb).

Para obtener las proteínas de fusión se transformaron células BL21 y se realizó la inducción de la transcripción del gen que codifica para la proteína de fusión His-8c, mediante el agregado de 0.4 mM de IPTG, al cultivo bacteriano. Luego de la inducción se debería obtener una proteína de fusión entre un polipéptido codificado en el vector pRSETb (de 43 aminoácidos: 5.16 KDa), que posee una región de seis histidinas (His) consecutivas, con la proteína codificada por el inserto 8c del MRCV (de 278 aminoácidos). A esta proteína se la nombra como His-8c y tiene un peso teórico de 38.52 KDa.

Se extrajeron las proteínas bacterianas totales, se separaron mediante SDS-PAGE 12% y se tiñeron con Coomassie blue.

La Figura 22 muestra las proteínas totales de bacterias transformadas con la construcción pRSETb-8c (calles 5 y 6), con el vector pRSETa (calles 3 y 4), y sin transformar (calles 1 y 2). La expresión de estas proteínas fué inducida (calles pares) o no inducida con IPTG calles (calles impares). Se señala la proteína de fusión His-8c. La proteína mostró un peso molecular acorde a lo esperado.

Como se observa en la Figura, los niveles de expresión de las proteínas de fusión fueron altos. Además se observa que el control de la expresión por parte del promotor *T7*, fue eficiente ya que no hay expresión detectable con tinción con Coomassie blue cuando no se induce el promotor con IPTG.

En la Figura 22 también se muestra la proteína de fusión His-26d. El clon 26d (de la biblioteca de cDNA del MRCV) se digirió con las enzimas de restricción *Xho* I y *Hind* III. Los cortes producidos liberaron el inserto del clon 26d de aproximadamente 459 pb (387 pb del inserto 26d y 72 pb del sitio de clonado múltiple).

Este segmento fue eluido de un gel de agarosa y clonado en el vector de expresión pRSETa que previamente había sido digerido con las enzimas *Xho* I y *Hind* III y tratado con fosfatasa alcalina. El esquema de clonado es igual al de la construcción pRSET 8c.

Se observa que en el caso de la proteína His-26d el control de la expresión por parte del promotor *T7* no fue tan eficiente ya que se observa expresión de la proteína cuando no se induce el promotor con IPTG.

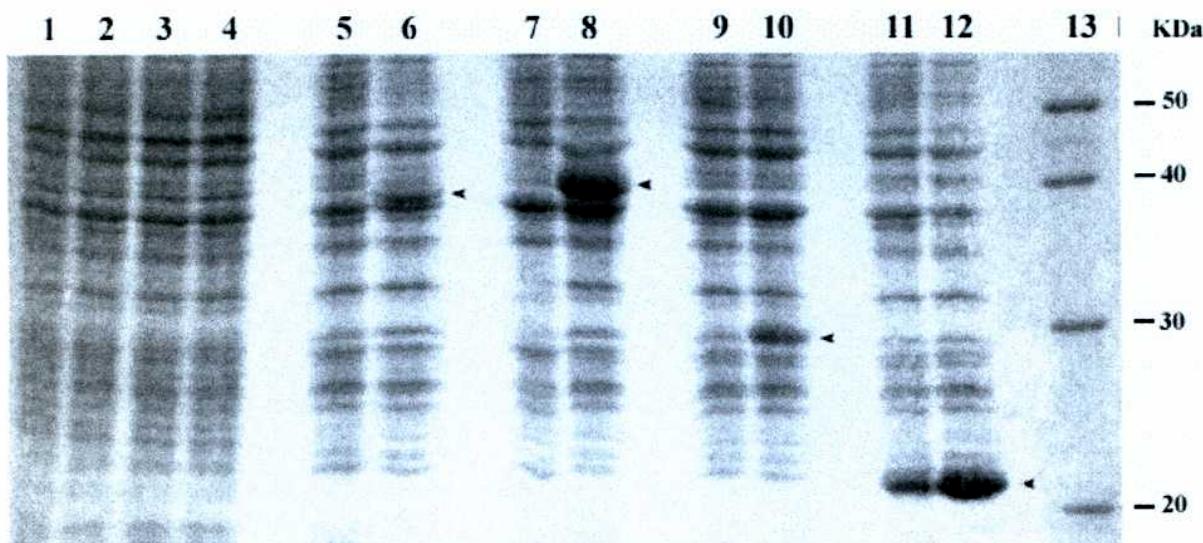


Figura 22: SDS-PAGE 12% de extractos proteicos totales, teñido con Coomassie blue. Se observa la proteína de fusión His-8c (calle 6), la proteína de fusión His-26d, extractos proteicos transformados con pRSETa (calles 3 y 4) y extractos proteicos de *E.coli* BL21 sin transformar (calles 1 y 2). Cultivo no inducido con IPTG (calles impares). Cultivo inducido con IPTG durante 2 hs (calles pares). A la derecha se indica la migración de un marcador de peso molecular.

Para confirmar que las proteínas observadas son efectivamente las proteínas de fusión esperadas, se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo comercial obtenido en ratón contra la región de seis His de la proteína de fusión, y un suero anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo (Figura 23). En la calle 4 se observa la proteína de fusión His-8c. En la calle 6 se observa la proteína de fusión His-26d, que presenta el tamaño teórico esperado de 21 KDa.

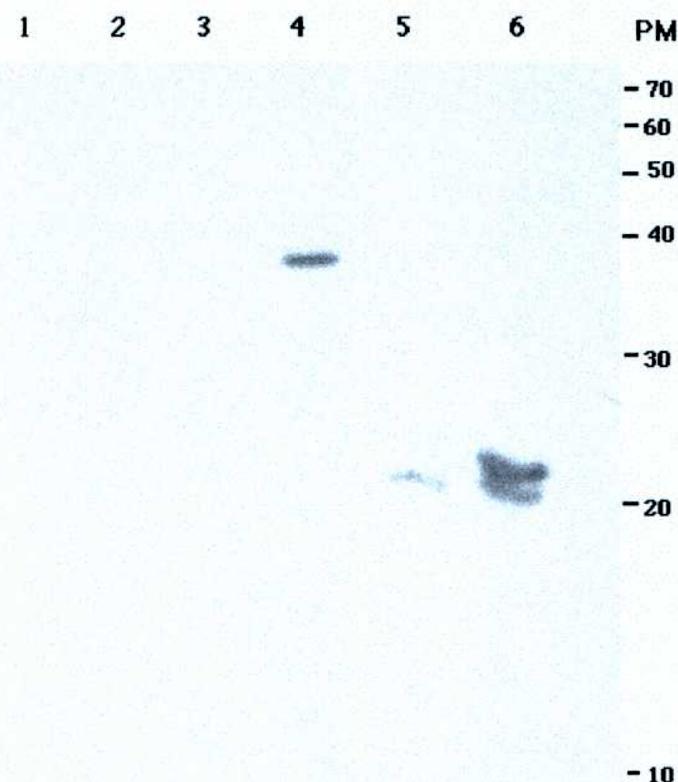
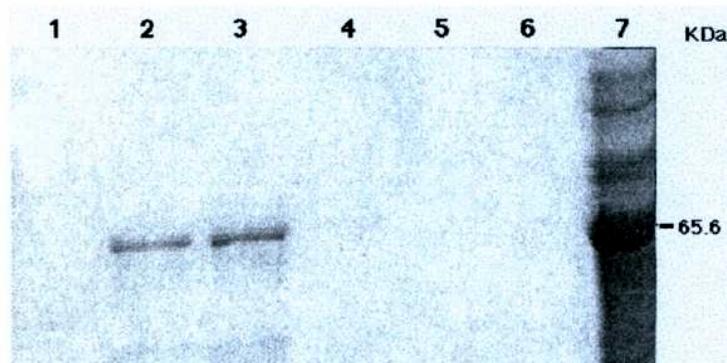


Figura 23: Detección por Western blot de las proteínas de fusión. Se sembró la proteína de fusión His-8c (calles 3 y 4), la proteína de fusión His-26d (calles 4 y 5) y extractos proteicos transformados con pRSETa (calles 1 y 2). Cultivo no inducido con IPTG (calles impares). Cultivo inducido con IPTG durante 2 hs (calles pares). A la derecha se indica la migración de un marcador de peso molecular. Se revelan las proteínas His-26 (calle 6) e His-8 (calle 4), con un antisuero comercial anti-His (dilución 1/5000), usando como anticuerpo secundario un suero anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1/7500). En las calles

6.3. Purificación de la proteína de fusión MBP-cápside MRCV

Las proteínas de fusión MBP-2d y MBP-26d se purificaron mediante una columna de afinidad. Las fracciones se corrieron en un SDS-PAGE 8% y se tiñeron con Coomassie blue. En las Figuras 24a y 24b se observan las fracciones en las que eluyeron mayoritariamente las proteínas de fusión MBP-2d y MBP-26d, respectivamente. En ambos casos la proteína de fusión eluyó en las fracciones 2 y 3 (calles 2 y 3 respectivamente), observándose en esta última fracción mayor cantidad de proteína. En ambos casos se sembró el extracto de proteínas antes de purificarlo por la columna para comparar (calle 7).

24a



24b

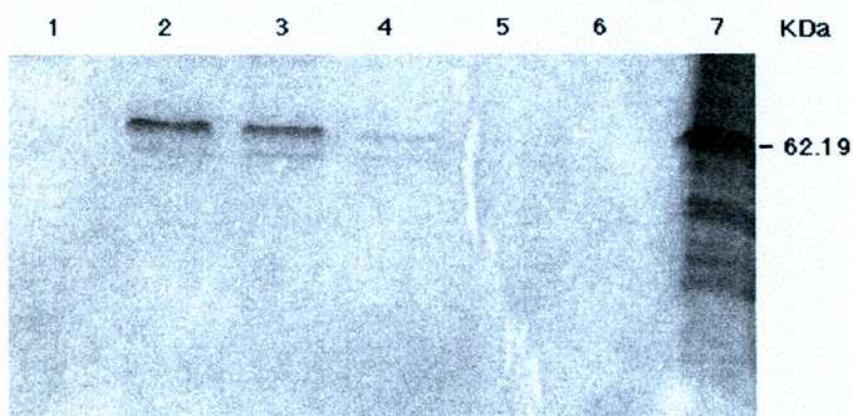


Figura 24: SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la columna de celulosa-maltosa, de las proteínas de fusión MBP-26d (14a) y MBP-2d (14b). Extracto sin purificar (calle 7), fracciones eluídas (calle 1, 2, 3, 4, 5 y 6, ordenadas desde la primera fracción que eluyó a la última).

Para confirmar que las fracciones obtenidas de las columnas correspondían a las proteínas de fusión MBP-2d y MBP-26d se realizaron dos Western blot con un anticuerpo comercial anti-MBP y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina, confirmándose que las proteínas obtenidas de la columna son las esperadas (Figura 25a y 25b).

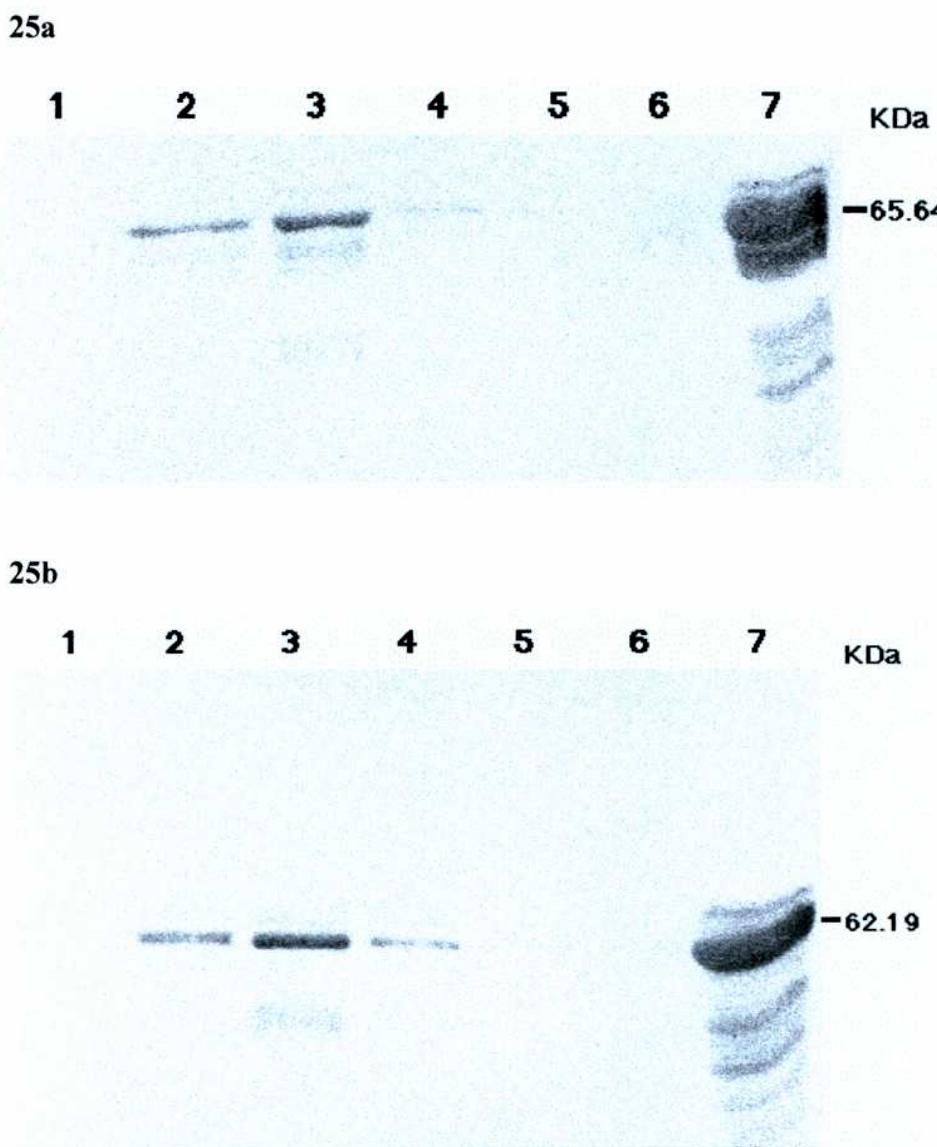


Figura 15: Detección por Western blot de las proteínas de fusión MBP-26d (10.a) y MBP-2d (10.b), con un antisuero comercial anti-MBP, usando como anticuerpo secundario un suero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Se sembró el extracto sin purificar (calle 7) y las fracciones eluidas (calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6, ordenadas desde la primera fracción que eluyó a la última).

6.4. Obtención de anticuerpos contra la proteína de fusión MBP-cápside MRCV

Con el objetivo de obtener un suero policlonal contra parte de la proteína de cápside del MRCV, se utilizaron las proteínas de fusión MBP-26d y MBP-2d (obtenidas según se describe en Materiales y Métodos) para la inmunización de conejos. Se utilizaron dos conejos por cada proteína y se les aplicó el esquema de inmunización descripto en *Materiales y Métodos*.

En la Figura 26 se muestra el resultado de la evaluación del suero pre-inmune y del suero inmune correspondiente al primer y segundo sangrado. En este experimento se sembró el extracto total de proteínas de la cepa *E.coli* DH5 α transformada con la construcción pMAL-26d e inducida durante 2 hs con 0.4 mM de IPTG, en un gel de poliacrilamida 12%. Luego del SDS-PAGE se electrotransfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, y se cortó la membrana en 6 tiras iguales (cada una corresponde a una calle del gel).

Se realizó un ensayo de Western blot utilizando distintos antisueros primarios contra la proteína MBP-26d en cada caso.

Con el objetivo de poner en evidencia los anticuerpos específicos contra la proteína de fusión que se usó para inmunizar (MBP-26), los distintos sueros (preinmune, primer sangrado y segundo sangrado) fueron bloqueados con un extracto de proteínas de la cepa *E.coli* DH5 α (calles 3 y 4) ó de la cepa *E.coli* DH5 α expresando MBP (calles 5 y 6).

Se observa que el antisuero producido en el primer y segundo sangrado es capaz de detectar la misma proteína de fusión que el anticuerpo comercial anti-MBP (comparar calle 1 con las calles 3, 4, 5 y 6), banda que no es detectada por el suero preinmune (comparar calle 2 con las demás). Como es de esperar el título del suero aumentó entre el primer y segundo sangrado (comparar calle 3 con 5). Además, si se compara la banda revelada luego de pre-absorber el suero con proteínas de DH5 α expresando MBP con la banda obtenida luego de preabsorber el suero con proteínas de DH5 α (comparar calle 3 con 4 y calle 5 con 6) uno podría suponer que parte de los anticuerpos totales son contra MBP y que parte son contra la proteína de cápside del

MRCV. Cabe la posibilidad, sin embargo, de que no todos los anticuerpos contra MBP hayan sido bloqueados por la incubación previa con las proteínas DH5 α transformadas con pMALc; por lo tanto la banda que se observa en las calles 4 y 6 puede deberse a los anticuerpos anti-MBP que no fueron bloqueados y no por anticuerpos específicos contra parte de la proteína de cápside del MRCV. Para evaluar esta posibilidad, se utilizó la proteína de fusión His-26d. La preparación de esta proteína se corrió en un SDS-PAGE y se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa para hacer un ensayo de Western blot. Los antisueros del primer y segundo sangrado no fueron capaces de reconocer esta proteína (la figura no se muestra).

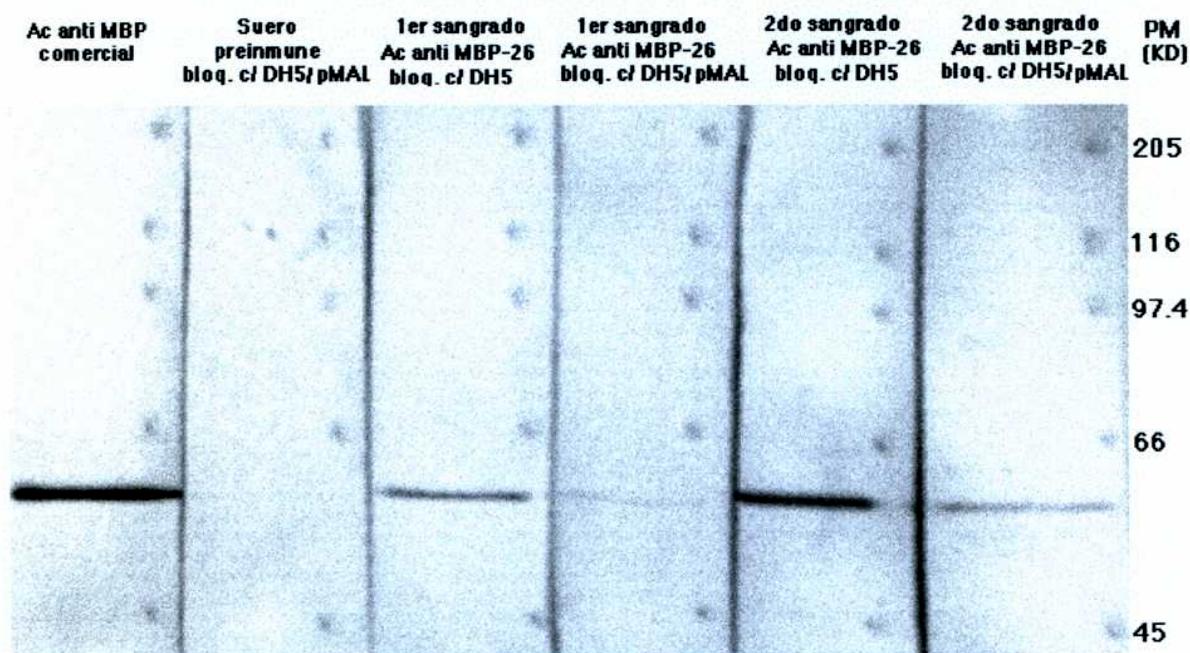


Figura 26: Detección de la proteína de fusión MBP-26d por medio de Western blot. Se utilizaron distintos antisueros pre-absorbidos con extractos proteicos de DH5 α (calles 3 y 4) o con DH5 α expresando MBP (calles 5 y 6) diluidos 1/1000. En todos los casos se usó como anticuerpo secundario un suero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1/7500.

La proteína MBP es inmunodominante, por lo tanto puede ocurrir que al inmunizar con la proteína de fusión MBP-26d se produzcan muchos anticuerpos contra la MBP y

muy pocos anticuerpos contra la proteína de cápside del MRCV. Por este motivo se decidió realizar una serie de desafíos ("boosters") con la proteína de fusión His-26d, para evaluar si esta proteína puede producir un aumento en el título de los anticuerpos específicos contra la proteína de cápside del MRCV. Siguiendo el esquema de inmunización descripto en Materiales y Métodos, se obtuvo un cuarto y un quinto sangrado, que fueron bloqueados con un extracto de proteínas de la cepa *E.coli* DH5 α . Para confirmar que los anticuerpos obtenidos son específicos contra la proteína de cápside del

MRCV, se probaron los antisueros obtenidos contra la proteína His-26d y contra otra proteína de fusión obtenida del MRCV no relacionada con la cápside (His-8c del MRCV). En este caso se observó que los anticuerpos del cuarto y quinto sangrado reconocieron a la proteína de fusión His-26d y no reconocieron a la proteína no relacionada (la figura no se muestra). Por lo tanto el reconocimiento estaría dado por anticuerpos contra la proteína 26d y no por anticuerpos contra la proteína codificada en el vector pRSET que posee seis histidinas consecutivas. Para confirmar que en los sangrados posteriores al "booster" con His-26d se obtuvieron anticuerpos específicos contra parte de la proteína de cápside del MRCV se realizó otro Western blot con los sueros del cuarto sangrado diluido 1/1000. Los sueros se evaluaron contra las proteínas MBP-26d y MBP-2d purificadas por columna de afinidad y cortadas con la proteasa Xa. Esta enzima corta la proteína de fusión en el sitio de unión entre la MBP y la proteína derivada del inserto, de manera que se produce un péptido de 17 KDa en el caso de la proteína 26d ó de 20 KDa en el caso de la proteína 2D y la proteína MBP de 46.80 KDa. Las proteínas se separaron en un SDS-PAGE 15% y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa.

En la Figura 27 se observa que el suero del cuarto sangrado (del conejo inyectado con MBP-26 y luego con His-26) reconoce la proteína de fusión His-26d de 21KDa (calle 1), como así también una proteína de 17 KDa (calle 2) que no es reconocida por el suero pre-inmune (calle 4). También se observa que hay reconocimiento de la proteína de fusión MBP-26 de 62.19 KDa que no fue digerida por el factor Xa y también se reconoce la proteína MBP sola de 46.8 KDa, ya que el suero del cuarto sangrado sigue

conteniendo anticuerpos contra MBP.

Se observa también que el suero preinmune reconoce la banda que corresponde a la proteína MBP de 45.12 KDa (calle 4). Debido a la dieta de los conejos es frecuente que en los sueros preinmunes se encuentren anticuerpos contra proteínas que tienen motivos de unión a maltosa, siendo esta la posible causa del reconocimiento de la MBP por el suero preinmune. Sin embargo este suero no reconoce la proteína de fusión MBP-26d; una explicación posible sería que el plegamiento adoptado por la proteína de fusión no permite que los anticuerpos anti-MBP existentes en el suero preinmune reconozcan los epítopes específicos de la MBP.

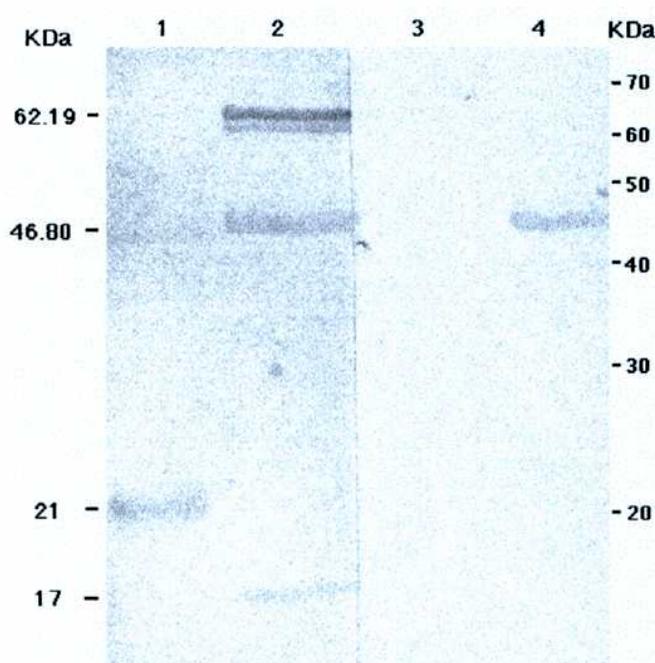


Figura 27: Detección de parte de la proteína de cápside del MRCV (26d) con un ensayo de Western blot. Se utilizó el antisuero del quinto sangrado (calles 1 y 2) y el antisuero preinmune (calles 3 y 4), pre-absorbidos con extractos proteicos de *E.coli* DH5, dilución 1/1000. En todos los casos se usó como segundo anticuerpo un suero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1/7500). En las calles 1 y 3 se sembró la proteína de fusión His-26d y en las calles 2 y 4 la proteína de fusión MBP-26d purificada y cortada con la proteasa Xa. A la izquierda se señala los PM esperados y a la derecha el patrón de migración de un marcador de PM.

Los antisueros provenientes de los conejos inyectados con MBP-2d reaccionan con la proteína correspondiente de la misma manera descripta para MBP-26d (Figura 28). La

proteína His-26 es reconocida por este suero debido a que el clon 2d posee una zona que se superpone con el clon 26d.

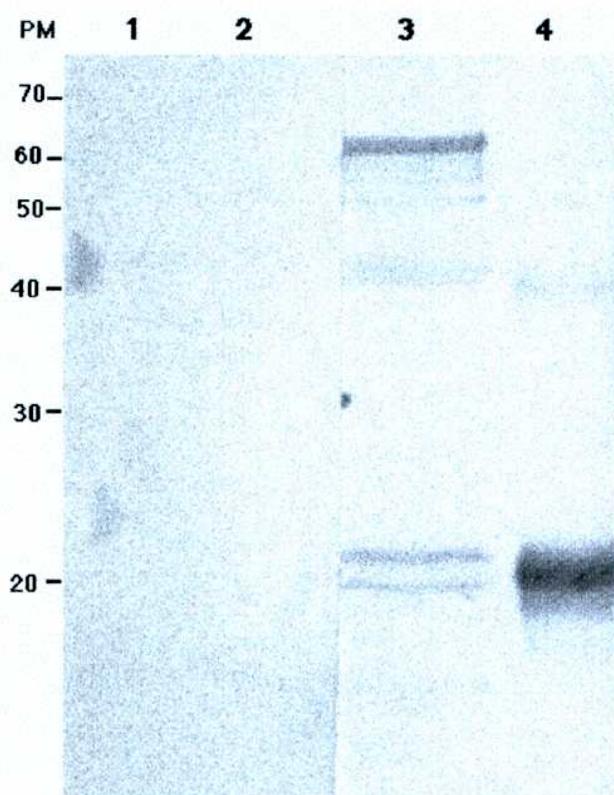


Figura 28: Detección de parte de la proteína de cápside del MRCV (2d) con un ensayo de Western blot. Se utilizó el antisuero del quinto sangrado (calles 3 y 4) y el antisuero preinmune (calles 1 y 2), pre-absorbidos con extractos proteicos de *E.coli* DH5 (dilución 1/1000). En todos los casos se usó como segundo anticuerpo un suero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1/7500). En las calles 2 y 4 se sembró la proteína de fusión His-26d y en las calles 1 y 3 la proteína de fusión MBP-2d purificada y cortada con la proteasa Xa. A la izquierda se señala los PM esperados y a la derecha el patrón de migración de un marcador de PM.

6.5. Obtención de anticuerpos contra la proteína His-RNA polimerasa del MRCV

Con el objetivo de obtener un suero policlonal contra parte de la proteína de la RNA polimerasa RNA dependiente del MRCV, se utilizó la proteína de fusión His-8c, obtenida según se describe en Materiales y Métodos, para la inmunización de un conejo. Se le aplicó el esquema de inmunización descripto en Materiales y Métodos.

En la Figura 29 se muestra el resultado de la evaluación del suero pre-inmune y de los sueros inmunes correspondientes al primero, segundo, tercero y cuarto sangrado. En

en este experimento se sembró el extracto total de proteínas de la cepa *E.coli* BL21 transformada con la construcción His-8c e inducida durante 2 hs con 0.4 mM de IPTG, en un gel de poliacrilamida 12%. También se sembró como control el extracto total de proteínas de la cepa *E.coli* BL21 transformada con una construcción realizada en el vector de expresión pRSET donde se clonó otro inserto correspondiente a un clon de la genoteca del MRCV distinto del clon 8c e inducida durante 2 hs con 0.4 mM de IPTG. Se obtiene una proteína de fusión denominada His-76c de 29.76 KDa. Luego del SDS-PAGE se electrotransfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, y se cortó la membrana en 6 tiras iguales correspondientes a dos calles del gel.

Con el objetivo de poner en evidencia los anticuerpos específicos contra la proteína de fusión que se usó para inmunizar (His-8c) se realizó un ensayo de Western blot utilizando distintos antisueros primarios contra la proteína His-8c en cada caso (ver Figura 29).

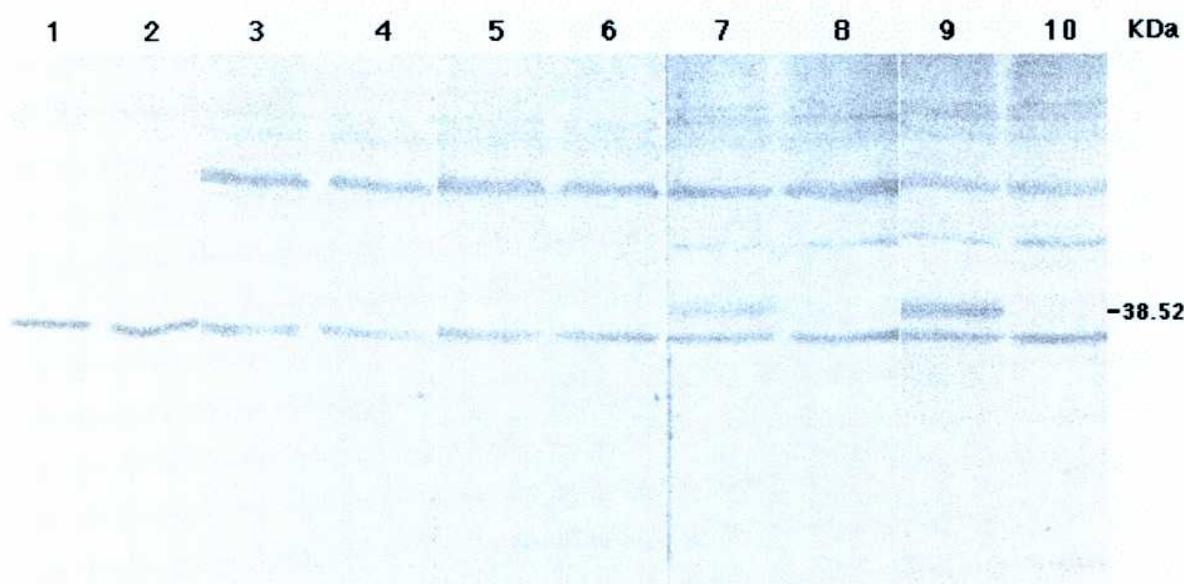


Figura 29: Detección de la proteína de fusión His-8c por medio de Western blot. Se sembró la proteína His-76c (calles pares) y la proteína His-8c (calles impares). Se utilizaron distintos antisueros pre-absorbidos con extractos proteicos de DH5 diluidos 1/1000: suero preinmune (calles 1 y 2), 1º sangrado (calles 3 y 4), 2º sangrado (calles 5 y 6), 3º sangrado (calles 7 y 8), 4º sangrado (calles 9 y 10). En todos los casos se usó como anticuerpo secundario un suero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1/7500. En las calles 11 y 12 que se utilizó un anticuerpo comercial anti-His diluido 1/5000 y como segundo anticuerpo un anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina dilución 1/7500. A la derecha se señala el PM esperado para la proteína His-8c y His-76c.

En las calles 11 y 12 se muestra el reconocimiento de las proteínas de fusión His-8c e His-76c.

En las calles 1 y 2 se observa que el suero preinmune reconoce proteínas inespecíficas pertenecientes a la bacteria *E.coli* BL21. En las calles 7 y 9 se observa que el tercer y cuarto sangrado, respectivamente, reconocen específicamente a la proteína de fusión His-8c y no reconocen a la proteína His-76c.

6.6. Evaluación de los antisueros

Con el objetivo de evaluar los distintos sangrados del suero obtenido contra la proteína de fusión His-26d, se hizo un “Dot Blot”. Se sembraron diluciones de la proteína de fusión His-26d y se realizó un ensayo de Western blot con los distintos sueros diluidos 1/1000 (Figura 30).

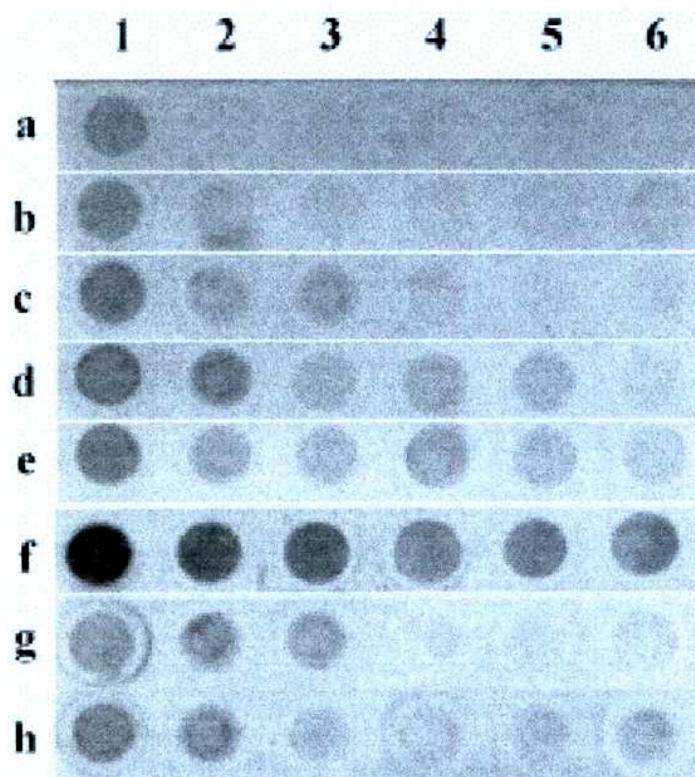


Figura 30 : Ensayo de Western blot para evaluar los distintos sangrados del suero contra la proteína His-26d. Se sembró la proteína His-26d tal cual y diluciones 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000 y 1/5000 (calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente). Se muestran los sueros pre-inmune, primero, tercero, cuarto, quinto, sexto, octavo y décimo (calles a, b, c, d, e, f, g, h respectivamente) diluidos 1/1000. Se utilizó como segundo anticuerpo un anti-conejo diluido 1/7500.

Se observa que el suero preinmune reconoce inespecíficamente la proteína de fusión His-26d tal cual y no las distintas diluciones (calle a); el primer sangrado reconoce en forma leve la dilución 1/50 de la proteína His-26d (calle b, 2), lo mismo ocurre con el segundo sangrado (no se muestra). El tercer sangrado reconoce la dilución 1/50 y 1/100 de la proteína His-26d (calle c, 2 y 3). El cuarto y quinto sangrado reconocen hasta la dilución 1/1000 de la proteína de fusión His-26d y el sexto sangrado reconoce hasta la dilución 1/5000. Se observa que el sexto sangrado tiene un título muy alto y es el que mejor reconoce a las distintas diluciones de la proteína His-26d.

El título de los sueros de los siguientes sangrados disminuyó considerablemente reconociendo solo las diluciones 1/50 y 1/100. Esto puede deberse a que luego del sexto sangrado se dejó descansar a los conejos durante un mes, antes de aplicarles el siguiente refuerzo. Se muestra en la figura el octavo (calles g) y décimo sangrado (calles h).

7. DISCUSIÓN

El Mal de Río Cuarto es sin duda en la actualidad la enfermedad de mayor importancia a nivel económico del cultivo de maíz, siendo escasos los conocimientos sobre la organización genómica primaria del virus que la causa. La caracterización molecular de los virus es muy importante para el análisis de la patogenia y de otras funciones biológicas, como por ejemplo la replicación en el insecto vector, el movimiento del virus de célula a célula dentro de la planta que aportan información muy valiosa para el control, manejo y solución a las enfermedades producidas por estos virus.

En el presente trabajo se muestran avances en el estudio de la organización genómica primaria del MRCV, seguido por la producción de anticuerpos que se usarán para una posterior caracterización de productos virales.

7.1. Análisis de las secuencias obtenidas del MRCV

Cuando se analizó la secuencia del clon 2d (inserto de 474 pb), se observó que el extremo 5' del mismo se superponía con el extremo 3' de la secuencia del clon 26d (inserto de 387 pb) en 192 pb, lo cual determinó una secuencia final de 669 pb que contenían un marco abierto de lectura que codifica para 222 aminoácidos. Las secuencias mostraron 4 diferencias en el área de superposición entre ambos clones, donde en todos los casos una T en el clon 26d fue sustituida por una C en el clon 2d. Ninguna de las cuatro sustituciones representó un cambio en la secuencia de aminoácidos. La genoteca de cDNA del MRCV se realizó con un aislamiento de campo del virus en la zona de Río Cuarto, pcia. de Córdoba, y no un aislamiento del virus en el sentido virológico clásico. Las diferencias observadas podrían deberse a la presencia de una población heterogénea (cuasiespecies), ya citadas para los *Fijivirus*. Por ejemplo, el segmento 6 (S6) del MRDV presenta una variación en la secuencia de nucleótidos del 1.18%; la explicación propuesta por los autores es que la fuente del virus fueron plantas cosechadas del campo (Marzachi y col., 1991). Similarmente, se observó que la secuencia del segmento 5 del NLRV presentaba una heterogeneidad del 2.5% aproximadamente cuando se colectaron en el campo, en 1987, los insectos

vectores infectados con el virus (Nakashima y col., 1996).

Cuando se comparó la secuencia de nucleótidos obtenida del clon 26d+2d y la secuencia de aminoácidos derivada de ella, con las secuencias depositadas en la base de datos, se encontró homología con la parte secuenciada del segmento 3 del RBSDV, que se especula que codifica para una proteína de cápside. Se encontró una homología del 71 % a nivel de nucleótidos y del 73 % a nivel de aminoácidos. La misma región presenta una homología del 32% con la proteína codificada por S4 del NLRV cuya función no ha sido establecida aún. El hecho que la misma región sea a su vez la que presenta mayor homología con NLRV señalaría que se trata de la región más conservada del fragmento proteico estudiado. Los resultados obtenidos comparando la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos indicarían, en principio, que el S4 del MRCV codifica para una proteína de cápside.

Cuando se analizó la secuencia del clon 92d (inserto de 727 pb), se observó que el extremo 3' del mismo se superponía con el extremo 5' del clon 8c (inserto de 834 pb) en 284 pb, dando lugar a una secuencia total de 992 pb que contenía un marco abierto de lectura que codificaba para 330 aminoácidos. Se determinó que los clones 92d y 8c (que se sabía corresponden al S1 del MRCV) presentaban una homología del 42 % a nivel de nucleótidos y del 43.4 % a nivel de aminoácidos con el S1 del NLRV, único virus dentro del género cuyo S1 ha sido secuenciado, y que se sabe codifica para la RNA polimerasa RNA dependiente. En la secuencia de aminoácidos deducida de la parte secuenciada del segmento 1 del MRCV, se determinó la presencia de los motivos típicos de las polimerasas virales que se encuentran en reovirus y rotavirus y tipificados por el motivo GDD que fue descripto como “core” de las RNA polimerasas RNA dependientes (Kamer y Argos, 1984; Suzuki y col., 1992b) indicando que el segmento 1 (S1) del MRCV codifica para la enzima RNA polimerasa RNA dependiente.

Nilaparvata Lugens Reo Virus (NLRV), es un reovirus de insectos que durante muchos años tuvo una clasificación incierta. Debido al número y movilidad de los segmentos genómicos, Nakashima y col (1996) proponen ubicarlo dentro del género Fijivirus al igual que el MRCV, a pesar de tratarse de un virus de insectos que no replica en las plantas de arroz. Actualmente es considerado un miembro putativo del

género *Fijivirus*.

Es importante destacar que el valor de homología observado a nivel de aminoácidos entre el S1 del MRCV y el S1 del NLRV (43.3 %) es el valor más alto de homología encontrado entre un miembro del género *Fijivirus* y el NLRV.

En la Figura 31 se muestra un dendograma construido con las secuencias obtenida de parte del S4 del MRCV, parte del S3 el RBSDV y parte del S4 del NLRV.

Figura 31: Relaciones filogenéticas entre el MRCV, RBSDV y NLRV.

El MRDV y el RBSDV son considerados por algunos autores como razas geográficas del mismo virus, debido a que presentan una homología muy alta, entre un 80 y 98%, entre los distintos segmentos secuenciados hasta el momento. La homología observada entre los distintos clones del MRCV y los distintos segmentos de los virus del género *Fijivirus*, es más baja que la observada entre el MRDV y el RBSDV. Este análisis indicaría, en principio, que existe un origen común entre los distintos miembros del género *Fijivirus*, pero mostraría que el MRCV es una raza más alejada del MRDV y del RBSDV.

El tamaño del S1 del NLRV (4391pb) y del S1 del MRCV (aprox. 4200 pb, Conci, 1997) es similar, y la zona de homología encontrada entre ambos se extiende entre los aminoácidos 542 y 962 del NLRV. El fragmento secuenciado de 992 pb representa el 22,63% del S1. De la Figura 31 se desprende que restarían secuenciar aproximadamente 1650 pb del extremo 5' y 974 pb del extremo 3' del MRCV.

De la misma manera, los tamaños del S4 del NLRV (3560 pb) y el S4 del MRCV

(aprox. 3400 pb, Conci, 1997) son similares, y la zona de homología entre ambos resultó estar comprendida entre los aminoácidos 167 y 309 del RBSDV. Teniendo en cuenta el tamaño estimado del S4 del MRCV, el fragmento secuenciado de 669 pb representa el 20 % del mismo. En la Figura 31 se observa que restan secuenciar aproximadamente 2271 pb del extremo 5' y 459 pb del extremo 3' del MRCV.

En base a estos datos, y a los publicados por Conci, 1997, se realizó un esquema hipotético de la estructura de los segmentos del MRCV. Se resaltan las zonas del S1 y del S4 secuenciadas en este trabajo. Ver Figura 32.

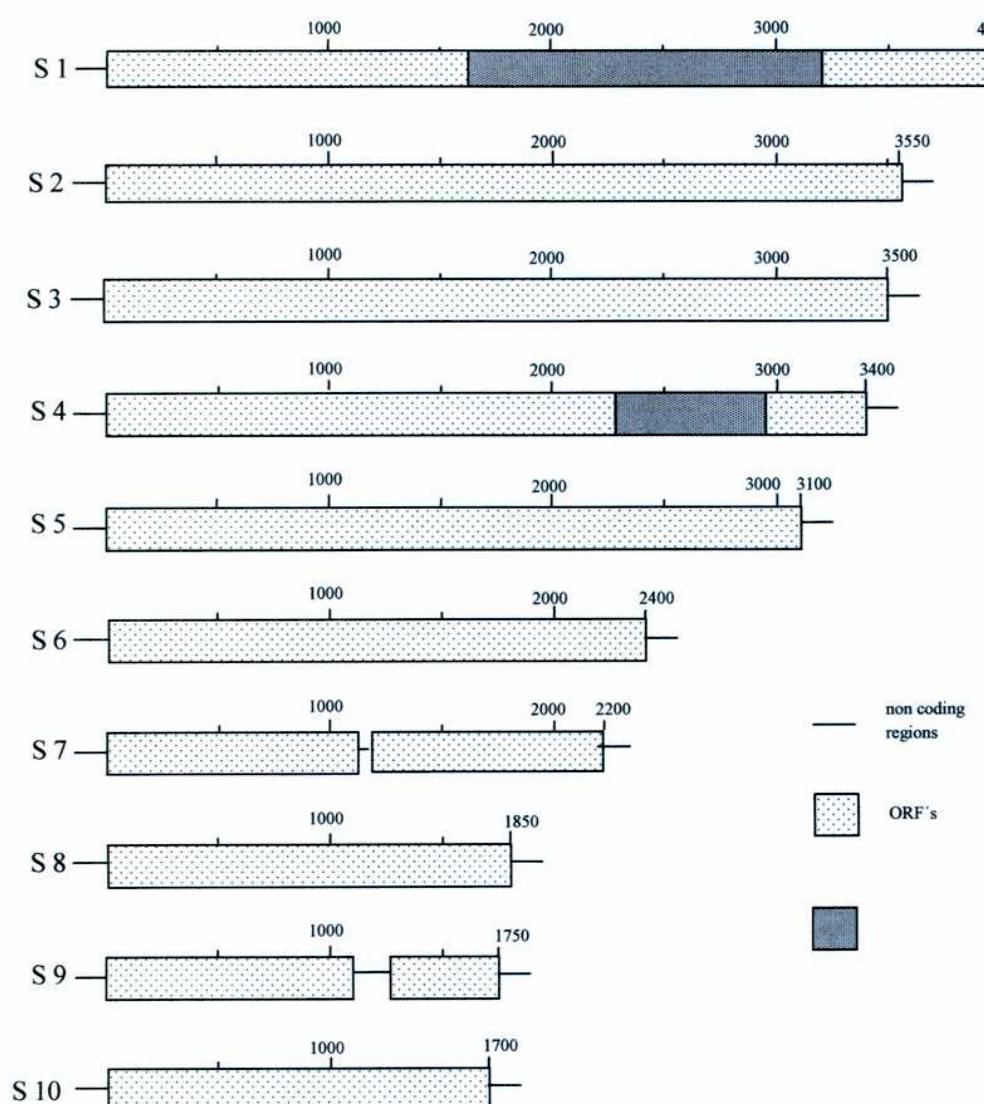


Figura 32: Esquema hipotético de la estructura de los segmentos del MRCV.

7.2. Obtención de proteínas de fusión

Utilizando el programa Protean, que permite analizar y predecir características de una proteína a partir de los datos de la secuencia primaria, se obtuvo un gráfico del perfil de hidrofilicidad e índice antigenico de parte de la proteína de cápside del MRCV y de parte de la RNA polimerasa RNA dependiente. Los resultados mostraron que teóricamente son proteínas altamente hidrofílicas y con un índice antigenico alto.

Este análisis nos permitió especular que las proteínas obtenidas serían adecuadas para la obtención de anticuerpos policlonales dirigidos hacia estas zonas.

Con el objetivo de obtener la expresión de estas proteínas se realizaron las construcciones en los vectores de expresión pMALc y pRSET, obteniéndose altos niveles de expresión en las proteínas de fusión MBP-26d, MBP-2d, His-26d e His-8c en sistemas bacterianos.

7.3. Obtención de antisueros

Con las proteínas de fusión se realizaron esquemas de inmunización en conejos y se obtuvieron sueros correspondientes a los distintos sangrados, que reconocieron a las proteínas de fusión en ensayos de Western blot.

Se realizó un ensayo de titulación del suero obtenido contra parte de la proteína de cápside del MRCV. Se determinó que el sexto sangrado tiene un título muy alto y es el que mejor reconoce a las distintas diluciones de la proteína His-26d.

7.4. Perspectivas

En este trabajo se logró secuenciar aproximadamente el 22.6% del S1 del MRCV que codifica para la RNA polimerasa RNA dependiente y el 20% del S4 del MRCV que codifica para la proteína mayoritaria de cápside. El próximo paso en el estudio de este virus es la secuenciación completa de estos dos segmentos, como así también de los restantes segmentos del MRCV hasta completar la secuencia total del genoma del MRCV. Esto permitirá un estudio completo de la organización primaria del virus, como así también la caracterización de los productos virales. Para poder cumplir este

objetivo se planificó la construcción de una nueva genoteca del MRCV, en la cual idealmente los clones obtenidos posean insertos que correspondan a cada uno de los diez segmentos completos del MRCV. Para ello ya se aisló dsRNA a partir de raíces de plantas de maíz enfermas de los campos experimentales de INTA-Pergamino y de la región de Sampacho, Córdoba.

La información de las secuencias obtenidas en la presente Tesis se utilizará para la identificación de los clones de la nueva genoteca del MRCV que contengan secuencias virales río arriba ó río debajo de las regiones ya secuenciadas.

Además se intentará secuenciar los extremos 5' y 3' de los distintos segmentos genómicos virales. La obtención de estas secuencias aportará información para definir si la secuencia propuesta por Isogai y col. (1998) corresponde a la secuencia género-específica de los *Fijivirus*.

La secuenciación del genoma del MRCV también aportará valiosa información para el estudio del origen de los *Fijivirus*.

Los antisueros obtenidos serán usados en ensayos de Western blot de extractos de proteínas de plantas enfermas y plantas sanas para comprobar que son capaces de diferenciarlas, y para caracterizar las proteínas virales producidas durante la infección. En el caso en que no sean capaces de reconocer proteínas virales en plantas enfermas, se purificarán parcialmente partículas virales, se transferirán a membranas de nitrocelulosa y se revelarán con los anticuerpos policlonales obtenidos.

Por otro parte los anticuerpos obtenidos contra las dos proteínas del MRCV, así como los que se están obteniendo contra otras proteínas serán conjugados con fosfatasa alcalina y usados para la detección de proteínas virales expresadas tanto en las plantas de maíz como en el insecto vector, mediante técnicas de inmunodetección.

Además se utilizarán los anticuerpos obtenidos para desarrollar herramientas para aumentar la eficacia de purificación del virus y para la detección de proteínas estructurales y funcionales que se expresarán por ingeniería genética en plantas transgénicas o en sistemas de expresión transitoria.

Se intentará identificar los genes responsables de la replicación y diseminación del virus en la planta como así también en el insecto vector, profundizándose el estudio de los mecanismos de replicación y diseminación del MRCV.

Toda esta información se podrá utilizar para el desarrollo de mecanismos de control de la enfermedad mediante técnicas de ingeniería genética, basadas principalmente, en la producción de plantas de maíz transgénicas resistentes al Virus del Mal de Río Cuarto, mediante la expresión de partes del genoma viral (ya sea regiones codificantes o no). Se prevé subclonar algunos de los marcos abiertos de lectura virales encontrados, en vectores adecuados para su expresión en plantas.

Se trabajará en la obtención de plantas de maíz transgénicas para algunos de los genes virales identificados, con el objetivo final de lograr mediante el silenciamiento génico una disminución o bloqueo de la replicación del MRCV en las plantas de maíz.

7.5. Conclusiones

- 1- Se secuenció aproximadamente el 20.63% del S1 del MRCV que contiene un marco abierto de lectura que codifica para 330 aminoácidos.
- 2- Se secuenció aproximadamente el 20% del S4 del MRCV que contiene un marco abierto de lectura que codifica para 222 aminoácidos.
- 3- Por homología con secuencias de otros *Fijivirus* secuenciados se identificaron a estos dos marcos abiertos de lectura con la proteína RNA polimerasa RNA dependiente del MRCV (S1) y con la proteína de cápside del MRCV (S4).
- 4- Se lograron altos niveles de expresión de parte de ambas proteínas del MRCV como proteínas de fusión en sistemas bacterianos.
- 5- Se obtuvieron anticuerpos policlonales contra ambas proteínas.

MARIANA DR. VAS
Co-DIRECTORA

AUDISTEFANO

HOPP
DIRECTOR

8. Bibliografía

- Anzola, J; Xu, Z; Asamizu, T; Nuss, D. 1987.** Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interfering RNA's. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 831-8305.
- Ausbel, F; Brent, R; Kingston, R; Moore, D; Seidman, J; Smith, J; Struhl, K. 1997.** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Azuhata, F; Uyeda, I; Kimura, I; Shikata, E. 1993.** Close similarity between genome structures of rice black-streaked dwarf and maize rough dwarf viruses. J. Gen. Virol. 74: 1227-1232.
- Azuhata, F.; Uyeda, I; Shikata, E. 1992.** Conserved terminal nucleotide sequence in the genome of rice black streaked dwarf virus. Journal of General Virology 73, 1593-1595.
- Conci, L. R; Valdivia, M. B; Nome, S. F. 1992.** Fitopatología. Vol. 27 (1): 26-32.
- Conci, L. R; Marzachi, C. 1993.** Avances en la caracterización molecular del genoma del virus causal del "Mal de Río Cuarto". Resúmenes Workshop Mal de Río Cuarto del Maíz. Córdoba, Argentina. June 1993: 23-25.
- Conci, L. R. 1997.** Caracterización Molecular del Virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) y desarrollo de sistemas de diagnóstico basado en técnicas de hibridación molecular. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.
- Dagoberto, E; Remes Lenicov, A; Tesón, A y Paradell, S. 1985.** *Avena Sativa* L, hospedante preferencial del transmisor del "Mal de Río Cuarto", *Delphacodes kuscheli* Fennah (Homoptera; Delphacidae). *Neotrópica* 31:82.
- Francki, R; Milne, B; Hatta, T. 1985.** Atlas of Plant Viruses. Vol 1. CRC Press. Boca Ratón.
- Gimenez Pecci, M; Nome, S y Milne, R. 1986.** Purificación y obtención de antisuero de las partículas del virus causal del Mal de Río Cuarto. Congreso Argentino de Virología. 20-24 de octubre. Córdoba, Argentina. pp 23.
- Giorda, L; Ornaghi, J; Boito, G y March, G. 1993.** Identificación del vector del virus causal del Mal de Río Cuarto en sorgo y estudios poblacionales de delfácidos. En actas del Workshop "Mal de Río Cuarto del Maíz". 23, 24 y 25 de junio pp. 49-50. Córdoba, Argentina.
- Harris, K. 1980.** In Vectors of Plants Pathogens. Ed by Harris, K and Maramorosch, K. Chapter 1. Aphids, Leafhoppers and Planthoppers. Academic Press. Inc. pp. 1-15.

- Isogai, M; Uyeda, I; Lindsten, K. 1998a.** Taxonomic characteristics of fijiviruses based on nucleotide sequences of the oat sterile dwarf virus genome. *J. Gen. Virology* 79:1479-1484.
- Isogai, M; Uyeda, I; Lee, B. 1998b.** Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10. *J. Gen. Virology* 79:1487-1494.
- Klein, M. 1967.** PhD Thesis. Hebrew Univ. Jerusalem. Israel.
- Lenardón, S. L; March, G. J. 1983.** Estado acutal del "Mal de Río Cuarto" en cultivo de maíz. *Revista CREA* 104:22-42.
- Lenardón, S. L; March, G. J; Ornaghi, J. A; Beviacqua, J. E. 1985.** Centro de Investigaciones Northrup King Semillas SA.:11.
- Luisoni, E; Conti, M. 1970.** *Phytopathol. Mediterr.* 9: 102-105.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1984).** Molecular cloning. A laboratory manual. ColdSpring Harbor Laboratory Press, New York.
- March, G. J; Balzarini, M; Ornaghi, J. A; Beviacqua, J. E; Marinelli, A. 1995.** Predictive Model for "Mal de Rio Cuarto" Disease Intensity. *Plant Disease* 79 (10): 1051-1053.
- Marzachi, C., Antoniazzi, S., d' aquilio, M and Boccardo. 1996.** The double stranded RNA genome of maize rough dwarf *Fijivirus* contains both mono and dicistronic segments. *Europ. Journal of Plant Pathol.* 102:601-605
- Marzachi, C; Boccardo, G; Nuss, D. L. 1991.** Cloning of Maize Rough Dwarf Virus Genome: Molecular Confirmation of the Plant-Reovirus Classification Scheme and Identification of Two Large Nonoverlapping Coding Domains within a Single Genomic Segment. *Virology*. 180: 518-526.
- Marzachi, C; Boccardo G; Milne, R; Isogai, M; Uyeda, Y. 1995.** Genome Structure and Variability of Fijivirus. *Seminars in Virology* 6: 103-108.
- Milne, R. G. 1986.** Report on a visit to Argentina, in connection with the "Mal de Río Cuarto" disease of maize. Instituto di Fitovirologia Applicate, CNR. Italy. 22pp.
- Milne, r. and Lovisolo, O. 1977.** Maize rough dwarf virus and related viruses. *Adv. Virus Res.* 21:267-341
- Milne, R.; Conti, M. and Lisa,V. 1973.** Partial purification , Structure and Infectivity of complete MRDV Particles. *Virology* 53:130-141.
- Nome, S. F; Lenardón, S. L; Laguna, I. G; Lowe, S. M; Docampo, D. M. 1980.** Partículas de virus (Reovirus) asociadas al "Mal de Río Cuarto" en cultivos de maíz. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Serie Didáctica N°3. UNC. Pág. 1-7.

Nakashima, N. and Noda, H. 1995. Nonpathogenic *Nilaparvata lugens* reovirus is transmitted to the brown planthopper through rice plant. *Virology* 207:303-307

Nakashima, N; Koizumi, M; Watanabe, H; Noda, H. 1996. Complete nucleotide sequence of the *Nilaparvata lugens* reovirus: a putative member of the genus *Fijivirus*. *Journal of General Virology*. 77: 139-146.

Nome, S. F; Lenardón, S. L; Raju, B. C; Laguna, I. G; Lowe, S. M; Docampo, D. M. 1981. Association of Reovirus like particles with "Enfermedad de Río Cuarto" of Maize in Argentina. *Phytopathologische Zeitschrift* 101:7-15.

Ornaghi, J; Boito, G; Sánchez, G; March, G; Beviacqua, J. 1993. Studies on the populations of *Delphacodes kuscheli* Fennah in different years and agricultural areas. *J. Gen and Breed.* 47: 277-282.

Poch, O.; Sauvaget, I.; Delaure, M. and Tordo, N. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal* 8:3867-3874.

Remes Lenicov, A de ; Teson, A; Dagoberto, E; Huguet, N. 1985. Hallazgo de uno de los vectores del "Mal de Río Cuarto" del maíz. *Gaceta agropecuaria*. Vol 25: 251-258.

Rodriguez Pardina, P.; Laguna, G.; Dagoberto, E.; Truol, G. A. 1994. Trigo (*Triticum aestivum* L.): Hospedante natural del virus causal del "Mal de Río Cuarto" en Argentina. III Congreso Nacional de Trigo. Primer Simposio Nacional de Cereales de siembra otoño invernal; 26, 27 y 28 de Octubre. Bahía Blanca, Argentina.

Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467

Suzuki, N; Tanimura, M; Watanabe, Y; Kusano, T; Kitagawa, Y; Suda, N; Kudo, H; Uyeda, I; Shikata, E. 1992. Molecular analysis of Rice Dwarf Phytoreovirus segment S1: interviral homology of the putative RNA-dependent RNA polymerase between plant- and animal-infecting Reovirus. *Virology* 190, 240-247.

Tomaru, M; Maruyama, W; Kikuchi, A; Yan, J; Zhu, Y; Suzuki, N; Isogai, M; Oguma, Y; Kimura, I; Omura, T. 1997. The Loss of Outer Capsid Protein P2 Results in Nontransmissibility by the Insect Vector of Rice Dwarf Phytoreovirus. *Journal of Virology*. Oct: 8019-8023.

Uyeda, Y; Azuhata, F; Shikata, E. 1990. Nucleotide sequence of rice black-streaked dwarf virus segment 10. *Proc. Japan Acad. Sci.* 66: 37-40.

Uyeda, Y; Milne, R, G. 1995a. Genomic organization, diversity and evolution of plant reoviruses. *Seminars in Virology* 6: 85-88.

Uyeda, Y; Kimura, I; Shikata, E. 1995b. Double-stranded RNA of Plant Reoviruses: Recent Advances in Characterization fo Rice Dwarf Phytoreovirus. Pathogenesis and host specificity in plant viruses. Great Britain, Elsevier Science Ltd.: 225-238.

Vidano, C; Lovisolo, O; Conti, M. 1966. Atti Acad. Sci.-Torino. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat. 100: 699-710.