

Tesis de Posgrado

Clonado molecular y estudios sobre la estructura genómica del virus de la papa X

Mandel, María Alejandra

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Mandel, María Alejandra. (1988). Clonado molecular y estudios sobre la estructura genómica del virus de la papa X. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2096_Mandel.pdf

Cita tipo Chicago:

Mandel, María Alejandra. "Clonado molecular y estudios sobre la estructura genómica del virus de la papa X". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2096_Mandel.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

CLONADO MOLECULAR Y ESTUDIOS
SOBRE LA ESTRUCTURA GENOMICA
DEL VIRUS DE LA PAPA X

María Alejandra Mandel

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

Director: Dr. Héctor Norberto Torres

1988

Instituto de Investigaciones en
Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)
CONICET

20 96
Ej. 2.

a mis padres y hermano

a Daniel

a mi amiga Nora Solari de Lepíscopo

a mis amigas Clarita, Carmen, Rita y
Valy

a mis compañeros y amigos del "211",
Danny, Ricky, Erich, Gabriel y
Guillermo

a la memoria del Dr. Adalberto Somodi

Si parece fácil, es difícil
Si parece difícil, es imposible

Teorema de Stockmayer, de
Las Leyes de Murphy

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Héctor N. Torres, por su confianza y constante estímulo.

A la Dra. Mirtha Flawiá, por el apoyo y orientación brindados.

Al Dr. Alejandro Mentaberry, por haberme permitido realizar este Trabajo de Tesis en su grupo.

A los Dres. María Teresa Téllez-Iñón y Norberto Judewicz, por la ayuda y compañía que me brindaron.

A los Dres. Luis Molina y Vedia y Alberto Ochoa, por su grata amistad y la orientación que me dieron en mis primeros pasos en el campo de la investigación.

Al Dr. Alejandro Paladini, por su amistad y compañía durante todos estos largos años de trabajo.

A todos mis compañeros y amigos del INGEBI, por haber compartido los buenos y malos momentos.

A Martín Crespi, Héctor Martínez y Eduardo Orti, por la alegre compañía y colaboración brindadas.

A Adriana Urman, por su paciente y cuidadosa labor dactilográfica.

A Beile Wolf, por la ayuda brindada desde el área administrativa.

A Norberto Malarini, por su buen humor y compañía.

A Norberto Contreras, Gabriel Paissán, Claudio Alonso, Facundo Batista, María Alvarez y Leonor Acevedo, por su esmerada asistencia técnica.

Al Lic. Luis Giavedoni, por su valioso aporte en los experimentos de diagnóstico.

Al Ing. Agrónomo Sergio Nome, por la propagación de la cepa viral de PVXc.

A los miembros del IIB-Fundación Campomar, lugar donde me inicié en el campo de la investigación.

A Daniel Vallina, por la excelente labor gráfica y fotográfica.

I N D I C E

CAPITULO I: INTRODUCCION.....	1
1.1. Clasificación.....	2
1.2. Características de las enfermedades producidas por los virus vegetales.....	3
1.2.1. Concepto de enfermedad generalizada.....	3
1.2.2. Persistencia de la enfermedad viral.....	6
1.2.3. Principales síntomas externos.....	7
1.2.4. Inclusiones: síntoma interno específico.....	8
1.2.5. Vías de infección.....	12
1.2.6. Influencia del entorno.....	13
1.3. Arquitectura de los virus vegetales.....	13
1.3.1. Virus helicoidales.....	14
1.3.2. Virus icosaédricos.....	14
1.3.3. Rhabdovirus: simetría helicoidal con envoltura.....	16
1.4. Estructura nucleotídica de los virus a RNA monocatenario.....	19
1.4.1. Estructura en los extremos 5'.....	19
1.4.1.a. <i>Cap</i>	19
1.4.1.b. Proteína <i>VPg</i>	21
1.4.1.c. Grupo fosfato.....	21
1.4.2. Estructuras en el extremo 3'.....	21
1.4.2.a. Estructuras tipo tRNA.....	21
1.4.2.b. Poliadenilación.....	22
1.4.2.c. Extremos 3' afines a proteínas de la cápside.....	22
1.5. Estrategias de traducción de los RNA virales.....	24
1.5.1. Los Tobamovirus: Estrategia de marcos de lectura superpuestos y RNAs subgenómicos.....	24
1.5.2. Tobravirus y Cucumovirus: Estrategia de genoma dividido y RNA subgenómico.....	26

1.5.3.	Comovirus: Estrategia de genoma dividido y clivaje de poliproteínas.....	27
1.5.4.	Potyvirus: Estrategia de clivaje de una poliproteína.....	28
1.5.5.	Tymovirus: Estrategia conjunta de tres mecanismos. Superposición de marcos de lectura, RNA subgenómico y clivaje postraduccional.....	30
1.6.	Replicación de los RNAs virales.....	31
1.6.1.	RNA polimerasas - RNA dependientes.....	31
1.6.2.	Replicasas.....	31
1.6.3.	Origen de los RNAs subgenómicos.....	32
1.7.	Replicación de virus a RNA de polaridad negativa.....	33
1.8.	replicación de virus a DNA de doble cadena.....	34
1.9.	El grupo de los Potexvirus.....	36
1.9.1.	Clasificación.....	36
1.9.2.	Patologías causadas por los Potexvirus.....	38
1.9.2.1.	Sintomatología.....	38
1.9.2.2.	Localización interna: formación de cuerpos de inclusión.....	38
1.9.2.3.	Rango de huésped: 600 especies de 38 familias.....	40
1.9.2.4.	Tipos de transmisión: mecánica sin vectores	40
1.9.3.	Arquitectura de los Potexvirus.....	43
1.9.4.	Parámetros fisicoquímicos de los Potexvirus.....	44
1.9.5.	Estructura nucleotídica: <i>Cap</i> en el extremo 5' y poli(A) en el extremo 3'.....	46
1.9.6.	La relación ácido nucleico-proteína.....	47
1.9.7.	Estrategias de traducción y replicación.....	50
1.9.7.a.	Replicación.....	50
1.9.7.b.	Traducción.....	52
1.10.	Virus de la papa X.....	56
1.10.1.	Generalidades.....	56
1.10.2.	Estructura viral.....	57

1.10.3.	Cepas de PVX.....	59
1.10.4.	Sintomatología en plantas de papa.....	59
1.10.4.a.	Sintomas externos.....	59
1.10.4.b.	Localización interna.....	60
1.10.5.	Rango de huésped.....	60
1.10.6.	Tipo de transmisión.....	61
1.10.7.	Serología.....	61
1.10.8.	Control.....	62
1.10.9.	Estrategias de replicación y traducción.....	62
1.10.9.a.	Estrategias de traducción.....	62
1.10.9.b.	Estrategias de replicación.....	63

CAPITULO II: OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS.....64

CAPITULOS III Y IV: MATERIALES Y METODOS.....66

3.1.	Cepas bacterianas.....	67
3.2.	Medios de cultivo.....	67
3.3.	Reactivos.....	68
4.1.	Cepa viral.....	72
4.2.	Propagación del PVX.....	72
4.3.	Purificación del PVX.....	72
4.4.	Purificación de RNA viral.....	74
4.5.	Purificación de DNA.....	74
4.5.1.	Purificación de DNA plasmídico.....	74
4.5.1.a	Purificación de DNA en gran escala.....	74
4.5.1.b	Purificación de DNA en pequeña escala.....	76
4.5.2.	Purificación de DNA de bacteriófago M13	77
4.5.2.a	Purificación de DNA doble cadena en gran escala.....	77

4.5.2.b	Purificación de DNA simple cadena en pequeña escala.....	78
4.5.3.	Purificación de DNA de fagósmido.....	79
4.5.3.a	Purificación de DNA doble cadena de fagósmido KS.....	79
4.5.3.b	Purificación de DNA simple cadena de fagósmido KS....	80
4.6.	Síntesis de DNA copia por el método de la ribonucleasa H.....	80
4.6.a	Tratamiento del RNA con metilmercurio.....	80
4.6.b	Síntesis de la primera cadena del DNA copia (cDNA)...	80
4.6.c	Síntesis de la segunda cadena.....	81
4.6.d	Rellenado de posibles extremos 3' recesivos por el método de <i>fill-in</i>	82
4.6.e	Ligado del cDNA a un plásmido vector.....	83
4.7.	Ligado de fragmentos de DNA a vectores.....	83
4.7.1.	Preparación de los vectores.....	83
4.7.2.	Ligado de fragmentos de DNA en los vectores.....	85
4.8.	Transformación de células de <i>E. coli</i>	86
4.8.1.	Preparación de células competentes HB101 y NM522.....	86
4.8.2.	Preparación de células competentes JM101.....	87
4.8.3.	Transformación de células competentes.....	88
4.8.3.a	Transformación de células JM101.....	88
4.8.3.b	Transformación de células HB101 y NM522.....	89
4.9.	Hibridación <i>in situ</i> de colonias bacterianas y placas de bacteriófagos.....	89
4.9.1.	Hibridación de DNA de colonias bacterianas.....	89
4.9.1.a	Prehibridación.....	90
4.9.1.b	Hibridación.....	90
4.9.1.c	Lavados.....	90
4.9.2.	Hibridación de DNA de colonias bacterianas con oligonucleótidos sintéticos.....	91
4.9.2.a	Prehibridación.....	91
4.9.2.b	Hibridación.....	91
4.9.2.c	Lavados.....	92

4.9.3.	Hibridación de DNA de placas de bacteriófagos.....	92
4.9.3.a	Prehibridación.....	92
4.9.3.b	Hibridación.....	93
4.9.3.c	Lavados.....	93
4.10.	Uso de endonucleasas de restricción.....	93
4.11.	Marcación radioactiva de RNA.....	94
4.11.1	Marcación por fosforilación de extremos 5'.....	94
4.11.2.	Marcación por <i>priming at random</i> (iniciaciones al azar).....	95
4.12.	Marcación de DNA.....	96
4.12.1.	Marcación por el método de <i>fill-in</i>	96
4.12.2	Marcación por <i>nick translation</i> (desplazamiento del corte).....	98
4.12.3.	Marcación radioactiva de DNA por <i>priming at random</i> ...	98
4.13.	Electroforesis en geles.....	99
4.13.1.	Geles de agarosa.....	99
4.13.1.a	Geles de agarosa comunes.....	99
4.13.1.b	Geles desnaturalizantes de formaldehído.....	100
4.13.1.c	Buffers de siembra.....	101
4.13.2.	Geles de poliacrilamida.....	101
4.13.2.a	Geles de poliacrilamida nativos.....	102
4.13.2.b	Geles de poliacrilamida desnaturalizantes.....	102
4.14.	Purificación de fragmentos de DNA.....	104
4.14.1.	Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	104
4.14.1.a	Electroelución.....	104
4.14.1.b	Adsorción a matriz de sílica.....	104
4.14.2.	Purificación de fragmentos de DNA de geles de poliacrilamida.....	105
4.15.	Autorradiografías.....	106
4.16.	Transferencia de RNA (Técnica de Northern).....	106
4.17.	Transferencia de DNA	107
4.17.1.	Técnica de <i>Southern</i>	107

4.17.2.	Sembrado de <i>dots</i>	108
4.18.	Hibridación de RNA y DNA.....	108
4.18.1.	Hibridación con membranas de nitrocelulosa.....	108
4.18.1.a	Prehibridación.....	108
4.18.1.b	Hibridación.....	109
4.18.1.c	Lavados.....	109
4.18.2.	Hibridación con membranas de nylon.....	109
4.18.2.a	Prehibridación.....	109
4.18.2.b	Hibridación.....	110
4.18.2.c	Lavados.....	110
4.19.	Secuenciación de DNA por el método de los dideoxinucleótidos terminadores.....	110
4.19.1.	Secuenciación por el método de Sanger con la enzima de Klenow.....	111
4.19.1.a	Apareamiento.....	111
4.19.1.b	Secuenciación propiamente dicha.....	111
4.19.2.	Secuenciación por el método de Sanger con la enzima DNA polimerasa de bacteriófago T7.....	113
4.19.2.a	Mezcla de apareamiento.....	113
4.19.2.b	Secuenciación propiamente dicha.....	114
4.20.	Análisis de datos de secuencias.....	115

CAPITULO V: RESULTADOS.....116

5.1.	Clonado molecular del genoma del PVX.....	117
5.1.1.	Purificación de partículas virales de PVX.....	117
5.1.2.	Purificación del RNA viral.....	117
5.1.3.	Síntesis de DNA copia (cDNA).....	119
t5.1.4.	Transformación y selección de clones recombinantes..	123
5.2.	Caracterización de los clones positivos.....	123
5.2.1.	Selección de clones de mayor tamaño.....	123

5.2.2.	Análisis de los clones positivos por la técnica de <i>Northern</i>	124
5.2.3.	Mapeo de restricción.....	126
5.3.	Secuenciación de la primera <i>library</i> obtenida de PVX.....	126
5.3.1.	Elección del vector y cepas adecuados.....	126
5.3.2.	Subclonado en M13.....	129
5.3.3.	Análisis de los subclones. Positividad. Polaridad...	129
5.3.4.	Secuenciación.....	130
5.4.	Estrategias de clonado molecular.....	135
5.4.1.	Estrategia de <i>shot-gun</i>	135
5.4.2.	Aislamiento de secuencias correspondientes al extremo 3'.....	141
5.5.	Obtención y secuenciación de clones correspondientes a la proteína de cubierta.....	143
5.6.	Desarrollo de una sonda molecular para diagnóstico de PVX.....	147
 CAPITULO VI: DISCUSION.....		151
 CAPITULO VII: BANCO DE CLONES.....		166
 CAPITULO VIII: BIBLIOGRAFIA.....		184

ABREVIATURAS EMPLEADAS

cDNA:	Acido desoxirribonucleico copia
mRNA:	Acido ribonucleico mensajero
sgmRNA:	Acido ribonucleico mensajero subgenómico
sgRNA:	Acido ribonucleico subgenómico
BSA:	seroalbúmina bovina
CIP:	fosfatasa alcalina de intestino de ternera
PEG:	polietilenglicol
Hepes:	ácido N-2-Hidroxietilpiperazin-N'-2-etansulfónico
Tris-base:	Tris(hidroximetil)aminometano
Pipes:	ácido piperazin-N,N'-bis(2-etansulfónico)
IPTG:	isopropil β -D-tiogalactósido
MOPS:	ácido 3-(N-morfolino)propansulfónico
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido
DTT:	ditiotreitol
SDS:	Lauril sulfato de sodio
RNasaA:	Ribonucleasa A de páncreas bovino
DO:	densidad óptica
dNTPs:	mezcla de los 4 deoxinucleósidos trifosfato
EDTA:	etilendiaminotetraacetato disódico.

Código de una sola letra para aminoácidos

A: alanina; C: cisteína; D: ácido aspártico; E: ácido glutámico;
F: fenilalanina; G: glicina; H: histidina; I: isoleucina;
K: lisina; L: leucina; M: metionina; N: asparagina; P: prolina;
Q: glutamina; R: arginina; S: serina; T: treonina; V: valina;
W: triptofano; Y: tirosina.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Las enfermedades producidas por virus vegetales son causa de pérdidas considerables en la producción agrícola mundial. La viruela o *Sharka* de los durazneros, damascos y ciruelos ha diezmando en los últimos 15 años este conjunto de frutales en Francia, así como la Tristeza había destruido, 20 años antes, los cítricos en América del Sur. La acción conjunta del *Potato Leaf Roll Virus* (PLRV) y del *Potato Virus Y* (PVY) de la papa, ha producido un degeneramiento considerable en esta especie. El *Rice Dwarf Virus* (RDV), el *Tomato Spotted Wilt* (TSWV) y el *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), son capaces de afectar el 100% de las producciones de arroz, tomate y melón, respectivamente, en ciertos años y en determinadas regiones europeas (Bols, L., 1982).

En términos generales, se puede afirmar que los virus que atacan al hombre y a otros animales han interesado mucho más a los investigadores que los virus vegetales. Es notable el hecho que el Virus del Mosaico del Tabaco haya sido el primer virus descrito en 1883 por Adolf Mayer y recién 99 años más tarde, en octubre de 1982, se reportó su secuencia nucleotídica completa (Goelet, P. *et al*, 1982).

1.1. CLASIFICACION

Se ha intentado clasificar a los virus vegetales de acuerdo a distintos criterios, tales como la morfología del virión, el rango de huésped, o la serología (Van Regenmortel, M.H.-V., 1982). La clasificación utilizada actualmente se basa en la naturaleza y estructura del material genético viral (Matthews, R.E.F., 1981).

El genoma de los virus vegetales puede ser a DNA o a RNA, monocatenario o bicatenario; la simetría del virus puede ser helicoidal o icosaédrica. En la Tabla 1.1 se muestran los distin-

tos grupos virales actualmente aceptados y sus miembros tipo. En la Figura 1.1 se puede apreciar un diseño esquemático de estos mismos grupos representativos.

La gran mayoría de los virus vegetales poseen genomas a RNA; excepto para aquéllos asociados con las familias *Reoviridae* (genoma a RNA bicatenario) y *Rhabdoviridae* (genoma a RNA monocatenario), dichos genomas tienen polaridad positiva. Esto significa que el RNA viral tiene la misma polaridad que un RNA mensajero (mRNA). En algunos de estos virus el genoma completo está compuesto por una sola molécula de RNA (genoma monopartito) mientras que en otros está compuesto por dos o tres moléculas (genomas bi y tripartitos, respectivamente).

1.2. CARACTERISTICAS DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR LOS VIRUS VEGETALES

Las virosis vegetales son generalizadas, persistentes, frecuentemente transmitidas por insectos y ocasionan a la planta síntomas variables que generalmente no producen la muerte de los tejidos (Cornuet, P. 1987).

1.2.1. Concepto de enfermedad generalizada

El desarrollo de una enfermedad generalizada sirve usualmente para distinguir entre las enfermedades causadas por virus y las causadas por bacterias, que generalmente producen síntomas localizados, permaneciendo sano el resto de los tejidos. Las virosis vegetales, por el contrario, afectan paulatinamente todas las partes de la planta: raíz, tallo, hojas y flores. Es claro que, en este proceso, existen numerosas excepciones y límites.

Virus a DNA bicatenario Caulimovirus	miembro tipo: <i>Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)</i>
Virus a DNA monocatenario Geminivirus	miembro tipo: <i>Maize Streak Virus (MSV)</i>
Virus a RNA bicatenario Reoviridae	miembro tipo: <i>Wound Tumor Virus (WTV)</i>
Virus a RNA monocatenario con envoltura Rhabdoviridae <i>Tomato Spotted Wilt</i>	miembro tipo: <i>Potato Yellow Dwarf Virus (PYDVP)</i> miembro tipo: <i>TSWV</i>
Virus a RNA monocatenario, monopartitos de simetría icosaédrica <i>Maize Chlorotic Dwarf Virus</i> Tymovirus Luteovirus Tomusvirus Sobemovirus Tobacco Necrosis Virus	miembro tipo: <i>BCDV</i> miembro tipo: <i>Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV)</i> miembro tipo: <i>Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV)</i> miembro tipo: <i>Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV)</i> miembro tipo: <i>Southern Bean Mosaic Virus (SBMV)</i> miembro tipo: <i>TMV</i>
Virus a RNA monocatenario, bipartitos de simetría icosaédrica Nepovirus Comovirus <i>Pea Enation Mosaic Virus</i>	miembro tipo: <i>Tobacco Ringspot Virus (TRSV)</i> miembro tipo: <i>Cowpea Mosaic Virus (CPMV)</i> miembro tipo: <i>PEMV</i>
Virus a RNA monocatenario, tripartitos de simetría icosaédrica Cucunovirus Bromovirus Ilarvirus	miembro tipo: <i>Cucumber Mosaic Virus (CMV)</i> miembro tipo: <i>Brome Mosaic Virus (BMV)</i> miembro tipo: <i>Tobacco Streak Virus (TSV)</i>
Virus a RNA monocatenarios, monopartitos de simetría helicoidal Tobamovirus Potexvirus Potyvirus Carlavirus Closterovirus	miembro tipo: <i>Tobacco Mosaic Virus (TMV)</i> miembro tipo: <i>Potato Virus X (PVX)</i> miembro tipo: <i>Potato Virus Y (PVY)</i> miembro tipo: <i>Carnation Latent Virus (CLV)</i> miembro tipo: <i>Beet Yellow Virus (BYV)</i>
Virus a RNA monocatenario, bipartitos de simetría helicoidal Tobravirus	miembro tipo: <i>Tobacco Rattle Virus (TRV)</i>
Virus a RNA monocatenario, multipartito de simetría helicoidal Hordeivirus	miembro tipo: <i>Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV)</i>

TABLA 1.1

CLASIFICACION DE LOS VIRUS VEGETALES

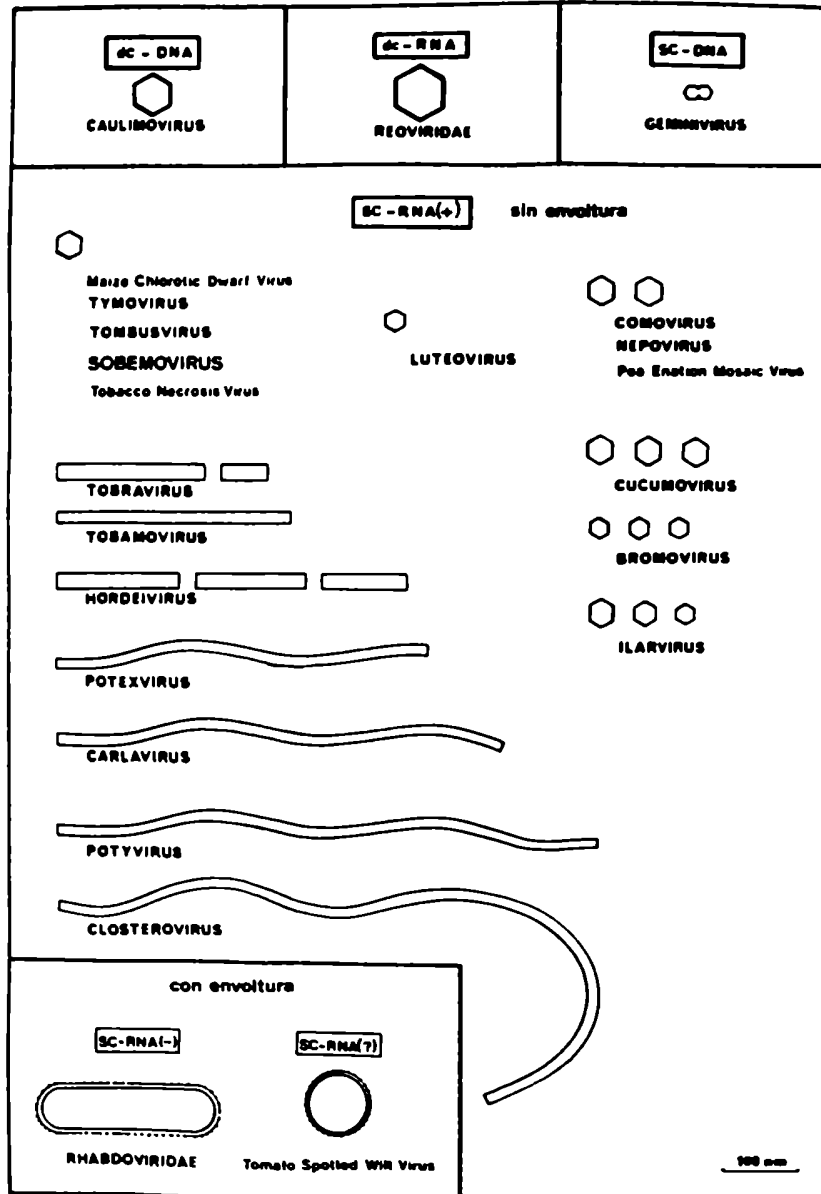


FIGURA 1.1: Familias y grupos de los virus vegetales

Introducción

La infectividad del virus en el tejido vegetal es función de: 1) su velocidad de replicación; 2) su capacidad de migración; y 3) la reacción de la planta huésped frente a estas dos primeras características. La interacción entre estas variables puede crear un amplio espectro de situaciones.

Existe una fuerte heterogeneidad en la distribución de un virus vegetal a nivel tisular y celular. A nivel de la célula, numerosos virus se acumulan en el citoplasma, otros lo hacen en vesículas citoplasmáticas (como el *Cowpea Mosaic Virus*), y otros, como el *Pea Enation Mosaic Virus*, se sitúan en el núcleo.

A nivel tisular, la especialización es aún más marcada que en los virus que atacan a los animales. Se distinguen dos grupos principales: 1) los virus que provocan "mosaico" que invaden generalmente tejido de los parénquimas lacunar y de empalizada y 2) los virus que producen amarilleamiento (por ejemplo, *Luteovirus*) que se localizan en el liber (o corteza interna) y células adyacentes.

Es generalmente aceptado que los meristemas vegetales permanecen libres de virus. Esto puede deberse a que los virus no pueden alcanzar las células meristemáticas o a que son inactivados a medida que avanzan hacia ellas. En oposición a esto se han encontrado "paquetes" de partículas virales en cortes de ápices meristemáticos de *Cymbidium* infectado con *Odontoglossum Ringspot Virus* (ORSV), aunque el cultivo *in vitro* de estos cortes permitió obtener plantas sanas.

1.2.2. Persistencia de la enfermedad viral

Los virus vegetales provocan enfermedades persistentes. Esto quiere decir que una vez que la planta ha sido infectada, lo estará para el resto de su existencia (Cornuet, P. 1987).

Introducción

En el ser humano y en los animales hay varios mecanismos de reacción ante las infecciones, por ejemplo la fiebre, el sistema inmunitario y también la inducción de interferón, siendo éste último específicamente antiviral. En las plantas, los dos primeros mecanismos mencionados no existen y en cuanto a los llamados "interferones vegetales", las moléculas que aparecen en el momento de la infección con actividad comparable a la del animal son, en la mayoría de los casos, notoriamente insuficientes para detener la progresión del virus.

La epidemiología de las virosis vegetales es influenciada así por la persistencia de la infección. El vegetal enfermo permanece como una fuente de virus toda su vida y la epidemia progresa lenta e inexorablemente sin riesgo de extinguirse.

Las virosis vegetales no sólo son persistentes, sino también incurables. En este punto, los virus animales y vegetales están en el mismo nivel. Actualmente existen numerosos inhibidores de la replicación viral pero, debido a su toxicidad para la célula, son inutilizables. Sólo se han registrado curaciones en casos excepcionales y en condiciones muy particulares con análogos de bases, de nucleósidos o de nucleótidos. Un análogo de la guanina, el viricida 1β -D-ribofuranosil-1,2,4-triazo-3-carbámidá, demostró ser activo en la planta 24 horas antes de la inoculación con *Turnip Yellow Mosaic Virus* (TYMV).

1.2.3. Principales síntomas externos

Los síntomas de las enfermedades producidas por virus vegetales constituyen otro grupo de caracteres originales. Aunque por el momento no se sabe a qué corresponden a nivel molecular, puede imaginarse globalmente que los síntomas virales resultan de la interacción entre el efecto depresivo de la multiplicación del virus y la reacción de defensa de la planta.

Introducción

Es probable que, además del efecto de competencia por los aminoácidos y los nucleótidos durante la replicación viral, se ocupen, en el transcurso de este proceso, sitios de la membrana celular que acarreen el bloqueo de funciones importantes. En la Tabla 1.2 se muestra la correlación entre distintos grupos de síntomas y los orígenes probables.

1.2.4. Inclusiones: síntoma interno específico

Dentro de las células de plantas infectadas se pueden observar diversos elementos asociados a la infección viral. Estos elementos, visibles con microscopio óptico, constituyen las denominadas inclusiones.

Las mismas pueden ser cristalinas o amorfas y se observan mejor dentro de células donde la infección es de larga data. Están constituidas por acúmulos de partículas virales o de proteínas codificadas por el virus. No se sabe si provienen de una superproducción de virus o de elementos de origen viral o de una asociación de proteínas virales con proteínas del huésped. Cualquiera sea su origen, las inclusiones son en general específicas del virus y de la cepa y hay métodos de diagnóstico basados en la observación de estos elementos. A continuación se dan algunos ejemplos del tipo de inclusiones producidas por determinados virus:

a) En las células basales de los pelos epidérmicos de hojas de tabaco infectadas con *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) se encuentra tres tipos de inclusiones:

1. Placas cristalinas hexagonales constituidas mayormente por partículas virales.

SINTOMA	ORIGEN SECUNDARIO
Enanismo, achicamiento de los entrenudos y disminución del tamaño de las hojas.	Competencia entre los metabolismos viral y del huésped. Disminución del sistema radicular. Posible acción de los virus y viroides a nivel de los intrones.
Mosaico, decoloración de nervaduras o de la zona internerval (<i>vein banding</i>)	Acción de los virus a nivel de los cloroplastos con localización del efecto a ciertas zonas de la hoja.
Amarilleamiento general, enrulamiento y endurecimiento del limbo; a veces, marchitamiento.	Los virus se multiplican en el <i>líber</i> y perturban las funciones conductoras del tejido. Acumulación de calosa en el <i>líber</i> . Bloqueo del metabolismo de azúcares, acumulación de almidón en las hojas.
Deformación por enrizamiento, reducción del limbo con modificación de la forma.	Bloqueo de la elongación celular en determinados macizos de células y crecimiento normal del resto del limbo.
Ramas aplastadas o proliferantes.	Acción sobre la morfogénesis.
Excrecencias, tumores.	Estimulación del crecimiento de determinados macizos celulares.
Manchas cloróticas y necróticas localizadas, líneas sinuosas necróticas o cloróticas sobre las hojas, arabescos. Estriás necróticas o cloróticas sobre las hojas elongadas	Reacción de defensa del huésped provocando la muerte celular y, a veces, la circunscripción del virus.
Disminución de la capacidad de reproducción sexual de la planta. Malformación del polen, esterilidad de los óvulos, aborto, inhibición de la germinación.	Estos síntomas pueden ser debidos a la localización específica de los virus en los órganos reproductores o al resultado de deficiencias metabólicas generales.

TABLA 1.2

ORIGENES SECUNDARIOS DE LOS SINTOMAS PRODUCIDOS
POR VIROSIS VEGETALES

Introducción

2. Paracristales o masas de agujas cristalinas constituidas por partículas virales.

3. Cuerpos X, inclusiones amorfas constituidas por los llamados túbulos X de vacuolas y organelas del huésped que comprenden retículo y ribosomas (Christie, R.G. *et al*, 1977).

b) Los Potyvirus son particularmente ricos en diversos tipos de inclusiones. En este grupo se distinguen:

1. Inclusiones citoplasmáticas cilíndricas en forma de molinete (*pinwheel*) que pueden ser cilíndricas propiamente dichas o cónicas. Posiblemente estos elementos sirvan para la migración del virus de una célula a otra.

2. Inclusiones citoplasmáticas amorfas. Son muy difíciles de ver y están constituidas por un núcleo de proteínas idénticas a las de las inclusiones cilíndricas rodeado de proteínas del factor *Helper* (factor proteico codificado por el virus cuya función está asociada a la transmisión por insectos) (de Mejía, M.V.G. *et al*, 1985).

3. El *Tobacco Etch Virus* (TEV) produce dentro del núcleo de las células infectadas inclusiones típicas en forma de placas perfectamente cuadradas. Las mismas podrían ser el resultado de la acumulación de una proteína asociada a la replicación viral (Dougherty, W.G. *et al*, 1980).

En la Figura 1.2 se observan algunos ejemplos de estas inclusiones.

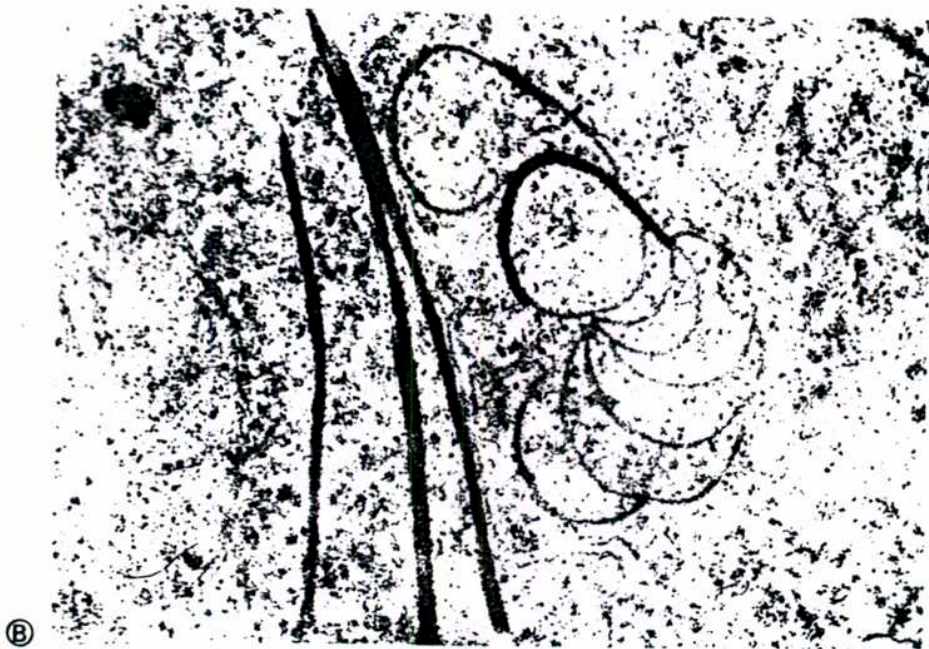
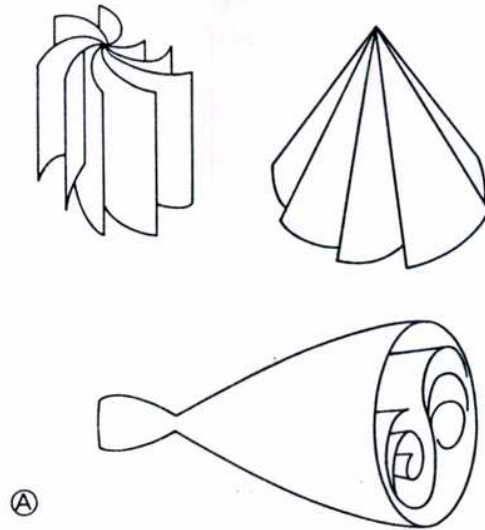


FIGURA 1.2: Inclusiones características de los Potyvirus. A: Diseño esquemático de los molinetes o *pinwheels*. B: Microscopía electrónica de los mismos.

1.2.5. Vías de infección

En numerosas enfermedades comunes de las plantas se encuentran generalmente esporas adaptadas a la diseminación por aire o por agua. En el caso de los virus vegetales, no hay una contaminación directa por polución del aire o del agua. Es necesario que haya un contacto real entre la planta enferma y la planta sana, ya sea a través de heridas recíprocas o más comúnmente, por un vector animal (suelen ser insectos) que tome el virus de una planta enferma, lo transporte y lo inocule en una planta sana.

Cada virus está asociado, con una gran especificidad, a un tipo determinado de vector. A nivel molecular, se podría concebir que ciertas secuencias de aminoácidos de la superficie de la cápside viral tienen una alta afinidad por las proteínas estructurales de la superficie de ciertos órganos del vector (estiletes del pulgón u odontostilo de nematodo). Así, es muy común que los virus que originalmente infectaban plantas salvajes requiriesen vectores de transmisión persistente ya que no era usual que dichas plantas estuviesen cercanas las unas a las otras.

Para ciertos virus vegetales, es posible la transmisión por semilla, polen o por contacto directo. Los Potexvirus, por ejemplo, se encuentran en alta concentración dentro de la célula, siendo éste uno de los factores que le permiten transmitirse por contacto directo de planta a planta; por otra parte, no cuentan con insectos vectores. Este tipo de virus (es decir, no transmisibles por vectores) sólo se encuentra en cultivos que reúnen un gran número de individuos sensibles y genéticamente idénticos, como ser la papa o plantas hortícolas sometidas a un modo de multiplicación anormal. Así, estos tipos de virus están asociados a la agricultura y horticultura.

Los Ilarvirus están adaptados a la transmisión por polen; por este motivo se encuentran en árboles frutales donde cada individuo produce una gran cantidad de polen, que compensaría en parte la ineficacia de este tipo de transmisión.

Evidentemente la agricultura (y principalmente el modo de propagación vegetativa) es una causa del desarrollo de enfermedades a virus. Todas las especies donde se utilizan tubérculos, bulbos, estolones, acodos, esquejes e injertos para la multiplicación acumulan diversos virus, ya que la infección es persistente. De todos estos, aquellos virus transmitidos por semilla son la causa actual de las principales pérdidas en agricultura.

1.2.6. Influencia del entorno

Las enfermedades producidas por virus vegetales son muy sensibles a la influencia del medio, de la nutrición, de la luz ambiente, de la temperatura y de la humedad. Estos factores pueden intervenir independientemente o en conjunto para modificar los síntomas. El clima especializa el tipo de enfermedad y puede tornar en predominante un número restringido de posibles transmisiones. En clima seco, desértico o muy frío, la mayoría de los virus se transmiten por semilla.

1.3. ARQUITECTURA DE LOS VIRUS VEGETALES

Los virus vegetales son simétricos, ya sea respecto a un eje o a un punto. Existen tres grandes grupos de arquitecturas:

1. Los virus a simetría helicoidal que se presentan al microscopio electrónico bajo la forma de bastones rígidos o filamentos flexuosos.

2. Los virus isométricos o de simetría icosaédrica, que se representan como pequeñas esferas.

3. Los virus con envoltura. Son los más gruesos, su cuerpo es de simetría helicoidal y se encuentran recubiertos por una túnica lipoproteica.

1.3.1. Virus helicoidales

El virus más estudiado dentro de este tipo es el TMV. En 1941, Bernal y Fankuchen, por estudios de difracción de rayos X, anunciaron que este virus tenía simetría helicoidal. Se determinó que el paso de la hélice es de 2,3 nm y que sólo cada tres giros de hélice se tenía un número entero de subunidades proteicas, esto implica que hay $16 \frac{1}{3}$ subunidades por cada giro (Hirth, L. *et al*, 1981). En la Figura 1.3 se muestra un esquema de la estructura del TMV.

1.3.2. Virus icosaédricos

El icosaedro es un poliedro regular constituido por 20 caras triangulares equiláteras que determinan 12 vértices. Tiene 3 ejes de simetría: uno que pasa a través de los vértices, de orden 5; uno perpendicular al centro de los triángulos, de orden 3 y otro que pasa por el medio de las aristas, de orden 2. Este tipo de simetría implica que la construcción viral más simple requiere como mínimo de 60 subunidades proteicas, 3 para cada triángulo.

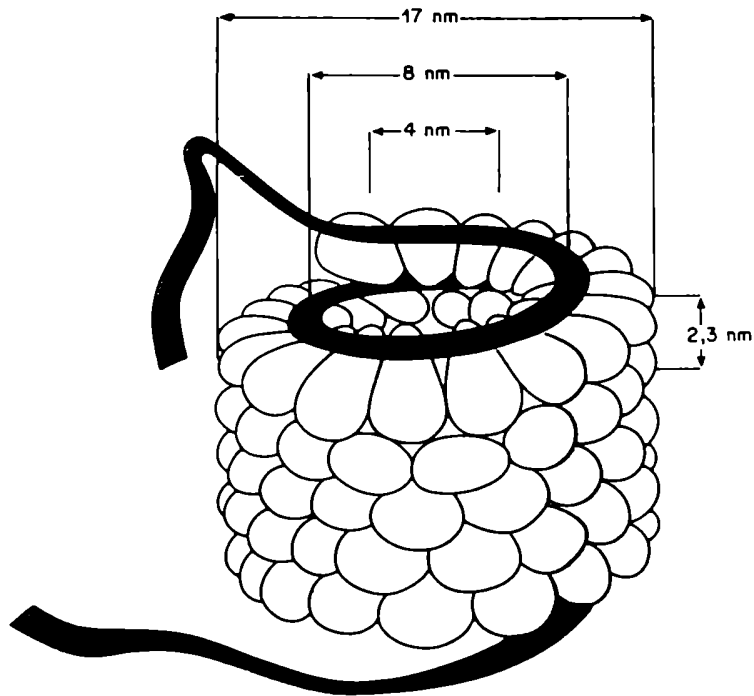


FIGURA 1.3: Virus de simetría helicoidal. Diseño esquemático de la estructura del TMV.

El TYMV fue uno de los primeros donde se estudió la simetría icosaédrica. Por estudios de difracción de rayos X se determinó que cada partícula viral está compuesta por 180 subunidades proteicas. Por microscopía electrónica se vio que está constituido por 12 grupos de 5 subunidades cada uno (grupos pentaméricos) en los vértices de orden 5 y por 20 grupos de 6 subunidades cada uno (grupos hexaméricos) en los vértices de orden 6 (Klug *et al*, 1966; Finch *et al*, 1966). La Figura 1.4 muestra un esquema del TYMV.

1.3.3. Rhabdovirus: simetría helicoidal con envoltura

Este tipo de arquitectura se diferencia de los dos anteriores por la presencia de una envoltura externa y por la naturaleza del genoma que es a RNA (-). Generalmente tiene una polimerasa asociada al virión.

Un Rhabdovirus típico está conformado por una envoltura externa constituida por dos capas lipídicas en las cuales están insertadas dos o tres tipos de proteínas y por una nucleocápside formada por RNA de polaridad negativa y proteínas virales asociadas en una estructura helicoidal laxa (Hull, R. 1976). La envoltura deriva del huésped y el virus la adquiere en el curso de la migración de la nucleocápside; puede provenir de la membrana nuclear interna, del retículo endoplasmático o de una membrana viroplásmica inducida por la infección. En la Figura 1.5 se observa un esquema de este tipo de virus.

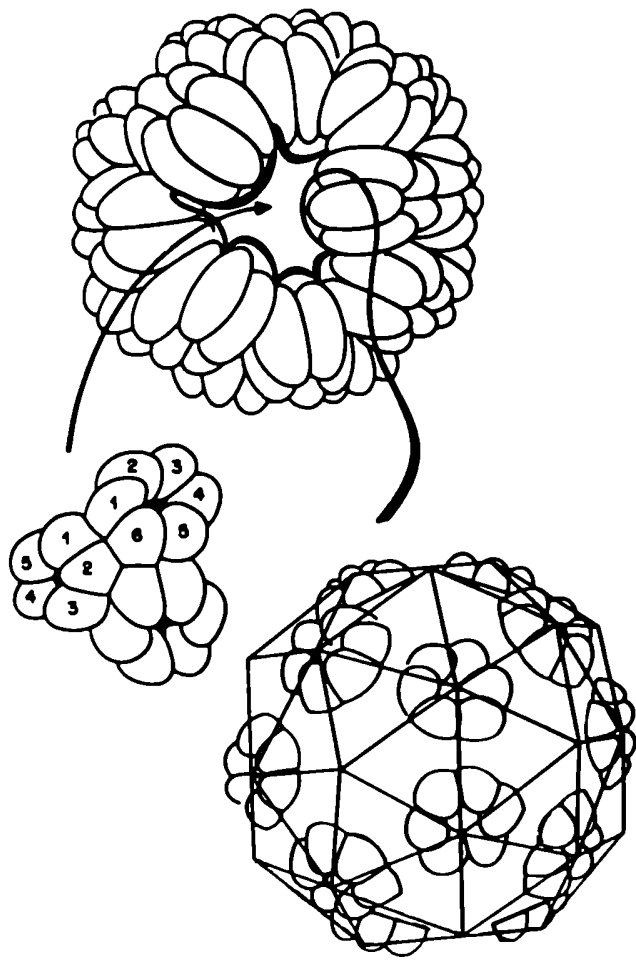


FIGURA 1.4: Virus de simetría icosaédrica. Diseño esquemático de la estructura del TYMV. Retirando de la partícula un pentámero y dos hexámeros se observa la disposición del RNA en el interior de la misma.

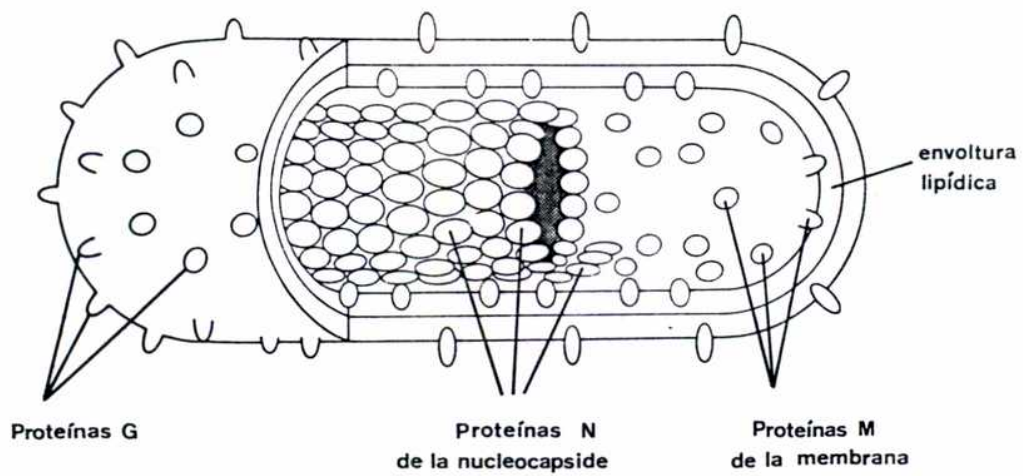


FIGURA 1.5: Virus de simetría helicoidal con envoltura. Diseño esquemático de la estructura de un Rhabdovirus.

1.4. ESTRUCTURA NUCLEOTIDICA DE LOS VIRUS A RNA MONO-CATENARIO

1.4.1. Estructura en los extremos 5'

Existen tres tipos de estructuras posibles en el extremo 5' de los RNA virales: a) tipo *cap*, b) proteína denominada *Vpg*, y c) fosfato terminal pppY.

En la Tabla 1.3 se detallan los tipos de estructura terminal correspondientes a distintos grupos virales. En la Figura 1.6 se muestra un esquema de estas estructuras.

1.4.1.a. *Cap*

Un gran número de virus vegetales tienen en el extremo 5' de su RNA genómico una estructura denominada *cap* constituida por una 7-metilguanosina unida por un puente trifosfato 5'-5' inusual al extremo 5' del RNA. Este tipo de estructura se encuentra también en la mayoría de los RNA mensajeros (mRNA) eucariotes. Comúnmente los dos primeros nucleótidos inmediatamente adyacentes a la guanosina terminal están metilados, pero en ningún virus vegetal se han observado estas metilaciones.

El *cap* parece ser importante en la traducción de los mRNA eucariotes donde contribuyen a la estabilidad del RNA y/o podrían servir para aumentar la afinidad por diversos factores de iniciación. Su función precisa es todavía desconocida.

Tipo de genoma	Grupo viral	Virus	Estructura terminal	
			5'	3'
monopartito	tobamo tymo potex poty luteo sobemo --	TMV TYMV PVX TEV PLRV SBMV SNV	<i>cap</i> <i>cap</i> <i>cap</i> VPg VPg VPg ppX	tRNA his tRNA val poli(A) poli(A) pXOH pXOH pXOH
bipartito	como nepo tobra --	CPMV TBRV TRV PEMV	VPg VPg <i>cap</i> VPg	poli(A) poli(A) pXOH pXOH
tripartito	bromo cucumo hordei ilar	BMV CMV BSMV AIMV	<i>cap</i> <i>cap</i> <i>cap</i> <i>cap</i>	tRNA tyr tRNA tyr tRNA tyr pXOH

TABLA 1.3

CLASIFICACION DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE VIRUS VEGETALES
A RNA CON LAS ESTRUCTURAS DE LOS EXTREMOS 5' Y 3'

1.4.1.b. Proteína VPg

La VPg es una pequeña proteína que algunos genomas tienen unida a su extremo 5'. Su nombre deriva de *Viral Protein genome linked*, su función no es muy clara y se ha postulado que podría servir de anclaje de la forma replicativa del genoma a alguna estructura celular. Es codificada por el genoma viral en forma de precursor de aproximadamente 12 Kd; en esta forma serviría de anclaje y una vez clivada tendría un peso molecular entre 4 Kd y 6 Kd. Está unida al RNA viral por un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo de una tirosina de la proteína y el fosfato del UMP, primer nucleótido del RNA. (Hari, V. 1981; Mayo, M.A. *et al*, 1982; Takegami, T. *et al*, 1983).

1.4.1.c. Grupo fosfato

Actualmente, se conoce un solo virus, el *Tobacco Necrotic Virus* y su satélite (STNV), que tienen este tipo de estructura elemental sin ninguna modificación. (Roman, R. *et al*, 1976; Leung, D.W. *et al*, 1976; Horst, J. *et al*, 1971).

1.4.2. Estructuras en el extremo 3'

En el extremo 3' del RNA viral pueden existir tres tipos de estructuras: a) tipo RNA de transferencia (*t-RNA like*); b) poliadeniladas; y c) secuencias con afinidad por la proteína de cubierta.

1.4.2.a. Estructuras tipo tRNA

Un aspecto interesante en algunos RNA virales es la aminoacilación del extremo 3' de sus genomas. Se cree que estos genomas tienen una estructura tipo tRNA que sería reconocida por tRNA amino acil sintetetasas específicas y podría estar involucrada en la regulación de la traducción del RNA viral (Joshi, S. *et al*, 1978; Pinck, M. *et al*, 1970; Yot, P. *et al*, 1970; Litvak, S. *et al*, 1973).

1.4.2.b. Poliadenilación

La mayor parte de los mRNAs eucariotes están poliadenilados en sus extremos 3'. Por el contrario, sólo algunos pocos virus vegetales tienen trectos de poli(A) en sus RNA genómicos. En caso de tenerlos, éstos están constituidos por aproximadamente 200 adenosinas. Se piensa que servirían de protección contra la acción de ciertas nucleasas.

1.4.2.c. Extremos 3' afines a proteínas de la cápside

Los RNAs de algunos virus no poseen estructuras particulares en sus extremos 3'. Dentro de esta clase de virus hay algunos, como el *Alfalfa Mosaic Virus* (AlMV) y el *Tobacco Streak Virus* (TSV)(ambos Ilarvirus) que presentan una particular afinidad por sus subunidades capsídicas (Houwing, C.J. *et al*, 1982). Se cree que esta unión sería necesaria para que la replicasa viral reconociera correctamente determinados segmentos del genoma.

Los Sobemovirus no tienen ninguna estructura particular en su extremo 3' ni afinidad alguna por subunidades capsídicas (Ghosh, A. *et al*, 1979).

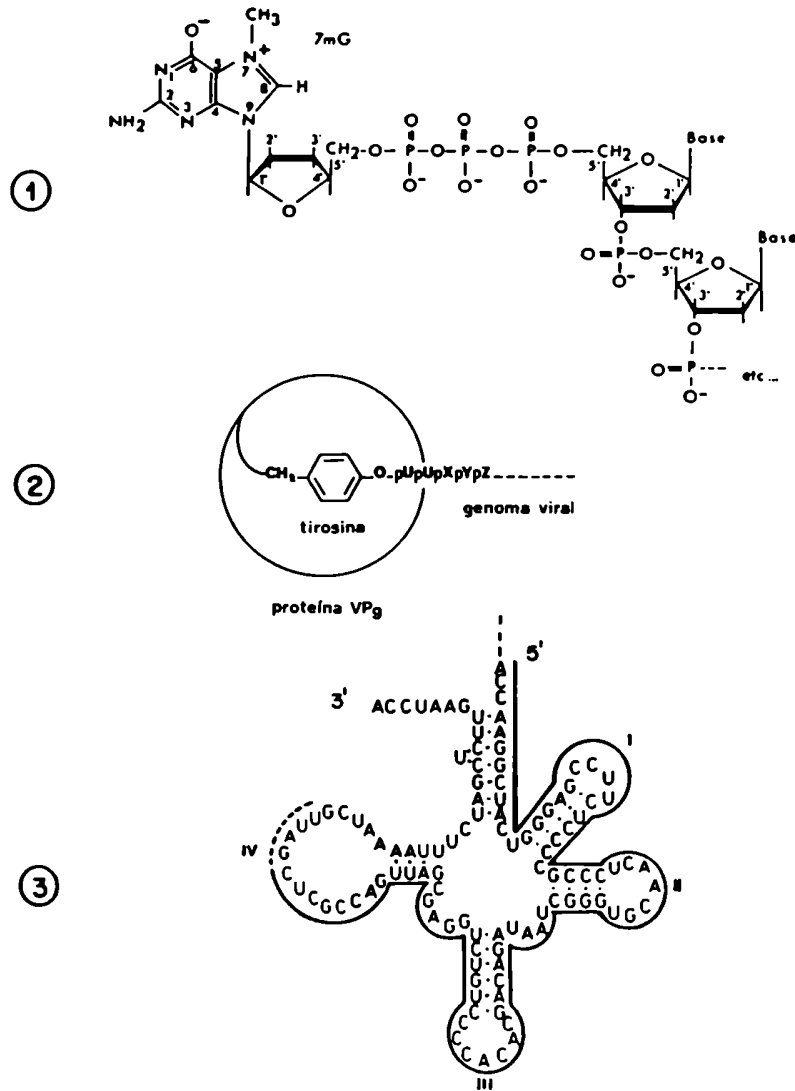


FIGURA 1.6: Estructuras de los extremos 5' y 3' del RNA de los virus vegetales. 1: Estructura del cap en el extremo 5'. 2: Unión de la proteína VPg al extremo 5'. 3: Estructura tipo tRNA en el extremo 3', en este caso, del RNA del TYMV. En III está el anticodón correspondiente al aminoácido valina.

1.5. ESTRATEGIAS DE TRADUCCION DE LOS RNA VIRALES

Además de las estrategias primarias de traducción que permiten que el RNA viral pueda ser leído en forma monocistrónica, existen estrategias secundarias que modulan la regulación de la traducción. Entre éstas se puede mencionar la síntesis diferencial de los RNA virales pertenecientes a un genoma dividido o de los RNAs subgenómicos. De este modo, en determinados momentos de la infección viral, puede haber mayor producción de una proteína en particular.

La encapsidación puede ser también un mecanismo de regulación. Existen sitios de iniciación de la encapsidación sobre el RNA genómico. Aquellos mensajeros (especialmente los subgenómicos) que no los posean nunca serán encapsidados y, por el contrario, aquellos mensajeros que posean dichas secuencias, sí lo podrán ser.

La presencia del *cap* y de otras estructuras en los extremos 3' y 5' representan también otros posibles mecanismos de regulación (Palukaitis, P., 1984; Davies, J.W. *et al*, 1982).

A continuación, se describen las estrategias de traducción de algunos virus vegetales que conforman los grupos más estudiados.

1.5.1. Los Tobamovirus: Estrategia de marcos de lectura superpuestos y RNAs subgenómicos

La expresión completa del genoma del TMV se efectúa por intermedio de dos RNAs subgenómicos (Hunter, T.R. *et al*, 1976; Zimmermann, D. 1975; Beachy, R.N. *et al*, 1977).

El primer marco de lectura abierto, próximo al extremo 5', codifica para una proteína de 126 Kd. El segundo marco de lectura abierto tiene su codón de iniciación dentro del primer marco en la misma fase y permite la síntesis de una proteína de 183 Kd. La síntesis de esta segunda proteína se produce por translectura del codón de terminación ámbar correspondiente a la proteína de 126 Kd. Estos datos son consistentes con observaciones de que el RNA de TMV puede ser traducido en sistemas libres de células dando como productos principales las proteínas de 126 Kd y 183 Kd. (Beachy, R.N. *et al*, 1977; Bruening, G. *et al*, 1976; Pelham, H.R.B., 1978). También se han obtenido los mismos resultados *in vivo* (Bruening, G. *et al*, 1976; Paterson, R. *et al*, 1975; Beier, M. *et al*, 1980).

La parte final del segundo marco de lectura abierto tiene cinco codones que se superponen con el marco de lectura que codifica para una proteína de 30 Kd. Esta proteína de 30 Kd es traducida a partir de un mensajero subgenómico y su eficiencia de traducción es bastante baja *in vivo*. (Beachy, R.N. *et al*, 1977).

También se encuentra otro RNA subgenómico más pequeño que codifica en forma muy eficiente para la proteína de cubierta (Guilley, H. *et al*, 1979). Ambos RNAs subgenómicos tienen *cap* en su extremo 5' (Zimmern, D. 1975).

En la Figura 1.7 se presenta un esquema de las estrategias de traducción descritas en esta sección para éste y otros virus vegetales.

1.5.2. Tobravirus y Cucumovirus: Estrategia de genoma dividido y RNA subgenómico

El primer virus en que se demostró la existencia de un genoma dividido fue el *Tobacco Rattle Virus* (TRV), perteneciente al grupo de los Tobravirus (Harrison, B.D. *et al*, 1978). Este virus tiene dos RNAs genómicos. El RNA 1 expresa *in vivo* e *in vitro* una proteína de 120 Kd y otra de 170 Kd; ambas, al igual que el TMV, tienen el mismo origen N terminal pero la segunda proviene del "salteo" o translectura del codón ámbar que determina el fin de la traducción de la primera (Pelham, H.R. 1979; Fritsch, C. *et al*, 1977). El RNA 2 codifica en primer término la proteína de la cápside de 22 Kd y también da origen a un RNA subgenómico que codifica para una proteína de 30 Kd. Estos datos han sido confirmados con experimentos de traducción *in vivo* e *in vitro* (Pelham, H.R. 1979; Mayo, M.A. *et al*, 1976; Fritsch, C. *et al*, 1977).

El *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), miembro tipo del grupo de los Cucumovirus, tiene un genoma dividido y encapsidado en tres partes que codifica cuatro proteínas. Dos de ellas son codificadas por los RNAs monocistrónicos 1 y 2. El RNA 3 codifica las otras dos proteínas, una de las cuales es la proteína de la cápside. La misma es traducida a partir de un RNA subgenómico. Todos estos RNAs, incluido el subgenómico, tienen estructuras del tipo *cap* en sus extremos 5' y están aminoacilados con tirosina en sus extremos 3'. (Kohl, R.J. *et al*, 1974; Francki, R.I.B. *et al*, 1979; Symons, R.H., 1975).

Otra característica importante de estos tipos de virus es que al estar el genoma segmentado y encapsidado en partes, cada una de las mismas puede expresarse simultáneamente desde el principio de la infección.

1.5.3. Comovirus: Estrategia de genoma dividido y clivaje de poliproteínas

Un tercer mecanismo importante combina el clivaje postraduccional con la existencia de un genoma dividido.

El *Cowpea Mosaic Virus* (CPMV), miembro tipo de los Comovirus, posee dos RNAs genómicos encapsidados independientemente. La cubierta de estos viriones está conformada por 60 subunidades de cada una de las dos proteínas capsídicas. Ambas proteínas son codificadas por el RNA genómico más pequeño y tienen un peso molecular de 23 Kd y 37 Kd, respectivamente (Goldbach, R. *et al*, 1980).

Cada uno de los RNA genómicos posee una VPg en el extremo 5' y tiene poliadenilado el extremo 3' (Daubert, S.D. *et al*, 1978; Stanley, J. *et al*, 1978; El Mann, M.M. *et al*, 1973). Los RNA genómicos no dan lugar a RNAs subgenómicos. El RNA de mayor tamaño es denominado RNA B y el más pequeño, RNA M.

El RNA B puede replicarse en las células vegetales pero sólo puede encapsidarse si está presente el RNA M, ya que éste es el que codifica las dos proteínas de la cápside (Van Kammen, A. 1967). En ensayos de traducción *in vitro* se observó que el RNA M produce dos proteínas, una de 105 Kd y otra de 95 Kd. Ambas tienen el mismo extremo C terminal ya que se conserva el mismo marco de lectura abierto. Se cree que esto es debido a que los ribosomas reconocen tanto al primer codón de iniciación como al segundo (Pelham, H.R.B. 1979; Goldbach, R. *et al*, 1981).

Las proteínas de la cápside de 37 Kd y 23 Kd se obtienen sólo si se agregan los productos de traducción del RNA B. Esto se debe a que el RNA B codifica una proteína que cli-

va a la proteína de 105 Kd (también a la de 95 Kd) en una de 58 Kd y en otra de 23 Kd (Franssen, H. *et al*, 1982). El RNA B se traduce primeramente en una poliproteína de 200 Kd que se auto-cliva dando la proteasa de 32 Kd, la VPg y otras tres proteínas, una de las cuales está íntimamente asociada con los complejos de replicación y tiene un peso molecular de 110 Kd (Franssen, H. *et al*, 1984b; Dorssers, L. *et al*, 1984). En la Figura 7 se muestra un esquema de esta estrategia.

1.5.4. Potyvirus: Estrategia de clivaje de una poliproteína

La estrategia de expresión seguida por los Potyvirus ha sido muy discutida y existe al respecto cierta controversia. Se sabe que no hay producción de RNAs subgenómicos en el transcurso de la infección (Dougherty, W.G. *et al.*, 1980; Dougherty, W.G., 1983), lo que reduciría las estrategias posibles a: a) síntesis de una poliproteína y posterior clivaje en proteínas funcionales o b) iniciación de la síntesis proteica en determinados sitios internos independientes. Los datos obtenidos recientemente tienden a apoyar la primer estrategia.

El *Tobacco Etch Virus* (TEV), el miembro más estudiado del grupo, ha sido completamente secuenciado y se tienen evidencias de que se sintetizaría una única poliproteína (Allison, R. *et al*, 1986). Los productos codificados por el genoma viral son: la VPg, la proteína de la cápside, el factor *Helper*, que es un factor proteico que permite al virus ser diseminado por pulgones y las proteínas constituyentes de los cuerpos de inclusión citoplasmáticos o "molinetes". Allison *et al* (1986) postularon que una de estas proteínas de inclusión, la de mayor tamaño (PM=54 Kd), tendría propiedades similares a las de

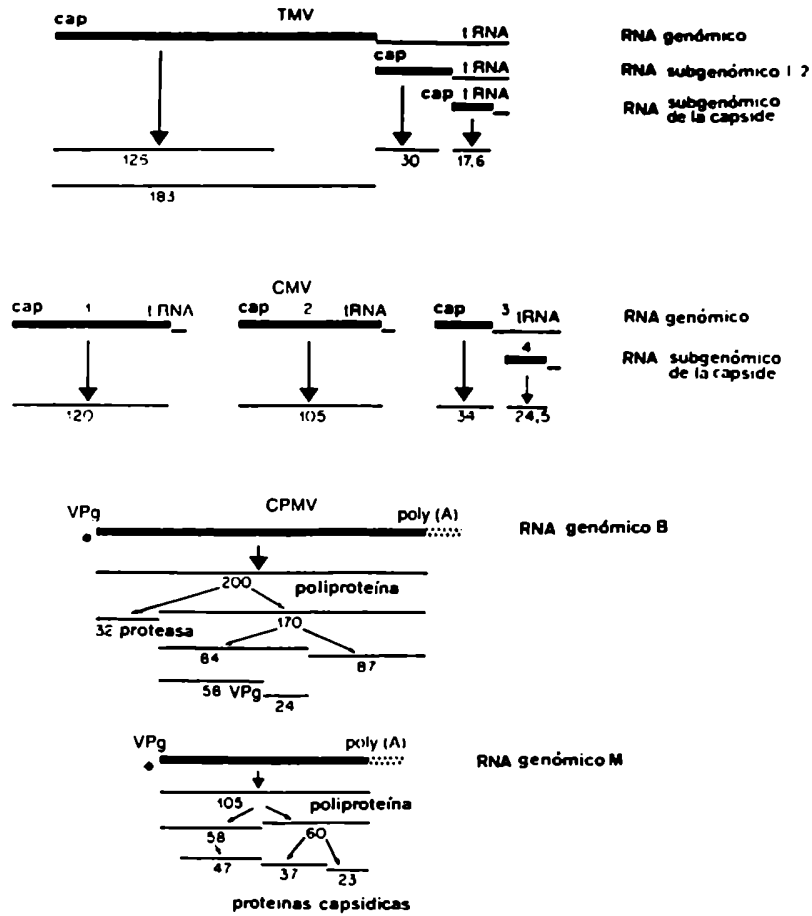


FIGURA 1.7: Síntomas inducidos en hojas de plantas infectadas sistémicamente con diversos Potexvirus. A: Mosaico producido en trébol blanco por WC1MV. B: Moteado inducido por PaMV en *N. benthamiana*. C: Necrosis en hoja de orquídea producida por CybMV.

una RNA polimerasa-RNA dependiente de origen viral. Esto surge de comparar la secuencia nucleotídica de esta putativa proteína con las correspondientes a las respectivas replicasas de distintos poliovirus y del CPMV (Kamer, G. *et al*, 1984; Franssen, H. *et al*, 1984b). La secuencia codificante de la proteína de la cápside está situada en el extremo 3' del RNA.

1.5.5. Tymovirus: Estrategia conjunta de tres mecanismos. Superposición de marcos de lectura, RNA subgenómico y clivaje postraducciona

La estrategia de traducción del *Turnip Yellow Mosaic Virus* (TYMV), miembro tipo del grupo de los Tymovirus, ha sido muy estudiada. Por ensayos de traducción *in vitro* se obtienen tres proteínas de 150 Kd, 195 Kd y 210 Kd que tienen el mismo extremo N terminal. (Benicourt, C. *et al*, 1978; Mellena, J.R. *et al*, 1979; Morch, M.-D *et al*, 1982). Estas proteínas provienen de un mecanismo de "translectura" que permite saltar los codones de terminación en fase y proseguir la traducción. Las proteínas de 195 Kd y 210 Kd son sometidas a un clivaje postraducciona dando origen, en ambos casos, a una proteína común de 120 Kd y a otras dos de 78 Kd y 93 Kd. Este proceso parecería ser autoproteolítico (Benicourt, C. *et al*, 1979). Curiosamente la proteína de 150 Kd no se autocliva en una de 120 Kd y otra de 30 Kd, a pesar de tener el sitio de clivaje correspondiente. En un paso posterior la proteína de 120 Kd se cliva en dos proteínas, una de 82 Kd y otra de 35 Kd. La de 82 Kd formaría parte del complejo de replicación (Mouchès, C. *et al*. 1984).

El marco de lectura abierto para la poliproteína de 210 Kd y el correspondiente a la proteína de la cápside se superponen. Esta última proteína es traducida a partir de un

mensajero subgenómico (Pley, C.W.A. *et al*, 1976; Benicourt, C. *et al*, 1976) que es 3' coterminar con el RNA genómico.

1.6. REPLICACION DE LOS RNAs VIRALES

Siguiendo el modelo general de conservación de la información genética, se puede concebir que los virus vegetales a RNA (+) pasan, durante la replicación, por un intermediario complementario a DNA o a RNA.

1.6.1. RNA polimerasas - RNA dependientes

En 1970 se postuló la existencia de una RNA polimerasa - RNA dependiente en plantas sanas (Astier, S. *et al*, 1971). Esta enzima sería, en la mayoría de los casos soluble, aunque también se la ha encontrado ligada a constituyentes celulares. Generalmente está presente en tejidos jóvenes y su actividad es estimulada por la infección viral. Luego de purificarla, su actividad enzimática es completamente dependiente de un RNA molde sobre el cual se efectúa la copia. Se cree que es un monómero de 140 Kd y el rol que cumpliría dentro de la célula sana es desconocido.

1.6.2. Replicasas

Se piensa que todos los virus vegetales contienen información para codificar polimerasas (replicasas) que serían parcialmente responsables del proceso de replicación viral. Se cree también que dichas polimerasas deben tener algún tipo de especificidad, ya que es poco probable que un RNA viral poly A(+)

se replique del mismo modo que un RNA con estructura tipo tRNA en su extremo 3'. Hasta el momento se trata de meras suposiciones, aunque se cuenta con algunos datos experimentales que las apoyarían. Por ejemplo, la secuencia nucleotídica correspondiente a la proteína de 87 Kd del CPMV presenta una alta homología con las replicasas de dos Picornavirus, el virus de la aftosa (FMDV) y el de la polio (Franssen, H. *et al*, 1984).

Por otra parte, en el caso del TYMV y del CPMV se han logrado obtener preparaciones virales que tienen actividad de polimerasa cuando se las separa de la actividad RNA polimerasa-RNA dependiente (Mouches, C. *et al*, 1974; Dorssers, L. *et al*, 1984). *In vitro*, estas actividades enzimáticas actúan parcialmente. En efecto, aún asociadas al complejo de replicación, sintetizan únicamente cadenas de polaridad positiva en tiempos cortos. La misma actividad, separada del complejo de replicación, reconoce inespecíficamente una cadena (+) como molde y sintetiza a partir de ésta una cadena (-); luego no continúa, es decir, no sigue sintetizando nuevas cadenas (+). Estas enzimas son, al menos en parte, codificadas por el genoma viral.

Actualmente se desconoce si se necesitan dos enzimas distintas para la síntesis de las cadenas (+) y de las cadenas (-) o si bastaría con una sola actividad enzimática y la producción de cada tipo de cadenas sería regulada a través del bloqueo de las otras.

1.6.3. Origen de los RNAs subgenómicos

Se han elaborado numerosas hipótesis acerca del origen de los RNAs subgenómicos (Cornuet, P., 1987).

a. Los RNAs subgenómicos que corresponden al extremo 3' del RNA genómico provendrían del clivaje de la cadena (+) del genoma.

b. Los RNAs subgenómicos provendrían de replications internas del RNA (-) genómico, en cuyo caso las polimerasas implicadas deberían reconocer sitios específicos en dicho RNA.

c. La replicación de los RNAs subgenómicos se realizaría sobre un RNA subgenómico molde. Este caso sería análogo al a) pero asociado con la replicación del subgenómico "molde".

d. El RNA subgenómico podría ser también un producto de procesamiento de un RNA genómico (-). Estos RNAs subgenómicos (-) servirían de molde para la síntesis de RNAs subgenómicos (+).

e. Los RNAs subgenómicos serían terminaciones prematuras de la síntesis de RNAs genómicos (+).

1.7. REPLICACION DE VIRUS A RNA DE POLARIDAD NEGATIVA

Los Rhabdovirus vegetales poseen, como característica particular, una envoltura lipoproteica que encierra una nucleocápside conteniendo un RNA genómico de polaridad negativa. Tienen, además, una RNA polimerasa asociada al virión. Algunos Rhabdovirus, como el *Potato Yellow Dwarf Virus* (PYDV) o el *Wheat Striate Mosaic Virus* (WStMV) se multiplican tanto en la planta como en el insecto vector. Los RNA (+) mensajeros tienen un *cap* en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'. El orden de los genes sobre el RNA (-) genómico es:

5' L G N NS M 3'

donde L y NS: proteínas posiblemente asociadas a la nucleocápside; G: glicoproteína; N: proteína asociada al RNA para formar la nucleocápside; M: proteína de la matriz, asociada con la envoltura (Francki, R.I.B. *et al*, 1981).

Los distintos mRNAs (+) son obtenidos por procesamiento del RNA (+) transcripto en forma de policistrón. Este mismo RNA sirve de modelo para la síntesis de las cadenas (-) genómicas que serán encapsidadas. La polimerasa responsable de la transcripción y la replicasa que sintetiza las cadenas (-), serian la misma enzima y estaría codificada por los genes L y NS (Wagner, R.R., 1975).

1.8. REPLICACION DE VIRUS A DNA DE DOBLE CADENA

Los Caulimovirus son un grupo de virus vegetales a DNA doble cadena. Su genoma está compuesto por un DNA circular de $5,1 \times 10^6$ D que presenta tres interrupciones, una en la cadena α y dos en la cadena β complementaria (Volovitch, M.G. *et al*, 1978; Hull, R. *et al*, 1978). La cadena (+) contiene ocho marcos de lectura abiertos muy cercanos entre sí. Cinco de estos marcos han sido asignados a proteínas o actividades enzimáticas presentes en la planta infectada. Dicha asignación es la siguiente (Hohn, T. *et al*, 1985):

- I proteína de 38 Kd
- II proteína de 18 Kd (está involucrada en la transmisión por áfidos vectores)
- III = proteína de 15 Kd
- IV = proteína de 57 Kd (al madurar genera la proteína de la cápside de 43 Kd)
- V proteína de 79 Kd (posiblemente sea la transcriptasa reversa)
- VI proteína de 62 Kd (proteína del viroplasma)

Los productos correspondientes a los marcos de lectura II, VII y VIII no se requieren para la infectividad.

Acerca del mecanismo de replicación, se tienen evidencias experimentales sobre varios de los eventos que ocurren (Guilley, H. *et al*, 1983; Hohn, T. *et al*, 1983; Hohn, T. *et al*, 1985).

1. La transcripción de DNA a RNA mensajero se efectúa en el núcleo de la célula huésped, en minicromosomas de origen viral que representarían la unidad de transcripción. Esta se efectúa con la RNA polimerasa II celular. Se sintetizan dos productos de transcripción mayoritarios: un RNA de 35 S un poco más largo que el genoma viral y un RNA de 19 S que es 3' coterminado con el de 35 S. Estos RNAs, luego de ser poliadenilados, pasan al citoplasma.

2. La traducción de dichos RNAs se efectúa en el citoplasma. No se sabe si el mensajero 35 S es policistrónico o si sintetiza una poliproteína que luego es procesada. El RNA de 19 S codifica para la proteína VI que es el componente principal de las inclusiones viroplásmicas.

3. La síntesis del DNA viral ocurre en el citoplasma y se realiza por medio de la transcriptasa reversa codificada por el genoma viral (Guilley, H. *et al.*, 1983).

4. En contraste con los Retrovirus animales, no se ha podido observar todavía la integración del genoma completo del CaMV en el cromosoma del huésped luego de la infección.

1.9. EL GRUPO DE LOS POTEXVIRUS

Este grupo comprende más de 14 tipos diferentes de virus cuyas partículas son levemente flexuosas y filamentosas. Sus genomas son a RNA de polaridad positiva, y la cápside está compuesta por subunidades idénticas de una única proteína codificada por el genoma viral.

Algunos de los aspectos en común de los Potexvirus, además de las características de las partículas, incluyen: estabilidad *in vitro*, fácil transmisibilidad por vía mecánica, ausencia de vectores, alta concentración en las plantas y agregación de los viriones formando cuerpos de inclusión de diversas formas. También son buenos inmunógenos.

1.9.1. Clasificación

En la Tabla 1.4 se muestra una lista actualizada de todos los miembros del grupo de los Potexvirus, así como de los que aún no han sido confirmados por el ICTV (International Committee for Taxonomy of Viruses)(Purcifull, D.E. *et al.*, 1981; Van Regenmortel, M.H.V., 1982; Hammond, J. *et al.*, 1981; Attathom, S. *et al.*, 1978). Todos los virus que figuran en dicha

MIEMBROS DEL GRUPO ACEPTADOS POR EL ICTV

Cactus Virus X: CaVX
Cassava Common Mosaic Virus: CCMV
Clover Yellow Mosaic Virus: CLYMV
Cymbidium Mosaic Virus: CybMV
Daphne Virus X: DaVX
Foxtail Mosaic Virus: FMV
Hydrangea Ringspot Virus: HyRSV
Narcissus Mosaic Virus: NaMV
Nerine Virus X: NeVX
Papaya Mosaic Virus: PaMV
Parsley Virus 5: PalV 5
Parsnip Virus 3: PanV 3
Pepino Mosaic Virus: PepMV
Potato Aucuba Mosaic Virus: PoAMV
Potato Virus X: PVX
Viola Mottle Virus: VioMV
White Clover Mosaic Virus: WC1MV

POSIBLES MIEMBROS

Artichoke Curly Dwarf Virus: ACDV
Bamboo Mosaic Virus: BoMV
Barley Virus B-1: BarB-1
Boletus Virus: BeV
Dioscorea Latent Virus: DiLV
Lily Virus: LV
Malva Veinal Necrosis Virus: MVNV
Nandina Mosaic Virus: NMV
Negro Coffee Mosaic Virus: NCMV
Plantain Virus X: PlVX
Rhododendron Necrotic Ringspot Virus: RhNRV
Rhubarb Virus I y II: RhuV-I y II
Wineberry Latent Virus: WiLV
Zygocactus Virus: ZV
Zygocactus Virus X: ZVX

TABLA 1.4

VIRUS PERTENECIENTES AL GRUPO DE LOS POTEXVIRUS

tabla han sido encontrados en mono o dicotiledóneas, salvo el Boletus Virus que se descubrió en tejidos de hongos (Huttinga, H. *et al.*, 1975).

1.9.2. Patologías causadas por los Potexvirus

1.9.2.1. Sintomatología

Dependiendo del virus y del huésped, las plantas infectadas (natural o experimentalmente) tienen uno o más de los siguientes síntomas: mosaico, moteado, clarificación de las nervaduras, bandeado, distorsión de las hojas, atrofiamiento, manchas anulares, necrosis y coloración veteada en los pétalos (Purcifull, D.E. *et al.*, 1981). A veces, no se observan síntomas macroscópicos en la planta infectada. En la foto de la Figura 1.8 se pueden apreciar algunos ejemplos de síntomas causados por Potexvirus.

1.9.2.2. Localización interna: formación de cuerpos de inclusión

No se sabe mucho acerca de la localización interna de los Potex en la célula vegetal. Durante las fases tempranas de la infección se encuentran partículas en células de la palisada, mesófilas y en algunas células epidérmicas. Las partículas virales se distribuyen en el citoplasma en forma difusa, en agregados densos o en los llamados cuerpos X de inclusión. Estas formas de agregación pueden llenar la mayor parte de las células, se localizan cerca del núcleo y están compuestos, además de virus, por ribosomas, mitocondrias y partes de retículo endoplasmático (Kozar, F.E. *et al.*, 1969). Las partículas virales y los cuerpos de inclusión esféricos se encuentran en los plástidos.

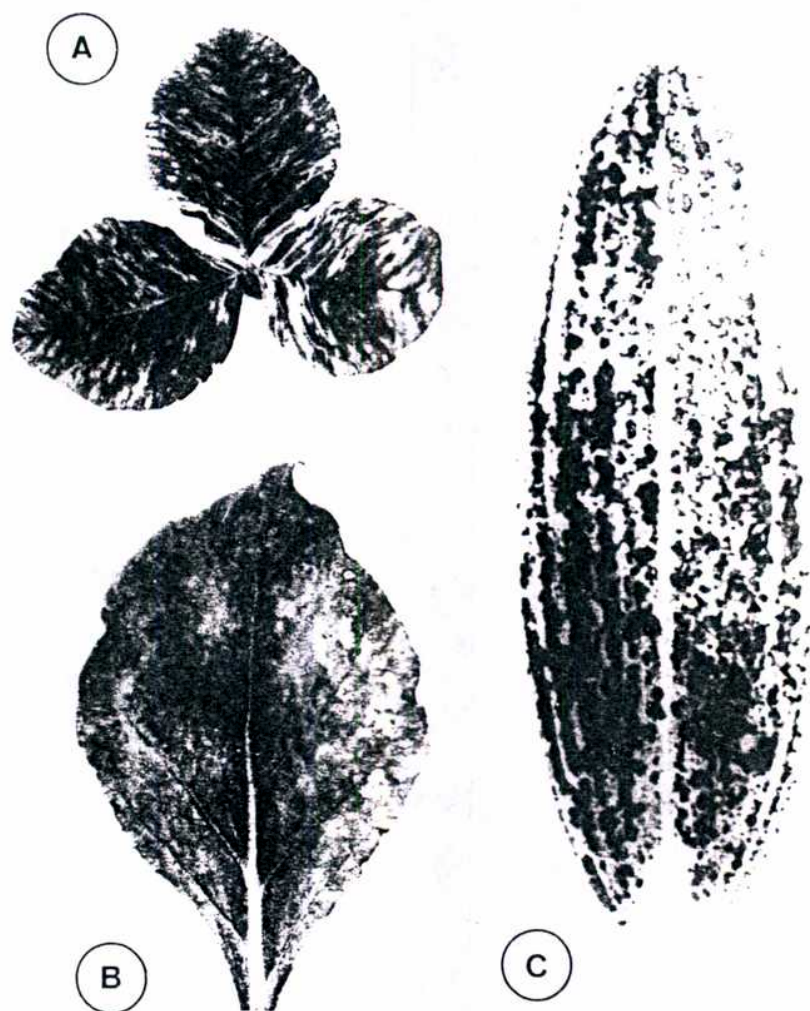


FIGURA 1.8: Síntomas inducidos en hojas de plantas infectadas sistémicamente con diversos Potexvirus. A: Mosaico producido en trébol blanco por WCIMV. B: Moteado inducido por PaMV en *N. benthamiana*. C: Necrosis en hoja de orquídea producida por CybMV.

Entre los distintos tipos de cuerpos de inclusión observados, han cobrado especial interés los cuerpos bandeados o *banded bodies*, que consisten en hileras de partículas virales alineadas en forma perpendicular a lo largo de la banda. Estos cuerpos se encuentran en la mayoría de los miembros del grupo. En la Figura 1.9 se muestran algunos ejemplos de estas inclusiones.

1.9.2.3. Rango de huésped: 600 especies de 38 familias vegetales

El rango combinado de huéspedes de todos los miembros y posibles miembros del grupo de los Potex es de aproximadamente 600 especies dicotiledóneas y monocotiledóneas, reunidas en 38 familias y un basidiomycete. El rango individual es bastante estrecho (Fenner, F., 1976).

El PVX infecta 240 especies de 16 familias de plantas, aunque la mitad de estas especies pertenece a la misma familia, la de las solanáceas. Estas cifras aparentemente abarcan muchas especies, pero el rango de huésped del PVX es chico, ya que existen virus vegetales que infectan más de 400 especies distribuidas en 50 familias.

1.9.2.4. Tipos de transmisión: mecánica sin vectores

Los Potexvirus se pueden transmitir mecánicamente, por contacto entre plantas sanas y enfermas y por manipulación de plantas enfermas. Con respecto a los vectores naturales, sólo se ha descrito con cierta certeza la transmisión a través de un hongo.

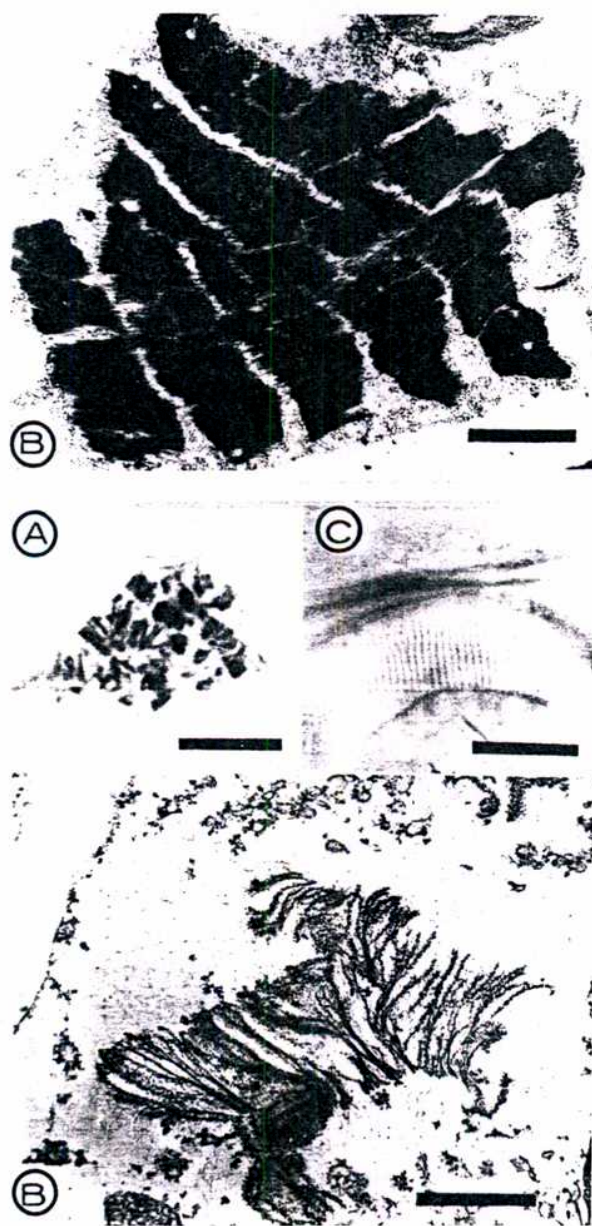


FIGURA 1.9: Inclusiones características de los Potexvirus. Fila Superior B: Microscopía electrónica de cuerpos bandeados inducidos por CLYMV. Fila inferior A y B: Microscopías óptica y electrónica, respectivamente, de inclusiones laminares inducidas por PVX. C: Microscopía óptica de los llamados *banded bodies* inducidos por PVX.

a. Transmisión mecánica: se realiza a través de herramientas de trabajo (cuchillas, tijeras, podadoras) contaminadas. También el hecho de cultivar una determinada especie, tal como la orquídea, aumenta la incidencia del virus respecto a la especie salvaje. El hombre es, de algún modo, un elemento transmisor, ya que al manipular y moverse entre plantas enfermas en las zonas de cultivo aumenta la propagación de estos virus.

b. Contacto planta a planta: éste es un modo muy común de diseminar los Potex, especialmente el PVX (de Bokx, J.A., 1972). Este virus se ha esparcido mucho más en cultivos de tomates que de papa por este tipo de contacto. Se ha visto que también se puede transmitir el PVX de tubérculos brotados infectados a sanos, contenidos en la misma bolsa.

c. Vectores: no se han encontrado vectores naturales para los Potexvirus. Hasta ahora, únicamente se ha descrito, con relativa certeza, la transmisión a través del hongo *Synchytrium endobioticum*, fomicete que afecta a la papa. Las zoosporas liberadas de esporangios desarrollados en plantas de papa infectadas con PVX fueron capaces de transmitir dicho virus a plantas sanas (Nienhaus, F. et al., 1965). Este es el único caso reportado en Potex, y debe ser estudiado con mayor profundidad.

d. Elementos propagadores: Distintas partes tomadas de plantas infectadas pueden servir como fuente propagadora viral, por ejemplo, propágulos vegetativos (tubérculos de papa o cortes de mandioca)(Nienhaus, F. et al., 1965). No hay propagación del PVX a través de semilla verdadera. Tampoco se

considera este tipo de transmisión para el resto de los Potex, debido a que los valores obtenidos han sido inferiores al 1%. Estos virus también pueden ser transmitidos a través de injertos de partes de la planta infectada. Este método es usado a veces como forma eficaz de propagación viral. Es el único modo en que se pudo propagar el *Rhododendron Necrotic Ringspot Virus* (Coyier, D.L. et al., 1977).

1.9.3. Arquitectura de los Potexvirus

Todos los miembros del grupo poseen partículas filamentosas y flexuosas. Mediante microscopía electrónica, se determinaron valores de longitud que oscilaban entre los 480 y 580 nm (Harrison, B.D. et al, 1971; Koenig, R. et al, 1978), y diámetros comprendidos entre los 11 y 13 nm (Brandes, J. et al, 1965; Varma, A. et al., 1968). Estos últimos autores también determinaron que los Potex tienen simetría helicoidal y que el paso de la hélice es de 3,4 a 3,7 nm.

Por estudios de difracción de rayos X se confirmó el tipo de simetría y se calcularon valores de paso de hélice de 3,5 a 3,6 nm para el NaMV (Tollin, P. et al., 1968), 3,25 nm para el WC1MV (Wilson, H.R. et al, 1978), 3,4 nm para el NaVX y el CybMV y 3,5 nm para el VioMV y el CaVX (Richardson, J.F. et al., 1981).

Se ha determinado con suma precisión el número de subunidades proteicas que forman cada giro helicoidal. En efecto, también por difracción de rayos X, se han calculado los parámetros físicoquímicos de la estructura de diez miembros del grupo de los Potexvirus y se llegó a los siguientes valores (Tollin, P. et al., 1975; Tollin, P. et al., 1980; Bancroft, J.B. et al., 1980; Richardson, J.F. et al., 1981):

Potexvirus	No. de subunidades proteicas por giro helicoidal
PaMV	8 3/4
CybMV	8 4/5
FTV	8 4/5
NaMV	8 4/5
WC1MV	8 4/5
VioMV	8 5/6
CaVX	8 5/7
PVX	8 7/8
NeVX	8 9/10
CLYMV	8 9/11

En la Figura 1.10 se muestra un dibujo esquemático de la distribución de las subunidades proteicas que conforman la simetría helicoidal de los Potexvirus.

1.9.4. Parámetros fisicoquímicos de los Potexvirus

Las partículas virales sedimentan como un único componente con un coeficiente de sedimentación de 118 a 121 S (Bercks, R., 1970; Hiebert, E., 1970).

El genoma consiste en una única molécula de RNA de polaridad positiva. Su PM oscila entre los 2,1 a 2,6x10⁶D y constituye el 5 al 7% del peso de la partícula. El coeficiente de sedimentación para los RNAs del PaMV y el FMV es de aproximadamente 32 S (Hiebert, E., 1970; Paulsen, A.Q. *et al.*, 1977). Se ha observado que el RNA aislado de Potex retiene cierta infectividad (Hiebert, E., 1970; Koenig, R., 1977; Hill, J.H. *et al.*, 1977).

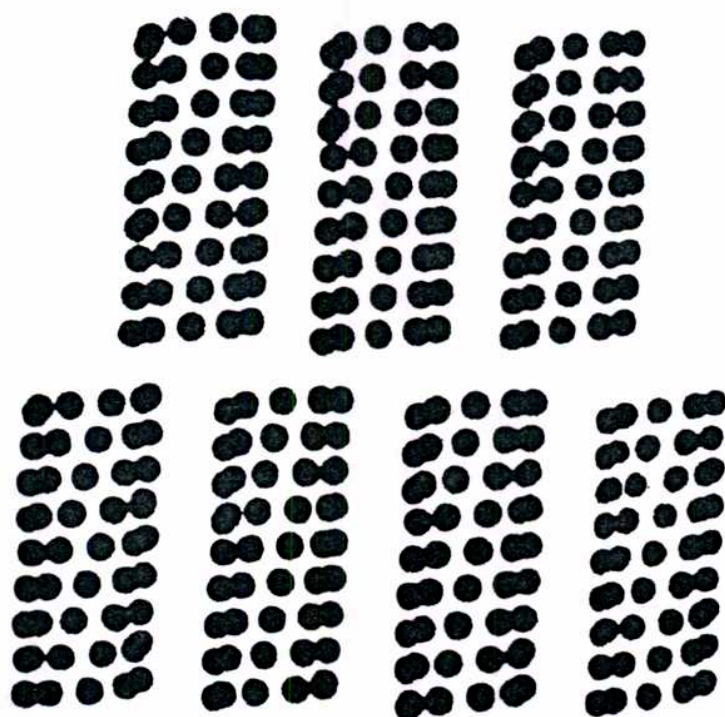


FIGURA 1.10: Diseño esquemático de la distribución espacial de las subunidades proteicas que conforman la cápside viral de los Potexvirus. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: conformación de $8^{3/4}$, $8^{4/5}$, $8^{5/6}$, $8^{5/7}$, $8^{7/8}$, $8^{9/10}$ y $8^{9/11}$ subunidades por giro helicoidal.

La cápside está compuesta por un único tipo de subunidad proteica cuyo peso molecular varía de acuerdo al miembro del grupo y oscila entre los 18 y 26 Kd. Estas proteínas han demostrado ser antigénicas, aunque con ciertas variaciones debidas, principalmente, a la cepa y a degradaciones producidas durante su purificación.

1.9.5. Estructura nucleotídica: Cap en el extremo 5' y poli(A) en el extremo 3'

En 1978, se determinó la existencia de una estructura tipo *cap* en el extremo 5' de los RNAs de PaMV (AbouHaider, M. *et al.*, 1978) y el PVX (Sonenberg, N. *et al.*, 1978). Dichos estudios se realizaron por medio de metilaciones *in vitro* y dieron como resultado la siguiente estructura en dicho extremo:



m = grupo metilo en la posición 7 de la guanosina
ppp = enlace trifosfato poco usual

Se desconoce la función exacta de esta estructura, pero se cree que serviría de protección contra diversas nucleasas. Por secuenciación directa sobre el RNA se determinaron las primeras 42 bases del PVX (Morozov, S.Yu. *et al.*, 1981), y los 138 primeros nucleótidos del extremo 5' del PaMV (Lok, S. *et al.*, 1986).

Con respecto al extremo 3', Sonenberg *et al.* (1978), publicaron un trabajo donde afirmaban que el RNA de PVX era poliA (-). Dichos investigadores observaron que el RNA de este Potex no era retenido al ser cromatografiado a través de co-

lumnas de poly U-Sepharosa. Esta creencia se mantuvo en vigencia por muchos años, a pesar que ya en 1981 Morozov *et al.* habían demostrado lo contrario. En efecto, cromatografiando RNA de PVX en columnas de oligo dT-celulosa y por síntesis de primeras cadenas de cDNA con *primers* de oligo dT₁₂₋₁₈ comprobaron que dicho RNA era poliA (+) (Morozov, S.Yu. *et al.*, 1981). El hecho de que este trabajo fuese publicado en su idioma y país de origen contribuyó a que muchos investigadores no lo conocieran. En los últimos años se ha generalizado el concepto de que todos los Potexvirus tienen poliadenilado el extremo 3' de su RNA genómico. Similares resultados fueron reportados para el PaMV (AbouHaidar, M.G. *et al.*, 1984) y para el DVX (Guilford, P.J. *et al.*, 1986).

1.9.6. La relación ácido nucleico-proteína

El mecanismo de ensamblado de los Potexvirus, y de los virus helicoidales en general, ha sido uno de los eventos que más ha interesado a los investigadores.

En el caso del TMV, varios grupos determinaron que el sitio de reconstitución de la cepa común estaba situado entre 800 y 1000 nucleótidos antes del extremo 3' del RNA (Zimmern, D. *et al.*, 1976; Lebeurier, G. *et al.*, 1977; Otsuki, Y. *et al.*, 1977). En 1980, Fukuda *et al.*, estudiando dos cepas distintas del TMV (una de tomate y otra de garbanzo), determinaron que el mecanismo, básicamente, es universal para todo TMV, es decir, es bidireccional y la zona de encapsidación está en la región 3'. La bidireccionalidad del ensamblado es un mecanismo en dos etapas. La primera abarca la elongación desde la zona 3' hacia la zona 5', y es rápida (tarda de 5 a 7 minutos) y la otra etapa es mucho más lenta. (Fukuda, M. *et al.*, 1986). El sitio exacto de la encapsidación varía con la cepa, en el caso de

la de tomate está aproximadamente a 800 nucleótidos del extremo 3', y en la del garbanzo a sólo 320 nucleótidos. Por otra parte, se sabe que la proteína de cubierta del TMV es traducida a partir de un RNA mensajero subgenómico (sgmRNA) que corresponde a los últimos 700 nucleótidos del extremo 3'. El sgmRNA correspondiente a la cepa de garbanzo es encapsidado *in vivo* en forma de partículas helicoidales cortas, mientras que el sgmRNA de las cepas comunes no lo es (Higgins, T.J.V. *et al.*, 1976; Burenning, G. *et al.*, 1976). Esta diferencia es explicada y demostrada por el hecho de que el sgmRNA de la cepa de garbanzo tiene el sitio de iniciación del ensamblado, mientras que las otras cepas no lo poseen.

En el caso de los Potex, se ha estudiado mucho el ensamblado del PaMV (Erickson, J.W. *et al.*, 1978a; Erickson, J.W. *et al.*, 1978b; AbouHaidar, M. *et al.*, 1978; Erickson, J.W. *et al.*, 1978c; AbouHaidar, M.G. *et al.*, 1984; Lok, S. *et al.*, 1986) y en menor escala el del PVX (Kaftanova, A.S. *et al.*, 1975; Goodman, R.M., 1975a; Goodman, R.M. *et al.*, 1975b). Para ambos virus, el mecanismo es, en general, el mismo. Es decir, el ensamblado comienza en el extremo 5' y se elonga unidireccionalmente hacia el extremo 3'.

Erickson *et al.* determinaron las condiciones óptimas para la reconstitución de partículas virales de PaMV a partir de RNA y proteínas del mismo virus. Dichas condiciones son: pH 8,0, 25°C de temperatura de reacción y relación de proteínas a RNA = 20:1. Postulan la existencia de dos fases energéticamente diferentes: una primera fase de iniciación de la hélice y una segunda de elongación de la misma. La primera fase ocurre en un amplio rango de temperatura (entre 0°C y 25°C), pero la segunda sólo ocurre a temperaturas mayores de 25°C. Aprovechando esta dependencia, trabajaron a bajas temperaturas para tener sólo com-

plejos de iniciación, analizando así la estructura del extremo 5' y comparándola con el sitio de iniciación de la encapsidación del TMV. La reconstitución a pH 8,0, empleando proteínas aisladas de PaMV, dio como producto partículas tubulares con el RNA genómico del mismo virus o de virus muy relacionados (por ejemplo, CLYMV), obteniéndose resultados negativos con RNA de virus no relacionados. Es decir, a pH 8,0 el ensamblado es específico. Si se trabaja a valores de pH más bajos, la reconstitución es inespecífica. Este efecto podría deberse a una mediación de uniones carboxilo-carboxilo.

En un trabajo de Lok *et al.*, a través de la determinación de la secuencia nucleotídica del extremo 5' del RNA del PaMV, se realiza un análisis muy interesante sobre el mecanismo molecular de la encapsidación. Estos autores encuentran secuencias pentaméricas muy parecidas, repetidas ocho veces consecutivas; dichos pentámeros tienen la siguiente composición:

$$\begin{array}{cccccc} A_1 & A_2 & & & C_2 & \\ G_8 & C_8 & A_8 & A_8 & A_8 & \\ U_1 & & & & & \end{array}$$

donde los subíndices representan las veces que aparece dicha base en el pentámero.

El estado de agregación de la proteína que dará lugar a la protohélice consiste en un doble disco de coeficiente de sedimentación de 14 S que tiene 14 subunidades proteicas en total. En el virión nativo hay $8 \frac{3}{4}$ subunidades por vuelta de hélice y cada subunidad interactúa con 5 nucleótidos. Esto indicaría que cada uno de los ocho pentámeros repetidos interactuaría con cada subunidad proteica. La primera capa de este doble disco estaría agregada sin RNA, entre ambas capas quedaría encerrado el

cap y en la segunda se ensamblaría el RNA con las subunidades proteicas. Este doble disco de proteínas con RNA forma la llamada protohélice y conformaría una estructura protectora del extremo 5' del RNA del virión naciente. En la Figura 1.11 se esquematiza la putativa protohélice del PaMV.

Se han reportado trabajos, no tan profundos, de reconstitución para el CLYMV (Bancroft, J.B. *et al.*, 1979) y el NaMV (Robinson, D.J. *et al.*, 1975). En este último, las partículas reconstituídas tienen el mismo diámetro que el virión, pero resultaron ser más largas, probablemente debido a agregaciones inespecíficas.

Los trabajos de reconstitución *in vitro* para el PVX muestran un cierto requerimiento del RNA para que la proteína se ensamble y se elongue. Estos son trabajos algo antiguos donde no se ahonda en los mecanismos que estarían involucrados a nivel molecular.

1.9.7. Estrategias de traducción y replicación

1.9.7.a. Replicación

Se desconocen los eventos precisos que ocurren en la replicación de los distintos virus del grupo. Se han reportado algunos hechos característicos aislados que estarían relacionados con dicho mecanismo. Por ejemplo:

- Atabekov (1975) determinó que el rango de huésped lo daría el RNA, ya que un híbrido de RNA de PVX con proteínas de *Cucumber Virus*' 4 (del grupo de los Tobamovirus) infecta *Nicotiana glutinosa* (huésped natural del PVX pero no del CuV4) y no infecta plantas de pepino (huésped para el CuV4 y no para el PVX).

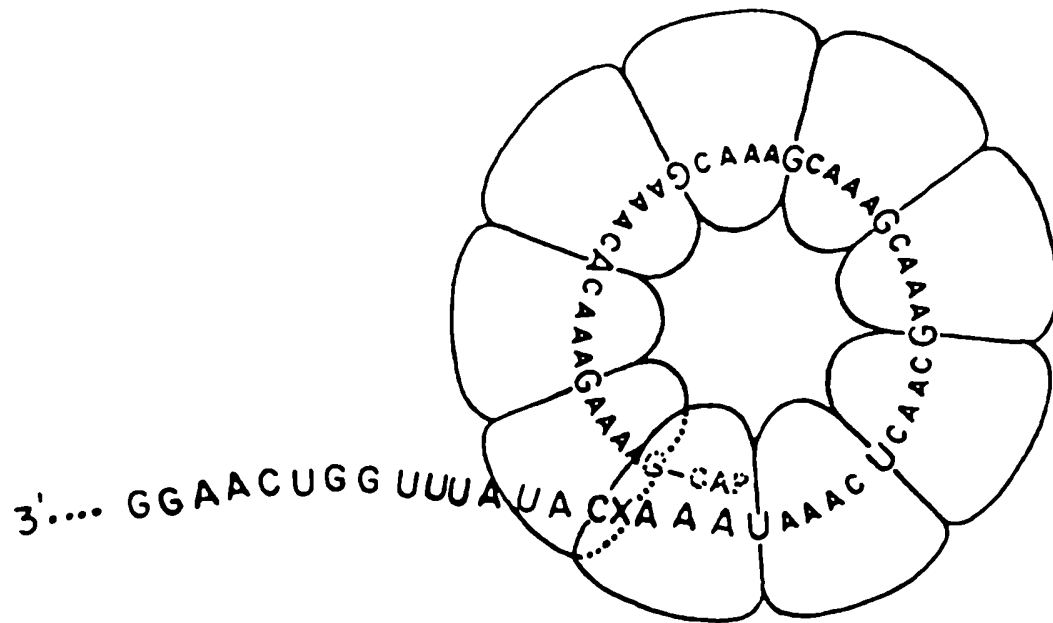


FIGURA 1.11: Diseño esquemático de la formación de la protohélice en el PaMV.

- La producción de PVX en protoplastos de tabaco es inhibida por cicloheximida y no por cloranfenicol (Otsuki, Y. *et al.*, 1974). Esto indicaría que el mecanismo de replicación emplearía ribosomas citoplasmáticos y no cloroplásticos.

- El RNA de ClYMV se sintetizaría en el nucleolo (Smith, S.H. *et al.*, 1965; de Zoeten, G.A. *et al.*, 1967).

1.9.7.b. Traducción

A lo largo de estos últimos años se han ido acumulando datos tendientes a dilucidar la estrategia de traducción de los Potexvirus. Se ha intentado, con relativo éxito, proponer un único mecanismo para todos los miembros del grupo. En la mayoría de los Potex estudiados, como ser el PVX, el NaMV, el ClYMV, el DVX, el FMV, el VioMV y el PaMV, se han encontrado algunos elementos comunes a todos. Por ejemplo, se sabe que tienen un RNA genómico de polaridad positiva que puede codificar un polipéptido grande (de 150 a 182 Kd), no estructural y que no es precursor de la proteína de la cápside. Este RNA jugaría un rol en la replicación viral, ya que podría codificar alguna polimerasa u otra enzima de función similar, aunque hasta el momento no se ha descrito ninguna.

También se encuentran, por traducción *in vitro*, un número grande de polipéptidos de tamaño más pequeño, que están relacionados en su secuencia primaria con el polipéptido más grande. Se supone que son productos incompletos de la traducción, realizada en el mismo marco de lectura abierto, producidos por pausamientos en la elongación del polipéptido grande. Esto podría deberse a detenciones de los ribosomas en determinados codones, con o sin liberación del péptido naciente. No se

sabe si este efecto es debido a estructuras secundarias del RNA genómico, a falta o escasez de determinados RNAs de transferencia, o a otros factores.

El punto de más controversia se centra en el mecanismo de expresión de la proteína de cubierta.

En 1978, Ricciardi *et al.*, obtuvieron por ensayos de traducción *in vitro* con extractos de germen de trigo y RNA aislado de PVX, varios productos, siendo el mayoritario un polipéptido de 110 Kd. Utilizando el sistema de traducción de reticulocitos de conejo, obtuvieron un perfil similar al anterior, pero de menor peso molecular. En ninguno de los dos casos obtuvieron un producto correspondiente a la proteína de cubierta (Ricciardi, R.P. *et al.*, 1978). En 1980, Wodnar-Filipowicz *et al.*, arribaron a resultados similares, con la diferencia de que los productos mayoritarios tenían pesos moleculares de 180 y 145 Kd (Wodnar-Filipowicz *et al.*, 1980). Estos autores sugirieron ya que la proteína de cubierta era traducida a partir de un mensajero subgenómico como en el caso del TMV y el TYMV (Hunter, A.-R. *et al.*, 1976; Klein, C. *et al.*, 1976; Pleij, C.W.A. *et al.*, 1976). Recién en 1987, Dolja, V.V. *et al.*, reportaron la presencia de un RNA mensajero subgenómico (sgmRNA) correspondiente a la proteína de cubierta. Los autores de este trabajo aislaron RNA de PVX de varias fuentes de partículas virales purificadas, de plantas infectadas, poli(A)(+) de plantas infectadas, etc. y lo hibridaron con una sonda de DNA correspondiente a la zona 5' codogénica de la proteína de cubierta. Detectaron, además del gRNA, seis RNAs subgenómicos poliadenilados. Uno de ellos, de 0,9 Kb, contendría la secuencia correspondiente a la proteína de cubierta (Dolja, V.V. *et al.*,

1987). Todas estas evidencias indicarían que, en el caso del PVX, la proteína de la cápside se sintetizaría a partir de un sgmRNA y no del gRNA. No se han detectado *in vivo* sgmRNAs de PVX encapsidados.

Hasta el momento no se han obtenido sgmRNAs activos para traducción *in vitro* a partir de partículas virales de VioMV y EMV (Bendena, W.G. *et al.*, 1986).

En 1985, Bendena, W.G. *et al.* obtuvieron por traducción *in vitro* de RNA genómico de PaMV, tres polipéptidos mayoritarios de 155 Kd, 73 Kd y 22 Kd. Este último correspondería a la proteína de cubierta, mientras los otros dos tenían el mismo origen 5' pero no comprendían la secuencia del de 22 Kd. La aparición de un sgmRNA activo a partir del gRNA se podría explicar por la presencia, durante la purificación, de nucleasas que cortarían el gRNA, generando un fragmento de RNA que mimificaría al sgmRNA verdadero. El hecho de que esto no ocurra con otros Potex, podría deberse a que los putativos fragmentos generados en las purificaciones no serían similares a los reales (Bendena, W.G. *et al.*, 1985).

Resultados similares fueron obtenidos para el CLYMV (Bendena, W.G. *et al.*, 1986), aunque al año siguiente el mismo grupo consiguió clonar el RNA genómico de este virus y, sin secuenciarlo, caracterizó los clones correspondientes a la zona del extremo 3' del genoma por ensayos de arresto de la traducción de RNA polisomal (Bendena, W.G. *et al.*, 1987). Con dichos clones encontraron dos sgmRNAs 3'coterminales en plantas infectadas con el CLYMV. Uno de estos mensajeros subgenómicos, por traducción *in vitro* da como producto la proteína de cubierta. También consiguieron detectar muy pequeñas cantidades de este sgmRNA encapsidadas.

El NaMV presenta, normalmente, dos poblaciones de partículas, una grande que contiene al gRNA y otra más pequeña correspondiente al sgmRNA de la proteína de cubierta. Se postuló, en base a los resultados obtenidos por ensayos de traducción *in vitro*, que dicha proteína sólo provendría del mensajero subgenómico y no del genómico. De este modo, las partículas chicas serían necesarias para la infección por el NaMV y dentro del grupo de los Potexvirus, habría distintas estrategias de traducción (Short, M.N. *et al.*, 1983). Tres años más tarde, Mackie, G.A. *et al.*, probaron lo contrario. En efecto, si lo afirmado anteriormente era cierto, implicaría que las partículas largas serían infecciosas, pero su progenie no podría encapsidarse y tampoco transferirse. Así, estos autores fraccionaron por tamaño las partículas de dos cepas distintas de NaMV y observaron que, en el 100% de los casos, las partículas largas de ambas cepas eran infectivas, así como su progenie. Por lo tanto, *in vivo*, las partículas grandes codificaban todas las funciones virales. El mismo grupo corroboró estas observaciones por medio de ensayos de hibridación de RNA de partículas cortas y largas con sondas de cDNA de partículas cortas, obteniendo resultados positivos. También hicieron ensayos de traducción *in vitro* e inmunoprecipitaciones con antisueros específicos de la proteína de cubierta, confirmando todo lo anteriormente expuesto. Se concluye entonces que el NaMV sigue la misma estrategia de expresión de la proteína de la cápside que el resto de los Potexvirus estudiados y que la diferencia estriba en que el sgmRNA de este virus es encapsidado en grandes cantidades (Mackie, G.A. *et al.*, 1986).

El DVX seguiría un mecanismo de traducción para su proteína de cubierta muy similar al PVX. Se detectaron cinco sgmRNAs de 4.9, 4.0, 2.1, 1.4 y 0.8 kb a partir de RNA de

N. clevelandii infectada con este virus. La totalidad de estos mensajeros estaba poliadenilada. Se tradujo en un sistema de reticulocitos de conejo y por inmunoprecipitación con antisuero antiDVX se identificó al sgmRNA de 0.8 kb como el portador de la secuencia de la proteína de la cápside. Dicha proteína, de 26 Kd, no se obtuvo por traducción *in vitro*, a partir de gRNA; en cambio, se obtuvo una proteína grande de 160 Kd y otros productos menores (Guilford, P.J. *et al.*, 1986).

1.10. VIRUS DE LA PAPA X

1.10.1. Generalidades

El virus de la Papa X (*Potato Virus X*) es el miembro tipo del grupo de los Potexvirus. Fue descrito por primera vez en 1931 (Smith, A.M., 1931). Es conocido también por otros nombres: *Potato Latent Virus*, *Potato Mottle Virus*, *Potato Interveinal Mosaic Virus*, *Tobacco Ringspot Virus*, *Up-to-date Streak Virus*, *Potato Virus B*, *Potato Virus D*, *Healthy Potato Virus* y *Potato Mild Mosaic Virus*.

Está distribuido en todas partes del mundo donde hay cultivos de papa. Es filamentoso y flexuoso y su criptograma es: R/1:2,1/6:E/E:S/(Fu)

donde

R = genoma a RNA

1 = monocatenario

2,1 = peso molecular del RNA = $2,1 \times 10^6$ D

6 = porcentaje de la masa del genoma respecto a la masa total de la partícula

- E = partícula y nucleocápside longitudinales, paralelas y de extremos no redondeados
- S = infecta la semilla
- (Fu) = transmitido posiblemente por un hongo.

1.10.2. Estructura viral

a. Propiedades físicas y arquitectura del virus:

En la Tabla 1.5 se detallan todos los parámetros estructurales y fisicoquímicos del PVX. Este virus tiene un peso molecular de aproximadamente 35×10^6 D y un coeficiente de sedimentación de 117.7 S. Su genoma a RNA constituye el 6% de la masa de la partícula, mientras que el 94% restante está constituido por proteína. Su coeficiente de extinción es de 2.97. Tiene 515 nm, aproximadamente, de largo y su diámetro es de 13 nm. Se ha detectado por microscopía electrónica un canal central de 3.0 nm de ancho.

b. Composición química y estructura nucleotídica

El genoma, al igual que todos los Potexvirus, es a RNA simple cadena de polaridad positiva. Tiene una estructura tipo *cap* en el extremo 5' (Sonenberg, U. *et al.*, 1978) y poli(A) en el 3' (Morozov, S.Yu. *et al.*, 1981). Se ha reportado la secuencia nucleotídica de las primeras 43 bases del extremo 5' (Morozov, S.Yu. *et al.*, 1981) y de aproximadamente 1300 nucleótidos del extremo 3' de una cepa europea. Esta secuencia incluye la correspondiente a la proteína de la cápside viral, la que comprende 237 aminoácidos.

PARTICULA VIRAL

largo	515 nm
diámetro	13 nm
paso de hélice	3,4 nm
peso molecular	35x10 ⁶ D
composición:	
RNA	6%
proteína	94%
lípidos	0%
azúcar	0%
punto isoeléctrico	pH 4,4
coeficiente de sedimentación	117,7 S
DO _{280nm} (1mg/ml, 1cm)	2,97
DO 260/280	1,20

PROTEINA

peso molecular	3,0x10 ⁴ D
no. subunidades/giro helicoidal	8 7/8

RNA

peso molecular	2,1x10 ⁶ D
porcentaje molar de nucleótidos	G21,8; A34,3; C22,8; U21,3
estructura 5'	m ⁷ GpppGpA
estructura 3'	poli(A)

TABLA 1.5
PARAMETROS MOLECULARES DEL VIRUS DE LA PAPA X (PVX)

c. Mecanismo de ensamblado

El modelo de ensamblado propuesto para el PVX ha sido descrito en la sección 1.9.6. de este capítulo.

Brevemente, se formaría una doble hélice proteica que encerraría al extremo 5' del RNA constituyendo la protohélice y se elongaría unidireccionalmente hacia el extremo 3' (Kaftanova, A.S. *et al.*, 1975; Goodman, R.M., 1976; Goodman, R.M. *et al.*, 1975).

1.10.3. Cepas de PVX

Se distinguen varias variantes menores, generalmente por los síntomas que dan en tabaco. Las cepas están divididas en cuatro grupos, de acuerdo a su serología (Matthews, R.E.F. 1949), en otros cuatro grupos según sea la infectividad en diferentes variedades de papa (Cockerham, G., 1955), o en otros tres grupos de acuerdo a sus puntos de inactivación térmica (Köhler, E., 1962).

1.10.4. Sintomatología en plantas de papa

1.10.4.a. Síntomas externos

Los síntomas causados por el PVX varían mucho con el tipo de cultivo y la cepa viral. Antiguamente, los cultivos eran afectados casi en un 100% y sólo muy pocas plantas conseguían sobrevivir. Se pensaba que éstas eran sanas, pero se vio que su rendimiento disminuía en un 10 a un 25% (Harrison, B.D., 1971; Hoyman, W.G., 1964; Munro, J., 1961; Murphy, H.J. *et al.*, 1966; Rich, A.E., 1977; Teri, J.M. *et al.*, 1977; Wright, N.S., 1970).

En condiciones cálidas y nubladas, se desarrolla un moteado leve en las plantas asintomáticas, que desaparece o es enmascarado en días muy soleados. En general, los síntomas varían desde un estado de latencia completa hasta la aparición de severas estrias necróticas. Comúnmente, causa mosaico suave en papa, mosaico y empequeñecimiento en tomate y moteado o anillos necróticos en tabaco. En asociación con el PVY causa el denominado "mosaico rugoso" de la papa, de síntomas muy severos.

1.10.4.b. Localización interna

En la sección 1.9.2.2. de este capítulo se ha descrito la localización interna del PVX y los distintos estados de agregación en que se lo ha encontrado. Se han observado distribuciones difusas o en forma de agregados densos en el citoplasma de la célula vegetal; cuerpos X de inclusión cerca del núcleo y cuerpos bandeados formados por alineaciones virales también en citoplasma.

1.10.5. Rango de huésped

El rango natural de huésped es la papa y el tomate. Causa el llamado "*doble virus streak*" del tomate en combinación con el TMV (Smith, K.M., 1972).

Los huéspedes experimentales abarcan unas 15 familias de angiospermas entre las que se cuentan: *Nicotiana Tabacum*, *N. glutinosa*, *Datura stramonium*, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Hyoscyamus niger*, *Cyphomandra betacea*, *Petunia sp.*, *Trifolium incarnatum* y otras. Nuevamente, los síntomas varían con la cepa de PVX y el cultivo.

Para diagnóstico se utilizan comúnmente *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa* y *Chenopodium amaranticolor*. Los síntomas que produce en estas plantas son los siguientes:

D. stramonium: moteado sistémico

G. globosa: lesiones locales necróticas muy distintivas en 4 a 5 días

C. amaranticolor: lesiones cloróticas, necróticas o manchas anulares.

G. globosa es una de las plantas más utilizada para diagnóstico debido a que es fácil de cultivar y el tipo de lesiones que da permite cuantificar el virus (Harrison, B.D., 1971).

1.10.6. Tipo de transmisión

El PVX se transmite muy fácilmente a través de jugo de hojas o de tubérculos infectados. También por elementos mecánicos utilizados en el cultivo, por contacto entre brotes, hojas o raíces (Roberts, F.M., 1946; Manzer, F.E. *et al.*, 1961). Existe alguna evidencia de que podría transmitirse por langostas (Walters, H.J., 1952). También se reportó la transmisión de este virus por esporas del hongo *Synchytrium endobioticum* (Nienhaus, F., 1965). No se transmite por semilla verdadera.

1.10.7. Serología

El PVX es serológicamente activo. Se prepara antisuero inoculando conejos por vía intramuscular con jugo de planta clarificado por calentamiento y adyuvante. El ensayo de aglutinación de látex es el más utilizado por ser rápido, confiable y sensible (Wright, N.S. *et al.*, 1977). Es usado rutinariamente para la certificación de semillas libres de PVX.

El virus en jugo tiene un punto de precipitación final de 1/5000 y el punto de inactivación térmica está entre 70°C y 76°C (Fribourg, C.E., 1975). El punto de dilución final está entre 1:10⁻⁵ y 1:10⁻⁶.

1.10.8. Control

Ante la aparición de los primeros síntomas de infección con PVX, se puede controlar la virosis por producción de nuevos cultivos a partir de semilla verdadera, aunque es realmente difícil mantener provisiones libres de este virus (Rich, A.E., 1983). El control sanitario es muy importante. Las plantas deben ser cultivadas de pequeñas y se deben usar equipos aéreos de fumigación para disminuir las posibilidades de transmisión.

Se han obtenido clones libres de PVX a partir de cultivos de yema apical de plantas infectadas y/o inactivadas por calor (MacDonald, D.M., 1973; Rich, A.E., 1969; Stace-Smith, R. *et al.*, 1968; Wright, N.S. *et al.*, 1976). Se ha reportado inmunidad a PVX en semillas de papa de las especies S41956, Saco, Saphir y Tawa (Peterson, C.E. *et al.*, 1958; Wetter, C. 1961).

1.10.9. Estrategias de replicación y traducción

1.10.9.a. Estrategias de traducción

En la sección 1.9.7. se ha discutido exhaustivamente el mecanismo de traducción que tendrían el PVX y los Potexvirus en general. De acuerdo a los datos obtenidos hasta la fecha, es altamente probable que la traducción de la proteína de la cápside del PVX se realice a través de un mensajero subgenómico. Se han detectado mensajeros subgenómicos poliadenilados a partir de RNA de plantas de *Datura stramonium* infectadas con PVX (Dolja, V.V. *et al.*, 1987). Uno de estos mensajeros, de 0.9 kb, correspondería a la proteína de la cápside, de acuerdo a los resultados obtenidos por hibridación con una sonda de cDNA conte-

niendo el extremo 5' de la secuencia correspondiente a dicha proteína. Los autores no hicieron experimentos de traducción *in vitro* para confirmar estos datos.

1.10.9.b. Estrategias de replicación

Como se ha remarcado anteriormente, no existen muchas evidencias acerca del mecanismo de replicación de los Potexvirus. Es lógico suponer que una vez que el virus penetró en el interior de la célula, se desnuda y replica su RNA genómico, de polaridad positiva, en un cierto número de cadenas negativas. Se desconoce la naturaleza de la replicasa que catalizaría dicha reacción. A partir de las cadenas negativas, se sintetizarían nuevas cadenas genómicas positivas que deben encapsidarse para formar la progenie viral. Las subunidades proteicas que, junto al RNA(+) dan origen a la nucleocápside, serían traducidas a partir de un mensajero subgenómico. Aún no se ha podido determinar si dicho sgmRNA es generado a partir de una cadena de gRNA(-), de una de gRNA(+) o de otros mensajeros subgenómicos.

Dolja, V.V. *et al.* (1987) han encontrado intermediarios de replicación de doble cadena de tamaños correspondientes al gRNA y a distintos sgmRNAs. Del análisis estructural que hacen, existirían evidencias indirectas que indican que los sgmRNAs doble cadena no podrían generar nuevos mensajeros subgenómicos. Todos los intermediarios de replicación encontrados tenían el extremo 3'(+) poliadenilado y el correspondiente tracto de poli(U) en la cadena complementaria (Dolja, V.V., 1987). De todas maneras, estos resultados son preliminares y el tema debe estudiarse más profundamente para postular un modelo más preciso del mecanismo de replicación.

CAPITULO II

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

El objetivo principal de la presente Tesis ha sido el estudio de la estructura genómica del Virus de la Papa X (PVX) en términos de la secuencia nucleotídica de su RNA constitutivo, lo que resulta fundamental para iniciar el estudio de la estrategia de replicación y de otros aspectos de la biología molecular de este patógeno. Se hizo énfasis especial en dilucidar la estructura de la región 3' del genoma viral, cuyo conocimiento resulta imprescindible para implementar diversas estrategias de resistencia antiviral por construcción de plantas transgénicas.

Un segundo objetivo ha sido la obtención de secuencias de cDNA a ser empleadas específicamente en el diagnóstico y cuantificación del virus por técnicas de hibridación molecular. Este aspecto incluyó la búsqueda de secuencias capaces de diferenciar específicamente entre las distintas cepas de PVX.

CAPITULOS III Y IV

MATERIALES Y METODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS

En el transcurso de este trabajo se usaron las siguientes cepas bacterianas:

- HB101: F⁻, hsdS20 (r⁻, m⁻), recA13, ara-14, proA2, lac Y1, gal K2, rps L20 (Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, λ-
- JM101: recA⁺ (supE, thi1, StrA, {F['], traD36, proAB, lacIQ, lac Δ ZM15}
- NM522: recA⁺ (SupE, thi1, Δ (lac-proAB), hsd5, {F['], proAB, lacIQ}, lac Δ ZM15}

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

Medio LB: (para 1 l)

Bacto-triptona (DIFCO)	10 g
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g
NaCl	10 g

llevar a pH 7.2 con NaOH 10 N

Medio LB-ágar:

Agregar 15 g/l de Bacto-ágar (DIFCO)

Medio LB-ágar blando (LB-top):

Agregar 7 g/l de Bacto-ágar (DIFCO)

Medio YT 2x: (para 1 l)

Bacto-triptona (DIFCO)	16 g
Extracto de levadura (DIFCO)	10 g
NaCl	10 g

Materiales y Métodos

Medio YT 1x: (para 1 l)

Bacto-triptona (DIFCO)	8 g
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g
NaCl	10 g

Medio SOB: (para 1 l)

Bacto-triptona (DIFCO)	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.58 g
KCl	0.19 g
MgCl ₂	2 g
MgSO ₄	2,5 g

Medio SOC: (para 1 l)

Agregar 3,6 g/l de glucosa al medio SOB

3.3. REACTIVOS

Ficoll	Sigma
Oligo dT ₁₂₋₁₈	Sigma
Polietilenglicol	Sigma
Polivinilpirrolidona	Sigma
Seroalbúmina bovina	Sigma
Hepes	Sigma
Tris-base	Sigma
Lisozima	Sigma
Bromuro de Etidio	Sigma
DNA de timo de ternera	Sigma
Deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma

Materiales y Métodos

Espermidina	Sigma
CaCl ₂	Sigma
Pipes	Sigma
IPTG	Sigma
MOPS	Sigma
Tris-base grado enzimático	BRL ^a
Complejo de Vanadyl ribonucleósidos	BRL
X-Gal	BRL
DNA ligasa de fago T4	BRL
Polinucleótido quinasa	BRL
Agarosa	BRL
^a Bethesda Research Laboratories	
Acrilamida	IBI
Bisacrilamida	IBI
Fenol	IBI
Urea	IBI
Formamida	Merck
Formaldehido	Merck
RNAsin	Promega Biolabs
Enzima de Klenow	Promega Biolabs
Sephadex G-50	Pharmacia
Sephacryl S-300	Pharmacia
<i>Primer</i> universal para M13	Pharmacia
<i>Random hexanucleotides primers</i>	Pharmacia
Dideoxinucleótidos	Pharmacia
Enzima de Klenow	Pharmacia

Materiales y Métodos

Oligo dT ₁₂₋₁₈	Pharmacia
DTT	Boheringher
Ribonucleasa H	Boheringher
SDS	Mallinckrodt
Biogel P2	Bio-Rad
DNA polimerasa I	Amersham
DNAsa I	Amersham
Película radiográfica Hyperfilm	Amersham
Matriz de sílica y soluciones de lavado (Gene Clean)	BIO 101, Inc.
Membranas de diálisis	Arthur Thomas
DNA polimerasa de fago T7 y soluciones (SEQUENASE)	U.S. Biochemical
Papel de filtro 3MM	Whatman
Película radiográfica Curix RP1	AGFA
Membrana de nylon (Gene Screen)	DuPont (New
Precursores radioactivos ($\alpha^{32}\text{PdATP}$, dCTP, dGTP, $\gamma^{32}\text{PdATP}$ y $\alpha^{35}\text{SdATP}$)	England Nuclear)
Película fotográfica 667	Polaroid

Materiales y Métodos

Bacto-ágar	DIFCO
Bacto-triptona	DIFCO
Extracto de levadura	DIFCO
Membrana de nitrocelulosa	Schleicher & Schüll
Ribonucleasa A	Worthington

Las enzimas de restricción se obtuvieron de las siguientes fuentes comerciales: BRL, Pharmacia, New England Biolabs, Promega, y otras.

4.1. CEPA VIRAL

La cepa de virus de papa X empleada fue la denominada PVXc, aislada y caracterizada en el Centro Internacional de la Papa (Lima-Perú).

4.2. PROPAGACION DEL PVX

Esta etapa se desarrolló en la Estación Experimental Regional del INTA-Balcarce y en el PROFIVA-Córdoba (Programa de Fito-virología Aplicada).

El virus se inoculó mecánicamente en hojas de plantas jóvenes de *Nicotiana glutinosa*. Al cabo de 3 a 5 semanas, de acuerdo con los síntomas de infección observados, se cosecharon las hojas infectadas congelándose inmediatamente.

4.3. PURIFICACION DEL PVX

Las preparaciones se hicieron a partir de una cantidad aproximada de 150 g de hojas infectadas. Durante todo el procesamiento se trabajó a temperaturas entre 0°C y 4°C, salvo que se indique lo contrario.

Las hojas se cortaron y homogeneizaron en un procesador de alimentos con *buffer* de homogeneización (KH₂PO₄ 0.5 M, EDTA (pH 8.0) 5 mM, β-mercaptoetanol 0.2%, urea 0.5%). El volumen utilizado fue igual al doble del peso de las hojas y se procesaron en 3 tandas de 3 minutos cada una.

El homogenato se filtró por *cheese-cloth* o tejido de nylon y se centrifugó 20 minutos a 6000 x g en un rotor Sorval SS34.

Materiales y Métodos

El sobrenadante se extrajo con 1/8 del volumen total de cloroformo y se centrifugó nuevamente 20 minutos a 6000 x g.

A la fase superior acuosa se agregó PEG y NaCl hasta una concentración final de 4% y 1.5%, respectivamente. Se agitó 15 minutos y se dejó en reposo por 60 minutos.

Se centrifugó en rotor SW28 a 14000 x g por 29 minutos. El *pellet* conteniendo el virus se resuspendió en 60 ml de *buffer* (KH₂PO₄ 0.2 M, EDTA (pH 8.0) 1 mM), con agitación suave por 2 horas.

La suspensión se centrifugó a 6000 x g por 20 minutos en un rotor Sorval SS34 para clarificarla. El sobrenadante se aplicó a un colchón de 5 ml de sacarosa 30% preparado en *buffer* de resuspensión.

El colchón de sacarosa se centrifugó en rotor SW28 a 105.000 x g por 150 minutos y el *pellet* se resuspendió en 600 µl de *buffer* Hepes (pH 7.0) 20 mM.

Esta suspensión se aplicó a un gradiente discontinuo de CsCl preparado de la siguiente manera:

500 µl de CsCl 34% en Hepes (pH 7.0) 20 mM
500 µl de CsCl 36% en Hepes (pH 7.0) 20 mM
1000 µl de CsCl 40% en Hepes (pH 7.0) 20 mM
500 µl de CsCl 45% en Hepes (pH 7.0) 20 mM
500 µl de CsCl 50% en Hepes (pH 7.0) 20 mM

Se centrifugó en rotor SW 56 a 175.000 x g por 300 minutos a 20°C. La banda viral que se obtuvo se tomó por aspiración con pipeta Pasteur y se sometió a una diálisis contra *buffer* Hepes (pH 7.0) 20 mM.

El virus obtenido se fraccionó en alícuotas pequeñas y se congeló inmediatamente a -70°C.

4.4. PURIFICACION DE RNA VIRAL

100 μ l de solución viral dializada se trataron con 1 mM de complejo de vanadyl ribonucleósidos y 50 unidades de inhibidor de ribonucleasas de placenta humana (RNAsin) por 20 minutos a temperatura ambiente.

Se extrajo una vez con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1,v/v/v) a 65°C y otra vez con un volumen de la misma mezcla a temperatura ambiente.

La fase acuosa se reextrajo dos veces con éter saturado en H₂O y se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% y 1/10 de volumen de NaAcO (pH 5.8) 2 M.

El *pellet* se lavó cuidadosamente con etanol 70%, se resuspendió con agua bidestilada y alicuotó en fracciones de 10 μ l. Se conservó a -70°C.

4.5. PURIFICACION DE DNA

4.5.1. PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO

4.5.1.a Purificación de DNA en gran escala

Se empleó el método de "lisis alcalina" (Birnboim, H.C. *et al*, 1979), descrito por Maniatis *et al* (2).

Se inocularon 5 ml de medio LB con una colonia aislada de bacterias y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación.

Materiales y Métodos

Con dicho cultivo se inoculó a su vez, 1 litro de medio LB y se incubó a 37°C con agitación hasta una $DO_{550nm} = 0.6$. Luego se agregó cloranfenicol en polvo hasta obtener una concentración final de 170 $\mu\text{g/ml}$ y se dejó crecer durante toda la noche a la misma temperatura con agitación suave.

El cultivo se centrifugó en un rotor Sorval GS3 a 5000 x g por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 20 ml de solución I.

Solución I: Glucosa 50 mM
 Tris-HCl (pH 8.0) 25 mM
 EDTA (pH 8.0) 10 mM
 lisozima 2 mg/ml

Luego de 5 minutos en hielo se agregaron 40 ml de una solución, preparada en el momento, de NaOH 0.2 N y SDS 1%. Se agitó muy suavemente y se dejó a 0°C por 10 minutos.

Se agregaron 30 ml de solución III fría, se agitó vigorosamente y se dejó en hielo por 10 minutos.

Solución III: Para 100 ml
 60 ml de KAcO 5 M
 11.5 ml de HAcO glacial
 28.5 ml de H₂O

Se centrifugó en el mismo rotor a 10000 x g por 40 minutos a 4°C. El sobrenadante se pasó cuidadosamente a través de gasa y se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol. Se dejó precipitar a temperatura ambiente por 15 minutos.

Se centrifugó en rotor SS34 a 17000 x g por 30 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, el *pellet* se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 7 ml de *buffer* TE (Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM, EDTA (pH 8.0) 1 mM).

Se añadieron 500 µl de solución de Bromuro de Etidio (EtBr) 1% p/v, se determinó el peso de esta mezcla y se agregó 1 g de CsCl por gramo de la misma.

Se ultracentrifugó por 48 horas en rotor Beckman 50 Ti a 130000 x g a 20°C.

Luego de la ultracentrifugación se extrajo la banda de DNA plasmídico por aspiración con pipeta Pasteur.

El EtBr se eliminó con 5 extracciones sucesivas con n-butanol y se dializó por 24 horas contra *buffer* TE (pH 8.0).

4.5.1.b Purificación de DNA en pequeña escala

Se inocularon 5 ml de medio LB con una colonia aislada de bacterias y se dejó crecer a 37°C con agitación hasta saturación.

Se centrifugó a 5000 rpm en centrífuga de mesa por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 1 ml de solución I (ver misma sección, parte a).

Se transfirió a un tubo de Eppendorf, se centrifugó a 4000 x g en microcentrífuga y se descartó el sobrenadante.

El *pellet* resultante se resuspendió en 100 µl de la misma solución I. Se le agregó 200 µl de una solución, preparada en el momento, de NaOH 0.2 N y SDS 1%. Se agitó suavemente y se dejó a 0°C por 5 minutos.

Se añadieron 150 µl de solución III, se agitó vigorosamente y se dejó 10 minutos en hielo.

Materiales y Métodos

Se centrifugó a 12000 x g en microcentrífuga por 15 minutos y se pasó el sobrenadante a otro tubo de Eppendorf.

Se extrajo una vez con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1,v/v/v) y dos veces con un volumen de éter saturado en agua. Se precipitó con 1/10 de volumen de NaAcO (pH 5.2) 3 M y 2 volúmenes de EtOH 100% a -70°C por 10 minutos.

El *pellet* de DNA se resuspendió en 100 µl de H₂O, se le agregó 1 µl de RNasa A (10 mg/ml), y se incubó a 37°C por 30 minutos.

Luego de este período de tiempo se precipitó el DNA por agregado de 7.5 µl de NaAcO (pH 5.2) 3 M y 300 µl de etanol 100%. Se dejó 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 x g 10 minutos en microcentrífuga, se lavó el *pellet* con etanol 70% y se resuspendió en 20 µl de H₂O bi-distilada.

4.5.2. PURIFICACION DE DNA DE BACTERIOFAGO M13

4.5.2.a Purificación de DNA doble cadena en gran escala

Se inoculó 5 ml de medio YT1x con una colonia aislada de bacterias JM101 y se dejó creciendo durante toda la noche a 37°C hasta saturación.

500 µl de este cultivo se inocularon en 10 ml de medio YT1x y se dejaron crecer a 37°C con agitación hasta saturación.

Otros 500 µl del cultivo saturado se inocularon en 10 ml de medio YT1x y se incubaron a 37°C con agitación, hasta una $DO_{550nm} = 0.5$.

A partir de una placa de fago M13 se inoculó con escarbadietes el inóculo de JM101 de $DO_{550nm} = 0.5$ y se dejó crecer durante 5 horas a 37°C con agitación.

1 ml del cultivo infectado con fagos y los 10 ml de JM101 crecidos a saturación (sin infectar), se utilizaron para inocular 1 litro de medio YT2x. Se dejó creciendo durante 4 horas a 37°C con agitación.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación y se procedió a purificar el DNA de los fagos tal como se describió en la sección 4.5.1.a.

4.5.2.b Purificación de DNA simple cadena en pequeña escala

A partir de una placa clara de fagos se inocularon 2 ml de medio LB con escarbadientes. Se agregaron 20 µl de bacterias JM101 provenientes de un cultivo saturado fresco. Se dejó crecer por 4.5 horas a 37°C con agitación vigorosa.

Luego de este período de tiempo, cada cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos en centrífuga de mesa. El sobrenadante se pasó a un tubo de Eppendorf y se centrifugó por 5 minutos a 12000 x g en microcentrífuga.

1,2 ml del sobrenadante se traspasaron a otro tubo de Eppendorf. Se agregaron 200 µl de una solución de PEG 20% - NaCl 2.5 M. Se agitó por inversión 10 veces y se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos.

Se centrifugó por 10 minutos a 12000 x g en microcentrífuga. El *pellet* de fagos, que debe ser visible, se resuspendió en 100 µl de *buffer* TE (pH 8.0).

Se agregaron 50 µl de fenol-cloroforno-alcohol isoamílico (25:24:1,v/v/v) y se hizo el siguiente tratamiento: a) agitación vigorosa con Vortex por 1 minuto; b) reposo por 5 minutos y c) nuevamente agitación vigorosa por otro minuto. De este modo, se desagregaron las cápsides de los fagos y se extrajo el material nucleico.

La fase acuosa se pasó a otro tubo de Eppendorf y se precipitó con 300 μ l de una solución de etanol: NaAcO (pH 5.2) 3 M (25:1,v/v).

Se dejó durante 30 minutos a -70°C o durante toda la noche a -20°C , se centrifugó por 10 minutos en microcentrífuga, se lavó el *pellet* obtenido con etanol 70% y se resuspendió en 15 μ l o 25 μ l de *buffer* TE (pH 8.0).

4.5.3. PURIFICACION DE DNA DE FAGOSMIDO

Los fagósmidos KS y SK son construcciones desarrolladas por la compañía Stratagene bajo el nombre genérico de *BlueScript*. Normalmente, se comportan como plásmidos, replicándose y amplificándose como tales. Sin embargo, en presencia de un bacteriófago *helper*, su DNA se encapsida en proporciones 50:1 (fagósmido *helper*) en forma de simple cadena. El *helper* proporciona las funciones en *cis* y en *trans* para el encapsidamiento, el fagósmido sólo posee las funciones en *cis*. En este trabajo se empleó el fagósmido KS+.

4.5.3.a Purificación de DNA doble cadena de fagósmido KS

Por lo anteriormente descrito, para obtener DNA doble cadena se amplificó y purificó fagósmido como cualquier plásmido, siguiéndose los protocolos descritos en las secciones precedentes.

4.5.3.b Purificación de DNA simple cadena de fagósmido KS

Se inocularon 3 ml de medio YT2x con una colonia aislada de bacterias. Se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación.

Al día siguiente se tomaron 300 μ l del cultivo y se inocularon 5 ml de medio YT2x. Se incubó 90 minutos a 37°C con agitación.

Luego se agregaron 1.5×10^{10} fagos *helper* (VCS o R408) y se dejó crecer por 7 horas a 37°C con agitación fuerte.

Se centrifugó a 4000 x g por 5 minutos en centrifuga de mesa y el sobrenadante se sometió al mismo procedimiento de purificación descrito en la sección 4.5.2.b.

4.6. SINTESIS DE DNA COPIA POR EL METODO DE LA RIBONUCLEASA H

El procedimiento seguido fue una modificación del método de Gubler y Hoffman (Gubler, U. *et al*, 1983). Se utilizó como molde o templado RNA genómico de PVX y como iniciadores de la transcripción se emplearon, alternativamente, fragmentos de DNA de timo de ternera (iniciadores inespecíficos) u oligo dT₁₂₋₁₈.

4.6.a Tratamiento del RNA con metilmercurio

Se incubaron 5 μ l de RNA viral (aproximadamente 1 μ g) en 10 μ l de H₂O a 70°C durante 1 minuto.

Se agregó 1 μ l de hidroximetilmercurio 0.1 M y se dejó actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 2 μ l de β -mercaptoetanol y se dejó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

4.6.b Síntesis de la primera cadena del DNA copia (cDNA)

Los pasos seguidos en esta etapa son los mismos independientemente de los *primers* empleados.

Materiales y Métodos

A la preparación anterior se agregaron 2.5 μg ó 1 μg de *primers at random* u oligo dT₁₂₋₁₈, respectivamente. Se utilizaron 100 unidades de transcriptasa reversa en 50 μl de volumen de incubación, en las siguientes condiciones finales de reacción:

Tris-HCl (pH 8.3) a 42°C		100 mM
MgCl ₂		10 mM
KCl		140 mM
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	c/u	1 mM
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP		20 μCi (Actividad específica 3000 Ci/mmol)

Se incubó durante 90 minutos a 42°C y se detuvo la reacción con 2 μl de EDTA (pH 8.0) 0.5 M.

Se calculó el porcentaje de deoxinucleótido radioactivo incorporado a la primera cadena del cDNA por precipitación con ácido tricloroacético (TCA).

Se extrajo una vez con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y los dNTPs no incorporados se separaron del cDNA por cromatografía en columnas de 5 ml de Sephadex G-100.

Se precipitó con 1/10 de volumen de NaAcO (pH 5.2) 3 M y 2 volúmenes de etanol 100% y se resuspendió en 16 μl de H₂O.

4.6.c Síntesis de la segunda cadena

El producto de la reacción anterior (híbrido DNA-RNA) se trató con 0.5 unidades de ribonucleasa H, 12.5 unidades de DNA polimerasa I de *E. coli* y 1 unidad de DNA ligasa de *E. coli* en las siguientes condiciones finales de reacción:

Materiales y Métodos

Tris-HCl (pH 7.5)	20	mM
MgCl ₂	4	mM
KCl	80	mM
dNTPs	c/u 50	mM
NAD	150	mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	mM
BSA	2.5	µg
α ³² P-dCTP	10	µCi (Actividad específica 3000 Ci/mmol)

Se incubó por 1 hora a 12°C y por otra hora a 22°C.

Se extrajo una vez con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v).

Se calculó la masa de cDNA obtenida por las cpm precipitables por TCA. El rendimiento obtenido fue usualmente de 80 ng de cDNA doble cadena por µg de RNA.

Los dNTPs no incorporados se separaron por cromatografía en columna de 2 ml de Sephacryl S-300.

El cDNA se precipitó con 1/10 de volumen de NaAcO (pH 5.2) 3 M y 2 volúmenes de etanol 100%. Se resuspendió en 10 µl de H₂O bidestilada.

4.6.d Rellenado de posibles extremos 3' recesivos por el método de *fill-in*

La preparación anterior se incubó con 15 unidades de enzima de Klenow (fragmento grande de la DNA polimerasa I) en un volumen final de reacción de 30 µl por 20 minutos a temperatura ambiente en las siguientes condiciones:

Tris-HCl (pH 7.5)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	50 mM
DTT	5 mM
dNTPs	c/u 400 mM

La enzima se inactivó por calentamiento a 70°C por 15 minutos.

4.6.e Ligado del cDNA a un plásmido vector

El cDNA se ligó en forma *blunt end* (por unión de extremos romos) a los plásmidos pAT153-PvuII/8 y KS+ que previamente fueron cortados en sus sitios únicos PvuII y SmaI (respectivamente) y desfosforilados en sus extremos libres con fosfatasa alcalina de intestino de ternera.

La técnica se describe en la siguiente sección.

4.7. **LIGADO DE FRAGMENTOS DE DNA A VECTORES**

Los plásmidos vectores empleados fueron:

pAT153 - PvuII/8

M13mp18 y mp19, en su forma replicativa doble cadena

KS+, en su forma replicativa doble cadena.

4.7.1. PREPARACION DE LOS VECTORES

Se cortaron entre 5 y 10 µg de cada vector con las enzimas de restricción deseadas.

La digestión completa se controló haciendo ensayos de transformación con el vector cortado hasta obtener "ruido de fondo" suficientemente bajo.

Las condiciones del ensayo fueron las siguientes:

a) Condiciones del tratamiento con fosfatasa

Se emplearon 5 mU de enzima por pmol de extremos 5' fosfato y 0.1 mU por μ l de reacción final. Las mU necesarias por pmol de extremos se calcularon de acuerdo con la concentración del vector. El volumen final de reacción se calculó en base a las unidades por μ l.

Se empleó como *buffer* de dilución "*CIP buffer*" (Tris-HCl (pH 9.0) 50 mM, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, espermidina 1 mM).

Se incubó por 15 minutos a 37°C y por otros 15 minutos a 56°C.

Se le agregó la misma cantidad de enzima que en el paso anterior y se incubó durante los mismos tiempos.

Para detener la reacción, se llevó el volumen de reacción al doble y se agregó SDS y *buffer* NET 10x (NET 1x Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA (pH 8.0) 1 mM) hasta concentraciones finales de 0.5% y 1x respectivamente. Se calentó durante 15 minutos a 68°C.

Se hicieron extracciones sucesivas con fenol, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1,v/v/v) y éter saturado en H₂O.

Se precipitó con etanol y se resuspendió en agua.

- b) Preparación de vectores por corte con dos enzimas de restricción.

Los plásmidos vectores cuyo sitio de inserción se obtuvo por digestión con dos enzimas de restricción distintas se prepararon del siguiente modo:

Se digirieron 5 a 10 μg de plásmido con una de las enzimas de restricción.

Se controló la eficiencia de la digestión por ensayos de transformación.

Se digirió con la otra enzima de restricción y se volvió a controlar la eficiencia de corte como en el paso anterior.

Se tomó una pequeña alícuota, usualmente 1 μl de esta mezcla y se marcó radioactivamente por el método de *fill-in* (procedimiento descrito en la sección 4.12.1).

La alícuota marcada se reunió con el resto de la preparación y se sometió a cromatografía en columna de 2 ml de Sephacryl S-300 en *buffer* TE-NaCl 0.15 M. De este modo se separó el vector cortado del fragmento escindido en la digestión.

4.7.2. LIGADO DE FRAGMENTOS DE DNA EN LOS VECTORES

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μl en las siguientes condiciones:

A 10-15 ng de vector se agregaron 1 μl de *buffer* de ligasa 10x, 2 unidades de DNA ligasa de bacteriófago T4 y distintas relaciones molares de extremos de inserto (10:1 y 50:1, inserto:vector, respectivamente).

Buffer de ligasa 10x = Tris-HCl (pH 7.4) 500 mM
MgCl₂ 100 mM
DTT 50 mM
espermidina 1 mM
ATP 10 mM (agregado en el momento)

Se incubó entre 5 y 10 horas a 18°C y luego se transformaron bacterias competentes de las cepas HB101, JM101 o NM522 (ver secciones siguientes), con la mitad del volumen de la mezcla de ligación.

Se hicieron los siguientes controles:

- a) Estado de competencia de las células: transformación con 1 ó 2 ng de vector sin cortar.
- b) Grado de corte de los vectores: transformación con 10 ó 15 ng de vector cortado.
- c) Grado de fosforilación de los vectores: transformación con 10 ó 15 ng de vector tratado con *buffer* de ligasa y DNA ligasa.

Se consideró aceptable un 1% de vector incompletamente tratado respecto del vector cortado.

4.8. TRANSFORMACION DE CELULAS DE *E. coli*

4.8.1. PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES HB101 y NM522

Se prepararon células competentes de *E. coli* de la cepa HB101 y NM522 según el método de Hanahan (Hanahan, D., 1983) con algunas modificaciones.

Materiales y Métodos

Se inocularon 5 ml de medio 30C con una colonia aislada de bacterias y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación.

Se tomaron 500 µl del cultivo anterior y se inocularon 100 ml de medio SOB contenidos en un Erlenmeyer de 500 ml. Se centrifugó durante 10 minutos a 5000 x g en rotor SS34 a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 40 ml de *buffer* de transformación I (TfbI) frío y se dejó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó 10 minutos a las mismas condiciones que en el paso anterior. El *pellet* bacteriano se resuspendió en TfbII frío y se dejó en hielo por 5 minutos.

Se alicuotó en tubos de Eppendorf y se congeló por inmersión en N₂ líquido y se mantuvo a -70°C.

<u>TfbI</u>		<u>TfbII</u>	
KAcO	30 mM	PIPES	10 mM
KCl	100 mM	KCl	10 mM
CaCl ₂	10 mM	CaCl ₂	75 mM
MnCl ₂	50 mM	Glicerol	15% v/v
Glicerol	15% v/v		
llevar a pH 5.8 con HAcO		llevar a pH 6.5 con KOH	

4.8.2. PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES JM101

Se utilizó en este caso el método descrito por Mandel y Higa (Mandel, M. *et al*, 1970) modificado.

Se inoculó 5 ml de medio LB con una colonia aislada de JM101 y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación.

Materiales y Métodos

1 ml de ese cultivo se inoculó en 50 ml de medio LB (contenidos en un Erlenmeyer de 250 ml) y se creció hasta una $DO_{550nm} = 0.3-0.4$.

Se centrifugó a 5000 x g en rotor SS34 por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 25 ml de CaCl₂ 50 mM frío.

Se dejó durante 20 minutos en hielo, se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior y se resuspendió en 5 ml de CaCl₂ 50 mM frío.

Estas bacterias competentes se usaron a partir de ese momento hasta 24 horas después de la preparación.

4.8.3. TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES

4.8.3.a Transformación de células JM101

200 µl de bacterias JM101 competentes se agregaron a un tubo de Eppendorf conteniendo hasta 10 µl de solución de DNA. Se dejó a 0°C por 40 minutos.

Se incubó por 3 minutos a 42°C (*shock* térmico) y se puso inmediatamente a 0°C.

Se agregaron 200 µl de bacterias JM101, provenientes de un cultivo saturado fresco, 20 µl de IPTG 100 mM y 40 µl de X-Gal 2%.

Esta mezcla se agregó a 3 ml de LB-*top* (previamente fundido y mantenido a 50°C) y se volcó en una placa de Petri con LB-ágar.

Se incubó en estufa a 37°C durante toda la noche.

4.8.3.b Transformación de células HB101 y NM522

100 µl de bacterias se agregaron a un tubo de Eppendorf conteniendo hasta 10 µl de solución de DNA. Se dejó durante 30 minutos a 0°C.

Se incubó por 3 minutos a 42°C (*shock* térmico). Se agregó 1 ml de medio SOC y se incubó a 37°C por 30 minutos.

Se tomó una alícuota de 100 a 200 µl y se plaqueó por rastrillado en placas de LB-ágar conteniendo ampicilina (100 µg/ml). En el caso de las bacterias NM522, las placas de medio LB-ágar-ampicilina fueron rastrilladas media hora antes con 50 µl de IPTG 100 mM y 20 µl de X-Gal 2%.

4.9. HIBRIDACION *IN SITU* DE COLONIAS BACTERIANAS Y PLACAS DE BACTERIOFAGOS

4.9.1. HIBRIDACION DE DNA DE COLONIAS BACTERIANAS

El procedimiento seguido se basó en el método descrito por Grunstein y Hogness (Grunstein, M. *et al*, 1975).

Se colocó un papel de filtro Whatman 541 sobre la superficie de una caja de Petri donde crecieron las colonias bacterianas.

Se dejó durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente retirándose luego el filtro con las colonias adsorbidas.

El filtro se trató de manera secuencial, por 5 minutos en cada paso, con las siguientes soluciones:

- SDS 10%
- NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M a 80°C

Materiales y Métodos

- Tris-HCl (pH 7.5) 0.5 M, NaCl 1.5 M a temperatura ambiente con agitación ocasional
- SSC 2x (SSC 1x = citrato de sodio 0.015 M, NaCl 0.15 M)
- Etanol 96% y dejar secar al aire.

4.9.1.a Prehibridación

Los filtros, contenidos en una bolsa plástica sellada, se incubaron a 65°C con agitación con las siguientes soluciones:

SSC 3x, 10 minutos,

SSC 3x, solución de Denhardt 10x, SDS 0,1% 60 minutos.

SSC 3x, Denhardt 10x, SDS 0.1%, DNA de timo de ternera (desnaturalizado por calentamiento) 100 µg/ml, 120 minutos.

Solución de Denhardt 50x: BSA 1% (p/v)
 polivinilpirrolidona 1% (p/v)
 ficoll 1% (p/v)

4.9.1.b Hibridación

La sonda radioactiva se desnaturalizó por calentamiento a 100°C por 5 minutos y se agregó a la bolsa conteniendo los filtros junto con la solución de hibridación (SSC 3x, solución de Denhardt 1x, SDS 0.1% (p/v) y DNA de timo de ternera (desnaturalizado por calor) 100 µg/ml).

- Se incubó durante 15 horas a 65°C con agitación.

4.9.1.c Lavados

La sonda no hibridada se eliminó con los siguientes lavados sucesivos:

- SSC 1x, a 65°C por 15 minutos, 2 veces.

SSC 0.1x a temperatura ambiente por 15 minutos, 2 veces.
Se dejó secar a temperatura ambiente y se expuso a película radiográfica con pantalla intensificadora.

4.9.2. HIBRIDACION DE DNA DE COLONIAS BACTERIANAS CON OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS

Este procedimiento se utilizó para hibridar *in situ* DNA de colonias bacterianas con oligo dT₁₂₋₁₈ marcado con γ ³²P-ATP y la enzima polinucleótido quinasa de bacteriófago T4. Se emplearon discos de nitrocelulosa y los pasos de desnaturalización y neutralización fueron similares a los seguidos en la secuencia inmediatamente anterior.

4.9.2.a Prehibridación

Los filtros, contenidos en una bolsa plástica sellada, se incubaron a 65°C con agitación con la siguiente solución:

SSC 5x, solución de Denhardt 10x, DNA de timo de ternera (desnaturalizado por calentamiento) 100 µg/ml, 120 minutos.

4.9.2.b Hibridación

La sonda radioactiva se agregó a la bolsa conteniendo los filtros con la solución de prehibridación.

Se incubó durante 90 minutos a 37°C con agitación.

4.9.2.c Lavados

La sonda no hibridada se eliminó con los siguientes lavados sucesivos:

SSC 5x, a 4°C por 15 minutos, 4 veces.

Se dejó secar a temperatura ambiente y se expuso a película radiográfica con pantalla intensificadora.

4.9.3. HIBRIDACION DE DNA DE PLACAS DE BACTERIOFAGOS

Este procedimiento se utilizó para hibridar DNA simple cadena proveniente de placas de crecimiento retardado de bacteriófagos M13. Se emplearon discos de membrana de nylon.

Se colocó un disco sobre la superficie de la caja de Petri conteniendo el cultivo y se dejó por 2 ó 3 minutos.

Se retiró y se puso, con las placas adheridas hacia arriba, sobre una solución de NaOH 0.5 N.

Luego de 2 minutos, se pasó a un papel secante y se repitió el paso anterior.

Se puso sobre una solución de Tris-HCl (pH 7.5) 1 M.

Se dejó 2 minutos y se pasó a papel secante. Se repitió una vez más este paso.

Se dejó secar a temperatura ambiente.

4.9.3.a Prehibridación

Los discos se incubaron en bolsas de plástico selladas a 42°C durante un período mínimo de 1 hora. La solución de hibridación fue la siguiente: formamida deionizada 50%, SDS 1%, NaCl 1M.

4.9.3.b Hibridación

A la bolsa conteniendo los discos con la solución de prehibridación se le inyectó la sonda radioactiva y DNA de timo de ternera (100 µg/ml), ambos desnaturalizados por calentamiento a 100°C por 5 minutos.

- Se incubó a 42°C por aproximadamente 15 horas.

4.9.3.c Lavados

Los filtros se sometieron a los siguientes lavados sucesivos:

- SSC 2 x a temperatura ambiente por 5 minutos, 2 veces.
SSC 2x, SDS 1% a 65°C por 30 minutos, 2 veces.
SSC 0.1x a temperatura ambiente por 30 minutos, 2 veces.
Se dejó secar a temperatura ambiente y se expuso a película radiográfica con pantalla intensificadora.

4.10. USO DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción se obtuvieron de diversas fuentes comerciales. De acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes, las digestiones se efectuaron en las siguientes condiciones:

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	en concentraciones variables de 0, 50, 100 y 150 mM. En el caso de la

enzima Sma I, se sustituyó el NaCl por KCl 20 mM.

Las incubaciones se realizaron generalmente por un período de tiempo de 2 horas en la temperatura aconsejada con 3 a 5 unidades de enzima por μg de DNA y en volúmenes tales que la concentración final de glicerol presente en las mismas fuese igual o inferior al 10% (v/v).

4.11. MARCACION RADIOACTIVA DE RNA

4.11.1 MARCACION POR FOSFORILACION DE EXTREMOS 5'

Se usó la enzima polinucleótido quinasa de bacteriófago T4 y como precursor radioactivo $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$. El procedimiento consiste en un primer paso de degradación controlada de las moléculas de RNA en fragmentos pequeños carentes de grupos fosfato en sus extremos 5' y en un segundo paso de marcación propiamente dicha.

Los *buffers* empleados fueron los siguientes:

Buffer I:

Glicina	5 mM
EDTA (pH 8.0)	10 μM
Tris-HCl (pH 9.5)	50 mM
Espermidina	100 μM (agregada en el momento)

Buffer II:

MgCl_2	10 mM
DTT	5 mM

Materiales y Métodos

Primer paso: En un volumen final de 50 μ l se mezclaron 40 μ l de *buffer* I con 2 a 3 μ g de RNA. Se incubó a 90°C por 30 minutos.

Segundo paso: A la mezcla anterior, se le agregaron 5 μ l de *buffer* II, 35 μ Ci de γ ³²P-ATP (actividad específica 1500 Ci/mmol) y 10 unidades de polinucleótido quinasa de bacteriófago T4.

- Se incubó 30 minutos a 37°C.

Se detuvo la reacción por desnaturalización de la enzima con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v).

Se separó el nucleótido radioactivo no incorporado por cromatografía en columna de 2 ml de Sephacryl S-300 en *buffer* TE-NaCl 0.15 M.

4.11.2. MARCACION POR PRIMING AT RANDOM (INICIACIONES AL AZAR)

Este método se basa en la síntesis de cadenas cortas de cDNA a partir de oligonucleótidos sintéticos que hibridan inespecíficamente (*primers at random*). Como templado se usó RNA de PVX parcialmente degradado y la enzima empleada fue la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviaria.

Buffer R Mix 2x:

Tris-HCl (pH 8.3)	100	mM
EDTA (pH 8.0)	10	mM
DTT	4	mM
KCl	60	mM
dNTPs-dxTP	100	μ M de cada uno*
dxTP	4.4	μ M*

Materiales y Métodos

En un tubo de Eppendorf se mezclaron 5 μ l de RNA con 25 μ l de *RMix 2x*, 5 μ l de $\alpha^{32}\text{P}$ dGTP (actividad específica 3000 ci/mmol), 2 μ l de *primers at random* (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 30 unidades de transcriptasa reversa en un volumen final de 50 μ l.

Se incubó a 42°C por 1 hora, se volvió a agregar la misma cantidad de enzima y se reincubó por otra hora a la misma temperatura.

Se detuvo la reacción por agregado de 5 μ l de EDTA (pH 8.0) 500 mM, 5 μ l de DNA de timo de ternera (10 mg/ml) y 1.5 μ l de NaOH 10 N.

Se incubó a 42°C por 30 minutos y se neutralizó por agregado de 1.1 μ l de HAcO glacial.

Se separó el nucleótido radioactivo no incorporado por cromatografía en columna de 2 ml de Sephacryl S-300 en *buffer* TE-NaCl 0.15 M.

* Significa que se utilizó una concentración 100 μg de cada uno de los deoxinucleótidos (dNTPs) menos del radioactivo (dXTP).

4.12. MARCACION DE DNA

4.12.1. MARCACION POR EL METODO DE *FILL-IN*

Se digirió una cantidad aproximada de 1 μg de DNA con una o más enzimas de restricción (que originen extremos 5' protruyentes) en un volumen final de 20 μ l.

Luego de incubar por 1 ó 2 horas a 37°C se agregaron 0.5 μ l de cada uno de los deoxinucleótidos no radioactivos (0.5 mM cada uno), 2 μ l del deoxinucleótido radioactivo faltante

Materiales y Métodos

(actividad específica 3000 Ci/mmol), 1 unidad de enzima de Klenow y 2 μ l de *buffer* de concentración salina media 10x (*buffer* 1x = Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM) en un volumen final de 40 μ l.

Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, se agregó 1 μ l de dNTPs (0.5 mM cada uno) y se reincubó por otros 10 minutos en las mismas condiciones.

Se desnaturalizó la enzima por calentamiento a 65°C por 20 minutos.

4.12.2 MARCACION POR NICK TRANSLATION (DESPLAZAMIENTO DEL CORTE)

300 a 500 ng de DNA circular (plásmido) o lineal (fragmento) de un tamaño superior a los 150 pares de bases se incubaron con la siguiente mezcla enzimática: 0,025 unidades de deoxirribonucleasa de páncreas bovino (DNAsa), 0,05 ng de DNA polimerasa I (*E. coli*), 25 μ Ci de α^{32} PdCTP (actividad específica 3000 Ci/mmol), *buffer* de *nick translation* 10x y los otros tres deoxinucleótidos no radioactivos en concentración 50 μ M en un volumen final de 40 μ l.

Buffer de *nick translation* 10x:

Tris-HCl (pH 7.2)	50	mM
MgSO ₄	10	mM
DTT	0,1	mM
BSA	50	μ g/ml

Se incubó por 45 minutos a 60°C y se detuvo la reacción con el agregado de 3 μ l de EDTA (pH 8.0) 0.5 M.

El deoxinucleótido radioactivo no incorporado se separó del DNA marcado por cromatografía en columnas de 2 ml de Sephacryl S-300 en *buffer* TE-NaCl 0.15 M.

4.12.3. MARCACION RADIOACTIVA DE DNA POR PRIMING AT RANDOM

Para marcar DNA por este método es necesario que dicho DNA esté linearizado. Se empleó DNA proveniente de plásmidos digeridos con una única enzima de restricción o de fragmentos purificados por diversos métodos (ver sección 4.14).

Materiales y Métodos

5 a 100 ng de DNA lineal en un volumen menor a 10 μ l se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C por 2 minutos.

Se les agregó 4 μ l de *buffer* OLB 5x, 2 μ l de una mezcla de los tres deoxinucleótidos no radioactivos de concentración 0.2 M en *buffer* TE (pH 7.5), 1 a 5 μ l de α^{32} PdCTP (actividad específica 3000 Ci/mmol), 5 unidades de enzima de Klenow y H₂O hasta un volumen final de reacción de 20 μ l.

Buffer OLB 5x:

Pipes (pH 6.6)	500	mM
MgCl ₂	25	mM
DTT	50	mM
<i>Random hexanucleotides primers</i>	1,25	mg/ml
BSA	1	mg/ml

Se incubó a temperatura ambiente toda la noche y se detuvo la reacción por agregado de 2 μ l de EDTA (pH 8.0) 0.5 M.

Se separó el deoxinucleótido radioactivo no incorporado por cromatografía en columna de 2 ml de Sephacryl S-300 en *buffer* TE-NaCl 0.15 M.

4.13. ELECTROFORESIS EN GELES

4.13.1. GELES DE AGAROSA

4.13.1.a Geles de agarosa comunes

Se utilizó agarosa en concentraciones de 0.8% (p/v) a 1.5% (p/v) en *buffer* TAE 0.5X.

Los tamaños variaron entre el de un portaobjetos hasta geles de 15x20 cm.

Buffer TAE 50x:

Tris-HAcO (pH 8.0)	2 M
EDTA (pH 8.0)	50 mM

La preparación es similar a la descrita por Maniatis *et al* (Maniatis, T. *et al*, 1982) y se corrieron a un voltaje no mayor que 8 volts por cm de distancia entre los electrodos de las cubas de electroforesis.

El *buffer* de corrida fue el mismo que el de armado del gel. Una vez finalizada la corrida, se tiñó por inmersión en una solución de Bromuro de Etidio (EtBr) 50 µg/ml. El DNA se observó por transiluminación con luz ultravioleta (UV) de 300 nm y se fotografió con una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo y película Polaroid 667 de alta sensibilidad.

4.13.1.b Geles desnaturalizantes de formaldehido

Este tipo de geles se utilizó para correr RNA en condiciones desnaturalizantes. La velocidad de migración a través de este tipo de geles es proporcional al log₁₀ de su peso molecular.

Preparación del gel: Para 100 ml de solución de agarosa 1.5% se disolvieron por calentamiento 1.5 g de agarosa en 73 ml de H₂O y se llevaron a 60°C. Se le agregó 10 ml de *buffer* MOPS 10x (pH 7.0) y 16.2 ml de formaldehido 37%. El gel se armó rápidamente en forma vertical con espaciadores de 2 mm de espesor.

Buffer MOPS 10x:

MOPS	0.2 M
NaAcO	0.05 M

EDTA (pH 8.0) 10 mM

Preparación de las muestras a sembrar: El RNA, en cantidades variables de 0.1 a 1 µg, se disolvió en un volumen apropiado de una solución conteniendo formamida deionizada 50%, formaldehído 6% y MOPS 1x. Se incubó a 60°C por 15 minutos, se le agregó el *buffer* de siembra y se utilizó inmediatamente. El *buffer* de corrida utilizado fue MOPS 1x.

4.13.1.c Buffers de siembra

El *buffer* de siembra que se utilizó para todas las electroforesis en geles de agarosa y de acrilamida nativa (ver sección siguiente) tuvo la siguiente composición:

Glicerol	50%
EDTA (pH 8.0)	1 mM
Azul de bromofenol	0.4%

Para electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturante se empleó el siguiente *buffer* de siembra:

Formamida deionizada	95%
EDTA (pH 8.0)	20 mM
Azul de bromofenol	0.05%
Xylene cyanol FF	0.05%

4.13.2. GELES DE POLIACRILAMIDA

Para la preparación de todos los geles descritos se partió de una solución madre de acrilamida 40% (p/v)

El *buffer* del gel y el de corrida, salvo que se indique lo contrario fue TBE 1x.

TBE 10x: Para 1 l

Tris-base	108 g
Acido bórico	55 g
EDTA (pH 8.0) 0.5 M	40 ml

Las dimensiones de los geles fueron: 40 ó 60 cm de largo, 20 cm de ancho y 0.4 mm de espesor.

La preparación de los geles es similar a la descrita por Maniatis *et al* (Maniatis, T. *et al*, 1982).

Los geles se corrieron a potencia constante, con valores entre 30 y 40 Watts para los de 40 cm y 70 Watts para los de 60 cm.

4.13.2.a Geles de poliacrilamida nativos

Se empleó este tipo de geles para separar fragmentos de DNA radioactivos marcados por *fill-in* (ver sección 4.12.1) y para mapeos con enzimas de restricción. Los porcentajes de acrilamida variaron entre un 5% y un 10%, de acuerdo al tamaño de los fragmentos a separar.

4.13.2.b Geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Para la secuenciación de DNA se emplearon geles de poliacrilamida desnaturalizante.

- Se prepararon del siguiente modo: para 100 ml de solución, 15 ml de solución madre 40% (ver sección 4.13.2.a), 10 ml de TBE 10x, 42 g de urea y H₂O.

Materiales y Métodos

Excepcionalmente, se prepararon geles que contenían, además, formamida 40%.

También se utilizaron geles en gradientes de *buffer*. Se prepararon del siguiente modo:

<u>solución 0.5x (para 100 ml)</u>		<u>solución 2.5x (para 100 ml)</u>	
Acrilamida	6 g	Acrilamida	6 g
Bisacrilamida	0.3 g	Bisacrilamida	0.3 g
Urea	42 g	Urea	42 g
TBE 10x	5 ml	TBE 10x	25 ml
		Azul de bromofenol	5 mg
		Sacarosa	10 g

Con una pipeta de 10 ml y una propipeta se aspiraron 4 ml de solución 0.5 x. Con la misma pipeta se tomaron 6 ml de la solución 2.5 x, cuidando de no producir turbulencias. Se hicieron entrar dos burbujas de aire (para formar el gradiente dentro de la misma pipeta) y se descargó la mezcla entre los vidrios para formar el gel. Se completó el volumen requerido con la solución 0.5x.

El *buffer* de corrida fue TBE 0.5x en la parte superior de la cuba de electroforesis y TBE 1x en la inferior.

4.14. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA

4.14.1. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

4.14.1.a Electroelución

Se corrió un gel de agarosa preparativo, se tiñó con EtBr y se localizó la banda de interés por visualización con luz UV.

Se recortó la porción que contenía dicha banda, y se la colocó en un pocillo hecho en otra parte del mismo gel de agarosa recubierto con una membrana de diálisis. Se continuó la electroforesis al mismo voltaje por 30 minutos para hacer que el DNA se pegara a la membrana.

Se retiró la membrana del gel sin cortar la corriente eléctrica.

Se eluyó el DNA con 3 lavados sucesivos de 150 μ l cada uno de *buffer* TE. Estos lavados se reunieron en un tubo de Eppendorf, se extrajeron una vez con fenol y se precipitaron con 1/10 de volumen de NaAcO (pH 5.2) 2 M y 2 volúmenes de etanol. Se lavó el *pellet* con etanol 70% y se resuspendió en 10 a 20 μ l de *buffer* TE.

4.14.1.b Adsorción a matriz de sílica

Otro método alternativo para purificar fragmentos de DNA de geles de agarosa fue adsorberlos a una matriz de sílica (pequeñas bolitas de vidrio). En este caso se utilizó un *kit* comercial.

Se corrió un gel de agarosa, se localizó la banda de DNA de interés por visualización con luz UV y se cortó ese trozo de gel.

Se determinó su peso y se le agregó 3 a 4 volúmenes de solución de NaI respecto al peso del trozo de agarosa.

Se disolvió por calentamiento a 50°C y se le agregó la solución con la matriz de sílica. El volumen agregado, en μl , fue proporcional a los μg de DNA de la banda.

Se dejó adsorber a 0°C, se centrifugó 5 segundos en microcentrífuga y se descartó el sobrenadante.

Se lavó el *pellet* 3 veces con solución de lavado provista por los fabricantes y se eluyó con un volumen de 5 a 20 μl de H₂O por calentamiento a 50°C por 5 minutos.

Todas las soluciones fueron provistas por los fabricantes (GeneClean, BIO 101, Inc.).

4.14.2. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Se utilizó esta técnica para purificar fragmentos de DNA marcados radioactivamente por el método de *fill-in* (sección 4.12.1).

- La muestra de DNA marcado se sembró en geles de poliacrilamida nativos (ver sección 4.13.2) de porcentajes entre un 5% y 8% de acuerdo con los tamaños de los fragmentos a separar. Una vez finalizada la electroforesis, se visualizó la banda exponiendo a autorradiografía por 15 minutos.

Se cortó la banda del gel correspondiente al fragmento deseado y se la introdujo en un tubo de Eppendorf conteniendo 400 μl de NaAcO (pH 5.2) 0.3 M. El DNA marcado se dejó eluyendo toda la noche a 37°C.

4.15. AUTORRADIOGRAFIAS

La exposición autorradiográfica se utilizó rutinariamente para detectar fragmentos radioactivos de DNA, ya sea en geles o en membranas de nylon o de nitrocelulosa.

- Se utilizó película plástica autoadherente ("Rolopack") para cubrir los geles o las membranas antes de la exposición. Se utilizó película Agfa Curix Rp1 para las marcaciones radioactivas con ^{32}P y película Hyperfilm de Amersham para las marcaciones con ^{35}S . Se expuso a temperatura ambiente o a -70°C con pantallas intensificadoras de tungsteno-calcio-fósforo (Cronex Lightning Plus, DuPont), dependiendo de la intensidad de la marca.

4.16. TRANSFERENCIA DE RNA (TECNICA DE *NORTHERN*)

A continuación se detallan los pasos seguidos en este procedimiento.

a) Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa-formaldehido tal como se describió en la sección 4.13.1.

Se sembró aproximadamente 1 μg de RNA viral y se corrió la electroforesis a un voltaje constante de 8 V/cm (entre electrodos) en *buffer* MOPS 1x.

b) Transferencia a membrana de nylon

Se cortó un trozo de membrana de nylon (Gene Screen, DuPont)

del mismo tamaño que el gel.

Se embebió en una solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.5) 0.025 M por 15 minutos. Se humedecieron dos trozos de papel de filtro Whatman 3MM en la misma solución.

Los papeles de filtro se ubicaron sobre un soporte elevado de tal modo que sus extremos estuvieran en contacto con la solución de fosfatos.

El gel se ubicó encima de estos filtros y la membrana de nylon se dispuso arriba del gel, cuidando de no formar burbujas entre ambas superficies.

Consecutivamente, se dispusieron por encima de esta membrana cinco papeles de filtro Whatman 3MM, una pila de 7 cm de alto de servilletas de papel absorbente, y un peso de 1/2 Kg.

Se dejó transferir por capilaridad durante toda la noche.

Se retiró la membrana, se enjuagó en el mismo *buffer* para eliminar restos de agarosa, y se dejó secar a temperatura ambiente.

La membrana se dispuso entre dos papeles Whatman 3MM y se horneó a 80°C por 2 horas.

4.17. TRANSFERENCIA DE DNA

4.17.1. TECNICA DE SOUTHERN

Las muestras de DNA, de doble o simple cadena, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (ver sección 4.13.1). Cuando finalizó la corrida, se sometió al gel al siguiente tratamiento:

Desnaturalización por inmersión en una solución de NaOH 0.2 N y NaCl 0.6 M por 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación.

Neutralización, por 3 lavados sucesivos, con una solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.5) 0.025 M por 1 hora a temperatura ambiente, con agitación.

Luego de este tratamiento, se transfirió el DNA a membrana de nylon tal como se describió en la sección anterior.

4.17.2. SEBRADO DE DOTS

Este procedimiento se siguió para ensayos de hibridación donde no interesaba caracterizar determinadas bandas o fragmentos de DNA.

Básicamente, consistió en sembrar pequeños volúmenes de muestra en una membrana de nylon o de nitrocelulosa, dejar secar a temperatura ambiente, y hornear a 80°C durante 2 horas entre dos filtros Whatman 3MM.

4.18. HIBRIDACION DE RNA Y DNA

En todos los casos, las prehibridaciones y las hibridaciones se hicieron en bolsas de plástico selladas.

4.18.1. HIBRIDACION CON MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

4.18.1.a Prehibridación

Se calculó un volumen de 1 ml de solución de prehibridación cada 10 cm² de membrana. La membrana se incubó por 1 a 2 horas a 68°C con agitación en una solución de la siguiente composición: *buffer* SET 4x, solución de Denhardt 10x, SDS 0.1% y DNA de timo de ternera (desnaturalizado por calentamiento) 50 µg/ml.

Buffer SET 20x:

Tris-HCl (pH 7.8)	400 mM
NaCl	3 M
EDTA (pH 8.0)	20 mM

4.18.1.b Hibridación

A la mezcla anterior, se le inyectó la sonda radioactiva en una concentración mayor o igual a 10^6 cpm por ml de solución de hibridación y de una actividad específica de 10^8 cpm/ μ g de sonda.

- Se incubó a 68°C por 15 horas.

4.18.1.c Lavados

Los filtros se dispusieron dentro de una caja plástica y se sometieron a los siguientes lavados:

SET 4x, SDS 0.1%	1 lavado de 10 minutos a temperatura ambiente.
SET 3x, SDS 0.1%	3 lavados de 20 minutos cada uno a 68°C .
SET 1x, SDS 0.1%	2 lavados de 20 minutos cada uno a 68°C .
SET 4x	1 lavado de 20 minutos a temperatura ambiente.

Se dejó secar a temperatura ambiente y se expuso a autorradiografía.

4.18.2. HIBRIDACION CON MEMBRANAS DE NYLON

4.18.2.a Prehibridación

La membrana se incubó a 42°C por 1 a 2 horas con agita-

ción en una solución de formamida deionizada 50%, SSC 2x, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.5) 0.05 M, solución de Denhardt 1x y DNA de timo de ternera desnaturalizado por calentamiento 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.18.2.b Hibridación

Se inyectó a la mezcla anterior la sonda radioactiva (de concentración y actividad específica similar a la descrita en la sección anterior).

4.18.2.c Lavados

Los filtros se lavaron en una caja de plástico con las siguientes soluciones:

SET 2x 2 lavados de 5 minutos c/u a temperatura ambiente.

SET 2x, SDS 1% 2 lavados de 30 minutos cada uno a 60°C.

SET 0.2x 2 lavados de 30 minutos c/u a temperatura ambiente.

Se dejaron secar y se expusieron a autorradiografía.

4.19. SECUENCIACION DE DNA POR EL METODO DE LOS DIDEOXINUCLEOTIDOS TERMINADORES

Este método fue desarrollado por Sanger *et al* (Sanger, F. *et al*, 1977). La reacción consta de un primer paso de hibridación o apareamiento del *primer* iniciador al DNA simple cadena y un segundo paso de secuenciación propiamente dicha. En este paso se utilizó la enzima de Klenow.

Posteriormente, se desarrolló un sistema muy similar que emplea la enzima DNA polimerasa de bacteriófago T7 que se describe en la parte 2 de esta sección.

El *primer* universal tiene la siguiente secuencia: 5'-d(GTAAAACGACGGCCAGT)-3' y es el iniciador específico que se emplea para secuenciar por este método.

4.19.1. SECUENCIACION POR EL METODO DE SANGER CON LA ENZIMA DE KLENOW

4.19.1.a Apareamiento

Se purificó DNA simple cadena de subclones de M13 tal como se describió en la sección 4.5.2. y se resuspendió en 25 μ l de *buffer* TE.

6 μ l de este DNA se mezclaron con 0.2 ng de *primer* universal, 1,2 μ l de *buffer* TMN 10x, y 3,6 μ l de H₂O.

Buffer TMN 10x:

Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
MgCl ₂	50 mM
NaCl	100 mM

Esta mezcla se calentó a 100°C por 3 minutos, se hizo descender la temperatura a 67°C, y se dejó que llegase a temperatura ambiente lentamente, en un lapso no menor de 30 minutos.

4.19.1.b Secuenciación propiamente dicha

Mezcla de enzima con precursor radioactivo: 5 unidades de enzima de Klenow, 5 μ l de α^{32} PdATP (actividad específica 3000 Ci/mmol), 3.5 μ l de dATP 2.5 μ M, 2 μ l de DTT 0.1 M y 8.5 μ l de Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM en un volumen final de 10 μ l.

Mezcla de deoxi-dideoxinucleótidos^a

	A ^b 10	C15	G10	T1
dCTP 0.5 mM	7.5	1	10	10
dGTP 0.5 mM	7.5	10	1	10
dTTP 0.5 mM	7.5	10	10	1
ddATP 0.25 mM	10	--	--	--
ddCTP 0.5 mM	--	15	--	
ddGTP 0.66 mM		--	10	--
ddTTP 1 mM	--	--	--	25
H ₂ O	20	10	20	--

^a: todos los volúmenes están expresados en μ l.

^b: se designó arbitrariamente a las mezclas con un número (10, 15, etc.) que expresa el volumen de dideoxinucleótido utilizado en dicha mezcla. Si se varió este volumen, la diferencia se compensó variando el volumen de H₂O. En el caso de la mezcla T, también se varió la cantidad de dTTP.

Se rotularon cuatro tubos de Eppendorf con las letras A, C, G y T.

Se mezclaron 2 μ l de la solución de apareamiento con 2 μ l de la mezcla de enzima y radioactivo y 2 μ l de la mezcla correspondiente de deoxi-dideoxinucleótidos.

Se incubó a 50°C por 15 minutos. Se agregó 1 μ l de una mezcla de dNTPs 2.5 mM de cada uno y se incubó otros 15 minutos a 50°C.

Se detuvo la reacción por agregado de 8 μ l de *buffer* de siembra con formamida.

Las mezclas se calentaron a 100°C por 3 minutos, se sembraron en un gel de poliacrilamida conteniendo urea (ver sección 4.13.2).

Una vez que finalizó la electroforesis, se desarmó el gel, se trató con solución fijadora (metanol 10%, HAcO 10%) para eliminar urea y se pasó a papel Whatman 3MM.

Se cubrió con película plástica autoadherente y se secó en una secadora de geles calefaccionada.

Se expuso a autorradiografía a temperatura ambiente.

4.19.2. SECUENCIACION POR EL METODO DE SANGER CON LA ENZIMA DNA POLIMERASA DE BACTERIOFAGO T7

Se purificó DNA simple cadena de subclones de M13 o clones de KS tal como fue descrito en las secciones 4.5.2 y 4.5.3, respectivamente, y se resuspendió en 10 μ l de *buffer* TE.

4.19.2.a Mezcla de apareamiento

Se mezclaron 7 μ l de DNA simple cadena con 2 μ l de *buffer* de secuenciación 5x y 1 μ l de *primer* universal (0.5 pmol/ μ l).

Buffer de secuenciación 5x:

Tris-HCl (pH 7.5)	200 mM
MgCl ₂	100 mM
NaCl	250 mM

Esta mezcla se calentó a 65°C por 2 minutos y se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente por un lapso no menor de 30 minutos.

4.19.2.b Secuenciación propiamente dicha

Mezclas de terminación

	A ^a	C	G	T
dATP	80	80	80	80
dCTP	80	80	80	80
dGTP	80	80	80	80
dTTP	80	80	80	80
ddATP	8	--	--	--
ddCTP	--	8	--	--
ddGTP	--	--	8	--
ddTTP	--	--	--	8
NaCl	50	50	50	50

^a: Las concentraciones están expresadas en μM salvo en el NaCl que está expresado en mM.

Mezcla de marcado 5x:

7.5 μM dGTP
 7.5 μM dCTP
 7.5 μM dTTP

Reacción de marcado: A la mezcla de apareamiento se le agregó 1 μl de DTT 0.1 M, 2 μl de mezcla de marcado diluída 1:5 ó 1:10 según el caso, 0.5 μl de $\alpha^{35}\text{SdATP}$ (actividad específica 1100-1300 Ci/mmol), 2 μl de DNA polimerasa de fago T7 (U.S. B.) diluída 1:8 en *buffer* TE.

Se incubó 5 ó 10 minutos a temperatura ambiente en el caso de usar la mezcla de marcado diluída 1:10 ó 1:5, respectivamente.

Reacción de terminación: Se rotularon cuatro tubos de Eppendorf con las letras A, C, G y T y se les agregó a cada uno 2.5 μ l de la respectiva mezcla de terminación. Se dejaron preincubando a 37°C.

Se les agregó 3.5 μ l de la mezcla de la reacción de marcado a cada uno de estos tubos y se incubó por 10 a 15 minutos a 37°C.

Se detuvo la reacción por agregado de 4 μ l de *buffer* de siembra con formamida.

Se prosiguió como en la sección anterior.

4.20. ANALISIS DE DATOS DE SECUENCIAS

Los datos obtenidos de la secuenciación de los clones de PVX se analizaron con un programa diseñado por J.M. Pustell para la firma International Biotechnologies, Inc. en una computadora IBM XT.

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1. CLONADO MOLECULAR DEL GENOMA DEL PVX

5.1.1. Purificación de partículas virales de PVX

El virus fue inoculado en plantas jóvenes de *Nicotiana glutinosa* y al cabo de 3 a 5 semanas se cosecharon las hojas infectadas que se utilizaron como fuente de virus.

Estas hojas se sometieron al proceso de purificación que resumidamente se describe a continuación:

Homogeneización y filtrado a través de *cheese cloth*
Extracción con cloroformo
Precipitación con PEG
Sedimentación y resuspensión
Colchón de sacarosa
Gradiente discontinuo de CsCl
Diálisis

Todos estos pasos fueron seguidos por microscopía electrónica para verificar el rendimiento y para estimar el grado de purificación de las partículas virales que se iba obteniendo. Este seguimiento permitió optimizar el procedimiento. En la Figura 5.1 se observa la microscopía electrónica de las partículas virales obtenidas luego del paso de diálisis.

5.1.2. Purificación del RNA viral

La microscopía electrónica evidenció que las partículas virales no estaban contaminadas con organelas o fracciones subcelulares de la planta.

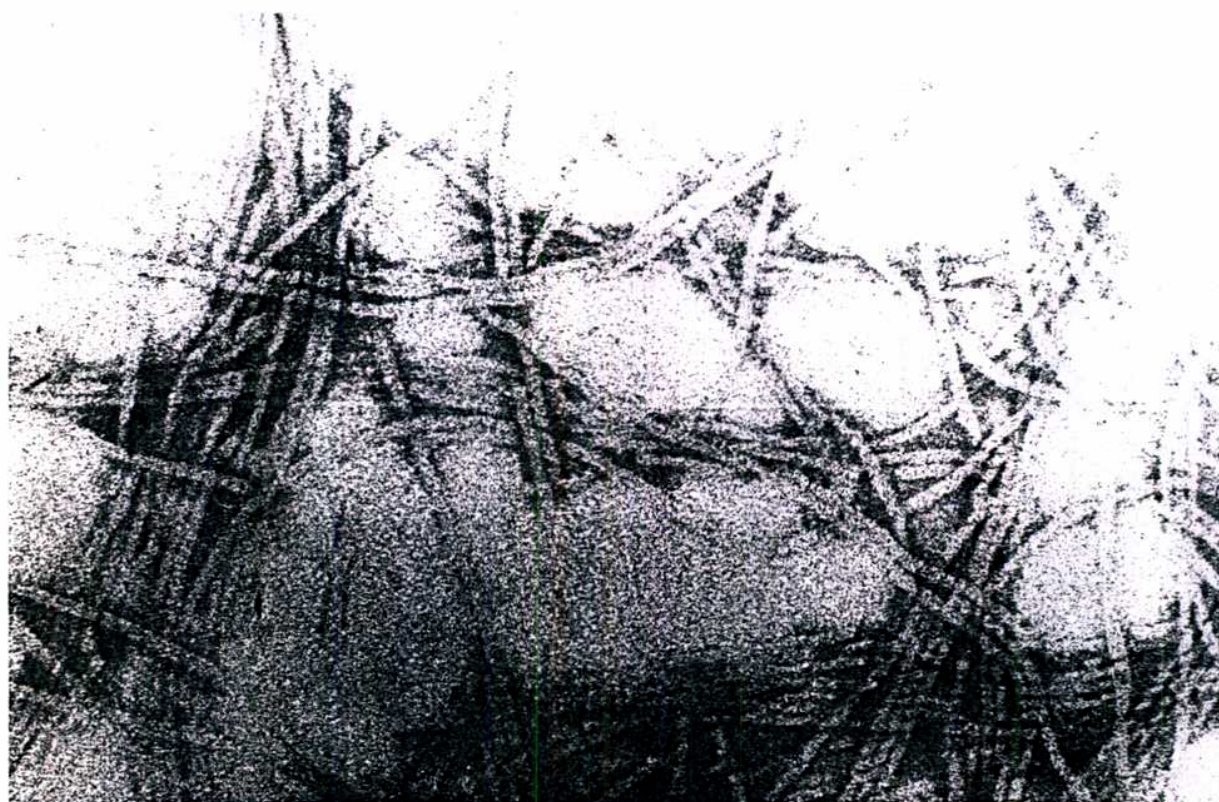


FIGURA 5.1: Microscopía electrónica de partículas virales de PVX. Hojas de *N. glutinosa* infectadas con PVXc fueron sometidas al proceso de purificación descrito en 5.11. La fotografía muestra los viriones obtenidos luego del paso de diálisis.

Existen numerosas publicaciones donde se describen diversos métodos para purificar RNA de Potexvirus (Kaftanova, A.S. *et al*, 1975; Goodman, R.M., 1975a; Ricciardi, R.P. *et al*, 1978; Wodnar-Filipowicz, A. *et al*, 1980). A pesar de no estar reportado en ninguna de ellas, nuestra experiencia indicó la existencia de ribonucleasas y proteasas, de origen aparentemente vegetal, que rápidamente degradaban las partículas virales y su material genético. Por esta razón, se probaron distintos reactivos para bloquear la acción de ribonucleasas, tales como la proteinasa K y el cloruro de guanidinio. Una mezcla de un complejo de ribonucleósidos de vanadilo y de inhibidor de ribonucleasas de placenta humana (RNAsin), agregados antes de la extracción del RNA, fue la combinación que resultó más eficaz.

El RNA viral se obtuvo por desnaturalización de las partículas virales purificadas con fenol caliente y precipitación rápida con NaAcO y etanol. En la Figura 5.2 se observa una electroforesis en gel de agarosa del RNA de PVX obtenido con este procedimiento. Es de notar que la banda de RNA tiene una velocidad de migración similar a la banda de 4.3 Kpb del marcador de peso molecular. Esto es un artificio debido a que en este tipo de gel (no desnaturalizante) los fragmentos de DNA doble cadena migran más lentamente que los de RNA simple cadena por tener mayor peso molecular. El RNA de PVX tiene un peso molecular aproximado de 6 kb.

5.1.3. Síntesis de DNA copia (cDNA)

En un primer momento se tenía la información errónea de que el RNA de PVX no tenía tracto de poli(A) en su extremo 3' (Sonenberg, N. *et al*, 1978). Este dato hizo que en la primera *library* que se construyó no se usara oligo dT como iniciador de la transcripción a partir del extremo 3', sino que se usara una

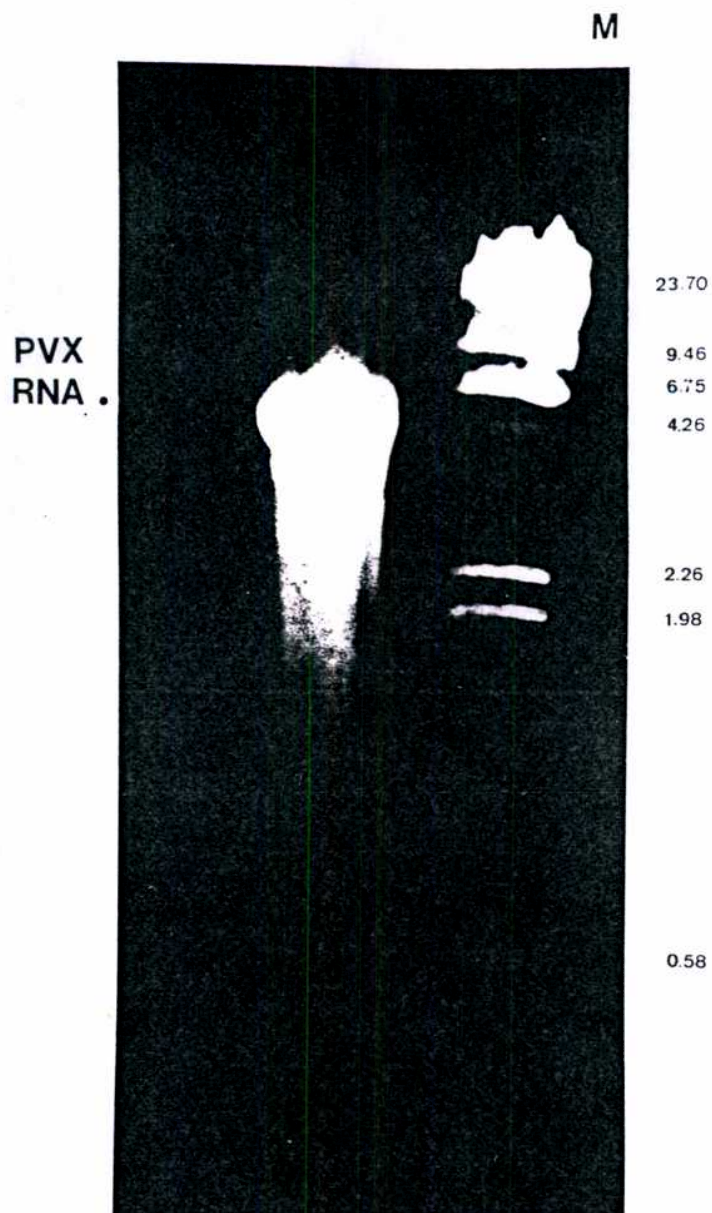


FIGURA 5.2: RNA de PVXc. Las partículas virales purificadas se trataron con fenol caliente y el RNA obtenido se precipitó con etanol y NaAcO. Luego se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1%. Se empleó DNA de fago digerido con HindIII como marcador de peso molecular.

Resultados

mezcla de oligonucleótidos como iniciadores inespecíficos, los que inician la reacción a partir de cualquier punto situado a lo largo de la molécula de RNA.

El cDNA se sintetizó de acuerdo al método de Gubler y Hoffman (Gubler, U. *et al*, 1983). En la Figura 5.3 se observa un esquema de la estrategia seguida, la que se describe detalladamente en la sección de Materiales y Métodos. Comprende los siguientes pasos:

Obtención de fragmentos de DNA de timo de ternera por digestión exhaustiva.

Hibridación de estos *primers* con el RNA viral y síntesis de la primera cadena de cDNA con la enzima transcriptasa reversa.

Digestión parcial del RNA hibridado con ribonucleasa H (esta enzima sólo actúa sobre el RNA cuando éste forma un híbrido doble cadena). Esta etapa permite generar puntos de iniciación para la segunda cadena.

Síntesis de la segunda cadena con DNA polimerasa I de *E. coli* y ligado de las interrupciones producidas por la síntesis discontinua del DNA con DNA ligasa de *E. coli*.

Rellenado de posibles extremos 3' recesivos con la enzima de Klenow.

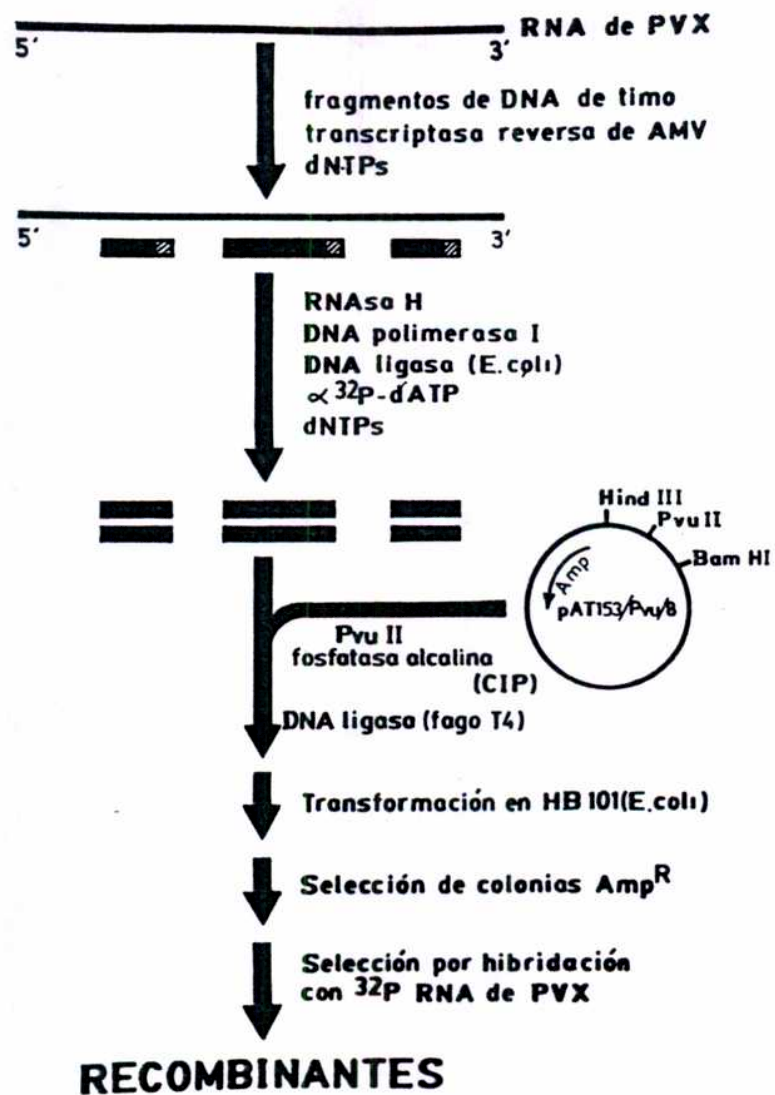


FIGURA 5.3: Esquema de la estrategia de síntesis y clonado de cDNA a partir de RNA de PVX.

- Ligado *blunt end* al sitio PvuII del plásmido pAT153-PvuII/8 con DNA ligasa de bacteriófago T4. El plásmido fue previamente tratado con fosfatasa alcalina para impedir la religación de sus extremos.

5.1.4. Transformación y selección de clones recombinantes

Con esta mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* HB101. Las bacterias transformadas se seleccionaron por resistencia a ampicilina.

Una réplica de las colonias obtenidas se analizó por hibridación con una sonda de RNA de PVX marcada con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$. Se seleccionaron de este modo 47 clones positivos y se hicieron minipreparaciones de los plásmidos recombinantes.

5.2. CARACTERIZACION DE LOS CLONES POSITIVOS

5.2.1. Selección de clones de mayor tamaño

El DNA obtenido de las minipreparaciones se sometió a doble digestión con las enzimas de restricción BamHI e HindIII (dichas enzimas tienen sitios de restricción flanqueantes al sitio PvuII de inserción) con el objeto de escindir los fragmentos correspondientes a los insertos. Estas mezclas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 6% nativa. De este modo se seleccionaron 23 clones con insertos de más de 150 pb. Estos clones comprendían 32 fragmentos por un total aproximado de 10000 bases. El hecho de que el número de fragmentos fuera mayor que el de insertos se debió a que algunos de estos últimos contenían si-

tios internos correspondientes a las enzimas BamHI o HindIII, por lo que, al digerir con estas enzimas se obtuvieron fragmentos adicionales.

5.2.2. Análisis de los clones positivos por la técnica de Northern

Dieciséis de estos clones, seleccionados por ser los de mayor tamaño, se purificaron en gran escala por el método de Birnboim y Doly (Birnboim, H.C. *et al*, 1979), descrito en Materiales y Métodos. Fueron denominados A1, A2, A7, A10, B1, B7B, B9A, B9C, C5, C8, D1A, D1B, D2B, D5, E101 y E102. Estos DNAs se analizaron por hibridación en *Northern* para confirmar su identidad. Se corrió RNA de PVX en geles desnaturalizantes de agarosa conteniendo formaldehído. El RNA se transfirió a una membrana de nylon y se cortó dicha membrana en tiras de tamaño correspondiente a cada carril. Estas tiras se hibridaron con cada uno de los clones mencionados anteriormente marcados radioactivamente por *nick translation*. Como control negativo se realizó una hibridación con el plásmido vector pAT153-PvuII/8, también marcado por *nick translation*. Los resultados de estas hibridaciones se pueden observar en la foto de la Figura 5.4, la que muestra una fuerte señal positiva sobre la banda del RNA viral con todos los clones utilizados como sondas.

Este último ensayo, junto con las evidencias obtenidas del método de selección utilizado, permitió confirmar que los insertos de los clones recombinantes contenían secuencias provenientes de una parte del genoma viral.

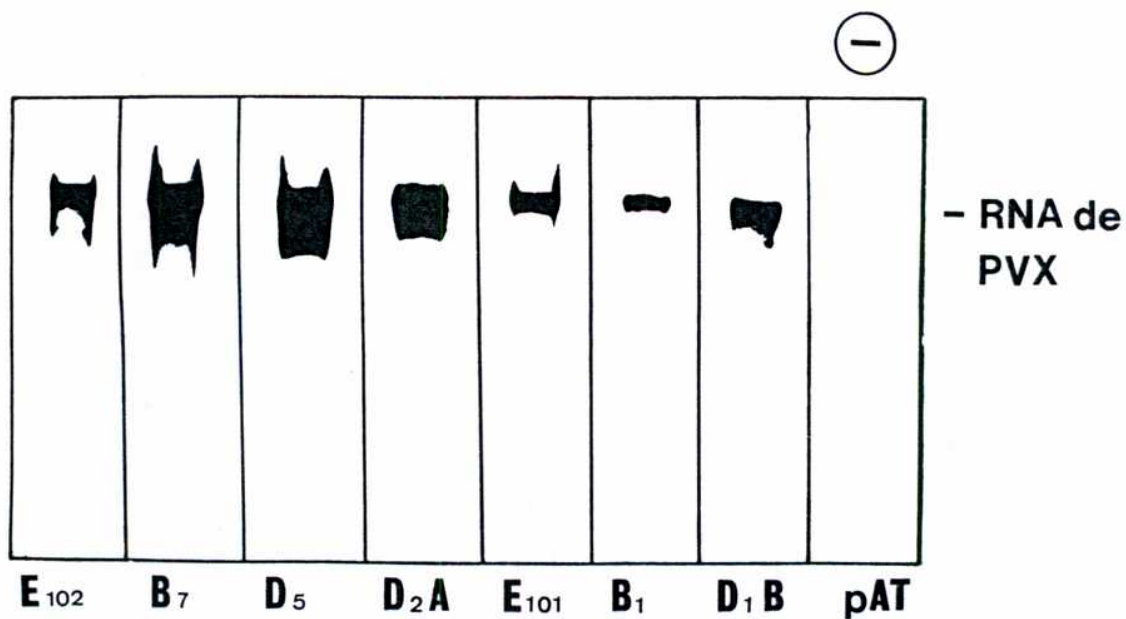


FIGURA 5.4: Hibridación en *Northern* del RNA de PVX con distintos clones recombinantes. RNA de PVX fue sometido a electroforesis en geles de agarosa conteniendo formaldehído y, posteriormente, transferido a membrana de nylon e hibridado con distintos clones recombinantes.

5.2.3. Mapeo de restricción

Algunos de estos clones fueron mapeados con enzimas de restricción para tener los primeros datos acerca de su estructura y posibles superposiciones.

Se cortaron los plásmidos recombinantes en uno de los flancos del inserto, ya fuese con las enzimas BamHI o HindIII, se marcaron los extremos libres por *fill-in* con nucleótidos radioactivos y luego se digirió el DNA con distintas enzimas de alto grado de corte. Los productos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida nativa y se analizó el tamaño de los fragmentos marcados. En la Figura 5.5 se observa un esquema de los mapas de restricción obtenidos.

5.3. SECUENCIACION DE LA PRIMERA *LIBRARY* OBTENIDA DE PVX

5.3.1. Elección del vector y cepas adecuados

Con el fin de trabajar siempre en las mismas condiciones, se hizo un ensayo con cuatro vectores de secuenciación de la serie M13 y dos cepas de *E. coli* apropiadas, JM101 y JM109. Es de remarcar que cada par de vectores probados, M13 mp8 y mp9, y M13 mp18 y mp19, comparten el mismo *polylinker*, pero en orientaciones opuestas, lo que permite secuenciar las dos cadenas complementarias del inserto clonado (Figura 5.6).

Se transformaron células competentes de JM101 y JM109 con 10 ng de cada uno de los vectores mencionados. De acuerdo con el número y tamaño de las placas obtenidas, se escogió como mejor combinación el par mp18-mp19 en JM101. Con estos vectores y esta cepa se llevó a cabo toda esta etapa del trabajo.

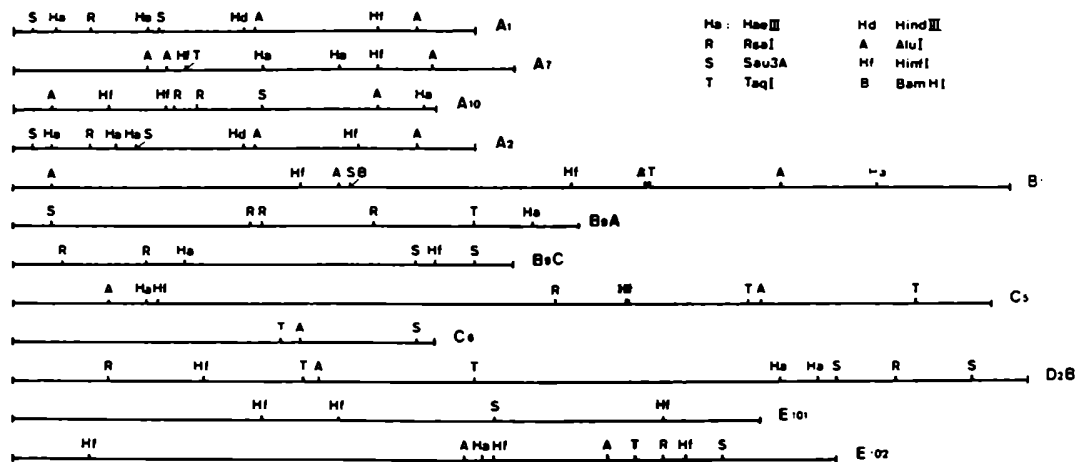


FIGURA 5.5: Mapa de restricción de los clones A1, A2, A10, B1, C5, C6, E101 y E102. Se cortó DNA de estos clones alternativamente con las enzimas Bam HI e Hind III, se marcó por *fill-in* y se recortó con distintas enzimas de restricción de alto grado de corte. Las mezclas de reacción se corrieron en geles de acrilamida nativos y se sometieron a autorradiografía.

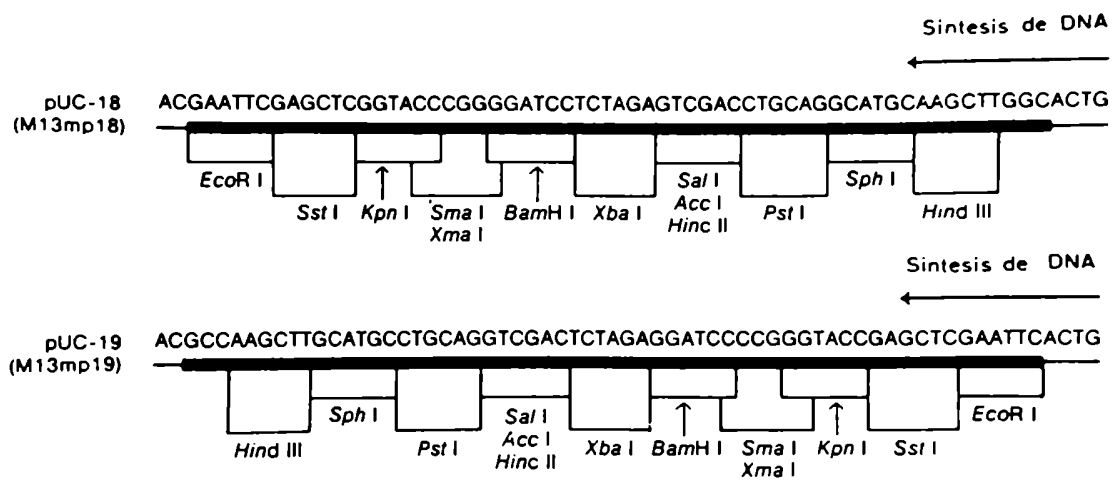


FIGURA 5.6: Secuencias de los *polylinkers* de M13 mp18 y mp19 los distintos sitios de restricción.

5.3.2. Subclonado en M13

Los vectores M13 mp18 y mp19 se digirieron con las enzimas de restricción BamHI e HindIII y se separó el fragmento del *polylinker* por cromatografía en columna (ver Materiales y Métodos para una descripción detallada). A su vez, el DNA purificado de cada uno de los 16 clones recombinantes se cortó con las mismas enzimas de restricción con el objeto de escindir sus insertos. Esta mezcla (sin separar el vector pAT153- PvuII/8 del fragmento de DNA) se ligó por "extremos cohesivos" a los vectores cortados. Se transformó en bacterias JM101 competentes y se plaqueó en las condiciones adecuadas. Las eficiencias de transformación obtenidas fueron de alrededor de 5×10^5 a 1×10^6 placas de M13 por μg de DNA transformante en el caso de M13 salvaje.

5.3.3. Análisis de los subclones. Positividad. Polaridad. Superposición

Positividad: Las placas conteniendo los subclones se transfirieron a discos de membrana de nylon y se hibridaron contra sondas radioactivas constituidas por los insertos respectivos. A partir de placas con señal de hibridación positiva, se hicieron minipreparaciones de DNA simple cadena. Estos DNAs se corrieron en geles de agarosa y se transfirieron posteriormente a membranas de nylon, las que se hibridaron por la técnica de *Southern* con las sondas radioactivas correspondientes. De este modo se reconfirmó la positividad de cada uno de los clones a secuenciar.

Polaridad: Para determinar la polaridad de cada uno de los 16 subclones estudiados se aprovechó el hecho de tener el DNA simple cadena en ambas orientaciones. Estos DNAs se hibridaron en

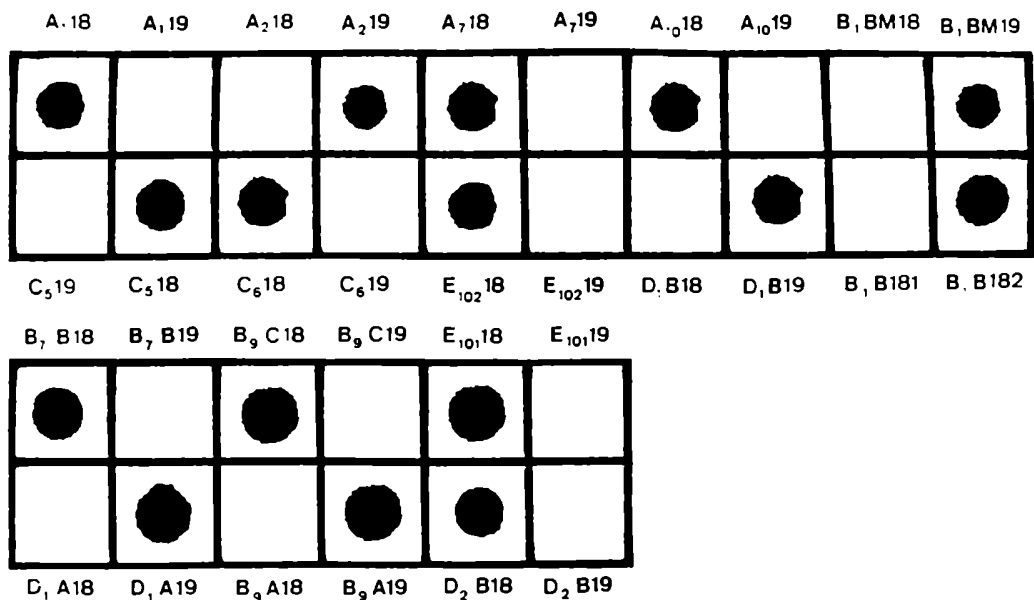
dots contra RNA de PVX marcado con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. El clon que daba señal positiva era complementario al RNA y el que daba señal negativa era, obviamente, homólogo al mismo. Así se determinó la polaridad de los 16 clones. El ensayo correspondiente se observa en la foto de la Figura 5.7.

Superposición: Como ensayo complementario a la secuenciación, se determinaron algunas superposiciones entre los clones por hibridación cruzada de los mismos. Se sembraron *dots* de los DNAs simple cadena (M13 conteniendo insertos) de cualquier orientación y se hibridó contra cada uno de los plásmidos recombinantes marcados por *nick translation*. Como puede apreciarse en la foto de la Figura 5.8, se determinó que había superposición entre los clones D5, D2B, C5 y A10 y E101, B1, B7B y D1A.

5.3.4. Secuenciación

En una etapa preliminar se puso a punto la técnica de secuenciación por el método de los dideoxiterminadores, determinándose las concentraciones y relaciones óptimas de los reactivos empleados. En la sección 4.19 del capítulo de Materiales y Métodos, se detalla el protocolo final que se utilizó. Al poder determinarse las secuencias de las dos cadenas complementarias de un mismo clon se incrementó considerablemente la precisión de la lectura final obtenida.

En el Anexo "Banco de Clones" se presentan las secuencias obtenidas de estos dieciséis clones en orientación 5'-3' y con la polaridad homóloga al RNA viral. En la Figura 5.9 se muestra un mapa con las superposiciones encontradas por hibridación y confirmadas por los datos de secuenciación. En la Tabla 5.1 se resumen los datos más importantes de estos clones.



Orientación homóloga de RNA de PVX

A1mp19	B1Bmp18.1	B9Cmp19	D1Bmp18
A2mp18	B1Bmp18	C5mp19	D2Bmp18
A7mp19	B7Bmp19	C8mp19	E101mp19
A10mp19	B9Amp18	D1Amp18	E102mp19

FIGURA 5.7: Determinación de la polaridad de los subclones de M13mp18 y mp19. Los DNAs simple cadena se hibridaron en dots contra RNA de PVX marcado con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP.

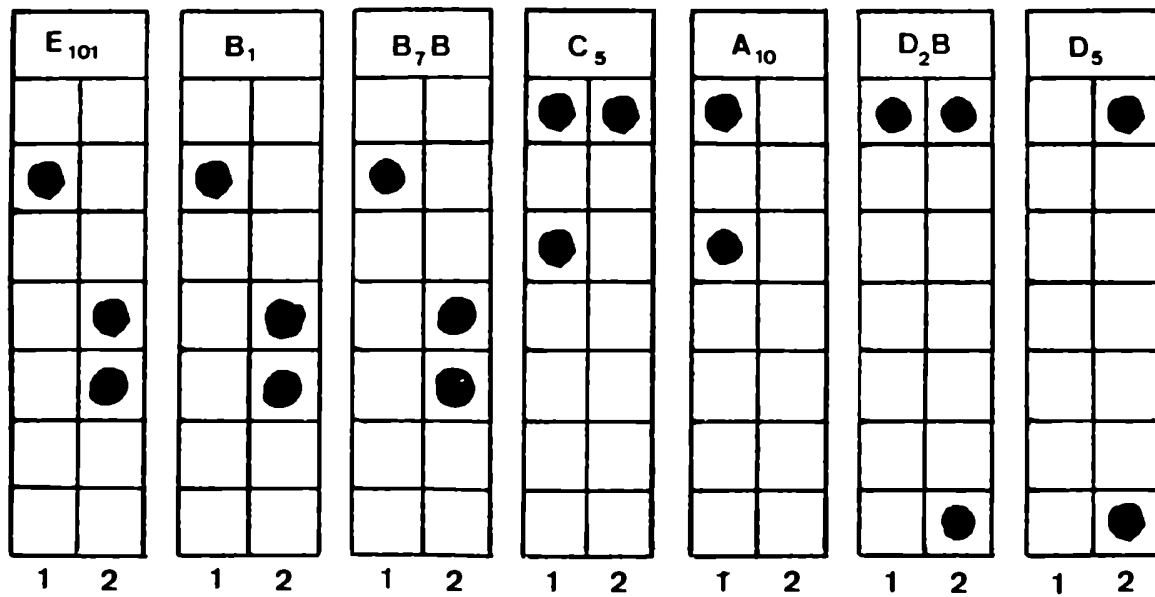


FIGURA 5.8: Determinación de la superposición entre los clones D₅, D₂B, C₅ y A₁₀ y E₁₀₁, B₁, B₇B y D₁A. Se sembraron *dots* de DNA simple cadena de estos subclones en M13 de cualquier orientación y se hibridaron contra cada uno de dichos plásmidos marcados por *nick-translation*.

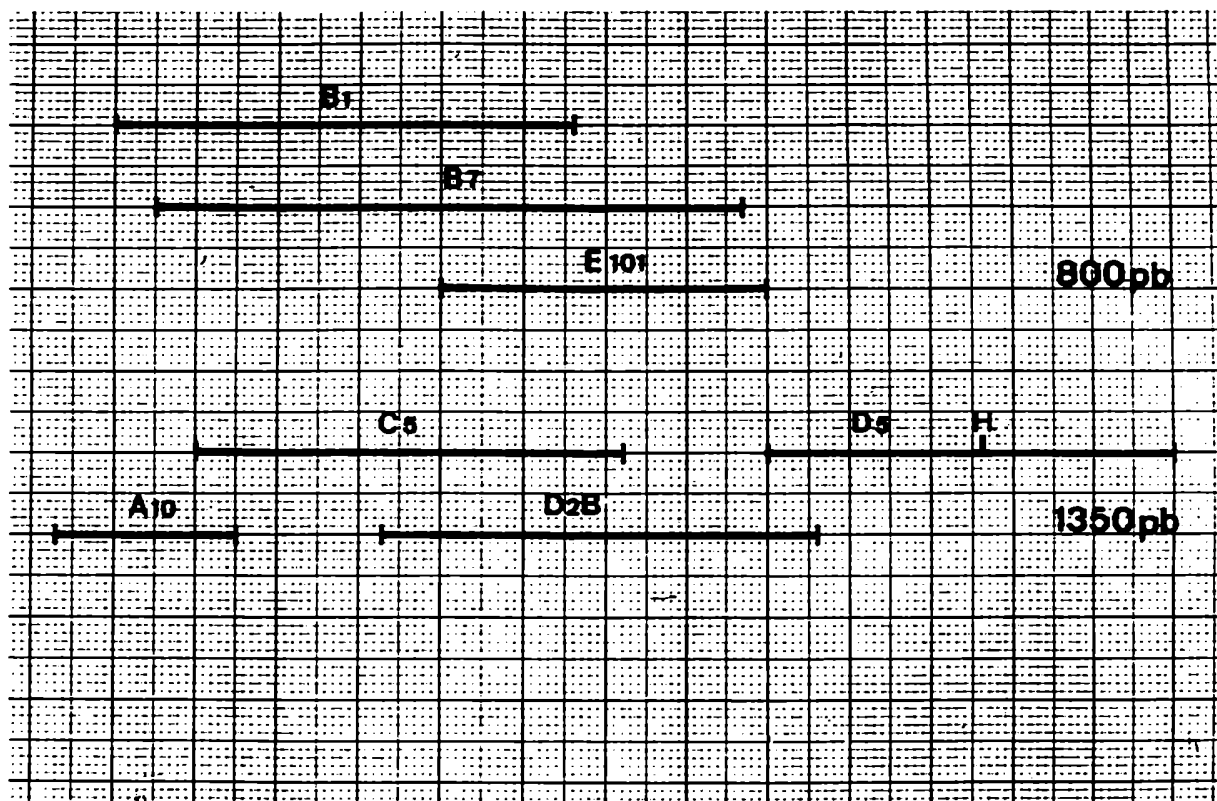


FIGURA 5.9: Mapa de las superposiciones entre los clones D5, D2B, C5 y A10 y E101, B1 y B7B encontradas por hibridación y confirmadas por secuenciación.

Clon	Longitud (pb)	G-H*	Northern	Secuencia
A1	251	+		Completa
A2	239	+		Completa
A7	275	+		Completa
A10	222	+		Completa
B1	560	+	+	Completa
B7	719	+	+	Completa
B9A	293	+	+	Completa
B9C	252	+	+	Completa
C5	510	+	+	Completa
C6	222	+	+	Completa
D1A	120	+	+	Completa
D1B	700		+	Parcial
D2B	530	+	+	Completa
D5	498	+	+	Completa
E10-1	405	+	+	Completa
E10-2	413	+	+	Completa

TABLA 5.1

**RESUMEN DE LOS DATOS CORRESPONDIENTES A LOS
CLONES OBTENIDOS EN LA PRIMER *LIBRARY***

Total de bases secuenciadas en ambas orientaciones: 4800

5.4. ESTRATEGIAS DE CLONADO MOLECULAR

5.4.1. Estrategia de *shot-gun*

Al finalizar la secuenciación de los primeros dieciséis clones se dispuso en nuestro Instituto de mejores condiciones materiales y de la infraestructura de computación necesaria para encarar una nueva estrategia de clonado molecular y secuenciación. Se decidió adoptar la estrategia *shot-gun* que, en esencia, consiste en secuenciar al azar una gran cantidad de clones y superponer las secuencias mediante el uso de un programa de computación. Para poder llevar a cabo esta estrategia se emplearon fagósmidos de *BlueScript* como vectores de clonado. Estos vectores son unas construcciones desarrolladas por la empresa Stratagene que normalmente se comportan como plásmidos de DNA doble cadena, y en presencia de un fago *helper* se encapsidan como DNA simple cadena. Su genoma contiene la secuencia de hibridación específica para el *primer* universal que permite secuenciar por el método de Sanger (Sanger, F. *et al*, 1977). Esto significa que se puede manipular como si se tratase de un plásmido cualquiera y, bajo determinadas condiciones, se puede obtener DNA simple cadena y secuenciar directamente sobre él, sin necesidad de subclonar ni re-seleccionar.

a) Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.6 de Materiales y Métodos con una mezcla de oligonucleótidos sintéticos como *primers at random*. Se ligó por *blunt end* al fagós-mido KS+ de *BlueScript*, previamente cortado en su sitio único SmaI y tratado con fosfatasa alcalina para eliminar los grupos fosfato de los extremos 5'.

b) Transformación y selección de recombinantes

Con la mezcla de ligado se transformaron células competentes de *E. coli* de la cepa NM522. Se seleccionaron por desarrollo de color azul en medio con IPTG y por resistencia a ampicilina. Las células transformadas se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con una sonda radioactiva de RNA viral marcado con ^{32}P -ATP. De este modo se seleccionaron 148 clones con señal de hibridación positiva cuyos tamaños oscilaban entre los 100 pb y los 1300 pb.

c) Caracterización de los clones positivos

Se hicieron minipreparaciones de DNA doble cadena de un grupo de 49 clones tomando algunos al azar y otros por dar señales más fuertemente positivas en las hibridaciones. Los plásmidos referidos se trataron con las enzimas de restricción BamHI y

HindIII que flanquean al sitio de inserción SmaI con el objeto de obtener los fragmentos clonados. Una parte de estas mezclas se marcó por *fill-in* y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida nativa con el objeto de visualizar en autorradiografías el tamaño de los fragmentos escindidos. En la foto de la Figura 5.10 se pueden ver algunos de estos geles.

Otra parte de dichas mezclas de restricción se sometió a electroforesis en geles de agarosa común, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se hibridó con una sonda de RNA de PVX marcada con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP con el objeto de reconfirmar la condición de positivos de dichos clones. Es de remarcar que estas hibridaciones se hicieron en condiciones de alta rigurosidad, debido al alto porcentaje de homología que se debía reconocer.

d) Secuenciación

En esta etapa del trabajo se dispuso también de un nuevo método de secuenciación que emplea la enzima DNA polimerasa de bacteriófago T7. Esta enzima puede sintetizar cadenas más largas que las sintetizadas por la enzima de Klenow (se pueden entonces "leer" secuencias más largas) y es capaz de superar obstáculos ante los cuales la enzima de Klenow se detiene (por ejemplo, estructuras secundarias en el templado). Además, se utilizó un precursor radioac-

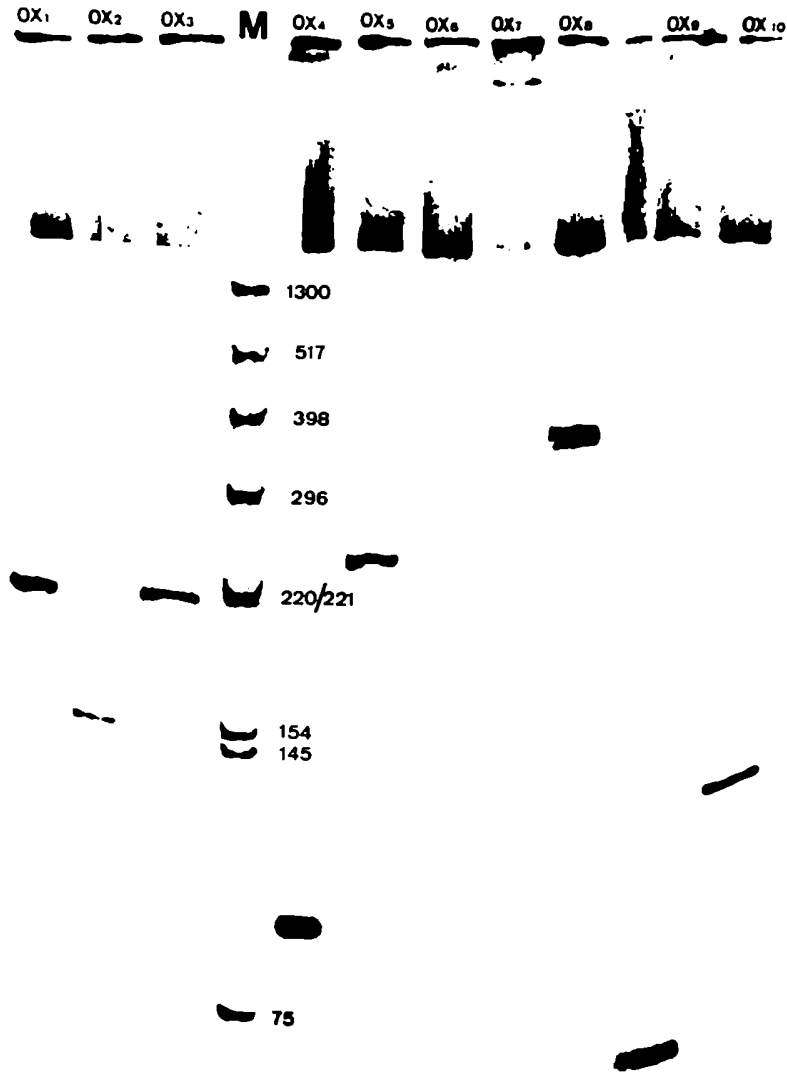


FIGURA 5.10: Determinación del tamaño de los insertos clonados en el fagósmido KS+. Se digirió DNA de los plásmidos recombinantes con las enzimas BamHI e HindIII, se marcó por *fill-in* y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida nativa 6%. M: se utilizó DNA del plásmido pAT 153-PvuII/8 digerido con HinFI como marcador de peso molecular.

tivo marcado con ^{35}S en lugar de ^{32}P , con lo cual se obtuvieron bandas más nítidas en los geles de secuencia, mejorándose la calidad de las lecturas.

Se purificó DNA simple cadena de los siguientes clones: 0X1, 0X2, 0X3, 0X4, 0X8, 0X10, 1X2, 1X3, 1X4, 1X5, 1X7, 1X9, 1X11, 1X12, 1X13, 1X14, 1X15, 1X17, 1X19, 1X20, 1X22, 1X24, 1X25, 1X26, 1X27, 1X29, 1X30, 1X31, 1X33, 1X42, 1X46, 1X53, 1X55, 1X61, 2X1, 2X36, 3X2, 3X9, 3X13, 3X17, 3X18.

Se procedió a secuenciarlos tal como se describe en la sección 4.19.2 del capítulo de Materiales y Métodos. Los datos de estas secuencias se presentan en el Anexo "Banco de Clones". La Tabla 5.2 resume los datos correspondientes a dichos clones.

e) Determinación de superposiciones

Con el objeto de determinar superposiciones se hicieron también ensayos de hibridaciones cruzadas entre estos clones y los dieciséis clones obtenidos en la primer *library*

Se hicieron *dots* de DNA doble cadena de los clones recombinantes en el fagósmido KS+ con inserto y se hibridaron con sondas radioactivas correspondientes al otro grupo de clones. Estas sondas se hicieron del siguiente modo:

Se digirió el DNA correspondiente a los clones pAT-inserto con las enzimas de restricción BamHI y HindIII.

Clon	Longitud (pb)	Secuencia	Clon	Secuencia leída
0X1	225	completa	4X17	200
0X2	120	completa	4X52	212
0X4	62	completa	4X60	121
0X8	380	parcial(333)	4X70	202
0X10	92	completa	4X91	203
1X2	109	completa	5X29	248
1X3	310	parcial(289)	5X41	256
1X4	181	completa	5X42	273
1X7	400	parcial(275)	5X43	167
1X9	500	parcial(310)	5X51	160
1X11	288	completa	5X74	131
1X12	191	completa	5X82	134
1X13	152	completa	5X84	193
1X14	73	completa	5X86	201
1X15	52	completa	5X9	156
1X16	390	parcial(233)	5X96	275
1X17	93	completa	5X106	258
1X19	181	completa	5X120	121
1X20	224	completa	6X15	218
1X22	260	completa	6X18	160
1X25	136	completa	6X100	600
1X26	157	completa	6X108	260
1X27	450	parcial(334)	6X119	380
1X29	190	completa	6X124	191
1X30	118	completa		
1X31	1100	parcial(126)		
1X33	62	completa		
1X42	181	completa		
1X46	305	completa		
1X53	1300	parcial(158)		
1X55	590	parcial(245)		
2X1	350	parcial(151)		
2X36	291	parcial(1300)		
3X2	192	completa		
3X9	370	parcial(212)		
3X11	168	completa		
3X13	180	completa		
3X17	370	parcial(245)		
3X18	165	parcial(370)		

TABLA 5.2
RESUMEN DE LOS DATOS DE SECUENCIAS OBTENIDAS
DE LA ESTRATEGIA SHOT-GUN

Los datos provenientes de la *library* obtenida por *random-priming* y los provenientes del clonado con oligo dT como iniciador de la transcripción (sección 5.4.2), se resumen en las columnas izquierda y derecha, respectivamente. Total de bases secuenciadas: 12685.

- Se purificó a partir de geles de agarosa común el fragmento escindido y se marcó por *priming at random* tal como se describió en la sección 4.11.2 del capítulo de Materiales y Métodos.

En la Figura 5.11 se pueden ver los mapas de algunas de las superposiciones obtenidas, confirmados por datos de secuenciación.

5.4.2. Aislamiento de secuencias correspondientes al extremo 3'

Durante el transcurso de la primera etapa de clonado molecular y secuenciación se tuvo acceso a algunos trabajos publicados por el grupo de Atabekov y colaboradores (Morozov, S.Yu. *et al*, 1981). En dichos trabajos se afirmaba la existencia de un tracto de poli(A) en el extremo 3' del RNA viral. Se trató entonces de construir una nueva *library* utilizando oligo dT como iniciador específico de la transcripción de la primera cadena de cDNA. Los primeros intentos resultaron infructuosos ya que no se consiguió un buen rendimiento en la síntesis de la primera cadena de cDNA. Se mejoraron las condiciones de trabajo, poniéndose particular énfasis en la calidad de los reactivos empleados, y se obtuvo entonces una alta eficiencia en el apareamiento entre el oligo dT iniciador y el RNA, con el consiguiente éxito en la síntesis de la primera y segunda cadenas de cDNA. La síntesis de cDNA, su ligado y la transformación se hicieron en las mismas condiciones que las descritas en la sección 5.4.1 de este capítulo. Se obtuvo una nueva *library* de más de 900 clones recombinantes, seleccionados, al igual que en la *library* anterior, por color y por resistencia a ampicilina.

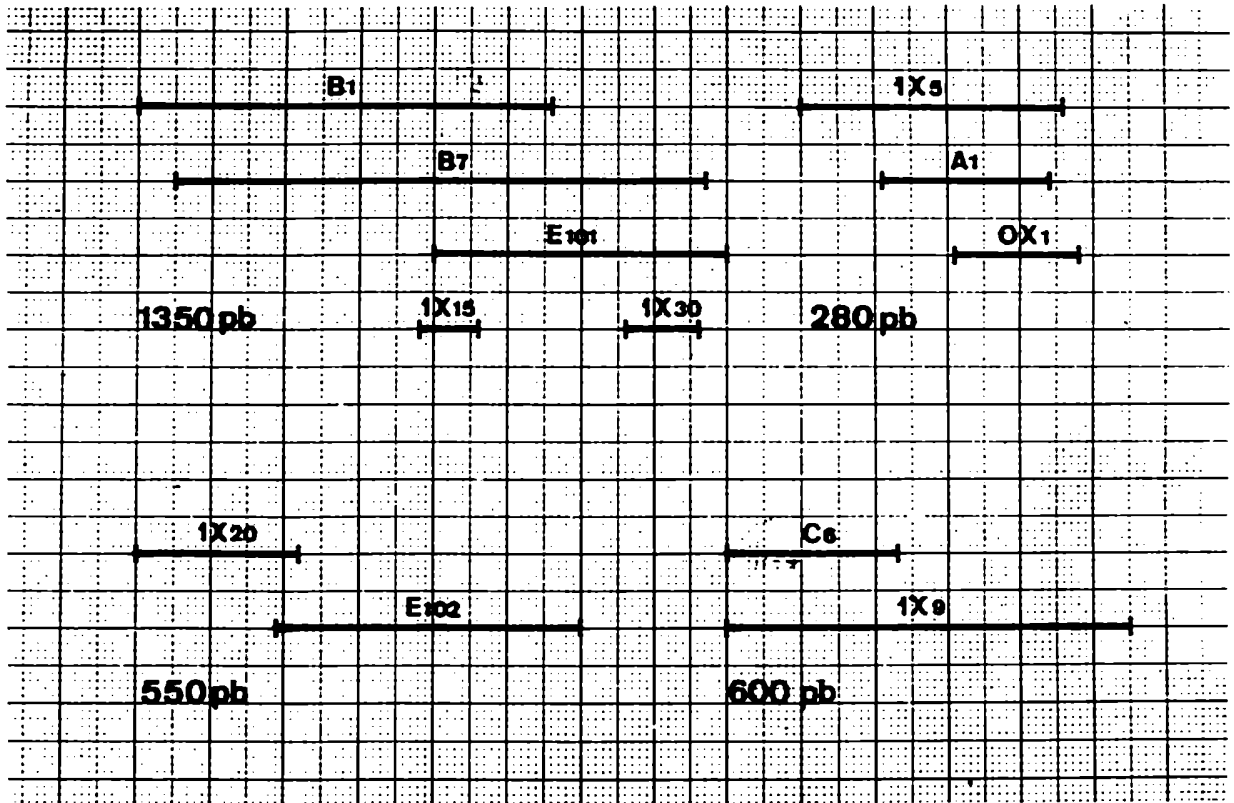


FIGURA 5.11: Mapa de las superposiciones obtenidas por hibridación cruzada entre algunos de los clones obtenidos en la primer *library* y las posteriores. Los datos fueron confirmados por secuenciación.

5.5. OBTENCION Y SECUENCIACION DE CLONES CORRESPONDIENTES A LA PROTEINA DE CUBIERTA

Tal como se detalló en la sección 1.9 del capítulo de Introducción, los Potexvirus poseen en el extremo 3' del genoma viral la secuencia que codifica la proteína de cubierta. Para encontrar esta secuencia en la *library* del extremo 3' se realizó una hibridación en colonias con una sonda radioactiva de oligo dT. Se obtuvieron veintiún clones positivos, los cuales fueron secuenciados. De acuerdo a los datos de las secuencias obtenidos, cinco de estos clones, denominados 4X52, 4X91, 6X18, 6X100 y 6X119, correspondían al extremo 3' del genoma de PVX. Los clones 4X52 (550 pb), 6X18 (500 pb) y 6X100 (aproximadamente 1000 pb) estaban orientados en forma complementaria al RNA viral, por lo cual su secuencia se comenzó a leer desde el extremo 3' hacia el extremo 5' del genoma. El clon 6X18 presentaba un tracto de alrededor de 60 adeninas, mientras que los clones 4X52 y 6X100 poseían sólo 6 ó 7 adeninas. Los clones 4X91 y 6X119, de tamaños aproximados de 300 pb y 1000 pb, respectivamente, tenían una orientación homóloga al RNA viral.

Debido a la orientación de estos clones, sólo se pudo contar con la secuencia confirmada de las últimas 250 pb del extremo 3' del genoma viral y parte del extremo 5' que codifica la proteína de cubierta (con el clon 6X119). Se buscó entonces la existencia de alguna superposición entre estos clones, ya secuenciados y ubicados, y otros pertenecientes a las *libraries* anteriores. Esta búsqueda se efectuó mediante programas de computación diseñados para tal fin, y no por hibridaciones cruzadas como anteriormente se había hecho. Se obtuvo como resultado que los clones A1, 1X5 y 0X1, este último en forma complementaria, se superponían a la secuencia 5' homóloga al RNA viral del clon 6X119.

También se encontró que los clones 5X43 (130 pb), 5X120 (250 pb) y 4X70 (350 pb), correspondientes al extremo 3', tenían secuencias superponibles con dicho clon. Además, por comparación de otro grupo de secuencias obtenidas por iniciación con oligo dT, se encontró que los clones 5X42 (350 pb) y 4X91 se superponían entre sí. En este punto se contaba entonces con 500 pb del extremo 3' del genoma viral y con 420 pb de la zona que comprendía al extremo 5' de la secuencia de la proteína de cubierta. La zona 3' presentaba un marco de lectura abierto desde su inicio, que terminaba 70 pb antes del poli(A), mientras que la zona 5' presentaba varios codones de iniciación pero el único que permitía un marco de lectura abierto estaba ubicado a 100 pb del extremo 3' del clon más extendido hacia dicho extremo. En el capítulo correspondiente a la Discusión, se analizarán otros putativos marcos de lectura abiertos y sus posibles implicancias.

Para tener la secuencia completa de esta región del genoma viral se secuenciaron los clones 6X100 y 6X119 en condiciones de "alta lectura", es decir, se aumentaron los tiempos y concentraciones de las reacciones de marcado y los geles se corrieron por 14 y 8 horas, respectivamente. De este modo se consiguieron superponer ambas secuencias resultantes con absoluta certeza y concordancia. En la Figura 5.12 se muestra un esquema de los clones que conforman la secuencia correspondiente al gen de la proteína de cubierta, y en la Figura 5.13 se pueden observar las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de dicha proteína.

Paralelamente al desarrollo de este trabajo, se reportó la secuencia de la proteína de cubierta de una cepa europea de PVX (Morozov, S.Yu. *et al*, 1987). Esta secuencia presenta una alta homología con la cepa PVXc (americana) secuenciada por nosotros y, dado que dicha homología es de aproximadamente 80%, sirvió para confirmar los datos obtenidos en este trabajo.

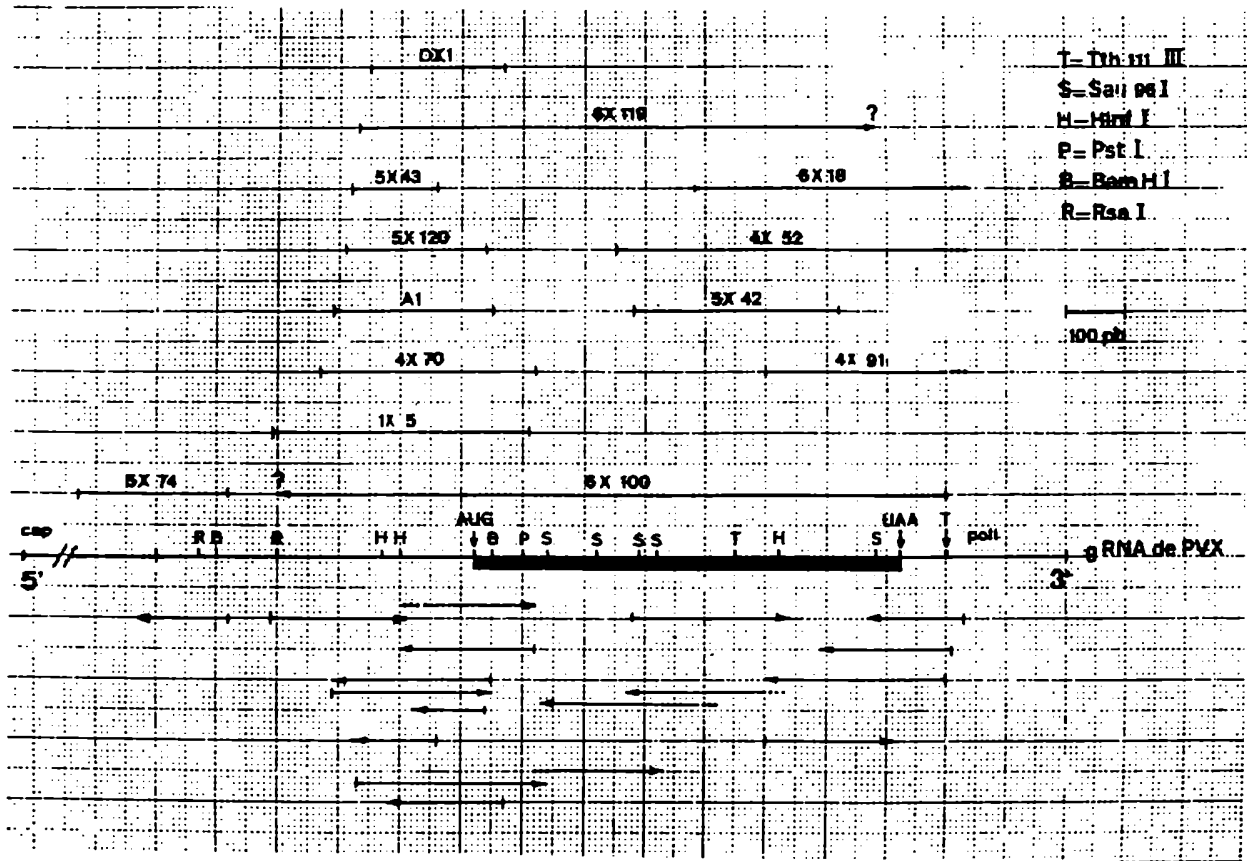


FIGURA 5.12: Esquema de clones que conforman la proteína de cubierta y de la estrategia de secuenciación seguida. Las flechas marcan el alcance de la lectura obtenida.

A.

```
1 ATGACTACAC CAGCCAACAC CACTCAAGCT GTAGGATCCA CCAAATCAAC TACCACCACC
61 ACTGCAGGCG CAACTCCTGC CAATTCAGGG CTATTCACCA TACCAGATGG GGACTTCTTT
121 AGGACCAGAA AGGCTGTGGT CGCTAGCGAT GCCGTGCAA CCAAGGAGGA ACTCAGCGAG
181 ATACAGAGTA TCTGGAGGAA CAATAAGGTC CCAACAGACA CTATGACACA GGAGGCTTGG
241 ACATTGGTAA GACACTGTGC TGACGACGGG TCCTCTGCC AAACGAAAT GATAGGACCC
301 GGTCATACT CCAATGGGGT CAGCCGGGCT AGACTGGCAG CTGCAATTAA AGAGGTGTGC
361 ACACTGAGGC AGTTCTGCAA AAAGTATGCC CCCGTGGTCT GGAAGTGGAT GCTCACAAC
421 AACAGCCCAC CGCCCAACTG GCAGGCACAA GGCTTCAAGC CGGAGCACAA ATTCGAGCC
481 TTTGACTTCT TTGATGGAGT CACTAATCCC GCAGCTATCA CTCCCAAAGA GGGGCTCATG
541 AGACCTCCGT CTGAGCAGA AATGAATGCC GCCCAACTG CTGCCTTTGT GAAGATCACC
601 AAGGCGAGGG CGCAATCCAA CGACTTTGCC AGTCTGGATG CCGCGGTCAC TAGGGCCCGC
661 ATCACAAGAA CACTGTGTC AGAAGCAGTT GTTCACTAC CCCCACCATA ACTAGTCCA
721 CATAACCGAC GCGTATCCA GTTTCATAGT ATTTCTGGT TTGATTGAT GAATAATATA
781 AAT
```

B.

```
1 MTPANTQA VGSTKSTTT TAGATPANS6 LFTIPD6DF RTAKAVVASD AVATKEELSE
61 IQSIWKNNKV PTDNTQAAH TLVRHCADD6 SSAQTEMIGT GPYSN6VSR RLAARIKEVC
121 TLRQFCKKYA PVVWNNMLTN NSPPANWQAG GFKPENKFAA FDFD6VTNP AAITPKEGLM
181 RPPSEAEHNA AQTAAFVKIT KARAQSNQFA SLDAAVTRGR ITGTTVAEAV VSLPPP
```

FIGURA 5.13: Secuencia de la proteína de la cápside del PVXc. A: secuencia de ácidos nucleicos. B: secuencia de aminácidos obtenida por traducción de la secuencia anterior.

5.6. DESARROLLO DE UNA SÓNDA MOLECULAR PARA DIAGNOSTICO DE PVX

En colaboración con un laboratorio del INTA-Castelar, se desarrolló un método de diagnóstico para PVX. Como sonda molecular se empleó uno de los clones de cDNA obtenidos, marcado con radioactividad o por incorporación de biotina. Se utilizó el clon denominado B1, de alrededor de 500 pb, proveniente de la primera *library* y cuyas cadenas complementarias fueron secuenciadas completamente. Dicho clon se marcó alternativamente por *random priming* con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, tal como se describió en la sección 4.12.3 de Materiales y Métodos, o por incorporación de bio-11-dUTP de acuerdo al procedimiento descrito por Leary *et al* (Leary, J.J. *et al*, 1983). Como fuente viral se utilizaron partículas virales purificadas o jugo de plantas de *N. tabacum* infectadas con PVX, clarificado y pretratado con formaldehído. Se realizaron las hibridaciones en condiciones similares a las descritas por Tchen *et al* (Tchen, P. *et al*, 1984). Las señales radioactivas se detectaron por exposición autorradiográfica de los filtros. Las sondas biotiniladas se revelaron por el método de la estreptoavidina-fosfatasa alcalina (Chan, V.T.-W. *et al*, 1985). Con la sonda radioactiva se obtuvo una sensibilidad de 0.5 ng de PVX, que representan alrededor de 25 pg de gRNA (Figura 5.14). Con la sonda biotinilada se detectaron hasta 8 ng del mismo virus (Figura 5.15).

Se analizó la especificidad del ensayo haciendo *dots* de extractos de hojas de *N. tabacum* infectadas con distintos virus de papa e hibridándolos con la sonda biotinilada. Como se puede observar en la Figura 5.16, mientras los extractos de hojas infectadas con PVX dieron una fuerte señal positiva, los de hojas infectadas con PVY, *Potato Virus S* (PVS) y *Potato Leafroll Virus* (PLRV) no presentaron señal alguna (Mandel, M.A. *et al*, 1988).

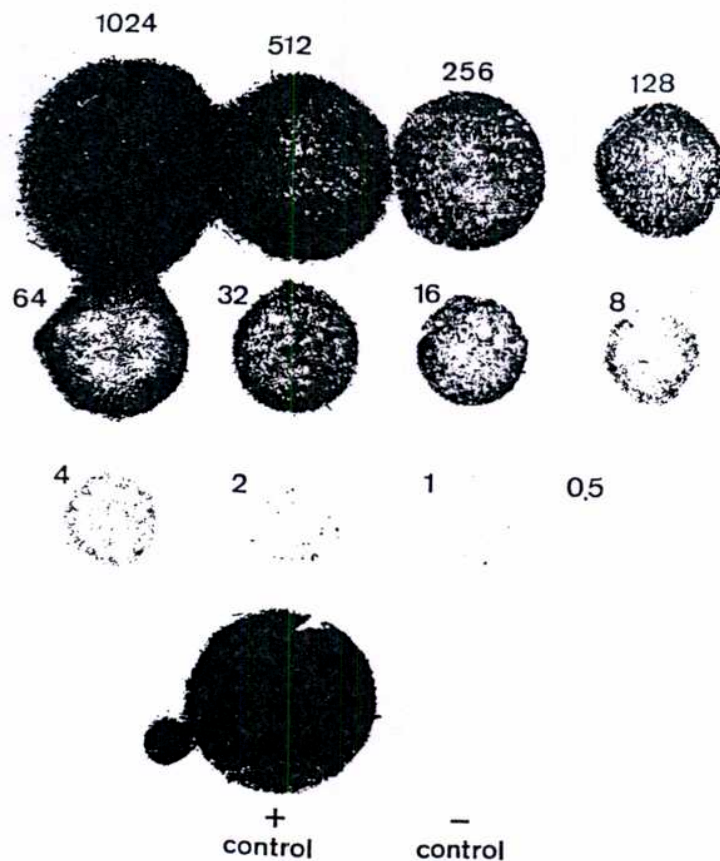


FIGURA 5.14: Hibridación de partículas virales de PVX contra DNA del clon B1 marcado radioactivamente. Se hicieron *dots* de diluciones seriadas de PVX tratado como se describe en el texto y se hibridaron contra DNA de B1 marcado por *random priming* con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. Los números indican los nanogramos de partículas sembradas.

A

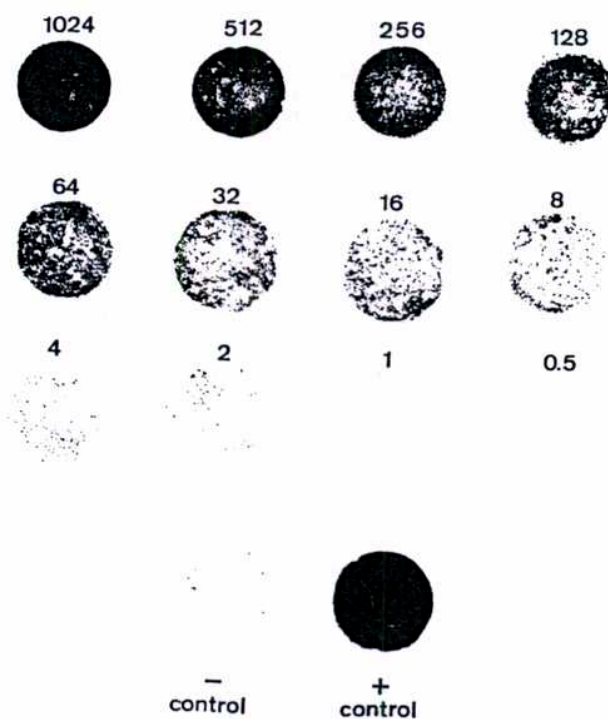


FIGURA 5.15.: Hibridación de partículas virales de PVX contra DNA del clon B, marcado con biotina. Las partículas de PVX se trataron y sembraron como en el caso anterior y se hibridaron contra DNA del clon B1 marcado con biotina.

A

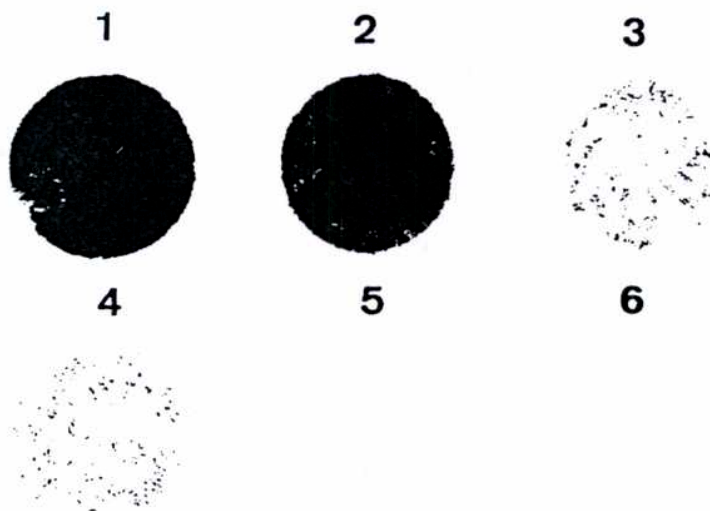


FIGURA 5.16: Diagnóstico diferencial de PVX en plantas infectadas utilizando sondas biotiniladas. Se extrajo DNA total de plantas sanas y plantas infectadas con PVX, PVY, PLRV y PVS y se trató tal como se describe en el texto. Se sembraron *dots* de estos extractos y se hibridó contra DNA de B₁ marcado con biotina. 1 y 2: plantas de tabaco y papa, respectivamente, infectadas con PVX; 3, 4 y 5: plantas infectadas con PVY, PVS y PLRV, respectivamente; 6: plantas sanas.

CAPITULO VI

DISCUSION

El conocimiento de la estructura primaria de los genomas es de fundamental importancia en el estudio de los organismos vivos. En años recientes han podido ser determinadas un número considerable de secuencias, parciales o completas, de genomas virales vegetales. Esto ha contribuido a aumentar el conocimiento acerca del funcionamiento de estos genomas. Por ejemplo, si bien es cierto que existían fuertes evidencias que indicaban la presencia de un codón de terminación ámbar al final del cistrón de 126 Kd del TMV (Beachy, R.N. *et al*, 1977; Pelham, H.R.B., 1978), la prueba final y conclusiva se obtuvo al estar elucidada la secuencia completa del genoma viral (Goelet, P. *et al*, 1982). Por el contrario, un supuesto codón de terminación leaky en el RNA 1 del *Alfalfa Mosaic Virus* (AlMV) (Van Tol, R.G.L. *et al*, 1980) no apareció como tal luego de ser secuenciado dicho genoma (Cornelissen, B.J.C. *et al*, 1983). La aminoacilación de varios RNAs virales sugirió la presencia de estructuras tipo tRNA en los extremos 3' de dichos RNAs, hecho que sólo pudo ser confirmado luego de conocerse dichas secuencias y estudiarse las posibles conformaciones tridimensionales. Asimismo, por comparación de secuencias nucleotídicas se encontró que uno de los productos codificados por el CaMV era homólogo a la transcriptasa reversa codificada por distintos retrovirus animales (Toh, H. *et al*, 1983). También se han establecido homologías de este tipo por comparación de las replicasas y proteasas del CPMV con otros picornavirus (Franssen, H. *et al*, 1984). Asumiendo que la clasificación de los virus vegetales refleja posibles relaciones evolutivas, la determinación de homologías entre secuencias genómicas puede transformarse en el criterio taxonómico más importante y válido para clasificarlos.

En este trabajo de tesis se han obtenido y caracterizado varios clones de cDNA de PVX por técnicas de DNA recombinante. Muchos de estos clones, correspondientes a distintas partes del genoma, han sido secuenciados, dilucidándose la secuencia completa de la proteína de la cápside. También se ha obtenido información sobre la secuencia de otros grupos de clones que, en conjunto, abarcan una proporción mayor al 70% del genoma viral.

Recientemente, se ha informado la secuencia de la proteína de cubierta de dos Potexvirus, el PaMV (Short, M.N. *et al*, 1986) y una cepa europea del PVX (Morozov, S.Yu. *et al*, 1987). En el caso del PaMV, la secuencia se obtuvo directamente de la proteína por técnicas que combinan el mapeo con proteasas, degradación de Edman y espectrometría de masa. En la Figura 6.1 se muestra una comparación realizada mediante un programa de computación entre dicha secuencia y la obtenida en este trabajo. El porcentaje de homología calculado es de 35%. Es importante destacar que la proteína de la cápside del PaMV tiene una longitud de 211 aminoácidos, mientras que la determinada para el PVX es más larga, de 236 aminoácidos. Se ha establecido una comparación similar con la secuencia reportada para las cepas de PVX europea, obteniéndose 81% de homología en la secuencia de ácidos nucleicos y 89% de homología en la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la anterior (Figuras 6.2 y 6.3). A través de estas comparaciones se ha observado que la secuencia **ACAGCT** (posiciones 82 a 87 de la secuencia correspondiente a la cepa europea de PVX) que codifican los aminoácidos Treonina y Alanina ha sido sustituida por la secuencia **AAT** (posiciones 82 a 84 de la secuencia correspondiente a la cepa americana) que codifica Asparagina. El efecto resultante de esta sustitución es la ausencia de un aminoácido en la secuencia total del PVXc. La secuencia de dicha zona se ha obtenido a

través del análisis de tres clones, por lo cual concluimos que esta diferencia refleja una variación real entre ambas cepas y no un cambio polimórfico o un artificio de secuenciación.

```

PVXc                HTTPANTTQAVGSTKSTTTTAGA      24

PaMV MSTPNTAFPAITQEQMSSIKVDPTSQNLPSQEQKSVSTLNVAAKVPAASVTTVALELV  60
      |                | |             | | |  | | |
PVXc  TPAN-SGLFTIPD6DFRTAKAVVASDAVATKEELSEIQSIWKNKVPDTMTQAAMTLV  83

PaMV  NFCYDNGSSAYTTVTGPSSIPEISLAQLASIVKASGTSLRKFCRYFAPIIWNLRDKNAP  120
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
PVXc  RHCADD6SSAQTEMIGT6PYSNGVSRARLAAAIKEVCTLRQFCCKYAPVVMHLTNNSP  144
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      LH

PaMV  ANWEAS6YKPSAKFAAFDFFDGVENPAAMQPPSGLIRSPTQEERIANATNKQVHLFDAAA  180
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
PVXc  ANWQAQ6FKPEHKFAAFDFFDGVTNPAAITPKEGLNRPPSEAHNAQTAAAFVKITKARA  204

PaMV  EDNMFASNSAFITK6QIS6STPTIQFLPPPQ      211
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
PVXc  QSNDFASLDAAVTRGRITGVAEAVVSLPPP      236
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      LTT
  
```

FIGURA 6.1: Comparación de las secuencias de aminoácidos del PaMV y el PVXc, obtenido en este trabajo.

PVXc	ATGACTACAC CAGCCAACAC CACTCAAGCT GTAGGATCCA CCAATCAAC TACCACCACC	60
	### ? ### ### ? ### ?? ?? ? ### ?? ? ? ? ###? ###? ?	
PVX*	ATGTACACAC CAGCTAGCAC AACACAGGCC ACAGGGTCAA CTACCTCAAC TACCACAAAA	60
PVXc	ACTGCAGGCG CAACTCCTGC CAATTCAGGG CTATTCACCA TACCAGATGG GGAATTCCTT	120
	##### ? ##### ? ?###? ?? ?###? ? ? ?###? ?? ?###?	
PVX*	ACTGCAGGCG CAACTCCTGC CGCTTCAGGA CTGTTACCA TCCCGGATGG GGAATTCCTT	123
	LACA	
PVXc	AGGACCGCAA AGGCTGTGGT CGCTAGCGAT GCCGTTCAG CCAAGGAGGA ACTCAGCGAG	180
	?? ?? ? ?###? ?? ?? ?###? ?###?###? ? ? ?###? ?###?###?	
PVX*	AGTACAGCCC GTGCTGTAGT AGCCAGCGAT GCCGTTCAG CCAATGAGGA CCTCAGCGAG	183
PVXc	ATACAGAGTA TCTGGAGGAA CAATAAGGTC CCAACAGACA CTATGACACA GGCAGCTTGG	240
	?? ?? ? ?###?###? ?? ?###? ?? ?###? ?###?###? ??? ?###?	
PVX*	ATTGAGGCTA TCTGGAGGAA CATGAGGGTG CCCACAGACA CTATGACACA GGCCTGCTGG	243
PVXc	ACATTGGTAA GACTGTGTGC TGACGACGGG TCCTCTGCC AAACGAAAT GATAGGCACC	300
	? ?? ? ? ?###?###? ### ? ?? ?? ?###? ?### ?### ?###? ??	
PVX*	AAGTATGCA GACTGTGTGC TGATGTGGG TCATCTGCTC AAACGAAAT GATAGATAG	303
PVXc	GGTCCATACT CCAATGGGGT CAGCCGGGCT AGACTGGCAG CTGCAATTAA AGAGGTGTGC	360
	##### ?### ?### ? ?### ? ? ?###?###? ? ?###? ? ?###?###?	
PVX*	GGTCCCTAG CCAACGGCAT CAGCAGAGCC AGACTGGCAG CAGCAATCAA AGAGGTGTGC	363
PVXc	ACACTGAGGC AGTCTGCAA AAAGTATGCC CCCGTGGTCT GGAAGTGGAT GCTCACAAC	420
	##### ?### ? ? ?### ?###?###? ?? ?###? ? ?###?###? ?? ? ? ?	
PVX*	ACACTTAGGC AATTTGTCAT GAAGTATGCC CCAAGTGGAT GGAAGTGGAT GCTGACTAAC	423
PVXc	AACAGCCAC CAGCAACTG CAGGACCAA GGCCTCAAGC CAGGACCAA ATTCGAGCC	480
	##### ?### ? ? ?### ? ? ? ? ? ?###? ? ?###?###? ?###? ?	
PVX*	AACAGTCCAC CTGCTAAGT CAGGACCAA GGTTCAGGC CTGAGCACA ATTCGCTGCA	483
PVXc	TTTACTTCT TTGATGGAGT CACTAATCCC GAGCTATCA CTCCAAAGA GGGGCTCATG	540
	?? ?###? ? ?###? ? ? ?? ? ? ? ? ? ? ? ?###? ?###?###?	
PVX*	TTCACTTCT TCAATGGAGT CACCAACCCA GCTGCCATCA TGCCAAAGA GGGGCTCAT	543
PVXc	AGACTCCGT CTGAGCAGA AATGAATGCC GCCCAACTG CTGCCCTTGT GAAGATCACC	600
	? ?? ?### ?###? ? ? ?###?###? ?###?###? ?###?###? ?###? ?	
PVX*	CAGCCACCGT CTGAGCTGA AATGAATGCT GCCCAACTG CTGCCCTTGT GAAGATTACA	603
PVXc	AAGGCGAGGG CCAATCCAA CACTTTGCC AGTCTGGATG CCGCGCTCAC TAGGGCCGC	660
	##### ? ?###? ?###?###? ?? ?? ?### ? ? ?###? ? ? ? ?	
PVX*	AAGGCCAGGG CCAATCCAA CACTTTGCC AGCTAGATG CAGCTGTAC TCAGGCTCGT	663
PVXc	ATCAGAGGA CACTGTTGC AGAAGCAGTT GTTCACTAC CCCACCATA ACTACGTCA	720
	##### ?### ? ? ? ? ?? ? ? ? ? ? ? ? ?###? ?###?###?	
PVX*	ATCACTGGA CACAACCGC TAGGGCTGT GTCACTTAC CACCACCATA ACTACGTCA	723
PVXc	CATAACCGAC GCTATCCCA GTTTCATAGT ATTTCTGGT TTGATTGAT GAATAATATA	780
	##### ?? ? ?### ?###?###? ?###?###? ?###?###? ?###?###?	
PVX*	CATAACCGAC GCCTACCCA GTTTCATAGT ATTTCTGGT TTGATTGAT GAATAATATA	783
PVXc	AAT	783
	###	
PVX*	AAT	786

FIGURA 6.3: Comparación de las secuencias nucleotídicas del PVXc y la cepa europea del mismo virus.

Mediante otro programa de computación se han realizado análisis de hidropatía, tanto de la secuencia obtenida para la proteína de cubierta del PVXc, como para las informadas del PaMV y el PVX europeo. En la Figura 6.4 se pueden apreciar los perfiles obtenidos. Se observa que existe una gran diferencia entre el PaMV y ambas cepas de PVX. Con respecto a estas últimas, se observa la presencia de 8 zonas de hidrofiliidad variable (zonas I, II, III, IV, V, VII, VIII y IX de la Figura 6.4), constatándose la aparición de una región hidrofílica adicional (VI) en la cepa americana. Además, se observa una acentuada variación cualitativa y cuantitativa entre las zonas III, IV y V de ambas cepas. Si se asume que las zonas hidrofílicas corresponden a las zonas más expuestas de la superficie de la molécula proteica y, por consiguiente, a las zonas de mayor antigenicidad (Lerner, R.A. *et al*, 1981), podría esperarse que la cepa americana (PVXc) fuera inmunológicamente más activa que la cepa europea. Lamentablemente, en el trabajo de Morozov y colaboradores no se identifica claramente la cepa, razón por la cual este aspecto no pudo ser explorado. Esta diferencia entre las regiones hidrofílicas podría traducirse también en una variación entre los repertorios epitópicos de ambas cepas. Con la disponibilidad creciente de anticuerpos monoclonales, esta hipótesis podría someterse en el futuro al análisis experimental.

Respecto a las regiones que flanquean a la secuencia correspondiente a la proteína de cubierta se observó lo siguiente:

En la región del extremo 3' comprendida entre el codón de terminación y el poli(A), existe un 96% de homología entre ambas cepas de PVX; si bien no se encontraron otras señales

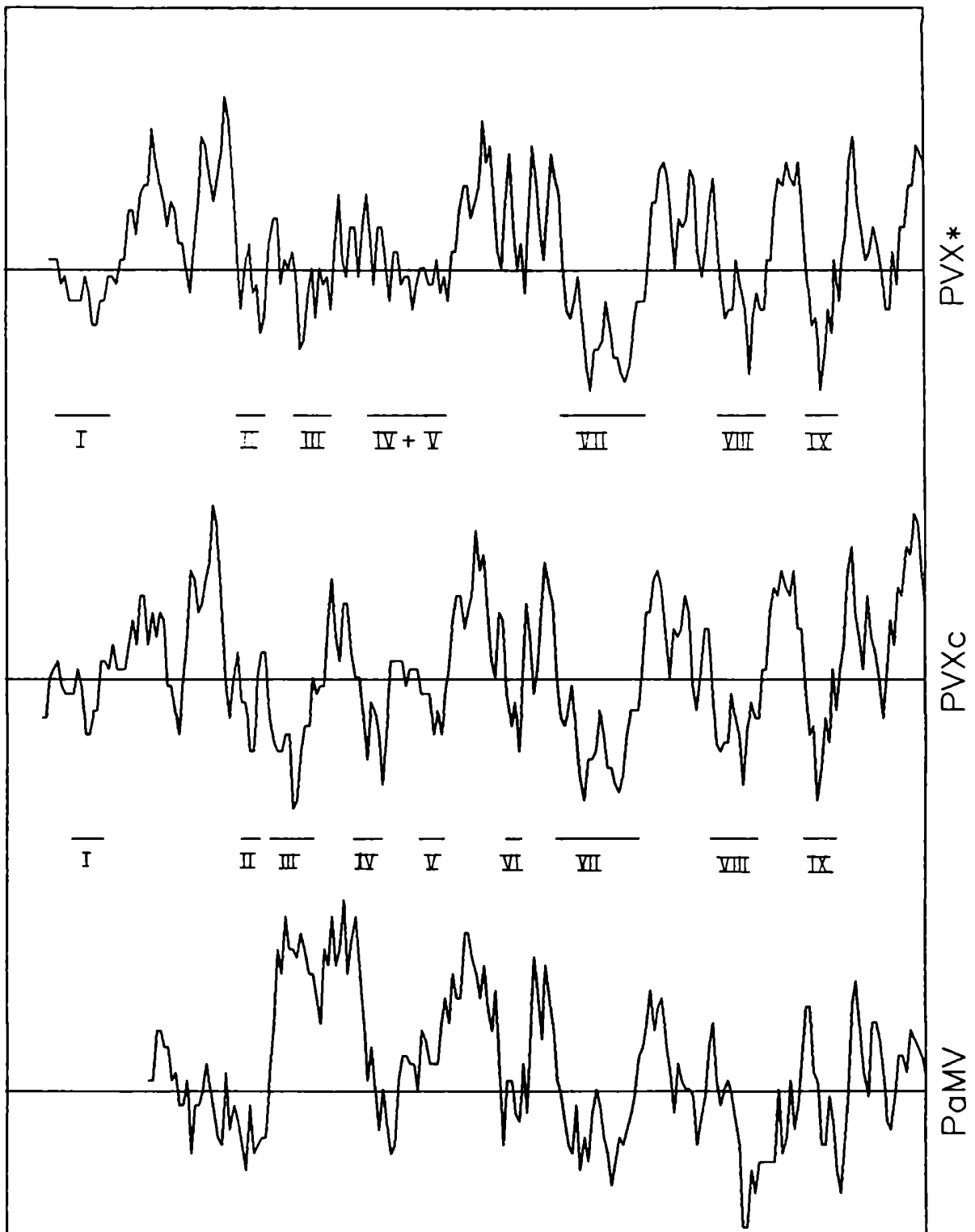


FIGURA 6.4: Perfiles de hidropatía correspondientes al PaMV, FVX (cepa europea) y PVXc. Los valores por encima de los ejes centrales representan hidrofobicidad y por debajo hidrofiliicidad.

de terminación, en ambos casos se encuentra una señal de poliadenilación característica de plantas, (AATAA), a 7 bases de la primer adenina del poli(A).

- En la región inmediatamente 5' al codón de iniciación se encontró la secuencia GAAAGATG que coincide con la secuencia consenso del inicio de la traducción CAANNATG definida en plantas. La primer base luego del codón de iniciación para cepa americana fue adenina y timina para la europea, difiriendo ambas de la guanina esperada en animales y plantas.

- También se encontró una secuencia de 15 nucleótidos ubicados 11 bases *upstream* del codón de iniciación de la proteína de la cápside y que, según el grupo de Atabekov y colaboradores (Dolja, V.V. *et al*, 1987), definiría la extremidad 5' de uno de los sgrNAS de PVX. Dicha secuencia, GGTAAAGTTTCCAGT, difiere de la cepa europea y de la reportada para el PoAMV (Bundin, V.S. *et al*, 1986) en solamente una base (G por A en la posición 14 de dicha secuencia). En la Figura 6.5 se puede observar un esquema detallado de estas regiones.

En el trabajo de Morozov y colaboradores se postulan también dos marcos de lectura putativos que flanquean al extremo 5' del marco de lectura correspondiente a la proteína de cubierta. Estos dos marcos, que se superponen entre sí, totalizan aproximadamente 550 bases y codifican cortas secuencias de aminoácidos hidrofóbicos. Estas posibles cadenas polipeptídicas poseerían una estructura compatible con la de las proteínas de membrana. Los autores comparan estas secuencias y las reportadas para el RNA 2 del *Barley Stripe Mosaic Virus* (BSMV) y el *Beet Necrotic Yellow Veinal Virus* (BNYVV), estableciendo similitudes en la organiza-

ción de los marcos de lecturas. En el caso de la cepa PVX secuenciada en este trabajo, se halló la misma organización de marcos de lectura descripta para la cepa europea. La Figura 6.6 muestra una comparación entre las secuencias correspondientes a estas regiones (denominadas ML1 y ML2) en ambas cepas.

Si bien la secuenciación del genoma viral no fue terminada completamente, este trabajo representa un avance sustancial en esta dirección. Un número importante de clones han sido agrupados en cinco grandes conjuntos de secuencias que abarcan más del 70% del genoma viral, junto con otro conjunto de secuencias aún no agrupadas. Estos clones integran un Banco de datos de más de 15000 pb secuenciadas. En una etapa próxima se buscarán superposiciones entre dichos conjuntos de secuencias y se reconfirmarán algunas regiones en que las secuencias no han sido aún totalmente depuradas de ambigüedades. Es de remarcar que al utilizar la técnica de secuenciación empleada en este trabajo, es común la aparición de recombinaciones entre partes diferentes del genoma debido a artificios ocurridos durante el clonado, así como de algunos pocos casos de polimorfismos o incertezas debido a los errores de lectura de las polimerasas empleadas. También es común detectar los denominados *full-stops*, que representan compactamientos en la lectura de zonas ricas en guanina y citosina. Estas secuencias formarían fuertes estructuras secundarias, difíciles de saltar por dichas polimerasas. Este tipo de inconvenientes se resuelve usualmente secuenciando las zonas problemáticas por la técnica de Maxam y Gilbert (Maxam, A.M. *et al*, 1980) o por secuenciación directa sobre el RNA por medio de ribonucleasas que reconocen sitios específicos.

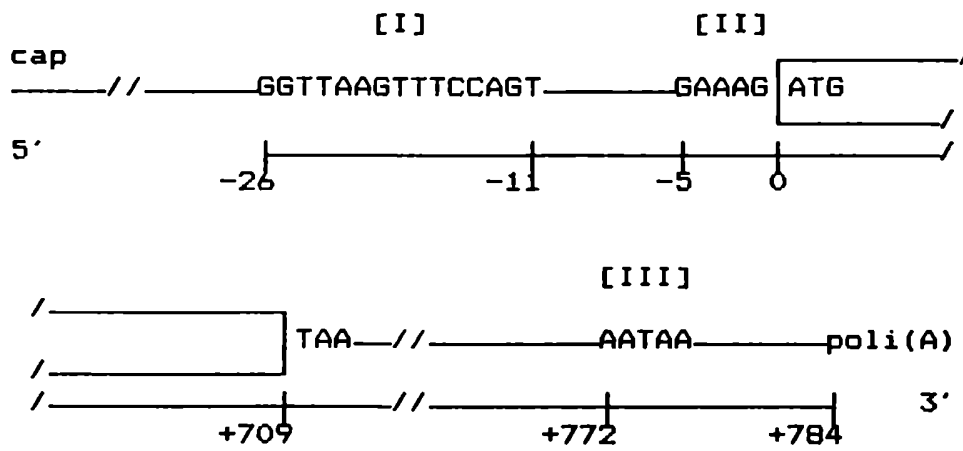


FIGURA 6.5: Esquema de las regiones flánqueantes de los extremos 5' y 3' de la secuencia correspondiente a la proteína de cubierta del PVXc.

ML1

PVX* MSAGGHRLTDPVNSEKVIYVLGLSFALVSI TFLLSRNSLPHVGDNIHSLPLGAYRDGTK

PVXc AVLYNSPNFGSRTSLSNGKNAAFVLLLSLLIYGSRCLSQRNHL CACGNNHSSH
* ***** ** ** ***** ** * ***** ** * ***** *****
PVX* AILYNSPNLGSRVSLHNGKNAFAVLLLTLLIYGSKYISQRNHTCACGNNHSSH

ML2

MEAGAYLNAIIFVLVATI IAVISVGLTRTEPCTIRITGESITVHACHIDSETIKALANLK
** ***** ** ***** * ***** * ***** ** * ** * **
MEANTYLNAILVVLVTIIAVISIFLVRTEPCVIKITGESITVLACKLDAETIRAIADLK

PLSLERLSFG
** *****
PLSVERLSFH

FIGURA 6.6: Comparación de los putativos marcos de lectura abiertos ML1 y ML2 de las cepas europea y americana de PVX.

Con los resultados obtenidos se abren varias líneas de trabajo. Una de ellas, descrita brevemente en la sección 5.6 del capítulo de Resultados, es el desarrollo de métodos de diagnóstico de virosis en papa mediante el empleo de los clones obtenidos como sondas de hibridación molecular. Una sonda (marcada alternativamente con radioactivo y con biotina), probó ser específica en la detección del virus y tan o más sensible que los ensayos de ELISA usualmente utilizados. Un objetivo secundario es el desarrollo de sondas de diagnóstico para diferenciar distintas cepas de PVX. Para esto se piensa sintetizar oligonucleótidos que sirvan como sondas específicas. Las zonas hidrofílicas descritas anteriormente, tales como la IV y la V, son regiones apropiadas para escoger secuencias de nucleótidos para estos oligonucleótidos sintéticos ya que muestran la mayor divergencia entre las cepas comparadas.

Una segunda línea que se abre a partir de los datos presentados en este trabajo, es la de la obtención de resistencia antiviral en plantas manipuladas por ingeniería genética. En particular, los datos de secuencia correspondientes a la región 3' del genoma (que contiene a la proteína de cubierta y a la secuencia 3' no codante) resultarán fundamentales para la implementación de las distintas estrategias disponibles. Dichas estrategias pueden resumirse sintéticamente así:

- 1) La llamada estrategia de "protección cruzada", que consiste en expresar en la planta, bajo la dirección de un promotor vegetal constitutivo "fuerte" (usualmente el del transcripto 35 S del CaMV), la secuencia estructural de la proteína de cubierta. Ya se han realizado ensayos exitosos utilizando esta estrategia con distintos virus vegetales (Van Dun, C.

M.P. *et al*, 1987; Wilson, T.M.A. *et al*, 1986). En el caso de PVX la secuencia correspondiente a la cápside ha sido completada totalmente y será relativamente sencillo subclonarla en los vectores apropiados para su introducción en plantas por medio de sistemas basados en *Agrobacterium*.

- 2) La llamada estrategia de "arresto de la transcripción". Se basa en competir la replicasa viral con su propia región de unión sobre el RNA del patógeno. Lleva implícita la superexpresión constitutiva en la planta de transcriptos cortos conteniendo esta secuencia, lo que puede lograrse por técnicas similares a las descritas en el punto anterior. En nuestro caso, existe una alta probabilidad de que las 70 bases de la región 3' no codante (región que sugestivamente presenta una homología mucho mayor que otras entre las dos cepas de PVX comparadas), incluya el sitio de unión de la replicasa viral. Como en el caso anterior, su introducción y expresión en plantas resultará relativamente simple.

- 3) La llamada estrategia o tecnología "antisentido", la que consiste en expresar constitutivamente en la planta transcriptos complementarios al RNA viral. En este caso, se supone que el apareamiento de estos transcriptos con el RNA genómico del virus impedirá el proceso de traducción del mismo y, por ende, interferirá el ciclo de replicación. Aunque existe cierta controversia al respecto, se supone que las regiones del gRNA involucradas en el reconocimiento por los ribosomas serían las más apropiadas para su utilización en esta estrategia. En el caso del PVX, se dispone a partir de los datos presentados de un conocimiento detallado de la estructura 5' de un probable RNA subgenómico que expresaría la

proteína de cubierta. Esta parecería ser pues, una de las secuencias apropiadas para su empleo en esta línea de trabajo. Aunque la utilización de la tecnología "antisentido" en plantas ha brindado hasta el presente resultados variables (Ecker, J.R. *et al*, 1986; Loesch-Fries, L.S. *et al*, 1987), el desarrollo de esta estrategia no implica en principio mayores dificultades técnicas que las mencionadas en los dos puntos anteriores.

CAPITULO VII

BANCO DE CLONES

CA1HOMOL 251 BP

1 AGCAGGTGCT TATCTCAACG CAATCATCTT TGTGCTTGTc GGCAACAATC ATAGCAGTCA
 61 TTAGCCGTGG GTTGA CTGG ACAGAGCCAG TCACCATCAG AATTACTGGT GAGTCGATCA
 121 CGGTACACGC TTGCCACATA GACAGCGAGA CGATCAAGGC TCTGGCTAAT CTCAAACCAC
 181 TCTCACTTGA GCGGTAAAGT TTCCAGTGAT AATTGAAAGA TGA CTACACC AGCCAACACC
 241 ACTCAAGCTG T

CA2HOMOL 239 BP

1 CAGTGAAGTG ATCCTATCAG TGGCCCTGGA TAGTGCTGTG TACATAACAT TGGCGCTATC
 61 cAGGGCCATG ATAGGATCAc TTCATCAACA CTAGTGCCAA CTCATCCGCT TTCTGGGAAA
 121 AGCTTGACAG CACCCTTACC TGAAGACTTT CTATCTGTGCG TAAGGGAGCA CGgCACATGT
 181 GAGTCTGGGT CGGGCTCTAT CGGCTAGCTC GGCAGGCTCA TATCCTAAGT GCAACTGgA

CA7HOMOL 258 BP

1 TCATGCCCAT CACCGAAATG GTTTTTGGAC TTGACAAAGA AGAGTTCCCT GAAGGAACCC
 61 CTGAAGCACT AGCTCGTGAG CTCAAAGCCA TGAATCGAAG CCCAACCACA ATTCCCTTGG
 121 ACTTACTCAG GGCCAGGGAC TATGGGAGCG ATGTTAAAAA TAAGAGGATT GGggcAATCA
 181 CTAAGACTCA GGCTGCCAGT TAGGTA CTCA CCCCAGCTGG CATCCTGAGT CTTccatGTG
 241 ATTcaatccg tgagatCC

CA10HOMOL 222 BP

1 ATTAAGGAGT ATGAGCCTGC CGAAGCTGAG CCGATTAAGG AGCCCGAACC CCAGACTCAC
 61 ATGTGCGTGG AGAATGAGGA GTCTGTACTA GAGGAGTACT AAGGAAGAGT TGCTGGAAAA
 121 ATTTGACAGG GAGATCCACT CAAGTGCACA CGGACACTCC AACGTGCGTG CAGACTGAAG
 181 ACACCACATT ACAGCTATTC TCCCATCAAC AGGCCTGTGG TA

CB1HOMOL 519 BP

1 GGACAAATTC TCGGCGGTTG AGCTAGTCTA CCTAGTCAGT TACATGGAGT TTCTAGCCGC
 61 CCTACAGGCT ACCACCTGCT TCTCCGACAC TTTATCGGGC GCCAGTCCAC CGCTTTGACC
 121 AGTTTTGCGT AGTCTTCCAA GCCACAAAGA CTCTAGCCCC TGTAAGAGCT TGGATCCAAG
 181 AAAAGAAGAT GCAACTTTGT GGCTTGGAAG ACTACGCAA ACTGGTCAA GCGGTGGACT
 241 GGCGCCAGT GGA CTCTCT TTTAAAGTTG AACCTGGGA CTTAGATT CACTAGG
 301 CATGTGGAAG GCTTTCCACC CAGTGAGCTG TCGAACGTGG AAGAGATGAA CAACTTCTTT
 361 GACGATGGCG ACTTGCTGGA CTGTTTTACA AGGATGCCAG CTTATGCAGT CAACGCTGAA
 421 GAAGACCTGG CCGGGATGAG GGGAAACAAT CAGGAAGGGA CATCAACAGC CCCTAGAGAA
 481 CCCGAGGGAG AGAAAAGGA ATACATCAAC CCGGCGAAC

CLONB7B 719 BP

1 CTAGGTTTCT AGCCGCCCTA CAGGCTACCA CCTGCTTCTC CGACACTTTA TCGGGCGGCT
 61 TACTAACAAA GACTCTAGCC CCTGTAAGAG GTTGGATTCA AGAAAAGAAG ATGCAACTTT
 121 GTGGCTTGGG AACTACGTA AACTGGTCA AAGCGGTGGA CTGGCGCCCA GTGGACTTGT
 181 GTTTTAAAGT TGAAACCTGG GACTTCAGAT TCAACTCAAC TAGGCATGTG GAAGGCTTTC
 241 CAGCCAGTG AGCTGTCAGA CGTGGAAGAG ATGAACAAC TCTTTGACGA TGGCGACTTG
 301 CTGGACTGTT TTACAAGGAT GCCAGCTTAT GCAGTCAACG CTGAAGAAGA CCTGGCCGGG
 361 ATGAGGGGAA ACAATTCAGG AAGGGACATC AACAGCCCCT AGAGAACCCG AGGGAGAGAA
 421 AAAGGAATAC ATCAACCCGG CAGAAACCTT CCTAGACAAA CTGACTAGGA AACACAATCG
 481 GGAAACCAGG AGTCGCGCTG CAAAGAAAGC CAAACGCCTG GCCGAAATCC AAGACTCCAT
 541 GAACAGGGAC AGGACTGAGG AAGGAAGTCA TAAGACACCC AACATGGCGA AGCGCCAAGC
 601 AATGCTGATC TTCCCGGCGT CAATGAAGTG GAGGCTGGCA CCACATTCCC GACCTTGAAA
 661 GCCCTACCAC AAAAATGGGA AGATGCATCA TCCACTGACT CCTCAACAAT TGCCCCGGT

CB9AHOMOL 293 BP

1 CAATCTCCAG TAAGAATGAT CAATTTAATT TTTACTGGAG ATAGCAGACA AAGTGTCTAC
 61 CATGAGACGT GAGATGACGC TTCTATCAGG CACTTAGGCC CGGCTACTGA AgTGTTTGCT
 121 AAGTACTGCA GGTACTACTT GAACGCCACA CACCGCAACC AAcAAAGACT TGGCAAACAT
 181 GCTAGGTGTG TACAGCGAGA GAACCGGACA CCacaTGAAC ATAAGCTATc cGAGTTCTCG
 241 AATTTCTCGG CAACGGTGTT ACCGACCCTA GTGgCCCTCA AGAACGAAAA GAG

CB9CHOMOL 256 BP

1 TCGAAAGTCG CTGGTGTCTT GAGTGACGTA CTAAAACAAA CTAATCTCGT CACGGTTCGT
 61 GTATGTGACT GTACGTCCTG GAATTATTTT AGGCCTGCCC CGTGACAATC GGAAGGGGCG
 121 GAGTTCTTAA AGGATATTGG CAATTCAATG GTAAATCTGA ACTTATTCTA CCTATAAGAG
 181 TAGTAATCAA ACTTTTCAAA TCCAATGAGA TCTTGATGAT TCCCTGACCT TAGATTTCCG
 241 GATCGTGCAG ATCGAC

CC5HOMOL 511 BP

1 TTCAGCACAC GGACACTCCA ACTGCGTGCA GACTGAAGAC ACCACAATAC AGCTATTCTC
 61 CCATCAATAG GCCAAAGATG AGACTCTTCT ATGGGCAACC ATTGATGCTC GCCTGAAGAC
 121 CAGCAACCAA GAAAGCAACT TCCGTGAGTT CCTGAGTAAG AGAGACATTG GAGATGTCCT
 181 CTTCTTAAAT TACCAGAGGG CAATGGGGCT GCCAAAGGAA CCAATCCCTT TCTCACAGGA
 241 GGTGTGGGAG GCGTGCGCGC ATGCAGGTGC AGAGTAAGTA CTTGAGCAAG TCTAAGTGCA
 301 ACCTCATCAA TGGCACAGTT AGGCAGAGTC CTGACTTTGA TGAAAACAAA ATCATGGTAT
 361 TCCTTAAGTC CCAATGGGTA ACTAAAGTCG AAAAGCTGGG ATTGCCAAAA ATCAAACCGG
 421 GTCAGACTAT TGCCGCCTTT TACCAACAGA CAGTTATGCT CTTTGGCACA ATGGCTCGAT
 481 ACATGCGTTG GTTTAGGCAG GCGTTTCACT G

CC6HOMOL 222 BP

1 AGCTTCAGCT TCAAGGACAT TTTCCATAAT GTCGCCATTG AACCGAGAGA TGTTGCTAGA
 61 TACCCAAAGG AAACCATCAT ACACAAACTA GCAGAGATAG AGACGGACAC GGCATACATC
 121 AGCGACACTC TACTTTCCT CGACCCGAGC TATATTGTAG AGACGTTCCA GAACTGTCCG
 181 AAATAACAAA CACTCTACGC CACTCTCGCC CTCCCCTGGA TC

CD2BHOMOL 525 BP

1 CGCACgCTCC CACACCTCCT GTGAGAAAGG GATTGGTTCC TTTCTCACAG GAGGTGTGAg
 61 cgTcgcgATG AGGTGCAGAG TAAGTACTTG AGCAAGTCTA AGTGCAACCT CATCAATGGC
 121 ACAGTTAGGC AGAGTCCTGA CTTTGATGAA AATAAAATCA TGGTATTCCCT TAAGTCCCAA
 181 TGGGTA ACTA AAGTCGAAAA GCTGGGATTG CCAAAAATCA AACCGGGTCA GACTATTGCC
 241 GCCTTTTACC AACAGACAGT TATGCTCTTT GGCACAATGG CTCGATACAT GCGTTGGTTT
 301 AGGCAGGCGT TTCAACCAAG GAAGTCTTCA TCAATTGTGA GACGACACCT GAGGACATGT
 361 CGGCATGGCT TGAGCAACTG GAACTTCACG AGGCCAGTC TTGCAAATGA CTACACGGCC
 421 TTTGATCAGT CACAGGACGG AGCCATGTTG CAGTTTGAGG TACTTAAAGC CAAGCATCAC
 481 TGCATCCCAG AAGAGATCAT CCAGGCATAC ATTGACATCA AGACA

CD5HOMOL 258 BP

1 GTTTGAGGTA CTTAAAGCCA AGCATCACTG CATCCCAGAA GAGATCATCC AGGCATACAT
 61 TGACATCAAG ACAAACGCAC AAATTTTCTT AGGCACTCTG TCAATCATGC GACTCACTGG
 121 AGAAGGCCCA ACATTTGATG CCAATACTGA GTGCAACATC GCCTTTACAC ACACCAAGTT
 181 GACATACCCG CAGTACAGCT CAAGTGTACG CTGGCGATGA CTCGGCAGTA GACTGTGTTC
 241 CAGAAGTTAA GCAAAGCT

CE101HOMOL 388 BP

1 GGATGAGGGG AAACAATCAG GAAGAGACAT CAACAGCCCC TAGAGAACCC GAGGGAGAGA
 61 AAAAGGAATA CATCAACCCG GCAGAAACCT TCCTAGACAA ACTGACTAGG AAACACAATC
 121 GGGAAACCAG GAGTCGCGCT GCAAAGAAAG CCAAACGCCT GGCCGAAATC CAAGACTCCA
 181 TGAACAGGGA CAGGACTGAG GAAGGAAGTC ATAAGACACC CAACATGGGC GAAGCGCCAA
 241 GCAATGCTGA TCTTCCCGGC GTCAATGAAG TGGAGGCTGG CACCACATTC CCGACCTTGA
 301 AAGCCCTACC ACAAAAATGG GAAGATGCAT CATCCACTGA CTCCTCAACA ATTGACCCGA
 361 CGGAAATCAT CCCAGGAGAA GAGGACGT

CE102HOMOL 413 BP

1 CAGCGTATGA GATAGACCTG AGTTACGCCT ACGACCACAA GGA₂CTCACTG CATGATTTGT
 61 TTGATGAGAA GCAGTGCCAA GCACATACAC TGACATGCAG GACCTTAATA AAGTCCGGAC
 121 GGGGCACTCT TAGCCTTCCC CGCCTCAAGA ATTTCTATA ACCGTTAAGT TACCATTTAG
 181 ACTTGAATAA GATGGATATT CTCATCATTG GTTTGAAAAG TTTAGGTAC TCTAaCTGCT
 241 AGGCCTTTAG ATTCCAGTCC CTTAGTAGTG CAGTGTGACC GGTGCCGGAA AGTCCACTGC
 301 ACTACGGAAG CTGCTTGCAC GACTCTGCAC CTTACAGTA CACTCTTTG GAGTCCCAGA
 361 TAAGATCAGT ATAAGGACCA GGGGCATACA GAAGCCAGGA CCAATCCCCG CTG

COX1HOMOL 205 BP

1 TTGACTCGGA CAGAGCCAGT CACCATCAGA ATTACTGGTG AGTCGATCAC GGTACACGCT
 61 TGCCACATAG ACAGCGAGAC GATCAAGGCT CTGGCTAATC TCAAACCACT CTCACTTGAG
 121 CGGTAAAGTT TCCAGTGATA ATTGAAAGAT GACTACACCA GCCAACACCA CTCAAGCTGT
 181 AGGATCCACC AAATCAACTA CCACC

COX2BS 120 BP

1 GCTGGGTGAG TACCTAACTG GAAAAATTGA GAGCTTACCA GCGCGGAAAG TGGCTGCTTG
 61 TGTCATCCAT GGGGCTGGGG GATCTGGCAA GAGCCACGCG ATCCAAAAAG CGCTGAGAGA

COX4BS 62 BP

1 CATGCCCATC ACCGAAATGG TTTTGGACT TGACAAAGAA GAGTTCCTG AAGGAACCCC
 61 AT

COX8HOMOL 333 BP

1 CTACTGAAGT GTTTGCTAAG TACTGCAGGT ACTACTTGAA CGCCACACAC CGCAACAAGA
 61 AAGACTTGGC AAACATGCTA GGTGTGTACA GCGAGAGAAC CGGCACCACT GAAATAAGTA
 121 TGAGCTCTGA ATTTCTGGAA GGTGTTCCGA CCCTAGTGCC CTCAGACGAA AAGAGGAGGT
 181 TGTACATGGG CACAGGCAGG AATGACACAT TCACATACGC AGGATGCCAA GGTCTCACGA
 241 AGCCAAAGTC CAGATCGTGC TAGACCACAA CACTCAAGTG TGTAGCGCCA ATGTTATGTA
 301 CACAGCACTA TCAGGCACTA GATGGAGGgC TGC

COX10BS 92 BP

1 TGGCCAATTT CTTCGATCGG GGCTGCGGAC ACGATGGTGA CTACCGGGAA TTCCAGACCC
 61 GTGACTTGGC ACGGCTTAAC AAATTCAACT CC

C1X2BS 109 BP

1 AAACACCACC AACACAGCCA AACCCACCAC GCCCAATTAA CACACACCCG CTTGAAAAAG
 61 AAAGTCTGTT AAATGGcCCA AGGTGCGCGA GGTTTACCAA TCATTCACC

C1X3HOMOL 289 BP

1 GGTCAGACTA TTGCCGCCTT TTACCAACAG ACAGTTATGC TCTTTGGCAC AATGGCTCGA
 61 TACATGCGTT GGTTTAGGCA GGCGTTTCAA CCCAAGGAAG TCTTCATCAA TTGTGAGACG
 121 ACACCTGAGG ACATGTCGGC ATGGGCTTTG AGCAACTGGA ACTTCACGAG GCCCAGTCTT
 181 GCAAATGACT ACACGGCCTT TGATCAGTCA CAGGACGGAG CCATGTTGCA GTTTAGGgta
 241 CTAAAGCCA AGCATCACTG CATCCAGAAG AGATCATCCA GGCGGGCTG

C1X4HOMOL 181 BP

1 CAATGGCACA GTTAGGCAGA GTCCGACTTT GATGAAAACA AAATCATGGT ATTCCTTAAG
 61 TCCCAATGGG TAACTAAAGT CGAAAAGCTG GGATTGCCAA AGATCAAACC GGGTCAGACT
 121 ATTGCCGCCT TTTACCAACA GACAGTTATG CTCTTTGGCA ATCCCCAGCT TTTGACTTT
 181 G

C1X5HOMOL 330 BP

1 GCGGTACTAT ACAaTTCACC CAACTTCGGC TCTAGAACTA GCCTGAGCAA CGGCAAGAAC
 61 GcCAGCCTTC GCTGTTGTGC TTTTGCTGTC GCTACTAATA TATGGAAGCA GGTGCTTATC
 121 TCAACGCAAT CATCTTTGTG CTTGTcGGCA ACAATCATAG CAGTCATTAG CCGTGGGCTT
 181 GACTCGGACA GAGCCATGCA CCATCAGAAT TACCGGTGAG TCGATCACGG TACACGCTTG
 241 CCACATAGAC AGCGAGACAG CATGGCCTTG GCTAATTCCA ACACTCTCAC TGAGCGTAGT
 301 TCAGTGATAT TGAAGATGAC TACACAGCAA

C1X7HOMOL 275 BP

1 AAAGAAGGAT AGTGATCTTC GATGATTACC TAAGCCTACC ACCAGGTTAT ATTGAGGCAC
 61 TCGTCAGCTT CTCCACAAAA ATAAAATTGA TCATTCTTAC TGGAGATAGC AGACAAAGTG
 121 TCTACCATGA GACGTCAGAT GACGCTTCTA TCAGGCACTT AGGCCCGGCT ACTGAAGTGT
 181 TTGCTAAGTA CTGCAGGTAC TACTTGAACG CCACACACCG CAACAAGAAA GACTTGGCAA
 241 ACATGCTAGG TGTGTACGAC GAGAGAACCG GCACC

C1X9HOMOL 310 BP

1 GGGAGGACGA GTGTGGCGTA GAGTGTTTGT AGTTTCGGAC AGTTCTGGAA CGTCTCTACA
 61 ATATTAGCTT GGGTCGAGGA AGTGTAGAGT GTCGCTGATG TATGCCGTGT CCGTCTCTAT
 121 CTCTGCTAGT TTGTGTATGA TGGTTTCCTT TGGGTATCTA GCAACATCTC TCGGTTCAAT
 181 GGCGACATTA TGGAAAaTGT CCTTGATCCG GGGGTTTCTC CTCAGAAATT TAGCTTTCTA
 241 GGTTTGAGAA aCATGAAGTG TACAGGCTCT TGTGGCAGAG GGAGCCTAGC ACCTCCAAAG
 301 TTTATtCTCA

C1X11HOMOL 288 BP

1 GCAGGCACAA GGCTTCAAGC GAGCACAAAT TCGCAGCCTT TGACTTCTTT GATGGAGTCA
 61 CACCAATCCC GCAGCTATCA CCCCAAAAGA AGGGCTCATG AGACCTCCGT CTGAAGCAGA
 121 AATGAATGCC GCCCAAAGTCTG CTGCCTTTGT GAAGATCACC AAGGCGAGGG CGCAATCCAC
 181 GACTTTGCCA GTCTGGATGC CGCGGTCACT AGGGGCCGCA TCACAGGAAC GACTGTTGCA
 241 GAAGCAGTTG TTCACTACCC CCACCATAAT CACGTCcACA TAACCGAC

C1X12HOMOL 191 BP

1 AGACCTCCGT CTGAAGCAGA AATGAATGCC GCCCAAAGTCTG CTGCCTTTGT GAAGATCACC
 61 AAGGCGAGGG CGCAATCCAA CGACTTTGCC AGTCTGGATG CCGCGGTCAC TAGGGGCCG
 121 ATCACAGGAA CGACTGTTGC AGAAGCAGTT GTTTCACTAC CCCCACCATA ACTACGTCCA
 181 CATAACCGAC T

C1X13HOMOL 152 BP

1 ATGGTCTCAC tgAGTCCCAA GCTGCAAACC ACTTGATTG CATCAGAAGA GAAATATGAT
 61 GACACCAGAG GTACGCACGT TTGGGCAACC AGACAGGTAT GTGCTGCCAC CACAAATATT
 121 CCTCCCAAAG GTACACAACCT GCAAGAAGCC CG

C1X14HOMOL 73 BP

1 CAGTTAGGTA CTCACCCCAG CTGAATGCAG TCGGCTTCAA GGCCCTAGAA ATCCAAAGAG
 61 ACAGAAATGG GAC

C1X15BS 53 BP

1 GTCAACGATG AAGAAGACCT GGCCGGGATG AGGGGAAACA ATCAGGAAGA GAC

C1X61BS 233 BP

1 GGTGCCGGTT CTCTCGCTGT ACACACCTAG CATGTTTGCC AAGTCTTTCT TGTTGCGGTG
 61 TGTGGCGTTC AAGTAGTACC TGCAGTACTT AGCAAACACT TCAGTAGCCG GGCCTAAGTG
 121 CCTGATAGAA GCGTCATCTG ACGTCTCATG GTAGACACTT TGTCTGCTAT CTCCAGTAAG
 181 AATGACAATT TtATTTTTTGT GGAGAACGTG ACGAGTGCCT tCAATATAAC CTT

C1X17HOMOL 93 BP

1 GGTAGACACT TGTCTGCTAT CTCCATGAAG AATGATCAAT TTATTTTTGTG GAGAAGCTGA
 61 CGAGTGCCTC AATATAACCT GGTGGTAGCT TAG

C1X19HOMOL 181 BP

1 GGTGCCTATG ATTTTCAGTTT GGGCAGAGGA cCGACGTCGG CACAGTGTCT CACTAAGTCC
 61 CAAGCTGCCT GAGCCATAGT GTCTGAAGGA ATTTTCATGT CCTTCCAGAT CTCCTGTATT
 121 TTGGCGAGTA CCTCGTTGGT GGCCACGGCA TTGCTAGCGA CCACCACCAC TGCAGGCGCA
 181 A

C1X20HOMOL 224 BP

1 CACAGGCTGG AAGATAAGTT GTTACTCAAG TCCAAGCCGG TCATCACCCA GCAAAGAAA
 61 GGAAGTTGGC CCGAATTCTG TGGATGGTTA ATCACACCGA AAGGAGTCAT GAAAGACCCC
 121 ATCAAATTGC ACGTGAGCTT GAAGCTCGCT GAAGCTAAAG GGGAGCTGAG GAAGTGTCAG
 181 GACTCGTATG AGATAGACCT GAGTTACGCC TACGACCACA AGGC

C1X20HOMOL 224 BP

1 CACAGGCTGG AAGATAAGTT GTTACTCAAG TCCAAGCCGG TCATCACCCA GCAAAGAAA
 61 GGAAGTTGGC CCGAATTCTG TGGATGGTTA ATCACACCGA AAGGAGTCAT GAAAGACCCC
 121 ATCAAATTGC ACGTGAGCTT GAAGCTCGCT GAAGCTAAAG GGGAGCTGAG GAAGTGTCAG
 181 GACTCGTATG AGATAGACCT GAGTTACGCC TACGACCACA AGGC

C1X22HOMOL 260 BP

1 GTCCCATTTT TGTCTCTTTG GATTTCTAGG CCTTGAAGCC GACTCGATTC AGCTGGGGTG
 61 AGTACCTAAC TGaAAAATTG AGAGCTTACC AGAGAGGAAA GTGGCTGCTT GTGTCATCCA
 121 TGGGGCTGGG GGATCTGGCA AGAGCCACGC GATCCAAAAA GCGCTGAGAG AGATTGGCAA
 181 GGGGTCAGAC ATTACTGTAG TGCTCCCAAC AAATGAGCTG CGGCTGGACT GGAGCAAGAA
 241 GGTCCCAAAC ACAGAGCCCC

C1X25HOMOL 136 BP

1 CACGCACATG TGAGTCTGGG GTTCGGGCTC CTTAATCGGC TCAGCTTCGG CAGGCTCATA
 61 CTCCTTAAGT GCATGCTCCC TTACGACAGA TAGAAAGGTC TTCAGGTAAG GGGTGCTGTC
 121 AAGACGTTTT TCCAG

C1X26BS 157 BP

1 CTCGGACAGA GCCATGCACC ATCAGAATTA CCGGTGAGTC GATCACGGTA CACGCTTGCC
 61 ACATAGACAG CGAGACGATC AAGGCTCTGG CTAATCTCAA ACCACTCTCA CTTGAGCGGT
 121 TAAGTTTCCA GTGATAATTG AAAGATGACT ACACCAG

C1X27BS 334 BP

1 TGCCTGATAC GGATCTGCAA AGAGAGCTTG GTAAGCCTCC CTTGGTGGTT GCGTCCAGCG
 61 TGTA CTGTC CAGGATGGCA AAATTGCCTT CGGGAATTGG TCCTGGCTTC TGTATGCCCC
 121 TGGTCCTTAT ACTGATCTTA TCTGGGACTC CAAGAGTGTG TACTGTGAAG GTCGAGTGTC
 181 GCGCAACGAG CTTCCGTCGT GCAGTGGACT TTCCGGCACC TGCAACAGCG TGTACTACTA
 241 AGGGACTGGA ATCTAAAGGC CTAGCAGTTC TAGAGTAACC TGGaCTTTCA AaCTAATGAT
 301 CGTCGGGTCA ATTGTTGAGG AGTCAGTAAG TAGT

C1X29HOMOL 190 BP

1 AACACCACCA ACACAGCCAA ACCCACCACG CCCAATTAAC ACACACCCGC TTGAAAAAGA
 61 AAGTCTGTTA AATGGCCAAG GTGCGCGAGG TTTACCAATC ATTCACCGAT TCCACTACAA
 121 AAACACTTAT TCAGGATGAG GCGTACCGTA ACATACGTCC CATCATGGAA AAACACAAGT
 181 TATCCAACCC

C1X30HOMOL 118 BP

1 GATCTTCCCG GACGTCAATG AAGTGGAGGC TGGCAACCAC ATTCCCGACC TTGAAAGCCC
 61 TACCACAAAA ATGGGAAGAT GCATCATCTA CTGACTCCTC AACAATTGAC CACGACGG

C1X31HOMOL 126 BP

1 CCCGGCGACT GAAACCTGTT GGGAGTTTCA CATGGCAAAC GCCTCCAGCA TTCACAGGAA
 61 GGCTCTTGAA GGTCAGCAAG CCGCGAAAAA GGTCTTGATG TCAAGTGGTA TGGCCTtGCG
 121 ACCTGA

C1X46HOMOL 305 BP

1 TATCGCACAC TCGTCCTCCC AGTGAAGCTG CtTTCaAATG aAAGCACCCA CCCAAACATA
 61 TACAGCCTGA AGTACTTTGG TGACGGCTTC CAGTACATAC CAGGCAACCA TGGTGGTGGA
 121 GCTTATCACC ATGAATTAC GACCTGCAGT GGCTAAAAGT TGGTAAGATC AAGTGGCGCG
 181 ACCCAAACCA CGGTCTACTC GGACATCTTA ACTACACACA TGAGCAGGTC GACACACACA
 241 CAGTGACCGT ACAGCTCCAA GAGTCCTTCG CTGCAAACCA CTTGTATTGC ATCAGAAGAG
 301 GAAAA

C1X53HOMOL 158 BP

1 TGGGGTTCGG GCTCCTTAAT CGGCTCAGCT TCGGCAGGCT CATACTCCTT AAGTGCATGC
 61 TCCCGCGGTG TGTGGCGTTC AAGTAGTACC TGCAGTACTT AGCAAACACT TCAGTCGCCG
 121 GGCCTTAAGT GCCTTGATAG AAGCGTCATC TtGACGTC

C1X55BS 245 BP

1 GCCTAGCAGT TCTAGAGTAA CCTAAACTTT TCAAACCTAAT GATGAGAATA TCCATCTTAT
 61 TCAAGTCTAA ATGGTAACTT AACGGTTATA GGAAATTCTT GAGGCGGGGA AGGCTAACAG
 121 TGACCGTACA ACTCCAAGAG TCCTTCGCTG CAAACCACTT GTATTGCATC AGAAGAGGAA
 181 ATATGATGAC ACCAGAGGTA CGCACGTTTG GGCAACCAGA CAGGTATGTG CTGCCAGGAC
 241 AAATA

C2X1HOMOL 152 BP

1 CACCCCAGTT GGCAGCCTGA GTCTTAGTGA TTGCCCAAT CCTCTTATTT TTAACATCGC
 61 TCCCATAGTC CCTGGCCCTG AGTAAGTCCA AGGGAATTGT GGTGGGGCTT CGATTTCATGG
 121 CTTTGAGCAA ATCCcTGAGA GAGctctcac ga

C2X36HOMOL 291 BP

1 TTGAAAAAGA AAGTCTGTTA AATGGCCAAG GTGCGCGAGG TTTACCAATC ATTCACCGAT
 61 TCCACTACAA AAACACTTAT TCAGGATGAG GCATACCGTA ACATACGTCC CATCATGGAA
 121 AAACACAAGT TATCCAACCC ATACGCTCAA ACTATCGAAG CAGCCAACGA TCTTGAAGGA
 181 TTTGGCATAG CACAAACCCT TACAGCATCG AGTTACATAA CACATGCGGC CGCTAAGACA
 241 ATTGAGAATA ACTTTTGGAG TGTGCTAGGC TCCCTCTTGC CACAAAGCCG A

C3X2HOMOL 192 BP

1 AATTCCCGAA GCAATTTTnC ATCCTGGACG AGTACACGCT GGACGCAACC ACAAGGGAGG
 61 CTTACCAAGC TCTCTTTGCA GCTCCGTATC AGGCACCAGA ACTCAGTCTC GAGCCCCACT
 121 TCTACTTGGA AACCTCCTTC AGGACCCCAA GGAAAGCAGC TGCCTTGATA GCTAGCTGCG
 181 CTTTGACTTT GA

C3X9BS 212 BP

1 GGCCTGTTGA TGGGAGAATA GCTGTATTGT TGTGTCTTCA GTCTGCACga cAGTTGGAGT
 61 GTCCGTGTGC ATCTGAGTGG ATCTCCCTGT CAAATTTTTC CAGCAACTCT TCCTTGTACT
 121 CCTCTAGTAC AGTATCACCA TGAATTCAGC CACCTGCAGT GGCTAAAAGT TGGTAAGATC
 181 AGTGCGCGA CCCAAaGGAC cGGTCTACTC GG

C3X11HOMOL 168 BP

1 CGGGCCTTCT CCAGTGAGTC GCATGATTGA CAGAGTGCCT AAGAAAATTT GTGCGTTTGT
 61 CTTGATGTCA ATGTATGCCT GGATGATCTC TTCTGGGATG CAGTGATGCT TGGCTTTAAG
 121 TACCTCAAAC TGCAACATGA TCACAGGAAC GACCTGTTGC AGAAGCAG

C3X13BS 174 BP

1 AATAAGAGGA TTGGGGCAAT CACTAAGACT CAGGCTaGCC AGCTGGGGTG AGTACCTAAC
 61 TGGAAAAATT GaAGAGCTTA CCAGAGAGGA AAGTgGCTGC TTGTGTCATC CATGGGGCTG
 121 GGGGATCTGG CAAGAGCCAC GCGATCCAAA AAAnnnnTGA GAGAGATTGG CAAG

C3X17BS 245 BP

1 AGGACATTTT CCATAATnnG GCGGATTGAA CCGAGAGATG TTGCTAGATA CCCAAAGGAA
 61 ACCATCATAC ACAAAC TAGC AGAGATAGAG ACGGACACGG CATAATCAG CGACTATAGT
 121 GATCTTCGAT GATTACTCTA AGCTACCACC AGGTTATATT GAGGCcACTC GTCTGCTTCT
 181 CCACAAAAAT AAAATTGATC ATTCTTACTG GAGATAGCAG ACAAAGTGTC TACCATGAGA
 241 CCGTC

C3X18HOMOL 165 BP

1 GGTTGGATAA CTTGTGTTTT TCCATGATGG GACGTATGTT ACGGTACTGC CTCATCCTGA
 61 ATAAGTGTTT TTGTAGTGGA ATCGGTGAAT GATTGGTAAA CCnnnnnnAC CTTGGCCATT
 121 TAACAGACTT TCTTTTTCAA TTCCAGTTAG GGTACTCACC CCAGC

C4X17BS 206 BP

1 CACGCTGTTG CCGGTGCCGG AAAGTCCACT GCACTACGGA AGCTGCTTGC GCGACACTCG
 61 ACCTTCACAG TCACACATCT TGGAGTCCCA GATAAGATCA GTATAAGGAC CAGGGGCATA
 121 CAGAAGCCAG GACCAATTCC CGAAGGCAAT TTTGCCAATC CTGGAACCGA AGTAACACGC
 181 TGGAACGCAA ACCACAAGGG AGGCTT

C4X52HOMOL 212 BP

1 TATTTATATT ATTCATACAA TCAAACCAGA AAATACTATG AAAGTGGGAT ACGCGTCGGT
 61 TATGTGGACG TAGTTATGGT GGGGGTAGTG AAACAAGTGC TTCTGCAACA GTCGTTCTTG
 121 TGATGCGGCC CCTAGTGACC GCGGCATCCA GACTGGCAAa GTCGTTGGAT TGCGCCcTCG
 181 CCTTGGTGAT CTTCACAAaG GCAGCAGTTG GG

C4X60BS 121 BP

1 ACCAACACAG CCAAACGCAC CACGCCCAAT TAACACACAC CCGCTTGAAA AAGAAAGTCT
 61 GTTAAATGGC CAAGGTGCGC GAGGTTTACC AATCAGTTCA CCGATTCCAC TAGAAAAACA
 121 C

C4X70HOMOL 202 BP

1 ATCACGGTAC ACGCTTGCCA CATAGACAGC GAGACGATCA AGGCTCTGGC TAATCTCAAA
 61 CCACTCTCAC TTGAGCGGTT AAGTTTCCAG TGATAATTGA AAGATGACTA CACCAGCCAA
 121 CACCACTCAA GCTGTAGGAT CCACCAAATC AACTACCACC ACCACTGCAG GCGCAACTCC
 181 TGCCAATTCA GGGCTATTCA CC

C4X91HOMOL 203 BP

1 GACCTCCGTC TGAAGCAGAA ATGAATGCCG CCCAAACTGC TGCCTTTGTG AAGATCACCA
 61 AGGCGAGGGC GCAATCCAAC GACTTTGCCA GTCTGGATGC CGCGGTCACT AGGGGCCGCA
 121 TCACAGGAAC GACTGTTGCA GAAGCAGTTG GGGCACTACC CCCACCATAA CTACGTCCAC
 181 ATAACCGACG CGTATCCCAG TTT

C5X29BS 248 BP

1 CAACCACAAG GGAGGCTTAC CAAGCTCTCT TTGCAGATCC GTATCAGGCA CCAGAACTCA
 61 GTCTCGAGCC CCACTTCTAC TTGGAACCT CCTTCAGGAC CCCAACCAAA GCAGCTGCCT
 121 TGATAGCTAG CTGCGGCTTT GACTTTGAGA CCAATTCGCA AGAAGAGGGA CACCTCGAGA
 181 TCACAGGGTA TACAAGGGAC CCTTGCTAGG AAAGGTGATT GCCATAGACT CAGAGGTCGA
 241 ACGACTTT

C5X41BS 256 BP

1 AAAAGTCCAT GATCGnGCTA GACCACAACA CTC AAGTGTG TAGCGCCAAT TGTTATGTAC
 61 TCAGCACTAT CCAGGGCCAC TGATAGGATT CACTTCATCA AACTAGTGC CAACTCATCC
 121 GCTTTCTGGG AAAAGCTTGA CAGCACCCCT TACCTGAAGA CCTTCTATCT GTCGTAAGGG
 181 AGCATGCACT TAAGGAGTAT GAGCCTGCCG AAGCTGAGCC GATTAAGGAG CCGAACCCAG
 241 ACTCACATGT GCGTGG

C5X42HOMOL 265 BP

1 GGGTCCTCTG CCCAAACTGA AATGATAGGC ACCGGTCCAT ACTCCAATGG GGTCAGCCGG
 61 GCTAGACTGG CAGCTGCAAT TAAAGAGGTG TGCACACTGA GGCAGTTCTG CAAAAAGTAT
 121 GCCCCCGTGG TCTGGAAGTGA GATGCTCACA AACACAGCC CACCGGCCAA CTGGCAGGCA
 181 CAAGGCTTCA AGCCGGAGCA CAAATTCGCA GCCTTtGACT TCTTTGATGG AGTCACTAAT
 241 CCGCAGCTAT CACTCAAAGA GGCAC

C5X43HOMOL 167 BP

1 CATCTTTGTG CTTGTGGCAA CAATCATAGC AGTCATTAGC GTGGGCTTGA CTCGGACAGA
 61 GCCATGCACC ATCAGAATTG CCGGTGAGTC GATCACGGTA CACGCTTGCC ACATAGACAG
 121 CGAGACGATT GCGTTGAGAT AAGCACCTGC TTCCATATAT TAGTAGC

C5X51BS 160 BP

1 GGGGGCCCGG TACCAGCTTT TGTTCCCTTT AGTGAGGGTT AATTTGAGC TTGGCGTAAT
 61 CATGGTCATA GCTGTTTCCT GTGTGAAATT GTTATCCGCT CACAATTCCA CACAACATAC
 121 GAGCCGGAAG CATAAAGTGT AAGCCTtGGG TGCCTtAATA

C5X74HOMOL 131 BP

1 GCAATCACAA GGTCGAAGGG ACTGACTTAT GTCCGCGCAG GGGCATAGAC TGACCGCACC
 61 GGTCAACTCT GAAAAAGTGT ACATAGTATT AGGTTTATCA TTTGATTTGG TGGATCCTAC
 121 AGCTTGAGTG G

C5X82HOMOL 134 BP

1 CAATnCAGGG CTATCACTAT ACCAGAATTG GCAGGCGTTG CGCCTGCAGT GGTGGTGGTA
 61 GTTGATTGG TGGATCCTAC AGCTTGAGTG GTGTTGGCTG GTGTAGTCAT CTTTCAATTA
 121 TACTGGAAAC TTAA

C5X84BS 193 BP

1 CACCAACACA GCCAAA_gCCC ACCACGCCCA ATTAACACAC ACCCGCTTGA AAAAGAAAGT
 61 CTGTTAAATG GCCAAGGTGC GCGAGGTTTA CCAATCATTC ACCGATTCCA CTACAAAAAC
 121 ACTTATTCAG GATGAGGCGT ACGTAACATA CGTCCATCAT GGAAAAACAC AAGTTATCCA
 181 ACCCATACTC AAA

C5X86BS 201 BP

1 CTGACTTTGA TGAAAACAAA ATCATGGTAT TCCTTAAGTC CCAATGGGTA ACTAAAGTCG
 61 AAAAGCTGGG ATTGCCAAAG ATCAAACCGG GTCAGACTAT TGCCGCCTTT TACCAACAGA
 121 CAGTTATGCT CTTTGGCACA ATGGCTCGAT ACATGCGTTG GTTTAGGCAG GCGTTTCAAC
 181 CCAAGGAAGT CTTTCATCAAT T

C5X91BS 156 BP

1 CTCAGGGCCA GGGACTATGG GAGCGATGTT AAAAAATAAGA GGATTGGGGC AATCACTAAG
 61 ACTCAGGCTG CCAGCTGGGG TGAGTACCTA ACTGGAAAAA TTGAGAGCTT ACCAGAGAGG
 121 AAAGTGGCTG CTTGTGTCAT GGATGGGGCT TGGGGG

C5X96BS 275 BP

1 CAAAGAGACA GAAATGGGAC CATGATCATG CCCATCACCG AAATGGTTTT TGGACTTGAC
 61 AAAGAAGAGT TCCCTGAAGG AACCCCTGAA GCACTAGCTC GTGAGCTCAA AGCCATGAAT
 121 CGAAGCCCAA CCACAATTCC CTTGGACTTA CTTACTCAGG GCCAGGGACT ATGGGAGCGA
 181 CGTTAAAAAT AAGAGGATTG GGGCAATCAC TAAGACTCAG GCTGCCAGCT GGGGTGAGTA
 241 CCTAACTGGA AAATTGAGAG CTTACCAGAG AGGAA

C5X106BS 258 BP

1 CCCAGAAAAG AAAGGAAGTT GGCCCGAATT ATGTGGATGG TTGATCACAC CAAAAGGAGT
 61 CATGAAAGAC CCCATCAAAT TGCACGTGAG CTTGAAGCTC GCTGAAGCTA AAGGGGAGCT
 121 GAGGAAGTGT CAGGACTCGT ATGAGATAGA CCTGAGTTAC GCCTACGACC ACAAGGACTC
 181 ACTGCATGAT TTGTTTGATG AGAAGCAGTG CCAAGCACAT ACGCTGACAT GCAGGACCTT
 241 AATAAAGTCC GGACGGGG

C5X120HOMOL 121 BP

1 GACAGCGAGA CGATCAAGGC TCTGGCTAAT CTCAAACCAC TCTCACTTGA GCGGTAAAGT
 61 TTCCAGTGAT AATTGAAAGA TGACTACACC AGCCAACACC ACTCAAGCTG TAGGATCCAC
 121 C

C6X15BS 218 BP

1 CGTCCTCCCA GTGGAAGCTG CTTCAAAATG GAAAGCACCC ACCCAAACAT ATACAGCCTG
 61 AAGTACTTTG GTGACGGCTT CCAGTACATA CCAGGCAACC ATGGTGGTGG AGCTTATCAC
 121 CATGAATTCA GCCACCTGCA GTGGCTAAAA GTTGGTAAGA TCAnGTGGCG CGACCCAAAG
 181 GACGGCACTC GGACACTAAT tCACTCACGC ACAGAGCC

C6X100HOMOL 212 BP

1 TGATGCGCCA ATCGTCGCct TTGTGAAGTC GCAAGGCGAG GCGCAATCCA ACGACTTGCC
 61 AGTCTGGATG CcGGCGGTCAC TAGGGCCGCA TCACAGGAAC GACTGTTGCA GAAGCAGTTG
 121 TTTCCTACTACC CCCACCATAA CTACGTCCAC ATAACCGACG CGTATCCCAG TTTCATAGTA
 181 TTTTCTGGTT TGATTGTATG AATAATATAA AT

C6X108BS 260 BP

1 ACATTCCTTC CTCAGTCCTG TCCCTGTTCC TCAGTCCTGT CCCTGTTTCAAT GGAGTCTTGG
 61 ATTTCCGGCCA GGCCTTTGGC TTTCTTTGCA GCGCGACTCC GGTTTCCCGA TTGTGTTTCC
 121 TAGTCAGTTT TTCTAGGAAG GTTTCTGCCG GGTGATGTA TTCCTTTTTT CTCTCCCTCG
 181 GGTTCTCTAG GGGCTGTTGA CGTCTCTTCC TGATTGTTTC TCCTCACCCG GCCAGGTCTT
 241 CTTCAGCGTT GACTGCATAA

C6X119HOMOL 227 BP

1 GGCACAATCA TAGCAGTCAT TAGCGTGGGC TTGACTCGGA CAGAGCCATG CACCATCAGA
61 ATTACCGGTG AGTCGATCAC GGTACACGCT TGCCACATAG ACAGCGAGAC GATCAAGGCT
121 CTGGCGAATC TCAAACCACT CTCACTTGAG CGGTAAAGTT tCCAGTGATA ATTGAAAGAT
181 GACTACACCA GCCAACACCA CTCAAGCTGT AGGATCCACC AAATCAA

C6X124BS 191 BP

1 TAACGCAGGA AACGAACATG TGAGCAAAAA CCGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
61 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCT GACGAGCATC AAAAAATCG
121 ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGACTATAAA GATACCAGGC GTTCCCCTT
181 GGAAGCTCCT C

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

- AbouHaidar, M., Bancroft, J.B. (1978) *Virology* **90**, 54-59.
- AbouHaidar, M.G., Erickson, J.W. (1984) *Plant Molecular Biology*. Capítulo 3. Davies, J.W. (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Allison, R., Johnston, R.E., Dougherty, W.G. (1986) *Virology* **154**, 9-20.
- Astier, S., Cornuet, P. (1971) *Biochem. Biophys. Acta* **232**, 484-493.
- Atabekov, J.G. (1975) *Annu. Rev. Phytopathol.* **13**, 127-145.
- Attathom, S., Weathers, L.G., Gumpf, D.J. (1978) *Phytopathology* **68**, 1401-1406.
- Bancroft, J.B., AbouHaidar, M., Erickson, J.W. (1979) *Virology* **98**, 121-130.
- Bancroft, J.B., Hills, G.J., Richardson, J.F. (1980) *J. Gen. Virol.* **50**, 451-454.
- Beachy, R.N., Zaitlin, M. (1977) *Virology* **81**, 160-169.
- Beier, H., Mundry, K.W., Issinger, O.-G. (1980) *Intervirology* **14**, 292-299.
- Bendena, W.G., AbouHaidar, M., Mackie, G.A. (1985) *Virology* **140**, 257-268.

- Bendena, W.G., Bancroft, J.B., Mackie, G.A. (1987) *Virology* **157**(2), 276-284.
- Bendena, W.G., Mackie, G.A. (1986) *Virology* **153**(2), 220-229.
- Benicourt, C., Haenni, A.-L. (1976) *J. Virology* **20**, 196-202.
- Benicourt, C., Morch, M.D. (1979) *Biochem. Trans.* **7**, 1095-1097.
- Benicourt, C., Péré, J.-P., Haenni, A.L. (1978) *FEBS Lett.* **86**, 268-272.
- Bercks, R. (1970) *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses No.* 4.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) *Nucl. Acids. Res.* **7**, 1513-1523.
- Bols, L. (1982) *Crop protection*, **1**, 263-282.
- Brandes, J., Bercks, R. (1965) *Adv. Virus Res.* **11**, 1-24.
- Bruening, G., Beachy, R.N., Scalla, R., Zaitlin, M. (1976) *Virology* **71**, 498-517.
- Bundin, V.S., Vishnyakova, O.A., Zakharyev, V.M., Morozov, S.Yu., Atabekov, J.G., Skryabin, K.G. (1986) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **290**, 249-259.
- Chan, V.T.-W., Fleming, K.A., McGee, J.O.D. (1985) *Nucl. Acids Res.* **13**, 8083-8091.

- Christie, R.G., Edwardson, J.R. (1977) "Light and electron microscopy of plant virus inclusions". Monograph Series, Flo. Agric. Exp. St., Florida.
- Cockerham, G. (1955) Proc. 2nd. Conf. Potato Virus Dis. (Lisse-Wageningen, 1954), 89-92.
- Cornelissen, B.J.C., Brederode, F.Th., Moorman, R.J.M., Bol, J.F. (1983) Nucl. Acids Res. **11**, 1253-1265.
- Cornuet, P. (1987) "Eléments de virologie végétale", I.N.R.A., Paris.
- Coyier, D.L., Stace-Smith, R., Allen, T.C., Leung, E. (1977) Phytopathology **67**, 1090-1095.
- Daubert, S.D., Bruening, G., Najarian, R.C. (1978) Eur. J. Biochem. **92**, 45-51.
- Davies, J.W., Hull, R. (1982) J. Gen. Virol. **61**, 1-14.
- de Bokx, J.A. (1972) Viruses of Potatoes and Seed-potato Production. Centre for Agric. Publ. and Documentation, Wageningen, The Netherlands.
- de Mejía, M.V.G., Hiebert, E., Purcifull, D.E., Thornbury, D.W., Pirone, T.P. (1985). Virology, **142** 34-43.
- de Zoeten, G.A., Schlegel, D.E. (1967) Virology **32**, 416-427.
- Dolja, V.V., Grama, D.P., Morozov, S.Yu., Atabekov, J.G. (1987) FEBS Lett. **214**(2), 308-312.

- Dorssers, L., Van der Krol, S., Van der Meer, J., Van Kammen, A., Zabel, P. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81**, 1951-1955.
- Dougherty, W.G. (1983) Virology **131**, 473-481.
- Dougherty, W.G., Hiebert, E. (1980) Virology **104**, 183-194.
- Dougherty, W.G., Hiebert, E. (1980) Virology **104**, 174-182.
- Ecker, J.R., Davis, R.W. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 5372-5376.
- El Mann, M.M., Bruening, G. (1973) Virology **53**, 198-206.
- Erickson, J.W., AbouHaidar, M., Bancroft, J.B. (1978c) Virology **90**, 60-66.
- Erickson, J.W., Bancroft, J.B. (1978a) Virology **90**, 36-46.
- Erickson, J.W., Bancroft, J.B. (1978b) Virology **90**, 47-53.
- Fenner, F. (1976) Intervirology **7**, 4-115.
- Finch, J.T., Klug, A. (1966). J. Mol. Biol. **15**, 344-364.
- Francki, R.I.B., Kitajima, E.W., Peters, D. (1981) "Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis". E. Kurstak (ed.), Elsevier, Holland.
- Francki, R.I.B., Mossop, P.W., Hatta, T. (1979) CMI/AAB descriptions of plant viruses, n° 213.

Franssen, H., Goldbach, R., Broekhuijsen, H., Moerman, M., Van Kammen, A. (1982) *J. Virol.* **41**, 8-17.

Franssen, H., Goldbach, R., Van Kammen, A. (1984a) *Virus Research* Vol. 1, 280-286.

Franssen, H., Leunissen, J., Goldbach, R., Lomonossoff, G., Zimmermann, D. (1984b) *EMBO Journal* **3**, n° 4, 855-861.

Fribourg, C.E. (1975) *Potato Res.* **18**, 216-226.

Fritsch, C., Mayo, M.A., Hirth, L. (1977) *Virology* **77**, 722-732.

Fukuda, M., Okada, Y., Otsuki, Y., Takebe, I. (1980) *Virology* **101**, 493-502.

Ghosh, A., Dasgupta, R., Salerno-Riffe, T., Rutgers, T., Kaesberg, P. (1979) *Nucl. Acids. Res.* **7**, 2137-2146.

Goelet, P., Lomonossoff, G.P., Butler, P.J.G., Akam, M.E., Gait, M.J., Karn, J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5818-5822.

Goldbach, R., Rezelman, G., Van Kammen, A. (1980) *Nature* **286**, 297-300.

Goldbach, R.W., Schilthuis, J.G., Rezelman, G. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **99**, 89-94.

Goodman, R.M. (1975) *Virology* **68**, 287-298.

- Goodman, R.M., Horne, R.W., Hobart, J.M. (1975) *Virology* **68**, 299-308.
- Grunstein, M., Hogness, D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3961-3971.
- Gubler, U., Hoffman, B.J. (1983) *Gene* **25**, 263-269.
- Guilford, P.J., Forster, L.S. (1986) *J. Gen. Virol.* **67(1)**, 83-90.
- Guilford, P.J., Forster, R.L.S. (1986) *J. Gen. Virol.* **67**, 83-90.
- Guilley, H., Jonard, G., Kukla, B., Richards, K.E. (1979) *Nucl. Acids Res.* **6**, 1287-1308.
- Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. (1983) "Plant infectious agents". Cold Spring Harbor Lab. (eds.), New York.
- Hamilton, R.I., Edwardson, J.R., Francki, R.I.B., Hsu, H.T., Hull, R., Koenig, R., Milne, R.G. (1981) *J. Gen. Virol.* **54**, 223-241.
- Hammond, J., Hull, R. (1981) *J. Gen. Virol.* **54**, 75-90.
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 551-580.
- Hari, V. (1981) *Virology* **112**, 391-399.
- Harrison, B.D., Robinson, D.J. (1978) *Adv. Virus Res.* **23**, 25-77.

Harrison, B.D. (1971) "Disease of Crop Plants". Western, J.H. (ed.) Willey, New York.

Harrison, B.D., Finch, J.T., Gibbs, A.J., Hollings, M., Shepherd, R.J., Valenta, V., Wetter, C. (1971) *Virology* 45, 356-363.

Hiebert, E. (1970) *Phytopathology* 60, 1295.

Higgins, T.J.V., Goodwin, P.B., Whitfeld, P.R. (1976) *Virology* 71, 486-497.

Hill, J.H., Benner, H.T., Zeyen, R.J. (1977) *J. Gen. Virol.* 34, 115-125.

Hirth, L., Richards, K.E. (1981) "Advances in virus research". Vol. 26. Acad. Press, New York.

Hohn, T., Pietrzak, M., Dixon, L., Koenig, I., Penswick, J., Hohn, B., Pfeiffer, P. (1983) *Plant Infectious Agents* Cold Spring Harbor Lab. (eds.), New York.

Hohn, T., Hohn, B., Pfeiffer, P. (1985) *Trends Biochem. Sci.* 5, 205-209.

Horst, J., Fraenkel-Conrat, M., Mandeles, S. (1971) *Biochemistry* 10 (25), 4748-4752.

Houwing, C.J., Jaspars, E.M.J. (1982) *Biochemistry* 21, 3408-3414.

Hoyman, W.G. (1964) *Am. Potato J.* 41, 208-211.

Hull, R. (1976) *Adv. Virus Res.* 20, 1-32.

Hull, R., Howell, S.H. (1978) *Virology* 86, 482-493.

Hunter, T.R., Hunt, T., Knowland, J., Zimmern, D. (1976) *Nature* 260, 759-764.

Huttinga, H., Wichers, H.J., Dieleman-Van Zaayen, A. (1975) *Neth. J. Plant Pathol.* 81, 102-106.

Joshi, S., Haenni, A.L., Hubert, E., Huez, G., Marhaix, G. (1978) *Nature* 275, 339-341.

Kaftanova, A.S., Kiselev, N.A., Novikov, V.K., Atabekov, J.G. (1975) *Virology* 65, 283-287.

Kamer, G., Argos, P. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 7269-7282.

Klein, C., Fritsch, C. Briand, J.P., Richards, K.E., Jonard, G., Hirth, L. (1976) *Nucl. Acids. Res.* 3, 3043-3061.

Klug, A., Longley, W., Leberman, R. (1966) *J. Mol. Biol.* 15, 315-343.

Koenig, R. (1971) *J. Gen. Virol.* 10, 111-114.

Koenig, R., Lesemann, D.E. (1978) "Potexvirus group". C.M.I./A.-A.B. *Descriptions of Plant Viruses*, No. 200.

Kohl, R.J., Hall, T.C. (1974) *J. Gen. Virol.* 25, 257-261.

Köhler, E. (1962) *Phytopath. Z.* **44**, 189-199.

Kozar, F.E., Sheludko, Y.M. (1969) *Virology* **38**, 220-229.

Leary, J.J., Brigatti, D.J., Ward, D.C. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4045-4049.

Lebeurier, G., Nicolaieff, A., Richards, K.E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 149-153.

Lerner, R.A., Green, N., Alexander, H., Lin, F., Sutcliffe, J.G., Shinnick, T. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3403-3407.

Leung, D.W., Gilbert, C.W., Smith, R.E., Sasavage, N.L., Clark, J.M. (1976). *Biochemistry* **15** (22), 4943-4950.

Litvak, S., Tarrago, A., Tarrago-Litvak, L., Allende, J.E. (1973) *Nature New Biol.* **241**, 88-90.

Loesch-Fries, L.S., Halk, E., Merlo, D., Jarvis, N., Nelson, S., Krahn, K., Burhop, L. (1987) *Molecular Strategies for Crop Protection*, 221-234.

Lok, S., AbouHaidar, M.G. (1986) *Virology* **153**(2), 289-296.

MacDonald, D.M. (1973) *Potato Res.* **16**, 263-269.

Mackie, G.A., Bancroft, J.B. (1986) *Virology* **153**(2), 215-219.

Mandel, M., Higa, A. (1970) *J. Mol. Biol.* **53**, 154-160.

Mandel, M.A., Giavedoni, L., Hop, H., Torres, H.N., Mentaberry, A.N. (1988) *Plant Disease* (en prensa).

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.

Manzer, F.E., Merriam, D. (1961) *Am. Potato J.* **38**, 346-352.

Matthews, R.E.F. (1949) *Ann. Appl. Biol.* **36**, 460-474.

Matthews, R.E.F. (1981) "Plant Virology", 2nd Edition, Acad. Press, New York.

Maxam, A.M., Gilbert, W. (1980) *Methods Enzymol.* **65**, 499-560.

Mayo, M.A., Barker, H., Robinson, D.J., Tamada, T., Harrison, B.D. (1982) *J. Gen. Virol.* **59**, 163-167.

Mayo, M.A., Fritsch, C., Hirth, L. (1976) *Virology* **69**, 408-415.

Mellena, J.R., Benicourt, C., Haenni, A.-L., Noort, A., Pley, C.W.A., Bosch, L. (1979) *Virology* **96**, 38-46.

Morch, M.-D., Drugeon, G., Benicourt, C. (1982) *Virology* **119**, 193-198.

Morozov, S.Yu, Gorbulev, V.G., Novikov, V.K., Agranovski, A.A., Kozlov, Yu.V., Atabekov, J.G., Baev, A.A. (1981) *Dokl. Acad. Nauk. SSSR*, **259(3)**, 723-725.

Mouchés, C., Bove, C., Bove, J.M. (1974) *Virology* **58**, 409-423.

- Mouchès, C., Candress, T., Bové, J.M. (1984) *Virology* **134**, 78-90.
- Munro, J. (1961) *Am. Potato J.* **38**, 440-447.
- Murphy, H.J., Goven, M.J., Merriam, D.C. (1966) *Am. Potato J.* **43**, 393-396.
- Nienhaus, F., Stille, B. (1965) *Phytopathol. Z.* **54**, 335-337.
- Otsuki, Y, Takebe, I., Ohno, T., Fukuda, M., Okada, Y. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1913-1917.
- Otsuki, Y., Takebe, I., Honda, Y., Kajita, S., Matsui, C. (1974) *J. Gen. Virol.* **22**, 375-385.
- Palukaitis, P. (1984) *Methods in Virology*, Vol. III, 259-317.
- Paterson, R., Knight, C.A. (1975) *Virology* **64**, 10-22.
- Paulsen, A.Q., Niblett, C.L. (1977) *Phytopathology* **67**, 1346-1351.
- Pelham, H.R.B. (1978) *Nature* **272**, 469-471.
- Pelham, H.R.B. (1979) *Virology* **97**, 256-265.
- Pelham, H.R.B. (1979) *Virology* **96**, 463-477.
- Peterson, C.E., Hooker, W.J. (1958) *Am. Potato J.* **36**, 267-274.
- Pinck, M., Yot, P. Chapeville, F., Durantón, H. (1970) *Nature* **226**, 954-956.

Pleij, C.W.A., Neeleman, A., Van Vloten-Doting, L., Bosch, L. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **73**, 4437-4441.

Puncifull, D.E., Edwardson, J.R. (1981) Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. E. Kurstak (ed.), Elsevier, Holland.

Ricciardi, R.P., Goodman, R.M., Gottlieb, D. (1978) Virology **85**, 310-314.

Rich, A.E. (1969) Phytopathology **59**, 710-711.

Rich, A.E. (1977) "Potatoes: Production, Storing, Processing". Smith, O. (ed.) Westport, Connecticut, EE.UU.

Rich, A.E. (1983) "Potato Diseases". Academic Press, New York.

Richardson, J.F., Tollin, P., Bancroft, J.B. (1981) Virology **112**, 34-39.

Roberts, F.M. (1946) Nature **48**, 663.

Robinson, D.J., Hutcheson, A., Tollin, P., Wilson, H.R. (1975) J. Gen. Virol. **29**, 325-330.

Roman, R., Brooker, J.D., Seal, S.N., Marcus, A. (1976) Nature **260**, 359-360.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467.

Short, M.N., Davies, J.B. (1983) *Bioscis. Reports* 3, 837-846.

Smith, K.M. (1931) *Proc. R. Soc. B.* 109, 251-255.

Smith, K.M. (1972) "A Textbook of Plant Virus Diseases", 3rd Ed. Academic Press, New York.

Smith, S.H., Schlegel, D.E. (1965) *Virology* 26, 180-189.

Sonenberg, N., Shatkin, A.J., Ricciardi, R.P., Rubin, M., Goodman, R.M. (1978) *Nucl. Acids Res.* 5, 2501-2512.

Stace-Smith, R., Mellor, F. (1968) *Phytopathology* 58, 199-203.

Stanley, J., Rottier, P., Davies, J.W., Zabel, P., Van Kammen, A. (1978) *Nucl. Acids Res.* 5, 4505-4522.

Symons, R.H. (1975) *Mol. Biol. Rep.* 2, 277-285.

Takegami, T. *et al* (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 7447-7451.

Tchen, P., Fuchs, R.P., Sge, E., Leng, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3466-3470.

Teri, J.M., Thruston, H.D., Plaisted, R.L. (1977) *Am. Potato J.* 54, 271.

Toh, H., Hayashida, H., Miyata, T. (1983) *Nature* 305, 827-829.

Tollin, P., Wilson, H.R., Bancroft, J.B. (1980) *J. Gen. Virol.* **49**, 407-410.

Tollin, P., Wilson, H.R., Mowat, W.P. (1975) *J. Gen. Virol.* **29**, 331-333.

Tollin, P., Wilson, H.R., Young, D.W. (1968) *J. Mol. Biol.* **34**, 189-192.

Van Dun, C.M.P., Bol, J.F., Van Vloten-Doting, L. (1987) *Virology* **159**, 299-305.

Van Kammen, A. (1967) *Virology* **31**, 633-642.

Van Regenmortel, M.H.V. (1982) "Serology and Immunochemistry of Plant Viruses", Acad. Press, New York.

Van Tol, R.G.L., Van Gemeren, R., Van Vloten-Doting, L. (1980) *FEBS Lett.* **118**, 67-71.

Varma, A., Gibbs, A.J., Woods, R.D. (1968) *J. Gen. Virol.* **2**, 107-114.

Volovitch, M.G., Drugeon, G., Yot, P. (1978) *Nucl. Acids. Res.* **5**, 2913-2925.

Wagner, R.R. (1975) "Comprehensive Virology". Fraenkel-Conrat, M. and Wagner, R.R. (eds.) Vol. 4, Plenum Press, New York.

Walters, H.J. (1952) *Phytopathology* **42**, 355-362.

Wetter, C. (1961) *Phytopathol. Z.* **41**, 265-270.

Wilson, H.R., Al-Mukhtar, J., Tollin, P., Hutcheson, A.M. (1978) *J. Gen. Virol.* **39**, 361-364.

Wilson, T.M.A., Watkins, P.A.C. (1986) *Virology* **149**, 132-135.

Wodnar-Filipowicz, A., Skrzeczkowski, L.J., Filipowicz, W. (1980) *FEBS Lett.* **109(1)**, 151-155.

Wright, N.S. (1970) *Am. Potato J.* **47**, 475-478.

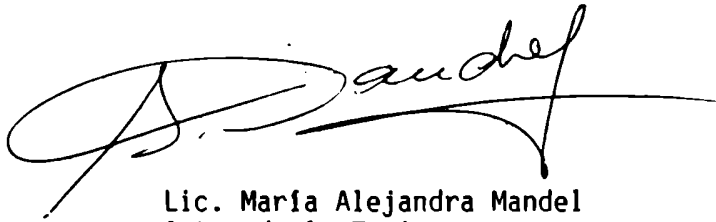
Wright, N.S., Coles, E.F. (1976) *Am. Potato J.* **53**, 365.

Wright, N.S., Mellor, F.C., Cole, E.F., Hyams, C.M. (1977) *Can. Agric.* **22**, 14-16.

Yot, P., Pinck, M., Haenni, A.L., Durantou, M., Chapeville, F. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **67**, 1345-1349.

Zimmern, D. (1975) *Nucl. Acids. Res.* **2**, 1189-1201.

Zimmern, D., Wilson, T.M.A. (1976) *FEBS Lett.* **71**, 294-298.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mandel', with a large, sweeping flourish extending to the left and a long horizontal line extending to the right.

Lic. María Alejandra Mandel
Autor de la Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Torres', with a large, sweeping flourish extending to the left and a long horizontal line extending to the right.

Dr. Héctor N. Torres
Director de Tesis