

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Caracterización parcial de un aislamiento del *maize rayado
fino virus* (MRFV) de Ecuador, comparación con otros
aislamientos y análisis filogenético**

Tesis sometida a la consideración del
Programa de Estudios de Posgrado en
Biología con énfasis en genética y biología molecular
Para optar por el grado de Magister Scientiae

MAURICIO CHICAS ROMERO

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio" Costa Rica

2004

DEDICATORIA

A mi hijo Esteban que me cambia el mundo con una sonrisa.

A mi esposa que es la mujer que amo y ha demostrado ser un gran apoyo en todos mis proyectos.

A mi madre que me dio vida, el amor al estudio y el deseo de un futuro mejor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora Pilar Ramírez por darme todo su apoyo y confianza en cada momento.

Agradezco al Dr. Kenneth Madriz por su instrucción en mis primeros pasos hacia la biología molecular

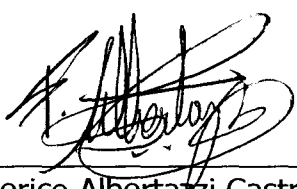
Agradezco a la MSc. Heidy Villalobos por sus acertadas opiniones acerca de la elaboración de este documento y por las veces que me prestó un paraguas salvándome de un torrencial aguacero.

Agradezco al Dr. Federico Albertazzi por las incontables veces que aclaró mis dudas.

Agradezco al Sistema de Estudios de Posgrado por haberme abierto sus puertas (especialmente la de salida).

Agradezco a todas las personas que laboran en el CIBCM que de una u otra forma han colaborado con mi formación.

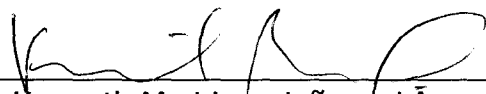
Esta tesis fue aceptada por lo Comisión del programa de Estudios de Posgrado en Biología (con énfasis en genética y biología molecular) de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de *magíster Scientiae*.



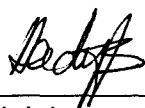
Federico Albertazzi Castro / Representante de la Decana del SEP



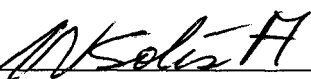
PhD. Pilar Ramírez Fonseca / Director de Tesis



PhD. Kenneth Madriz ordeñana / Asesor



MSc. Heidi Villalobos Barrantes / Asesor



Virginia Solís Alvarado/ Director del Programa de Estudios de Posgrado en Biología con énfasis en genética y biología molecular.



Mauricio Chicas Romero / Candidato

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
PÁGINA DE ACEPTACIÓN DEL SEP.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
RESUMEN.....	VII
LISTA DE CUADROS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. EL MAÍZ.....	1
1.1.1. Origen del Maíz.....	1
1.1.2. El cultivo del maíz.....	2
1.1.3. Usos del maíz.....	2
1.1.4. Producción mundial de maíz.....	3
1.2. VIRUS DE ARN DE PLANTAS.....	4
1.2.1 Tipos de Virus ARN en plantas.....	6
1.2.2 Virus ARN doble banda.....	7
1.2.3 Virus ARN negativo simple banda.....	7
1.2.4 Virus ARN positivo simple banda.....	8
1.2.4.1 Marafivirus.....	8
1.2.3.1.1 El Virus del Rayado Fino del Maíz.....	8
1.3 LA TEORÍA NEUTRAL DE LA EVOLUCIÓN.....	14
1.4 EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	14
1.5 ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO DE VIRUS.....	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	21
3. OBJETIVOS GENERALES.....	22
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1. COLECTA DEL MATERIAL.....	23
5.2. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	23
5.3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE LOS ARN EXTRAÍDOS.....	24
5.4. AMPLIFICACIÓN DE UN SEGMENTO DEL GEN DE LA CÁPSIDE DEL MRFV.....	25
5.5. ELABORACIÓN DE UN VECTOR DE CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.....	26
5.6. LIGACIÓN.....	26
5.7. ELABORACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....	26
5.8. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....	27
5.9. SELECCIÓN DE COLONIAS.....	27
5.10. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO.....	28
5.11. SECUENCIACIÓN.....	28
5.12. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL MRFV.....	29
5.12.1 Alineamientos.....	30
5.12.2 Análisis filogenéticos.....	31
5.12.3 Estimación de distancias.....	32
5.12.4 Estimación de estructuras secundarias de ARN.....	32
5.12.5 Pruebas de neutralidad y selección.....	32
6 RESULTADOS.....	33
6.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE UN FRAGMENTO DEL GEN CP.....	33

6.2	CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR	34
6.3	SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS	34
6.4	ALINEAMIENTOS	36
6.5	ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	41
6.6	ANÁLISIS DE DISTANCIAS GENÉTICAS	51
6.7	ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DEL ARN DE LA REGIÓN NO CODIFICANTE	52
6.8	PRUEBAS DE NEUTRALIDAD Y SELECCIÓN	54
7.	DISCUSIÓN	55
9.	BIBLIOGRAFÍA	66

RESUMEN

Chicas Romero, Mauricio

Caracterización parcial de un aislamiento del *maize rayado fino virus* (MRFV) de Ecuador, comparación con otros aislamientos y análisis filogenético.

Tesis de Maestría en Biología con énfasis en genética y biología Molecular. –San José, C.R.: M. Chicas R., 2004.

80h.: 29il. - 67 refs.

Se propone clonar y secuenciar parcialmente un aislamiento del MRFV de Ecuador. Además comparar la secuencia con la de otros aislamientos descritos en la literatura.

Se hicieron extracciones de ARN de 16 plantas de maíz provenientes de la Estación Experimental de Santa Catalina en Quito, Ecuador. Se tomó este ARN y se hicieron transcripciones reversas con el fin de obtener ADN copia del virus. Se hicieron reacciones de PCR con los imprimadores MRFV-09 y MRFV-10 a partir del ADNc obtenido. Los fragmentos amplificados por PCR se clonaron y secuenciaron utilizando el vector pBlueScript y los iniciadores M13. A partir de las secuencias se determinó un consenso. Se comparó el consenso y una de las secuencias que poseía una inserción en la parte 3' terminal con las secuencias de aislamientos del MRFV de Estados Unidos, México, Guatemala, Costa Rica, Colombia, Perú, Venezuela, Bolivia y Brasil. Se hicieron árboles filogenéticos con los métodos de Maximum Likelihood, UPGMA, Mínima Evolución, Neighbor-Joining y Máxima. Se hicieron cálculos de la estructura secundaria del ARN de la región no codificante para cada una de las muestras, análisis de distancias entre los diferentes aislamientos del MRFV y análisis de la existencia de selección positiva para el segmento de la secuencia que codifica para la cápside del MRFV.

Se observó que los aislamientos del MRFV se dividen en cuatro subgrupos, posiblemente a causa del aislamiento geográfico generado por las cadenas montañosas del continente americano. Se observó una estructura secundaria del

ARN en la región 3' terminal del MRFV muy conservada. De acuerdo con los análisis de las secuencias y las distancias genéticas entre los diferentes aislamientos se cree que el MRFV tuvo su origen en México o Guatemala y de allí se dispersó al resto de América.

Descriptores: Virus de Rayado Fino del Maíz (MRFV), Filogenia, Maíz, América Latina.

Ph.D. Pilar Ramírez Fonseca

Directora de Tesis

Maestría en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular

LISTA DE CUADROS

Cuadro	TÍTULO	
1	Usos del Maíz	3
2	Virus de ARN en plantas	7
3	Algunas maneras de obtener árboles filogenéticos	15
4	Reacción de transcripción reversa	24
5	Reacción de PCR a partir de ADNc	25
6	Secuencias nucleotídicas utilizadas en los análisis	29
7	Análisis filogenéticos	31
8	Distancias genéticas obtenidas a partir de las secuencias codificantes para la proteína de la cápside del MRFV y OBDV	51
9	Distancias genéticas obtenidas a partir de las secuencias no codificantes para el extremo 3' terminal del MRFV y OBDV	51
10	Estructuras secundarias del ARN de las regiones no codificantes	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	
1	MAÍZ INFECTADO CON MRFV	9
2	PARTÍCULAS VIRALES DEL MRFV	9
3	DISTRIBUCIÓN DEL MRFV	12
4	ÁRBOL FILOGENÉTICO PARA VARIOS AISLAMIENTOS DEL MRFV EN AMÉRICA LATINA	13
5	SÍNTOMAS DE PLANTAS COLECTADAS	23
6	ELECTROFORESIS QUE DESCRIBE LAS BANDAS OBTENIDAS AL AMPLIFICAR POR PCR UN FRAGMENTO DEL GEN CP DEL MRFV, USANDO COMO MOLDE ADN DEL ARN TOTAL DE LAS MUESTRAS VEGETALES	33
7	ELECTROFORESIS QUE MUESTRA EL PATRÓN DE BANDAS OBTENIDO AL DIGERIR LOS PLÁSMIDOS QUE CONTENÍAN EL FRAGMENTO DEL GEN CP DEL MRFV	34
8	ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS SIETE CLONES OBTENIDOS.	35
9	ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS CLONES OBTENIDOS Y COMPARACIÓN CON UN FRAGMENTO HOMÓLOGO DEL OBDV	37
10	ALINEAMIENTO CODIFICANTE	38
11	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS OBTENIDA AL TRADUCIR LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DEL ALINEAMIENTO CODIFICANTE	39
12	ALINEAMIENTO NO CODIFICANTE	39
13	ALINEAMIENTO CODIFICANTE INFORMATIVO	40
14	ALINEAMIENTO PROTEÍNA CP INFORMATIVO	40

15	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO POR EL MÉTODO DE MAXIMUM LIKELIHOOD UTILIZANDO LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS GENOMAS DE ALGUNOS MARAFIVIRUS Y TYMOVIRUS	41
16	ÁRBOL OBTENIDO POR EL MÉTODO DE MAXIMUM LIKELIHOOD QUE RELACIONA A LOS DIFERENTES AISLAMIENTOS DEL MRFV CON OTROS MARAFIVIRUS Y ALGUNOS TYMOVIRUS.	42
17	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON EL MÉTODO DE MAXIMUM LIKELIHOOD Y A PARTIR DEL ALINEAMIENTO CODIFICANTE.	43
18	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON EL MÉTODO DE UPGMA Y A PARTIR DEL ALINEAMIENTO CODIFICANTE.	43
19	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON EL MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING Y A PARTIR DEL ALINEAMIENTO CODIFICANTE.	44
20	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON EL MÉTODO DE MÍNIMA EVOLUCIÓN Y A PARTIR DEL ALINEAMIENTO CODIFICANTE.	45
21	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON EL MÉTODO DE MÁXIMA PARSIMONIA Y A PARTIR DEL ALINEAMIENTO CODIFICANTE.	46
22	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON EL MÉTODO DE MAXIMUM LIKELIHOOD Y A PARTIR DEL ALINEAMIENTO NO CODIFICANTE.	47
23	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON EL MÉTODO DE UPGMA Y A PARTIR DEL ALINEAMIENTO NO CODIFICANTE.	47
24	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON EL MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING Y A PARTIR DEL ALINEAMIENTO NO CODIFICANTE.	48
25	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON EL MÉTODO DE MÍNIMA EVOLUCIÓN Y A PARTIR DEL ALINEAMIENTO NO CODIFICANTE.	49
26	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO CON EL MÉTODO DE MÁXIMA PARSIMONIA Y A PARTIR DEL ALINEAMIENTO NO CODIFICANTE.	50
27	DISTRIBUCIÓN DE LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DEL MRFV EN AMÉRICA	56
28	ALINEAMIENTO CP INFORMATIVO LUEGO DE HABER REORDENADO Y ELIMINADO ALGUNOS SITIOS	59
29	ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO POR MÁXIMA PARSIMONIA Y UTILIZANDO LOS TERCEROS SITIOS DE CODÓN DEL ALINEAMIENTO CODIFICANTE.	62

Descriptores: *Virus del Rayado Fino del Maíz (MRFV), Filogenia, Maíz, América Latina.*

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. EL MAÍZ

1.1.1. Origen del Maíz

Maíz es una palabra de origen indígena americano que significa "lo que sustenta vida". El cultivo del maíz (*Zea mays*) tuvo su origen muy probablemente en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte hasta Canadá y hacia el sur hasta Argentina (FAO, 2003). Según Hilton y Gaut (1998) el maíz fue domesticado a partir de su pariente más cercano *Zea mays* spp *parviglumis* (teosinte) hace unos 7500 años y afirman que el *Zea mays* spp *parviglumis* y el *Zea luxurians* (que es otra especie cercana al maíz) divergieron de un ancestro común hace unos 700 000 años.

Las diferencias principales entre el teosinte y el maíz son las inflorescencias laterales, que en el teosinte son masculinas y en el maíz son femeninas. Esto genera una diferencia estructural bastante grande, pues el teosinte produce muy pocas mazorcas y granos por mazorca en comparación con el maíz (Doebley *et al.*, 1990).

Se cree que los indígenas americanos obtuvieron el maíz actual a partir de una pequeña población de 20 plantas de teosinte (que contenían las mutaciones adecuadas) y el proceso tomó unas 10 generaciones de siembra (Eyre-Walker *et al.*, 1998).

La razón por la cual el maíz pudo domesticarse tan rápido es que existen unos cinco loci en el genoma del género *Zea* asociados a grandes cambios anatómicos y la hipótesis es que los indígenas observaron algunas plantas con fenotipos propios de las

mutaciones en estos loci y de allí obtuvieron el maíz. (Doebley, 1992; Doebley y Stec; 1993).

El maíz era un artículo esencial en las civilizaciones maya y azteca y tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y nutrición; ambos pueblos incluso afirmaban que la carne y la sangre estaban formadas por maíz (FAO, 2003).

1.1.2. El cultivo del maíz

A finales del siglo XV, luego del descubrimiento de América, el maíz fue introducido en Europa a través de España. Se difundió por los lugares de clima más cálido del Mediterráneo y posteriormente a Europa septentrional. El maíz se cultiva en todas las regiones del mundo aptas para actividades agrícolas y se recoge en algún lugar del planeta todos los meses del año. Crece desde los 58° de latitud norte en el Canadá y Rusia hasta los 40° de latitud sur en el hemisferio meridional. Se cultiva en regiones por debajo del nivel del mar en la llanura del Caspio y a más de 4 000 metros de altura en los Andes peruanos. (FAO, 2003)

1.1.3. Usos del maíz

El maíz tiene tres usos posibles: alimento, forraje y materia prima para la industria (FAO, 2003)

Cuadro 1. Usos del Maíz

Alimento	Se puede utilizar todo el grano, maduro o no, o bien se puede elaborar con técnicas de molienda en seco para obtener un número amplio de productos intermedios, como sémola de partículas de diferentes tamaños, sémola en escamas, harina y harina fina, que a su vez tienen un gran número de aplicaciones.
Forraje	En los países desarrollados más del 60 por ciento de la producción se emplea para elaborar piensos compuestos para aves de corral, cerdos y rumiantes.
Materia prima	El maíz de elevada humedad ha despertado gran interés como alimento para animales. Los subproductos de la molienda en seco son el germen y la cubierta seminal; el primero se utiliza para obtener aceite comestible de elevada calidad mientras que la cubierta seminal se emplea como alimento o fuente de fibra dietética. También se produce almidón de maíz, gluten y se utiliza el germen para hacer harina.

(FAO,2003)

1.1.4. Producción mundial de maíz

Actualmente se cultiva más de 140 millones de hectáreas de maíz y 96 millones corresponden al área cultivada en países en desarrollo, tales como: China (26 millones de Ha), Brasil (12 millones de Ha), México (7,5 millones de Ha) e India (12 millones de Ha) (CYMMIT, 2000)

Sin embargo, aunque el 68% del área sembrada de maíz pertenece a países en desarrollo, sólo el 46% de la producción se lleva a cabo allí. Esto se debe a que en países

desarrollados se produce hasta 8 toneladas por hectárea, mientras que en los países en desarrollo se produce sólo 3. La diferencia en producción se debe esencialmente al clima, los pocos insumos y las diferentes enfermedades que atacan al maíz, entre las cuales, los virus son uno de los problemas principales. La enfermedad del enanismo del maíz es una de las tantas responsables de la disminución de la producción de maíz en todo el mundo y es causada por la asociación de un micoplasma y el maize rayado fino virus (MRFV), el cual es un virus de ARN (CYMMIT, 2000)

1.2. VIRUS DE ARN DE PLANTAS

Los virus que se pueden encontrar en plantas poseen características enormemente diversas, sin embargo, comparten algunas propiedades en cuanto a su forma de causar la infección y al número y velocidad con que se replican, no sólo entre ellos sino también con virus de ARN en animales. En cuanto a su replicación se puede mencionar que en general la partícula viral entra a la célula, pierde su cápside y libera el ARN; además la replicación del genoma viral es regulada por la expresión de genes virales y las diferentes partes del virus se ensamblan y son liberadas como viriones fuera de la célula. Con respecto al número de partículas y velocidad de replicación, los virus ARN pueden llegar a ser de hasta 10^{12} y su velocidad de replicación es tal que se puede producir una nueva partícula viral cada 0,4 segundos si la maquinaria de replicación funciona en óptimas condiciones, por lo que se generan hasta 100000 copias en 10 horas. Además de lo anterior los virus ARN poseen un tasa de mutación muy grande y que va desde 10^{-3} hasta 10^{-5} mutaciones por sitio por genoma por replicación (Moya *et al.*, 2000).

Debido a estas características (principalmente el tamaño de población y tasa de mutación) los virus de ARN son buenos modelos para el estudio de evolución bajo el principio de las quasiespecies. Una quasiespecie es una distribución en equilibrio de mutantes que se encuentran en una cantidad infinita y en la cual existe una o varias secuencias maestras muy dominantes en número y que se encuentran sujetas a variación, competencia y selección (Domingo, 2002).

Moya *et al.* (1993) observaron que la variabilidad en poblaciones naturales de virus de ARN es muy baja, según lo esperado para su alta tasa de mutación. Además, los valores de divergencia entre subpoblaciones es también menor de lo que se predice aplicando la teoría neutral. En consecuencia, concluyen que la variabilidad en las poblaciones de virus de ARN puede explicarse por una fuerte selección positiva (la selección positiva es la que se produce debido a las ventajas adaptativas que obtiene un individuo consecuencia de mutaciones no deletéreas) y que el mejor modelo para estudiarla es el de las quasiespecies.

De acuerdo al análisis de las poblaciones de virus ARN bajo el modelo de quasiespecies Domingo (2002) menciona que existe una estrecha relación entre rango de hospederos y espectro de mutantes (es decir, cuántos mutantes diferentes hay en la población). Asimismo, Moya *et al.* (2000) menciona que un gran espectro de mutantes confiere adaptabilidad a ambientes variables. También se ha observado que cuando el virus se transmite de un hospedero a otro por medio de un vector la velocidad con que aumenta el "fitness" disminuye, debido a que no necesariamente los mutantes con mayor tasa de replicación son transmitidos (Bergstrom *et al.*, 1999). Además, cuando el ambiente es cambiante o existe una competencia muy fuerte, aumentan las mutaciones deletéreas y disminuye el "fitness" de la población (Kamp y Bornholdt, 2002). Esto también sucede

cuando los estados nutricionales del hospedero son pobres (Domingo, 1997). Lo mencionado anteriormente concuerda con el comportamiento normal de virus de ARN, lo que refuerza la idea de que los virus de ARN pueden analizarse bajo un modelo de quasispecies.

En el párrafo anterior se utilizó el término *fitness*; al respecto cabe señalar que existen muchos trabajos referentes al "fitness" de las quasispecies, que en virus de ARN se refiere a la tasa de replicación (Domingo, 1997). Se ha observado que cuando las condiciones ambientales son constantes, la tasa de replicación de un virus (*fitness*) aumenta inicialmente de forma exponencial y luego de forma lineal, hasta llegar a una constante (es una constante teórica, pues no se ha comprobado experimentalmente). (Tsimring y Levine, 1996). Esto es importante, pues se entiende que en condiciones estables y luego de muchas generaciones la selección positiva se mantiene, con lo que disminuye la variabilidad de la población (Tsimring y Levine, 1996).

Debido a lo anterior es muy importante conocer las limitaciones que tiene la inferencia filogenética y el análisis poblacional clásico (los cuales son aplicaciones de la teoría neutral y no son válidos cuando hay una fuerte selección positiva o *fitness*) cuando se estudia virus de ARN (Moya *et al.*, 2000).

1.2.1 Tipos de Virus ARN en plantas

Existen diferentes tipos de virus ARN en plantas, los cuales se pueden clasificar como:

Cuadro 2. Virus de ARN en plantas

Tipo de Genoma	Familias de virus
ARN doble banda	<i>Reoviridae, Partitiviridae, Varicosavirus</i>
ARN negativo simple banda	<i>Rhabdoviridae, Bunyaviridae</i>
ARN positivo simple banda	<i>Bromoviridae, Comoviridae, Potyviridae, Tombusviridae, Sequiviridae, Closteroviridae, Luteoviridae, Otros no clasificados.</i>

(Hull, 2002)

1.2.2 Virus ARN doble banda

Sus genomas consisten de múltiples moléculas de ARN doble banda. Aunque algunas de estas moléculas parecen tener dos marcos abiertos de lectura no se ha comprobado que ambos sean funcionales. Las diferentes familias difieren en el número de moléculas (Hull, 2002).

1.2.3 Virus ARN negativo simple banda

Cada molécula de ARN de genoma viral está asociada con una proteína denominada "proteína nucleocapsídica". Además, poseen una RNA polimerasa que está asociada con el virión, pues es indispensable para la transcripción en la primer fase de la infección (Hull, 2002).

1.2.4 Virus ARN positivo simple banda

La mayoría de los virus de plantas poseen genoma de ARN positivo simple banda, el cual, puede estar compuesto de una o varias moléculas de ácido nucleico. Dentro de los Virus ARN simple banda positiva se encuentra el género *marafivirus* (Hull, 2002).

1.2.4.1 Marafivirus

Son virus con genoma de ARN simple banda positivo de aproximadamente 6500 nucleótidos y cápside icosaédrica (Hull, 2002). El ARN de estos virus se caracteriza por poseer una caperuza de guanosina en el extremo 5', estar poliadenilado en su extremo 3' y tener un elevado contenido de citosina (Hull, 2002).

El rango de hospederos de los marafivirus está restringido a la familia *Gramineae* y se transmiten por medio de saltahojas, con la particularidad de que son capaces de replicarse dentro de su insecto vector (Hull, 2002).

Dentro de los Marafivirus se encuentran el *maize rayado fino virus* (MRFV), el *oat blue dwarf virus* (OBDV), el *bermuda grass etched line virus* (BGELV) y por similitud de secuencias se propuso que también el *poinsettia mosaic virus* (PnMV) (Hull, 2002)

1.2.3.1.1 El Virus del Rayado Fino del Maíz

El virus del Rayado Fino del Maíz (MRFV) es un virus que pertenece a la familia de los Marafivirus y fue descrito por primera vez en El Salvador (Alcamao y Davis, 1961) y caracterizado en Costa Rica por Gámez (1969).

Cuando se hicieron los estudios iniciales del MRFV se observó que en los aislamientos proteicos había dos proteínas principales: una de 22 000 Da y otra de 28 000 Da designadas p22 y p28 (León y Gámez, 1986). Estas proteínas mostraban similitud de secuencia (Falk y Tsai, 1986). Sin embargo, Espinoza *et al.*, (1988) mencionaron que la traducción *in vitro* del ARN viral produce una proteína que no es reconocida por la técnica de ELISA utilizada por Rivera y Gámez (1983), la cual detecta la proteína de la cápside. A partir de este hecho se formuló la hipótesis de que existen ARNs subgenómicos que sirven de molde para la traducción de esta proteína (Espinoza *et al.*, 1988).

La secuencia completa del MRFV fue determinada por Hammond y Ramírez (2001). De acuerdo a su análisis este virus contiene un genoma de 6305 nucleótidos y dos encuadres de lectura que codifican para proteínas de 224 y 43 kDa. La proteína de 224 kDa es una proteína que tiene similitud en su parte aminoterminal con la proteína asociada a la replicación en la superfamilia de Virus de ARN simple banda positiva y la parte carboxilterminal corresponde a la proteína de la cápside del MRFV. El encuadre de lectura de 43 kDa es traslapante y codifica para una proteína que tiene cierta similitud con proteínas de movimiento en otros virus. Además propusieron que el ARN del MRFV no contiene cola de poli(A).

El MRFV se transmite por medio de un saltahojas del orden Homoptera, familia *Cicadellidae*, especie *Dalbulus maidis* (Gámez, 1979) y tiene la capacidad de multiplicarse dentro de este insecto vector (Gámez, 1973; Nault, 1989; Gámez, 1987), en donde se encuentra dentro de vesículas (Kitajima y Gámez, 1983; Gámez, 1987). El virus se mantiene activo dentro del insecto por un periodo de 8-22 días (Gámez, 1973) y a pesar de este largo periodo las hembras infectadas no transmiten el virus a los huevos. Sin

embargo, se ha observado que las ninfas y adultos que tienen el virus son igualmente infectivos (González y Gámez, 1974).

Dalbulus maidis es bastante persistente en el campo pues el macho puede soportar largos periodos de sequía lejos del hospedero. En consecuencia la enfermedad también tiene la característica de ser persistente (Larsen, Nault y Moya-Raygoza, 1992). Además, se sabe que *Dalbulus maidis* también transmite una enfermedad causada por un micoplasma (MBSM) y un espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*) (Ligrand y Power, 1994).

El rango de hospederos del MRFV es bastante restringido, pues parece que es capaz de infectar sólo a los géneros *Zea*, *Tripsacum* y *Rottboellia*, aunque experimentalmente también infecta a la cebada (Madriz-Ordeñana *et al*, 2000). Dentro de las especies de maíz el virus infecta todas incluyendo algunos teosintes, que es la especie de la que se cree es originario el maíz (Gámez, 1973; Paniagua y Gámez, 1977).

Asimismo, también de forma experimental se ha podido transmitir el MRFV por medio de *Graminella nigrifrons* (Ligrand y Power, 1994) y mecánicamente por medio de la técnica de punción vascular (Madriz-Ordeñana, 2000).

En sus estudios de resistencia y tolerancia al virus, Toler *et al* (1985), mencionaron que de 58 variedades de maíz de Estados Unidos sólo siete mostraron síntomas moderados y las demás tuvieron síntomas más severos. Por su parte Bustamente *et al*, (1998) evaluaron 20 variedades de maíz de Mesoamérica y el Caribe y determinaron que sólo dos fueron tolerantes y ninguna resistente. No obstante, (Madriz-Ordeñana, 1999) observó una variedad de maíz que no presentó síntomas luego de inoculación con el virus. Sin embargo, esta resistencia parece no ser específica hacia el MRFV, lo que dificulta el mejoramiento genético (Madriz-Ordeñana y Chicas-Romero, 2001 [Datos no publicados]).

En lo que respecta a la distribución del MRFV y su impacto, Nault y Bradfute (1979) lo consideraron presente e importante en México, Centroamérica y Sudamérica. Por su parte, Bradfute *et al* (1980) mencionaron que el virus fue colectado en el Valle de Río Grande en Texas y en Florida. Asimismo, Bradfute, Tsai y Falk (1985) mencionaron que se encuentra no sólo en regiones tropicales, sino también en zonas con estaciones marcadas y de altura como el este de Estados Unidos y Ecuador (Ramírez, 2001. Comunicación personal), lo que lo hace un virus con una amplia distribución.



Figura 3. Distribución del MRFV (Los círculos naranja representan los lugares donde se ha encontrado el virus) (Nault y Bradfute, 1979; Bradfute *et al.*, 1980; Bradfute *et al.*, 1985; Ramírez, 2001; Kogel *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2003; Giménez *et al.*, 2002).

El ARN genómico del MRFV posee un gen que codifica para una de las proteínas de la cápside en su extremo 3' (Hammond y Ramírez, 2001). Hammond *et al* (1997) diseñaron imprimadores que amplifican un fragmento de 633 pb del gen de la cápside, para posteriormente amplificar por PCR y secuenciar este fragmento en aislamientos de Bolivia, Colombia, Costa Rica, Guatemala, México, Perú, Venezuela y Estados Unidos. Luego confeccionaron un árbol filogenético que muestra tres grupos distintos de aislamientos de MRFV (Figura. 5).

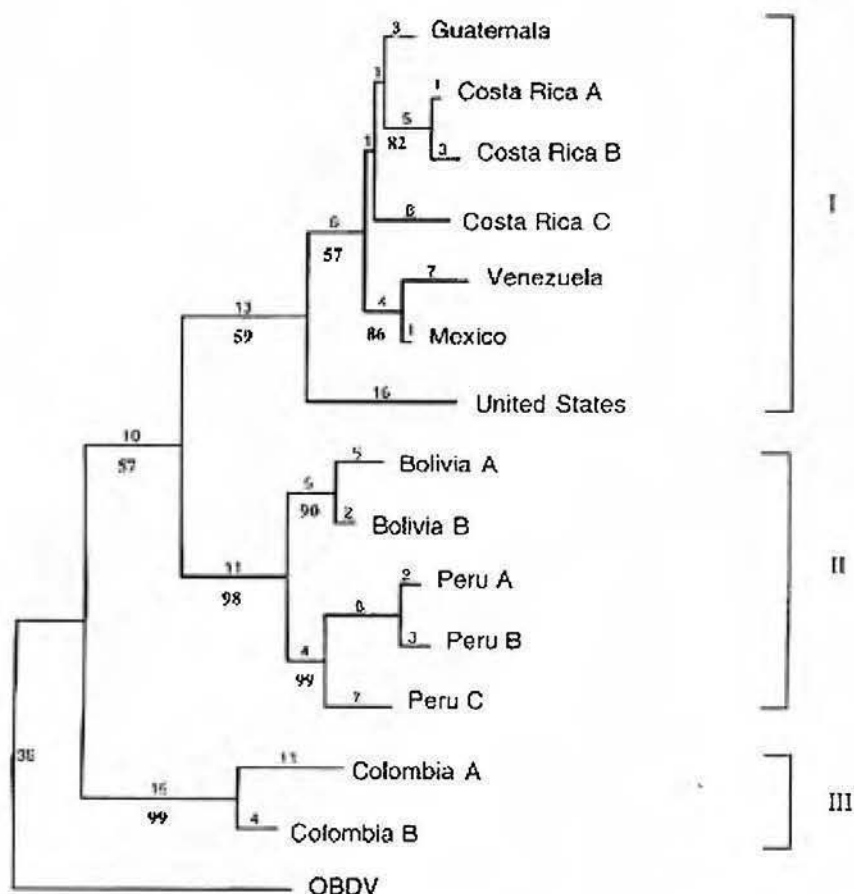


Figura 4. Árbol filogenético para varios aislamientos del MRFV de América Latina (Hammond *et al*, 1997).

El árbol fue obtenido con el programa PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) utilizando el método de Branch-And-Bound de Máxima parsimonia y el alineamiento previo fue hecho con Clustal versión 5.

1.3 LA TEORÍA NEUTRAL DE LA EVOLUCIÓN

La teoría neutral de la evolución fue propuesta en 1968 por Motoo Kimura (Kimura, 1991). Según esta teoría la gran mayoría de las mutaciones que se observan en una población de individuos provienen de mutaciones que fueron fijadas por azar, deriva genética o selección neutral (Kimura, 1991).

Esto difiere del neo-Darwinismo pues rechaza la idea de que las mutaciones son mantenidas en la población porque dan una ventaja adaptativa a los individuos (selección positiva). Asimismo, la teoría neutral es cuantitativa, en el sentido de que la tasa de evolución y la variabilidad pueden ser cuantificadas y estimadas (por medio de ecuaciones) a partir de datos de análisis moleculares actuales (Kimura, 1991).

1.4 EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Existen diferentes maneras de establecer la posible filogenia de los individuos, especies y familias de los seres vivos. Clásicamente se utilizaba las características anatómicas, bioquímicas y fisiológicas para hacer una inferencia de las relaciones evolutivas. Sin embargo, también se puede utilizar un análisis de las secuencias de ADN, ARN o proteínas para observar su posible relación evolutiva o filogenética (Swofford, 1996).

Existen diferentes formas para determinar la relación filogenética a partir de secuencias de ADN (Cuadro 1).

Cuadro 3. Algunas maneras de obtener árboles filogenéticos

Método	Principio de funcionamiento
Parsimonia	<i>Definición</i> Se escoge el árbol cuya longitud sea mínima. La longitud se calcula según la cantidad de transformaciones que deben darse para pasar de un carácter a otro
	<i>Ventajas</i> Toma en cuenta mucha información de la secuencia
	<i>Desventajas</i> Las transformaciones tienen el mismo valor independientemente del lugar dentro de la secuencia en que se encuentren. Sólo toma en cuenta los sitios informativos.
UPGMA	<i>Definición</i> Se calcula una matriz de distancias, se obtiene la media aritmética entre las secuencias más parecidas, luego con las siguientes más parecidas y así sucesivamente.
	<i>Ventajas</i> Es muy rápido.
	<i>Desventajas</i> Asume una tasa de evolución constante. Se pierde parte de la información de la secuencia al obtener promedios.
Mínima Evolución	<i>Definición</i> Se escoge el árbol cuya suma de la longitud de sus ramas sea mínima.
	<i>Ventajas</i> Toma en cuenta toda la información de la secuencia. La tasa de evolución no se asume constante.
	<i>Desventajas</i> Es computacionalmente costoso.
Vecino más cercano	<i>Definición</i> Se hace un árbol en forma de asterisco, luego se fusionan los taxa más similares y se continúa de esta forma hasta obtener el árbol.
	<i>Ventajas</i> La tasa de evolución no se asume constante.
	<i>Desventajas</i> No se toma en cuenta toda la información que se puede derivar de la secuencia.
Maximun Likelihood	<i>Definición</i> Se calcula el árbol más probable. Se calcula la probabilidad de un árbol para cada uno de los sitios de la secuencia.
	<i>Ventajas</i> Toma en cuenta toda la información de la secuencia. El cálculo va de acuerdo a un modelo evolutivo.
	<i>Desventajas</i> Depende de que el modelo evolutivo sea correcto. Asume que los cambios en cada sitio son independientes.

Fuente: Swofford *et al* (1996).

Algunos de los programas que se utilizan para confeccionar árboles filogenéticos son: **ClustalW** (Analiza secuencias y hace alineamientos y árboles con el algoritmo del vecino más cercano y *bootstrapping*), **ODEN** (Calcula distancias genéticas a partir de secuencias de nucleótidos o proteínas), **PHYLP** (Utiliza los métodos de parsimonia, máxima similitud, *bootstrapping* y otros más) y **TREECON** (Para calcular distancias e incluye *bootstrapping* y dibujo del árbol) (Swofford *et al*; 1996). También hay paquetes muy completos de análisis de secuencias y filogenia como: MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) y DNASTAR4.03 (DNASTAR Inc).

Para que estos métodos y algoritmos (y en consecuencia, también para que los programas funcionen) es necesario realizar un alineamiento de las secuencias con que se esté trabajando. Este es uno de los puntos más débiles en el análisis filogenético, pues los programas en general cometen errores en circunstancias especiales tales como la presencia de regiones invertidas o cuando hay barajamiento de exones (Swofford *et al*; 1996). En general, para el alineamiento se toman dos secuencias y se colocan en la primera fila y columna de una matriz, luego se observa cuáles son las similitudes y se colocan en la diagonal de la matriz. Entonces se hacen ajustes para que las secuencias alineen de la mejor manera (Swofford *et al*; 1996). Esto implica que se obliga a que la primera parte de una secuencia alinee con la primera parte de otra, aunque puede que el alineamiento correcto sea una parte inicial con una terminal o con ninguna.

1.5 ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO DE VIRUS

De acuerdo a trabajos recientes el análisis de distribución y filogenia de un virus puede tener varios niveles

- 1) Análisis de distribución geográfica
- 2) Análisis filogenético.
- 3) Test de neutralidad y de selección
- 4) Análisis de distancias entre clados o subgrupos
- 5) Correlación de distancias genética y geográfica.
- 6) Análisis de diversidad para determinar posible origen evolutivo.

En los trabajos que se puede encontrar en la literatura no siempre se ha podido hacer el análisis en todos los niveles. Sin embargo, hay trabajos muy destacados como el de Peterson et al. (2004) en donde se cuenta únicamente con información de la ubicación del virus. No obstante, se utilizaron datos de humedad, altitud, relieve entre otros; para determinar los nichos ecológicos en donde se encuentran diferentes especies de filovirus; lo cual es importante para la determinación de posibles lugares en donde se puede hallar o bien desarrollar cada especie viral.

Bakonvi *et al.* (2002) y Switzer *et al.* (1995) al trabajar con virus humanos, poseían información de la procedencia de los diferentes aislamientos virales y con parte de la secuencia nucleotídica. No obstante, en ambos trabajos, aunque los diferentes clados o subgrupos obtenidos en el análisis parecían ser bastante consistentes, la relación entre éstos parece ser no adecuada de acuerdo a conocimientos previos. En el caso de Switzer

et al (1995), quienes trabajaron con el HTLV-II (*human T-cell leukemia virus subtipo II*), el análisis filogenético indicó que el virus se originó en América, pero existe evidencia de que este virus se encuentra infectando a tribus de pigmeos en África, lo cual hace suponer que el origen más bien puede ser en el viejo mundo. En el trabajo de Bakonvi *et al.* (2002) las mayores similitudes de secuencia se observaron entre los aislamientos dentro de cada uno de los clados o subgrupos, sin embargo, las similitudes entre aislamientos muy distantes llegaron a ser de hasta un 96%, lo que hace pensar que se trata del mismo virus en todas las regiones de estudio.

En este aspecto cabe destacar que Schierup y Hein (2000) comenta que la presencia de recombinación en virus puede afectar severamente el análisis filogenético en diferentes aspectos, tales como:

- Subestimación de la cantidad de divergencia.
- Sobrestimación del número de mutaciones.
- Aparente crecimiento exponencial de la población
- Aparente heterogeneidad entre las tasas de sustitución entre los diferentes sitios.
- Aparentes sustituciones paralelas.
- Pérdida del reloj molecular.

Además Barrett *et al* (2002) sugieren que una escasa diversidad (que es equivalente a una escasa divergencia) puede deberse a una rápida dispersión del virus o a una baja tasa de mutación, aunque la segunda razón admiten que es poco probable.

A partir de este conocimiento, hay trabajos como el de Radjef *et al.* (2004) y Barret *et al* (2002) en donde se realizó el análisis filogenético y luego se hizo un análisis de

correlación entre la distancia geográfica entre los diferentes aislamientos y la distancia genética. En estos casos, sí se observó correlación, por lo que se concluyó que el análisis filogenético concordaba con la realidad. Sin embargo, en un estudio de Burt *et al.* (2002) sobre el WNV (*west nile virus*) no se determinó ninguna correlación entre la distancia genética y el lugar de procedencia de las muestras, especie de la que se aisló el virus o fecha de aislamiento; por lo cual, el análisis filogenético no es concluyente sobre cómo se dispersó o evolucionó el virus en este caso.

Se han reportado trabajos muy completos como los de Fargette *et al.* (2004) con el virus RYMV (*rice yellow mottle virus*) y Moonan & Mirkov (2002) con el virus SCYLV (*sugarcane yellow leaf virus*) (que infecta caña de azúcar) en donde se realiza el análisis filogenético por diferentes métodos para observar si hay consistencia en la formación de los diferentes subgrupos. Se hicieron pruebas de neutralidad y de recombinación para poder determinar la fiabilidad del análisis filogenético. Luego de hacer esto, en el caso de Fargette *et al.* (2004) se calculó la distancia entre los diferentes subgrupos del virus y la diversidad para cada uno. De acuerdo a esto, se observó que había correlación entre las distancias y un modelo de dispersión del virus y que además, la diversidad disminuía hacia el subgrupo más divergente y distante según el modelo de dispersión. En el estudio de Moonan & Mirkov (2002), se utilizó un modelo de evolución intrafamiliar para determinar las diferentes subpoblaciones del SCYLV y la relación de éstas con otros virus relacionados, con lo que se pudo determinar un posible origen del virus en Colombia.

Existen trabajos con aportes importantes como el de Dimcheff *et al.* (2000) quienes analizaron la dispersión del virus ASLV (*avian sarcoma/leukosis virus*) que infecta galliformes en América, Europa del Este, Asia y África. En este estudio, se compararon el análisis filogenético del virus y el de las diferentes especies de galliformes de las cuales se

aisló el virus y se concluyó que existe coevolución entre el virus y las diferentes especies de galliformes.

2. JUSTIFICACIÓN

El Virus del Rayado Fino del Maíz fue observado en Ecuador por Bradfute *et al* (1985) y estuvo presente en alrededor del 3% de las plantas examinadas. Asimismo, este virus no se caracteriza por inducir grandes pérdidas en el rendimiento de las plantas de maíz, sin embargo, está disperso en toda América Latina (Kogel *et al*, 1996) e infecta cultivos de maíz en países como Argentina, Ecuador, Brasil y Colombia (ISAAA, 1996 y Ramírez, 2001; comunicación personal), por lo que las pérdidas son considerables si se toma en cuenta el área afectada.

Al conocer las relaciones filogenéticas de diferentes aislamientos del MRFV se puede estimar su variabilidad y posibles razas. Esto es útil en la elaboración de planes de manejo, pues las diferentes variedades de maíz pueden responder de manera desigual ante los diferentes aislamientos del virus.

3. OBJETIVO GENERAL

Analizar la información de las secuencias de diferentes aislamientos del MRFV con el fin de conocer sus relaciones filogenéticas e historia evolutiva.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Clonar y secuenciar parcialmente el MRFV de un aislamiento ecuatoriano para poder realizar comparaciones con otros aislamientos

Analizar filogenéticamente todos los aislamientos mencionados del MRFV para establecer las relaciones filogenéticas del virus en América Latina.

Analizar la variación en las secuencias de ARN del MRFV de los diferentes aislamientos para dilucidar su historia evolutiva.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL

El material fue colectado por la Dra. Pilar Ramirez y el Dr. Mario Caviendes en septiembre de 2000 en la Estación Experimental Santa Catalina al oeste de Quito, la cual se encuentra a una altura de 3000 m.s.n.m. Se colectaron hojas de maíz que mostraban líneas cloróticas en dirección de las venas y enanismo, los cuales son síntomas del MRFV según Gámez, (1969). Las muestras se guardaron en tubos Falcon® de 50 ml con silicagel para evitar su descomposición.



5.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Se utilizó el kit de extracción de ARN ARNeasy (Qiagen, GMBH, Germany) para extraer el ARN de muestras de hojas de maíz provenientes de Ecuador que presentaban síntomas de infección con el virus MRFV.

Se tomaron alrededor de 200mg de cada muestra macerada previamente con nitrógeno líquido, se le agregaron 450µl de buffer RLC (viene con el kit) y se agitaron con vortex por unos segundos (esto produjo la lisis celular). Se tomó el lisado y se vertió en la columna de color lila (viene con el kit), la cual, se coloca sobre un tubo de centrifuga de 2ml. Se centrifugó por 2 minutos a 14000rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga de 1,5ml. Se agregaron 0,5 volúmenes de etanol al 96% al lisado y se mezclaron con la pipeta. Se tomó todo el contenido del tubo, se vertió en la columna de color rosado (que viene con el kit) y se centrifugó 15 segundos a 10000 rpm. Se

pipetearon 700 μ l de buffer RW1 (viene con el kit) sobre la columna y se volvió a centrifugar por 15 segundos a 10000rpm. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de 2ml, se pipetearon 500 μ l de buffer RPE (viene con el kit) sobre la columna y se centrifugó por 15 segundos a 10000rpm. Se agregaron 500 μ l de buffer RPE a la columna y esta se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm. Se transfirió la columna a un tubo de 1,5 ml, se agregaron 40 μ l de agua bidestilada estéril y se centrifugó la columna por 1 minuto a 10000 rpm para obtener el ARN en suspensión.

Se corrieron 5 μ l del ARN extraído en un gel de agarosa al 1 % para observar su concentración aproximada y calidad. Luego se midió su concentración en un espectrofotómetro y se llevó la concentración de todas las muestras a 600 ng/ μ l de ARN.

5.3 TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE LOS ARN EXTRAÍDOS

Para cada muestra se tomaron 2 μ l de mezcla de imprimadores inespecíficos 20 pmol/ μ l (estos son decámeros de secuencias arbitrarias), 3 μ l de ARN a 600 ng/ μ l y 5 μ l de agua. Se incubó a 65 °C por 5 minutos y a 37 °C por 10 minutos, luego se agregó esta mezcla a la reacción descrita en el cuadro 4:

Cuadro 4. Reacción de transcripción reversa

Reactivo	Cantidad	Conc. Final
Retrotranscriptasa 40U/ μ l (SuperScript II, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)	0,5 μ l	1 U/ μ l
dNTPs 2 mM	1,5 μ l	0,15 mM
Buffer 5X (Promega)	4 μ l	1X
Inhibidor de DNAsas 5 U/ μ l (RNasin, Promega, Madison, Wisconsin, USA)	0,5 μ l	0,125 U/ μ l
DTT 0,1 M	2 μ l	0,01 M
Agua	1 μ l	-

Se incubó a 37 °C por una hora.

5.4 AMPLIFICACIÓN DE UN SEGMENTO DEL GEN DE LA CÁPSIDE DEL MRFV

Se preparó la siguiente reacción de PCR para cada muestra de ADNc:

Cuadro 5. Reacción de PCR a partir de ADNc

Reactivo	Cantidad (μ l)	Conc. Final
MgCl ₂ 25, mM	1,25	3,125 mM
Buffer de Taq Polimerasa (10x)	2,5	1 x
dNTPs 1mM	1	0,04 mM
Imprimador MRFV- 09 * 10 pmol/ μ l	1	0,4 pmol/ μ l
Imprimador MRFV- 10 * 10 pmol/ μ l	1	0,4 pmol/ μ l
Taq Polimerasa 5 U/ μ l	0,25	0,20 U/ μ l
ADNc	1	-
Agua	17	-
Total	25 μ l	-

Los imprimadores MRFV-09 y MRFV-10 amplifican una región de 633 pares de bases en la parte 3' terminal del genoma del MRFV y corresponde a parte del gen de la cápside y a parte de la región terminal no codificante del ARN viral. Estos imprimadores tienen 30 y 33 nucleótidos de longitud con las secuencias 5'-AATCCGCCATTCATCACTGCTACTCGACTG-3' y 5'-AACTTCAGCCATTCAAACCTTCAGCCATTC-ACGT-3' respectivamente (Hammond *et al*, 1997).

El programa del termociclador fue el siguiente: 1 minuto 1 94 °C seguido de treinta ciclos de 1 minuto 95 °C, 2 minutos a 65 °C y 3 minutos a 72 °C. Finalmente 72 °C por 10 minutos.

5.5 ELABORACIÓN DE UN VECTOR DE CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Se tomaron 5 μg de plásmido pBluescript SK y se digirieron con la enzima de restricción EcoRV (Promega, Madison, Wisconsin, USA) para generar extremos romos, se hizo una limpieza con Fenol:Cloroformo 1:1 para eliminar los residuos proteicos. Luego se agregó 1 μl de dTTPs 100 mM, 10 μl de Buffer de Taq polimerasa 10x y 5U de Taq polimerasa. El volumen se llevó a 100 μl con agua bidestilada estéril y finalmente se incubó a 75 °C por 2 horas.

Con esto se adicionó colas de T al vector para posibilitar la clonación de fragmentos de PCR.

5.6 LIGACIÓN

Se tomaron 50 ng del vector de clonación de productos de PCR, se agregó 1 μl de T4-Ligasa (Promega, Madison, Wisconsin, USA) 5U/ μl , 1 μl de buffer de ligación 10x (Promega, Madison, Wisconsin, USA) y el 100ng de cada producto de PCR. Cada reacción se llevó a un volumen de 10 μl y se incubó a 14° C por 16 horas.

5.7 ELABORACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Se inocularon 3 ml de medio de cultivo LB con bacterias *E. coli* XL1-Blue y se incubaron toda la noche a 37 °C y 200 rpm.

Con los 3 ml de suspensión celular se inocularon 100 ml de medio de cultivo LB y se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta que la suspensión alcanzó una densidad óptica de 3. Luego se colocó en hielo por una hora.

Se centrifugaron los 100 ml de suspensión a 2000 rpm y 4 °C por 15 minutos, luego se resuspendieron en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M y se dejaron en hielo por 40 minutos. Entonces se centrifugaron a 2000 rpm por 15 minutos, se resuspendieron en 4 ml de CaCl₂ 0,1 M y 1 ml de glicerol al 88%.

5.8 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Para cada muestra se tomaron 100 µl de células competentes, a las cuales se les añadió el producto de la ligación. Los tubos con las muestras se colocaron 25 minutos en hielo, luego se incubaron a 42 °C por 1,5 minutos, se colocaron nuevamente en hielo por 8 minutos, se agregaron 900 µl de medio de cultivo LB y se incubaron a 37 °C por 1 hora.

Se prepararon placas con medio de cultivo LB que contenían 100 µg/ml de Ampicilina, 50 µg/ml de Tetraciclina y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside) e IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside). Se centrifugaron los 900 µl de suspensión celular de cada muestra, se resuspendieron en 50 µl de medio de cultivo LB, se cultivaron en las placas descritas anteriormente y se incubaron a 37 °C por 18 horas.

5.9 SELECCIÓN DE COLONIAS

Se escogieron 4 colonias de cada placa y se inocularon 3 ml de medio LB (Luria *et al.*, 1960) con cada una. Se incubaron a 37 °C y 200 rpm por 18 horas.

5.10 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO

Se utilizó el kit de extracción de plásmidos QIAprep (Qiagen, GMBH, Germany) para extraer el plásmido de las suspensiones bacteriales.

Para cada suspensión celular se tomaron 1,5 ml de medio inoculado y se colocaron en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Se centrifugó el tubo a 4000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 250 μ l del buffer P1. Se agregaron 250 μ l de buffer P2, se agitó el tubo invirtiéndolo tres veces, se agregaron 350 μ l de buffer N3 y se volvió a invertir el tubo tres veces. Se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 rpm. Se decantó el sobrenadante dentro de un tubo de 1,5 ml y se añadieron 250 μ l de buffer PB. Se centrifugó por 1 minuto a 10 000 rpm, se eliminó el líquido que quedó en el tubo y se añadió 750 μ l de buffer PE. Se volvió a centrifugar por 1 minuto a 10 000 rpm y se colocó la columna sobre un tubo de 1,5 ml limpio. Se agregó 50 μ l de agua bidestilada estéril sobre la columna y se centrifugó a 10 000 rpm por 1 minuto. El líquido que quedó en el tubo corresponde al ADN del plásmido en suspensión.

5.11 SECUENCIACIÓN

Se tomaron 10 μ l de plásmido a 50 ng/ μ l para cada uno de los siete clones obtenidos y se secuenciaron utilizando el kit Big Dye 2.0 de Applied Biosystems y el secuenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems model 377A). Para la reacción de secuenciación se utilizaron imprimadores M13 Forward y M13 Reverse.

5.12 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL MRFV

Se tomaron las secuencias disponibles en el GeneBank (National Center of Biotechnology Information) de diferentes aislamientos del MRFV, de otros Marafivirus y las secuencias completas de algunos representantes de los Tymovirus. Estas secuencias se describen a continuación:

Cuadro 6. Secuencias nucleotídicas utilizadas en los análisis

Número de Accesoión	Abreviatura	Nombre del virus	Clasificación	Localización
AF195000	ChMV	<i>chayote mosaic tymovirus</i>	Tymovirus	
J04374	EMV	<i>eggplant mosaic virus</i>	Tymovirus	
NC_001977	ErLV	<i>erysimum latent virus</i>	Tymovirus	
AJ309022	GFKV	<i>grapevine fleck virus</i>	Maculavirus	
X16378	TYMV	<i>turnip yellow mosaic virus</i>	Tymovirus	NA
NC_002164	PnMV	<i>poinsettia mosaic virus</i>	No asignado	
U87832	OBDV	<i>oat blue dwarf virus</i>	Marafivirus	
AY040531	BGELV	<i>bermuda grass etched line virus</i>	Marafivirus	
NC_002786	MRFV	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	
U97717	Bolivia A	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Cochabamba, Bolivia
U97718	Bolivia B	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Cochabamba, Bolivia
U97719	Colombia A	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Medellin, Colombia
U97720	Columbia B	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Bogota, Colombia
U97721	Costa Rica A	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Alajuela, Costa Rica
U97722	Costa Rica B	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Alajuela, Costa Rica
U97723	Costa Rica C	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Guapiles, Costa Rica
U97724	Guatemala	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Jutiapa, Guatemala
U97725	Mexico	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Veracruz, México
U97726	Peru A	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Ayacucho, Perú
U97727	Peru B	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Ayacucho, Perú
U97728	Peru C	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Chincha, Perú
U97729	United States	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Texas, United States
U97730	Venezuela	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	Maracay, Venezuela
AF186178	Brazil 26	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	NA
AF186179	Brazil 48	<i>maize rayado fino virus</i>	Marafivirus	NA

(Fuente : Martinelli *et al.*, 2002a y Martinelli *et al.*, 2002b)

5.12.1 Alineamientos

Se hicieron tres alineamientos que se llevaron a cabo por medio de programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). En el primero, se alineó las secuencias de los genomas de los Tymovirus, el OBDV y el MRFV (Alineamiento genomas Marafivirus-Tymovirus) luego se cortó estas secuencias de tal manera que se dejó sólo la parte que es análoga al fragmento de 633 pb que se donó.

Se alineó el fragmento obtenido (sin incluir la secuencia del MRFV) con las secuencias parciales de diferentes aislamientos del MRFV en América Latina y que son análogas al fragmento donado (Alineamiento parcial Marafivirus-Tymovirus).

El fragmento de 633 pb donado corresponde a la parte amino terminal de la proteína de la cápside del MRFV y a un segmento de la parte 3' terminal del genoma (Hammond *et al.*, 1997). Por tal motivo, se alinearon las secuencias parciales de nucleótidos de los diferentes aislamientos del MRFV (United States, México, Guatemala, Costa Rica A, Costa Rica B, Costa Rica C, Venezuela, Colombia A, Colombia B, Perú A, Perú B, Perú C, Bolivia A, Bolivia B, Brazil 26, Brazil 48, la nueva secuencia de Ecuador, y el fragmento correspondiente del OBDV). Luego, este alineamiento fue dividido en dos alineamientos, uno que se refiere al fragmento que codifica para parte de la proteína de la cápside (Alineamiento codificante) y otro que pertenece a la parte 3' terminal del MRFV (Alineamiento no codificante).

Se eliminaron los dos primeros nucleótidos del alineamiento codificante y se tradujo para obtener un alineamiento con las secuencias de aminoácidos (Alineamiento proteína cp).

Además se editaron los alineamientos codificante y proteína cp de tal manera que se mostraran sólo los sitios donde había dos o más secuencias diferentes al consenso (Alineamientos codificante informativo y proteína cp informativo respectivamente).

5.12.2 Análisis filogenéticos

Se realizaron los siguientes análisis filogenéticos

Cuadro 7. Análisis filogenéticos.

ALINEAMIENTO	MÉTODO
Genomas Marafivirus-Tymovirus	Maximum Likelihood
Parcial Marafivirus-Tymovirus	Maximum Likelihood
	Maximum Likelihood
	UPGMA
Codificante	Neighbor Joining
	Mínima Evolución
	Máxima Parsimonia
	Maximum Likelihood
	UPGMA
No codificante	Neighbor Joining
	Mínima Evolución
	Máxima Parsimonia

Los análisis por maximum likelihood se hicieron con el programa puzzle (Strimmer y Haesler, 1996) con el modelo de sustitución Tamura y Nei, y estimación de parámetros por Neighbor Joining y Quartet Puzzling (los demás parámetros fueron los predeterminados). En los demás análisis se utilizó el programa Mega 2.1 (Kumar *et al.*,

2001) con 1000 bootstrap y modelo de sustitución de Tajima y Nei (Los demás parámetros fueron los predeterminados).

5.12.3 Estimación de distancias

Se utilizó el programa DNADist 3.5 (Felsenstein, 1993) para estimar las distancias genéticas para cada par de secuencias de los alineamientos codificante y no codificante.

5.12.4 Estimación de estructuras secundarias de ARN

Se utilizó el programa DNASTAR 4.05 (DNASTAR Inc) para determinar la estructura secundaria de la región 3' terminal (parte no codificante) de cada una de las secuencias pertenecientes a los aislamientos: United States, México, Guatemala, Costa Rica A, Costa Rica B, Costa Rica C, Venezuela, Colombia A, Colombia B, Perú A, Perú B, Perú C, Bolivia A, Bolivia B, Brazil 26, Brazil 48 y la secuencia de Ecuador.

5.12.5 Pruebas de neutralidad y selección

Se utilizó el programa Mega 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) para determinar si las diferencias observadas en las secuencias del alineamiento codificante puede ser explicada por medio de la teoría neutral o si existe evidencias de selección positiva. Para ello se realizó la prueba de Neutralidad de Tajima y la prueba de Z (esta última para observar si la razón de mutaciones sinónimas y no sinónimas entre las diferentes secuencias era significativamente diferente de 1).

6 RESULTADOS

6.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE UN FRAGMENTO DEL GEN CP

Luego de realizar la extracción de ARN de las 16 muestras colectadas y de hacer transcripción reversa para cada una, se amplificó un fragmento del ADNc del MRFV por medio de PCR. En la siguiente figura se muestra una electroforesis de los productos de PCR amplificados, en donde se esperaba una banda con un peso molecular de 633 pb.

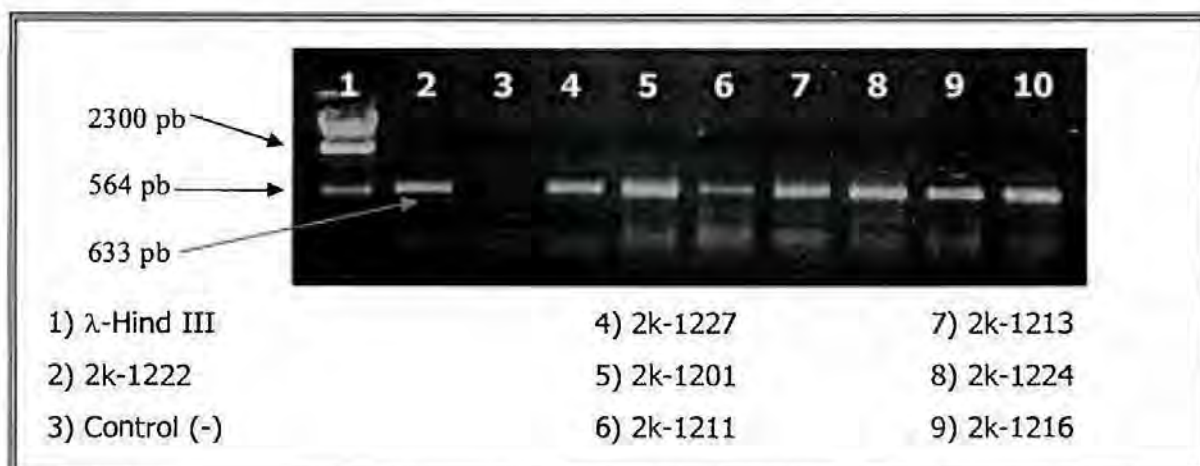


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que describe las bandas obtenidas al amplificar por PCR un fragmento del gen cp del MRFV, usando como molde ADNc del ARN total de las muestras vegetales. En el pozo 1 se muestra el marcador de peso molecular.

De las 16 muestras analizadas sólo las 7 muestras 2k-1222, 2k-1227, 2k-1201, 2k-1211, 2k-1213, 2k-1224 y 2k-1216 amplificaron el fragmento esperado por lo cual se continuó con la clonación de los siete fragmentos obtenidos por PCR.

6.2 CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR

Se obtuvieron clones para los siete fragmentos que amplificaron y se procedió a comprobar la presencia de los insertos de interés digiriendo los clones con enzimas de restricción. Se esperaba observar bandas de alrededor de 633 nucleótidos (al igual que en la reacción de PCR a partir de ADNc) que corresponden al inserto y bandas de alrededor de 3000 nucleótidos que corresponden al vector. En la siguiente figura se muestra los fragmentos obtenidos al digerir los clones con las enzimas EcoRI y Hind III.

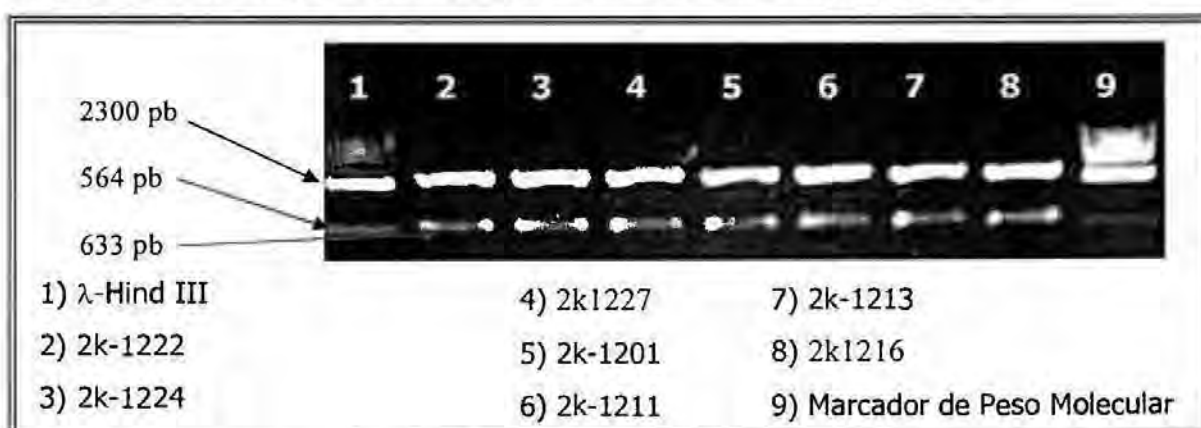


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra el patrón de bandas obtenido al digerir los plásmidos que contenían el fragmento del gen cp del MRFV.

Los tamaños de banda concordaron con lo esperado por lo que se procedió a secuenciar los siete fragmentos clonados.

6.3 SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS

Se obtuvieron las secuencias de los 7 fragmentos clonados, las cuales difieren en unos pocos nucleótidos entre sí:

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
2k1201  CTTCTCCGTA TCTCTCTCTT GTCTCTGAGA CCGCCCGGTC GCACCTCCNC GACCTCCCTT TCCAAATGGA GATCAGAGAC TTCAGGGGCT CCGCCCGGTA CCGAGGAGAC GACGATCTAT 120
2k1211  .....
2k1213  .....
2k1216  .....G.....
2k1222  .....
2k1224  .....C.....
2k1227  .....C..... 120

      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
2k1201  CCGCTCCGTC GATCAGAGAC ACTCTCTCTG CCGCCCTCCG TCAATGCGAG CTCCTCTCAG TCGAGATCTC CGTTCGGGCT TCCCTCTCTT GATCTCTCAA CCGGATCAGT TTCAGGCTCT 240
2k1211  .....A.....
2k1213  .....
2k1216  .....
2k1222  .....G.....A.....
2k1224  .....
2k1227  ..... 240

      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
2k1201  TTCGAGCTCC CCGCAGCTCT TCTCTCTCTG ATGCGCAGGA GAGCGACATC TTCTGGGCTC GTCAGATCAC CGTTCGGTGG CCTCTCTCTC TCTCTCTCAC CAGCCCGGTC CCGCCCGGAT 360
2k1211  .....C.....
2k1213  .....G.....
2k1216  .....
2k1222  .....
2k1224  .....A.....
2k1227  ..... 360

      370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
2k1201  TGGCCGAGAT GAATCCCGTC ATCAAGTCCA GCGTCTCTTA CAAAGACAGC CCGCCCTGGA CCAATGCTGT CCGCTCCGTC ACCGGTGGTG ACAACAGAT CCGGCTCTCC ACCGCTCTCA 480
2k1211  .....
2k1213  .....
2k1216  .....
2k1222  .....
2k1224  .....T.....
2k1227  .....C..... 480

      490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
2k1201  TCCCTGGGAT CATTCCCGTC TCAGCCCTCT CAGGGGCTCC CACTCCCTCC GCGTAAATCA CCGAGGCTCC AATTAATGGA GAGGAAATAC TCGCCAGAGC CCGAGCTGTT AAGCTGTATA 600
2k1211  .....
2k1213  .....A.....
2k1216  .....
2k1222  .....
2k1224  .....
2k1227  ..... 600

      610     620     630
2k1201  ACCCTCCGCC ATCCAGTCTT GCAAAATCT AAGG 633
2k1211  .....T..... 634
2k1213  ..... 633
2k1216  ..... 633
2k1222  ..... 633
2k1224  ..... 633
2k1227  ..... 633

```

Figura 8. Alineamiento de las secuencias de los siete clones obtenidos

Nótese que en la figura 8, la secuencia de la muestra 2k1211 presenta una inserción de un nucleótido en la posición 621, lo cual es una diferencia importante con respecto de las demás secuencias. Por tal motivo, se tomó la secuencia consenso (Ecuador A) y esta otra secuencia (Ecuador B) para los análisis posteriores.

6.4 ALINEAMIENTOS

En las figuras 9, 10, 11 y 12 se muestra los diferentes alineamientos de las secuencias que se analizaron.


```

USA 1 CTTCCTGATCCTCTCGTGTGGCTOGAGA-CGACCCGTCGCATTCCTCC-TCGACTCCC-TTCCATGGGAAGTTCAGGACTTCACAGGATACGTCCGCTACCGGAAACCGACGACTGTCCGCTCCGGGTACTGACCAGCTCTGTGCTCCGTACCGCCACCGGAGCTCCTCTAT 177
Mexico 1 .....C.....G.....G.....C.....C.....A..T..C..G.....T.....C 177
Guatemala 1 .....G.....G.....G.....C.....C.....T.....T.....T.....C 177
CostaRicaA 1 .....G.....G.....G.....C.....G.....A..T..C..G.....T.....C 177
CostaRicaB 1 .....G.....G.....G.....C.....G.....A..T..C..G.....T.....C 177
CostaRicaC 1 .....G.....G.....G.....A.....C.....G.....A..T..C..G.....T.....C 177
Venezuela 1 .....G.....G.....G.....C.....G.....C.....T.....C..C..G.....T.....C 177
Colombia_B 1 .....G.....C.....G.....C.....G.....C.....C.....C.....C.....T.....C 177
Colombia_A 1 .....G.....C.....G.....C.....G.....GC..C..A.....CG.....C.....T.....C..CA.....C.....T.....C 177
Bolivia_A 1 .....G.....G.....G.....C.....G.....GC..C..C.....A.....C.....C.....T.....T.....T.....C 177
Bolivia_B 1 .....G.....C.....G.....C.....G.....GC..C..C.....A.....C.....C.....T.....T.....T.....C 177
Peru_A 1 .....G.....C.....G.....C.....G.....GC..CT.....A.....G.....C.....C.....T.....T.....T.....C 177
Peru_B 1 .....C.....G.....C.....G.....G.....GC..C.....T.....A.....G.....C.....C.....T.....T.....T.....C 177
Peru_C 1 .....G.....C.....G.....C.....G.....GC..C.....T.....A.....G.....C.....C.....T.....T.....T.....C 177
Brazil_48 1 .....G.....G.....C.....G.....C.....GC..C.....T.....A.....G.....C.....C.....T.....T.....T.....C 177
Brazil_26 1 .....G.....G.....C.....G.....C.....GC..C.....T.....A.....G.....C.....C.....T.....T.....T.....C 177
Ecuador_A 1 .....G.....G.....C.....G.....C.....GC..C.....T.....A.....G.....C.....C.....T.....T.....T.....C 177
Ecuador_B 1 .....G.....G.....C.....G.....C.....GC..C.....T.....A.....G.....C.....C.....T.....T.....T.....C 177
OBDV 1 .....CT.G.....A.TG.G.....G.TCT..T..C..G.CG.ACG.....G.....G.....GCC..G..TCG.A.G.C..G..TC...A.GTT.CTC.....C..A.GA...T.TCAG...G.GC...ACCATCGGC..T.....CC 180

```

```

USA 178 GTCGAGATCTCCGTCGGCCGGTGCCTCCCAAGCCCATGTTCCAGTCCGCTGGTCTGGACACCGGCCGCACTGTCCCCGGGAGACGGCAAGGAGACCGACTACTA:GGGGGCGGTCAGATCAC:GTGGGGCGGGCTGTCTGTGTCCAGCACCCCGCGTCCCGCAGAC 357
Mexico 178 .....A.....T.....A.....C.....C.....C.....CG..C..CA..C.....G.....T.....A.....T.....C 357
Guatemala 178 .....G.....T.....A.....A.....CC.....C.....CG..C..CA..C.....T.....A.....T.....C 357
CostaRicaA 178 .....G.....T.....A.....T.....C.....C.....C.....CG..C..CA..C.....T.....A.....T.....C 357
CostaRicaB 178 .....G.....C.....T.....A.....T.....C.....C.....CG..C..CA..C.....T.....A.....T.....C 357
CostaRicaC 178 .....G.....C.....CT.....CT.....C.....C.....CT..A..CA..C.....T.....A.....T.....C 357
Venezuela 178 .....G.....T.....A.....T.....G..CC..T.....C.....G..A..CA..C.....G.....T.....T.....C 357
Colombia_B 178 .....G.....A.....A.....A.....T.....T.....C.....C.....CG..C..CA..CA.....T.....T.....T.....C 357
Colombia_A 178 .....G.....A.....T.....T.....C.....A.....T.....C.....CG..C..CA..C.....T.....T.....T.....C 357
Bolivia_A 178 .....G.....C.....C.....C.....C.....C.....CG..C..CA..C.....T.....C.....T.....C 357
Bolivia_B 178 .....G.....C.....C.....C.....C.....C.....CG..C..CA..C.....T.....C.....T.....C 357
Peru_A 178 .....T.....C.....C.....A.....T.....T.....T.....C.....A.....C.....TG..C..CA..C.....T.....C.....T.....C 357
Peru_B 178 C..C.....C.....C.....C.....C.....A.....T.....T.....C.....A.....C.....TG..C..CA..C.....CT.....T.....C 357
Peru_C 178 .....G.....C.....C.....C.....A.....T.....T.....C.....A.....C.....TG..C..CA..C.....C.....GT.....C 357
Brazil_48 178 .....T.....G.....C.....C.....A.....T.....T.....C.....A.....C.....TG..C..CA..C.....T.....C.....T.....C 357
Brazil_26 178 .....T.....G.....C.....C.....A.....T.....T.....C.....A.....C.....TG..C..CA..C.....T.....C.....T.....C 357
Ecuador_A 178 .....T.....G.....C.....C.....A.....T.....T.....C.....A.....C.....TG..C..CA..C.....T.....C.....T.....C 357
Ecuador_B 178 .....T.....G.....C.....C.....A.....T.....T.....C.....A.....C.....TG..C..CA..C.....T.....C.....T.....C 357
OBDV 181 .....C.....GAGT.....C..CCT.G..G.CG.C..G.....TCCG.....C.....GATA..T.CA.CG..A.CCAC.AC..CC..CT.C.G.....C..T.....A.TCC..CC.C..AG.CC.C..C..CA..GG.TC.GT...CG.A.C..A..C... 360

```

```

USA 358 CTGGCCCGCATGAACCCCTTCATCAAGTCCAGCGTCTCCCTACAA-GACACGCCCCGCTGGACCATGTCCGTCGCCGGTGGGGACCAACCAAGATCCCGCTCGCCAC:GGCTTCGTTCGGGGATCGTCCGCGTGTGAGCCCTCTGGGACTGCCACCCCTCTGCC 531
Mexico 358 .....T.....C.....C.....C.....C.....C.....G.....G.....G.....G.....T.....G.....T.....C 531
Guatemala 358 .....G.....C.....T.....C.....C.....C.....CG.....G.....G.....T.....G.....C.....T.....C 531
CostaRicaA 358 .....G.....C.....T.....C.....C.....C.....TG.....G.....G.....T.....G.....C.....T.....C 531
CostaRicaB 358 .....G.....C.....T.....C.....C.....C.....TG.....G.....G.....T.....G.....C.....T.....C 531
CostaRicaC 358 .....G.....C.....T.....C.....C.....C.....TG.....G.....G.....T.....G.....C.....T.....C 531
Venezuela 358 GC.G..G.....GG..CG.....C..A.....G.....GC..G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Colombia_B 358 .....A.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Colombia_A 358 .....A.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Bolivia_A 358 .....G.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Bolivia_B 358 .....G.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Peru_A 358 .....G.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Peru_B 358 .....G.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Peru_C 358 .....G.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Brazil_48 358 .....G.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Brazil_26 358 .....G.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Ecuador_A 358 .....G.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
Ecuador_B 358 .....G.....G.....T.....C.....T.....C.....T.....A.....G.....C.....G.....A.....T.....C.....A.....G.....G.....T.....C 531
OBDV 361 .....CA.....C..C.....G.....A..GC..GGG.....C.....GC.....TC.....AC.....TAT..C..A..C..TC.G..C..G.....A.....C..A..G..A..AG.TA.....C..C..C.G..T..G..C.ACA..GT.A..G.CA... 531

```

Fig 10 Alineamiento codificante (corresponde a una parte de la secuencia que codifica para la proteína de la cápside del MRFV). Además se incluye en el alineamiento parte de la secuencia que codifica para la cápside del OBVD, pues se utilizó como grupo de afuera en los análisis filogenéticos.

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	
United_Sta	1	LPDPPRVLET	PSHFLLDLPFQWKVTDFTGYVAYHGTDLLSASAVLTLTCAPYRHAELLYVEISVAPCP	PSFSKPI	MFTVVVWTPAALS	P	D				90
Mexico	1A.....A.....T.....A.....T.....A.....T.....A.....R.....	90
Guatemala	1A.....A.....T.....A.....T.....A.....T.....A.....R.....	90
Costa_Rica_A	1A.....A.....V.....T.....R.....A.....T.....R.....A.....	90
Costa_Rica_B	1A.....A.....V.....T.....R.....A.....T.....R.....A.....	90
Costa_Rica_C	1A.....N.....A.....L.....T.....A.....T.....A.....R.....	90
Venezuela	1A.....A.....T.....A.....T.....A.....T.....R.....A.....	90
Colombia_A	1A.....AA.....T.....A.....T.....A.....T.....A.....R.....	90
Colombia_B	1A.....AA.....R.....I.....T.....A.....T.....A.....R.....	90
EcuadorA	1A.....AA.....F.....T.....A.....T.....A.....R.....A.....	90
EcuadorB	1A.....AA.....F.....T.....A.....T.....A.....R.....A.....	90
Peru_A	1A.....AA.....LQ.....R.....A.....T.....A.....R.....A.....	90
Peru_B	1A.....AA.....LQ.....R.....A.....T.....A.....R.....A.....	90
Peru_C	1A.....AA.....LQ.....R.....A.....T.....A.....R.....A.....	90
Bolivia_A	1A.....AA.....L.....T.....A.....T.....A.....R.....A.....	90
Bolivia_B	1A.....AA.....L.....T.....A.....T.....A.....R.....A.....	90
Brazil_26	1A.....AA.....T.....A.....T.....A.....T.....R.....A.....	90
Brazil_48	1A.....FA.....T.....A.....T.....A.....T.....R.....A.....	90

		100	110	120	130	140	150	160	170		
United_Sta	91	GKETDYGG	RQITVGRAVLLSSTTAVPADLARMNPF	IKSSVSYNDTPRWTMSVPAVTGGDTKI	PLATAFVRGIVRVSAPSG	ATPSA				177	
Mexico	91GP.M.....T.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	177
Guatemala	91GP.M.....T.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	177
Costa_Rica_A	91GP.M.....R.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	177
Costa_Rica_B	91GP.M.....W.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	177
Costa_Rica_C	91	V.....GLIM.....I.....V.....W.....A.....A.....A.....A.....A.....	177
Venezuela	91	V.....G.M.....	R.....RNA.....	E.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	177
Colombia_A	91GP.M.....	V.....S.....	V.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	177
Colombia_B	91GP.M.....	S.....A.....I.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....	177
EcuadorA	91GP.M.....	V.....K.....	S.....	I.....	I.....A.....A.....A.....A.....	177
EcuadorB	91GP.M.....	V.....K.....	S.....	I.....	I.....A.....A.....A.....A.....	177
Peru_A	91GP.M.....AR.....A.....A.....A.....	177
Peru_B	91GP.M.....L.....A.....A.....A.....A.....	177
Peru_C	91	H.....GP.M.....M.....	N.....A.....A.....A.....A.....	177
Bolivia_A	91GP.M.....	V.....A.....A.....A.....A.....	177
Bolivia_B	91GP.M.....	V.....A.....A.....A.....A.....	177
Brazil_26	91GP.M.....A.....A.....A.....A.....	177
Brazil_48	91GP.M.....A.....A.....A.....A.....	177

Figura 11. Secuencia de aminoácidos obtenida al traducir las secuencias de nucleótidos del alineamiento codificante.

United States		TGATCCATCAAGGACCAATAATGCGAGAAAGAAAACCTGCCAGCCTTGA--GCTGGTAA--GCTGTTAAA--CCTCCGCC--CATCCATGTTT--GAAAAATCTAAGG	100
Mexico	1G.....	100
Guatemala	1G.....	100
CostaRicaA	1G.....	100
CostaRicaB	1G.....	100
Costa_Rica	1G.....A.....	100
Venezuela	1G.....	100
Colombia_B	1C.....G.....	100
Colombia_A	1C.....G.....	100
Ecuador_A	1C.....C.....CC.....	101
Ecuador_B	1C.....C.....CC.....	100
Peru_A	1T.....	100
Peru_B	1T.....	100
Peru_C	1G.....	100
Bolivia_A	1T.....	100
Bolivia_B	1T.....	100
Brazil_48	1T.....	100
Brazil_26	1G.....	100
OBDV	1	A.G..C..TCAC.G.TTTC..CAG...TTCCTTCCCGTTC.TTCPLC...CGA.CAA.G.AC.T..C.C.CTC..C..T.A.....C.CCG.TTCCCCC..CGTTC	107

Figura 12. Alineamiento no codificante. Al igual que con el alineamiento codificante se agregó parte de la región 3'-Terminal del genoma del OBDV. Aunque la región 3'-Terminal del OBDV es de mayor tamaño se dejó sólo lo que alineaba con la región 3'-terminal del MRFV

		10	20	30	40	50	60	70	80
United_States	1	CTAGAATACCCGTCGGCTGACCCCTCTTCGGCTTAGCCCGGTGGCTGCTGGTTGCGCACGCTCFC							
Mexico	1	..G.....AT.G...T.C.G..TT..T.....CC....C...CC.C...T.C...C.....C.....C.							
Guatemala	1	..G.....T.G...T.C.G..T...T..A..CC.....CCCC.TA.T...C...C..T...C.							
Costa_Rica_A	1	..G.....GTAT.G...T.C.G..T...T...C.C...CC...A.T...C...C..T...C.							
Costa_Rica_B	1	..G.....GTAT.G...T.C.G.C.T...T...C.C...CC...A.T...C...C..T...C.							
Costa_Rica_C	1	..G.....AT.G...T.C.G.C.T...T...CC.T...CC.C..A.T...C...C..T...C.							
Venezuela	1	..G.....AT.G...T.C.G..TT..T.T...CC.T..C...A.C...T.C..GCA...C.GG...C.							
Colombia_B	1	.CG...GC.ATA..CTAC.....C.....C..TTCC.....C...CCCCA.TTT.A..TCTT.TTC..TA.G.C.CT							
Colombia_A	1	.CG...GC..TA..CTA.....C..T..C..TT.C...C...CCCC.TTT.A.G.C.T.TTC..TA.G.CGC.							
Ecuador_A	1	GC.AGCGCGATA..T..C.TTTCTGCT...TC.TT.C.T...CT.TC.C..C.CT.TG.A..T.TC...T...TC.							
Ecuador_B	1	GC.AGCGCGATA..T..C.TTTCTGCT...TC.TT.C.T...CT.TC.C..C.CT.TG.A..T.TC...T...TC.							
Bolivia_A	1	..G...GC..TA...C..TT.C.GC...C.C..T..C...ATCA..CCCCT.C..T...C.....TCT.A..C.							
Bolivia_B	1	..G...GC..TA...C..TTTC.GC...C.C.TT.C...ATCA..CCCCT.C.TT...C.....CT.TCT.A..C.							
Peru_A	1	.CG...GC..TA...CT.TTTCT.C..T..C.TTT.C...T.A.CTC.CT.C.T...C...C..TCT...C.							
Peru_B	1	.CG...GC..TA...T.CT.TTTCT.C...CC.TTT.C...T.A.CTC.CT.C.T..T..C...C..TCT...C.							
Peru_C	1	.CG...GC..TA...C..TT.C.GC...C.C.TTT.CC...T..ATCCCC.C.T...C...CGATCC...C.							
Brazil_48	1	.CG...T..TA...T.C..TT.C.TGC...C.TTT.C...AT.A.CTC.CTTC.T...C...T.TCT...TC.							
Brazil_26	1	.CG...GC..TA...T.C..TT.C.TGC...C.TTT.C...TCA.CTC.CT.C.T...C...C..TCT...C.							

		90	100	110
United_States	81	GTCCGCGGTGCCCTGCCTGTAGTTC-CAA	110	
Mexico	81T.A.G...T...T	110	
Guatemala	81A.G...T...	110	
Costa_Rica_A	81CG.....A.G...TA...	111	
Costa_Rica_B	81TG.....A.G...TA...	111	
Costa_Rica_C	81	.C...TG.....A.G.A..T...	110	
Venezuela	81GG.....T.A.G...T...	110	
Colombia_B	81	...AT...C...A..GT..CT...CT...G	110	
Colombia_A	81	.CGT.TT..C...A.AGT..CG.....G	110	
Ecuador_A	81	ACT.A...C...A..TCAC.TCCC....	110	
Ecuador_B	81	ACT.A...C...A..TCAC.TCCC....	110	
Bolivia_A	81	.C...GT..C..T.C...A.....T...	110	
Bolivia_B	81	...GT..C..T.C...A.....T.TC.	110	
Peru_A	81	...GT..C..TT..T.A.....T.T.	110	
Peru_B	81	...GT..C..TT..T.A.....T...	110	
Peru_C	81	...GT..C..T.A.T.A.....T...	110	
Brazil_48	81	...GT..C..T.A...A.....T...	110	
Brazil_26	81	...GT..C..T..T.A.....T...	110	

Figura 13. Alineamiento codificante informativo.

		10	20	30	40	50
United_States	1	WDYVASAAYVECSFVAPSDGYQRAVLAVPALAFIKSNDTMTGGTVIVVST	53			
Mexico	1	A...A.....T.A...GP.M.....A.	53			
Guatemala	1	A...A.....T.A...GP.M.....A.	53			
Costa_Rica_A	1	A...A.V.....T.R...GP.M.....RA.	53			
Costa_Rica_B	1	A...A.V.....T.R...GP.M.....W.A.	53			
Costa_Rica_C	1	A.N.A.....L.T.A.V..GLIM.....I.V...W.A.	53			
Venezuela	1	A...A.....TRA.V..G..ME...RC.RNA.E...R...GA.	53			
Colombia_A	1	A..AA... ..T.A...GP.M...V.....S...V...A.	53			
Colombia_B	1	A..AA..R.....IT...GP.M...S...A..I..A.	53			
EcuadorA	1	A..AAG...F.....T.A...GP.M...V...K..S...I..I..A.	53			
EcuadorB	1	A..AAG...F.....T.A...GP.M...V...K..S...I..I..A.	53			
Peru_A	1	A..AA.....T.A...GP.M.....AR	53			
Peru_B	1	A..AA.....LQR..AT.A...GPCM...S...L.....A.	53			
Peru_C	1	A..AA.....L.T.A..HG.P.M...G.....M..N...A.	53			
Bolivia_A	1	A..AA.....L.T.A...GP.M.....V.....A.	53			
Bolivia_B	1	A..AA.....L.T.A...GP.M.....A.	53			
Brazil_26	1	A..AA.....T.A...GP.M.....A.	53			
Brazil_48	1	A..FA.....T.A...GP.M.....A.	53			

Figura 14. Alineamiento proteína cp informativo.

6.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

En la siguiente figura se puede notar que los marafivirus se ubican como un subgrupo dentro de los Tymovirus, por lo que se podría clasificar a los marafivirus como parte de los Tymovirus.

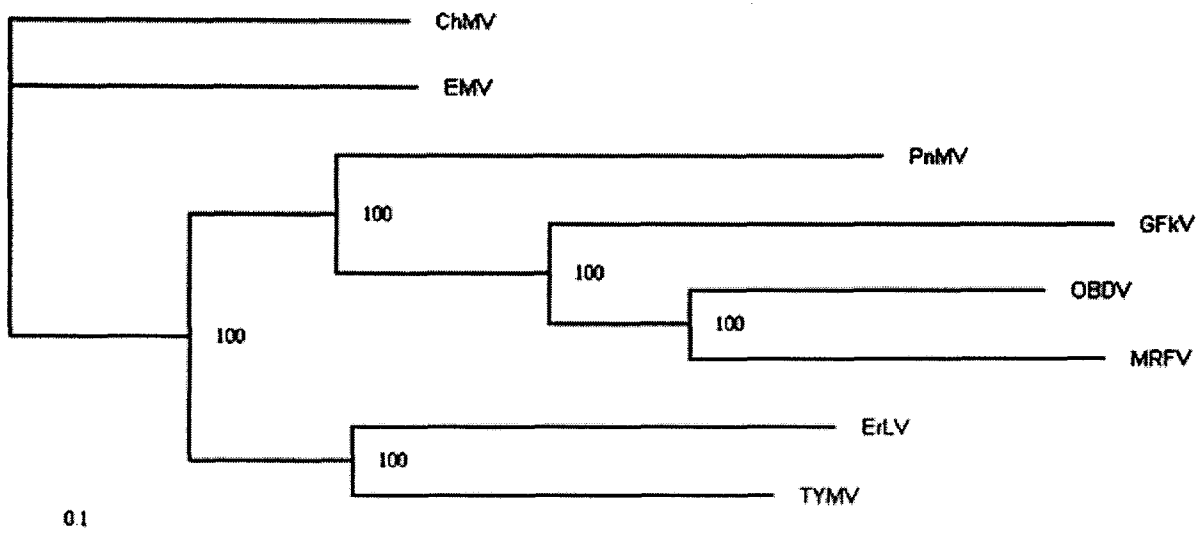


Figura 15. Árbol filogenético obtenido por el método de Maximum Likelihood utilizando las secuencias nucleotídicas de los genomas completos de algunos Marafivirus y Tymovirus. El alineamiento tiene una longitud total de 7901 sitios.

En las figuras 17 a 21 se muestran las relaciones filogenéticas entre los diferentes aislamientos del MRFV al utilizar diferentes métodos de inferencia filogenética. Aunque existen algunas leves diferencias en la topología en todos se distinguen los mismos cuatros subgrupos. Se denominaron los diferentes subgrupos como sigue: **Grupo I** (United States, México, Guatemala, Costa Rica A, Costa Rica B, Costa Rica C y Venezuela), **Grupo II** (Perú A, Perú B, Perú C, Bolivia A, Bolivia B, Brazil 26 y Brazil 48), **Grupo III** (Colombia A y Colombia B) y **Grupo IV** (Ecuador A y Ecuador B).

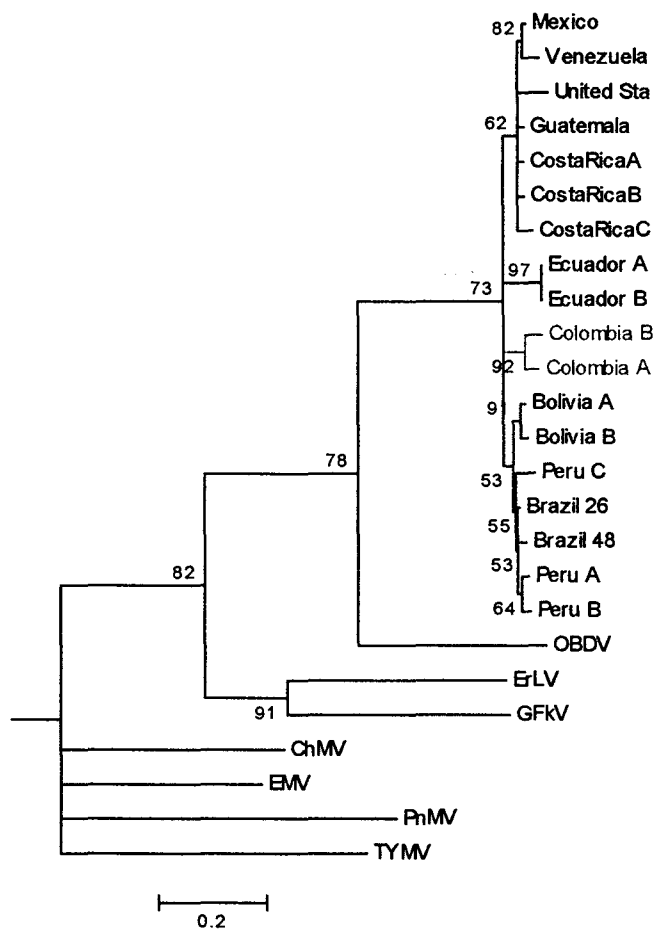


Figura 16 Árbol filogenético obtenido por el método Maximum Likelihood que relaciona a los diferentes aislamientos del MRFV con otros Marafivirus y algunos Tymovirus. El alineamiento tiene una longitud total de 691 sitios.

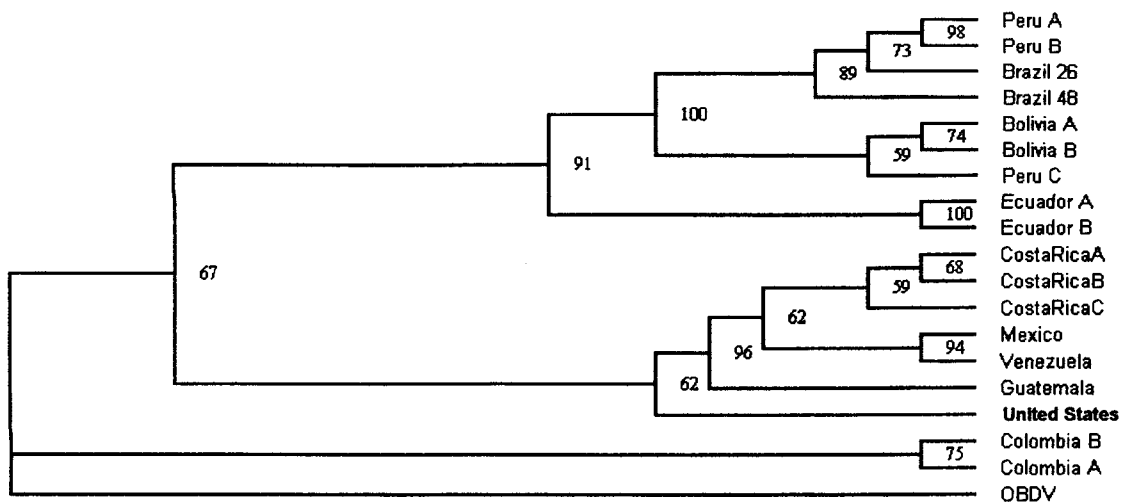


Figura 17. Árbol filogenético obtenido con el método de Maximum Likelihood y a partir de los 533 nucleótidos del alineamiento codificante.

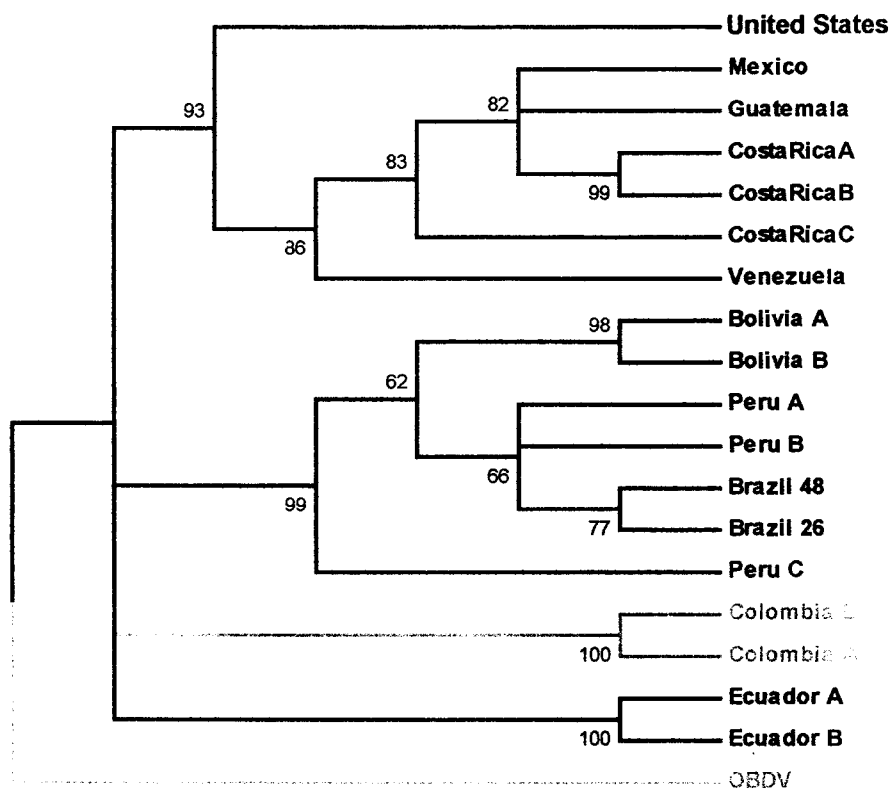


Figura 18. Árbol filogenético obtenido con el método de UPGMA y a partir del alineamiento codificante.

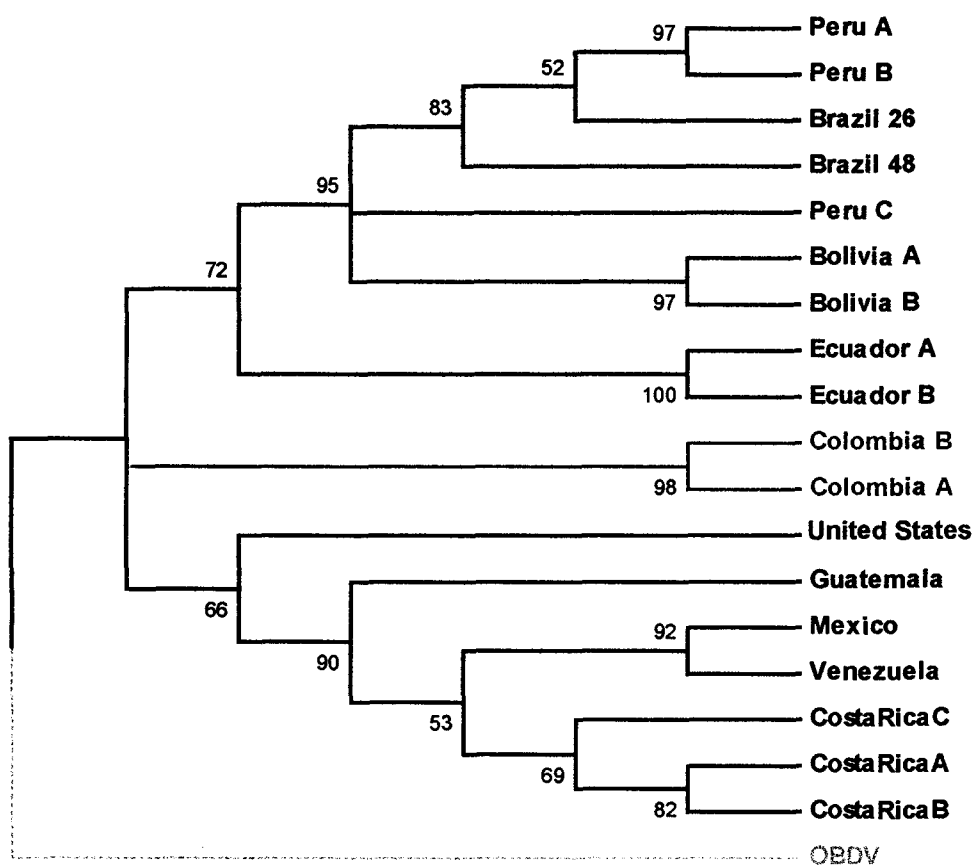


Figura 19. Árbol filogenético obtenido con el método de Neighbor-Joining y a partir del alineamiento codificante.

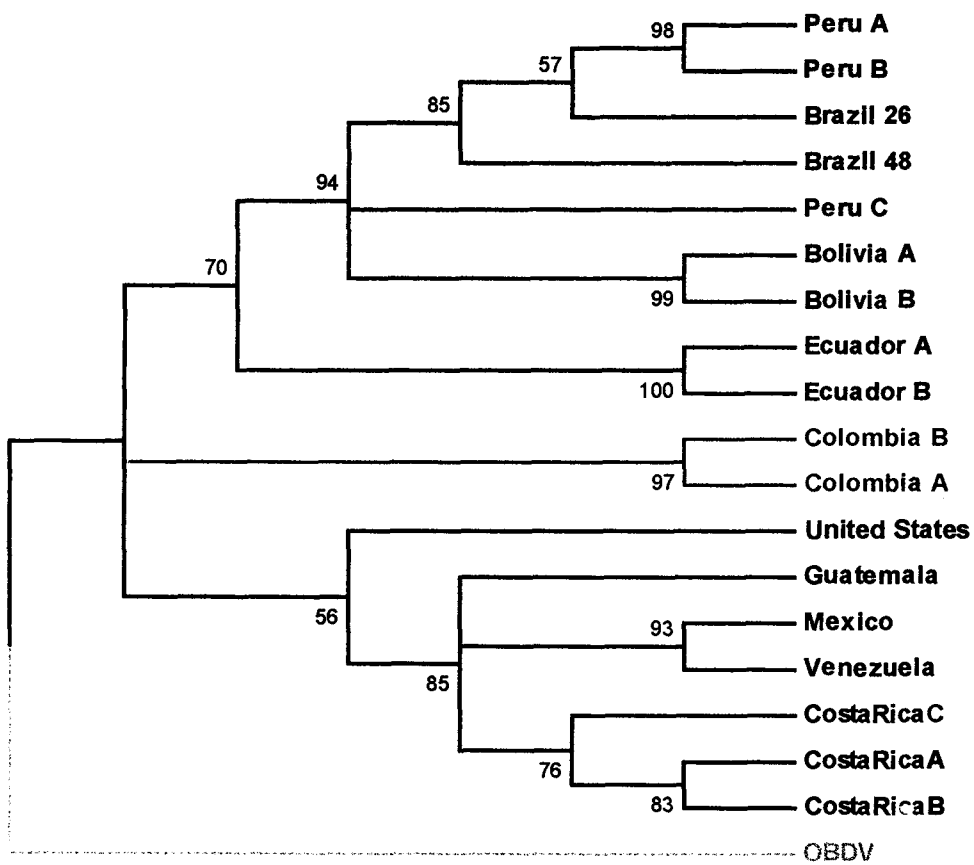


Figura 20. Árbol filogenético obtenido con el método de Mínima Evolución y a partir del alineamiento codificante.

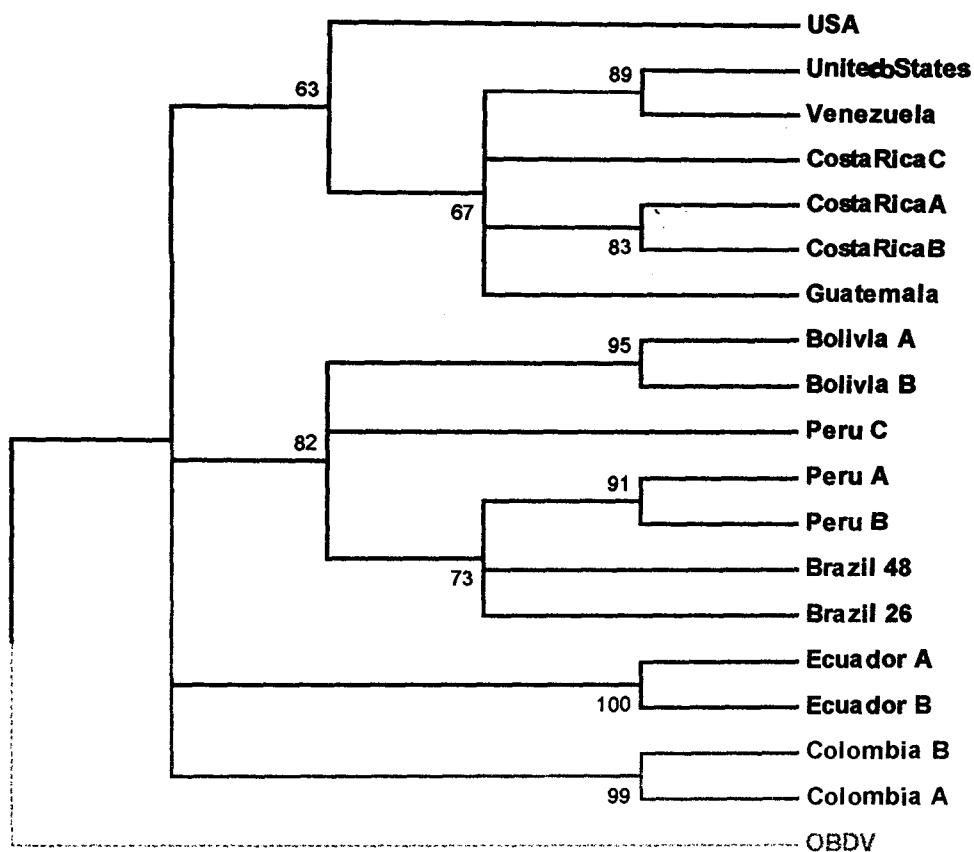


Figura 21. Árbol filogenético obtenido con el método de Máxima Parsimonia y a partir del alineamiento codificante.

En las figuras 22 a 26 se muestra las mismas inferencias filogenéticas que en las figuras 16 a 21 pero utilizando el alineamiento no codificante para el análisis.

Cabe destacar que no se observa la misma consistencia de los subgrupos del MRFV, sin embargo, presentan una leve tendencia a formarlos.

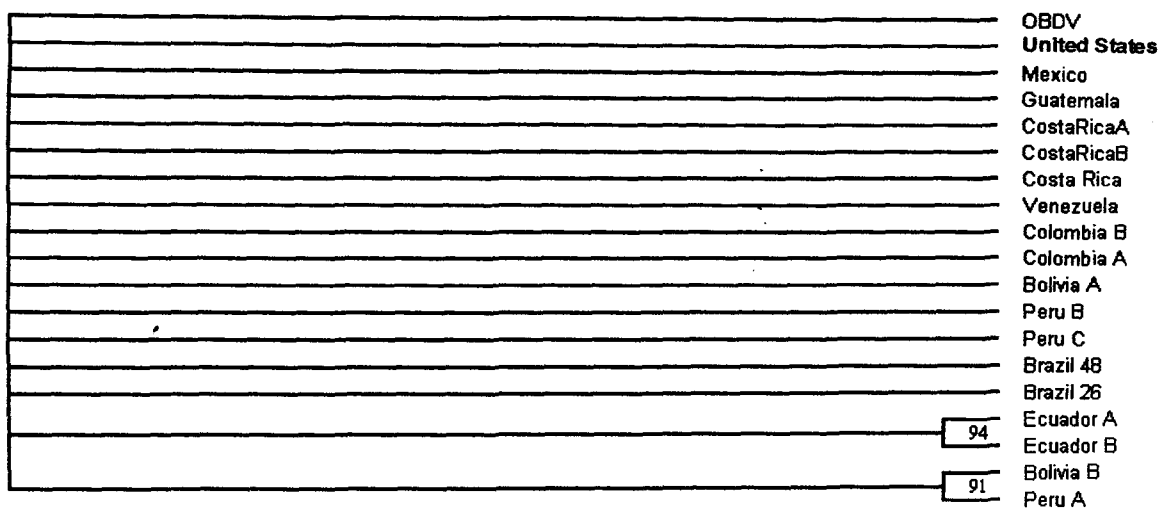


Figura 22. Árbol filogenético obtenido con el método de Maximum Likelihood y a partir los 100 nucleótidos del alineamiento no codificante.

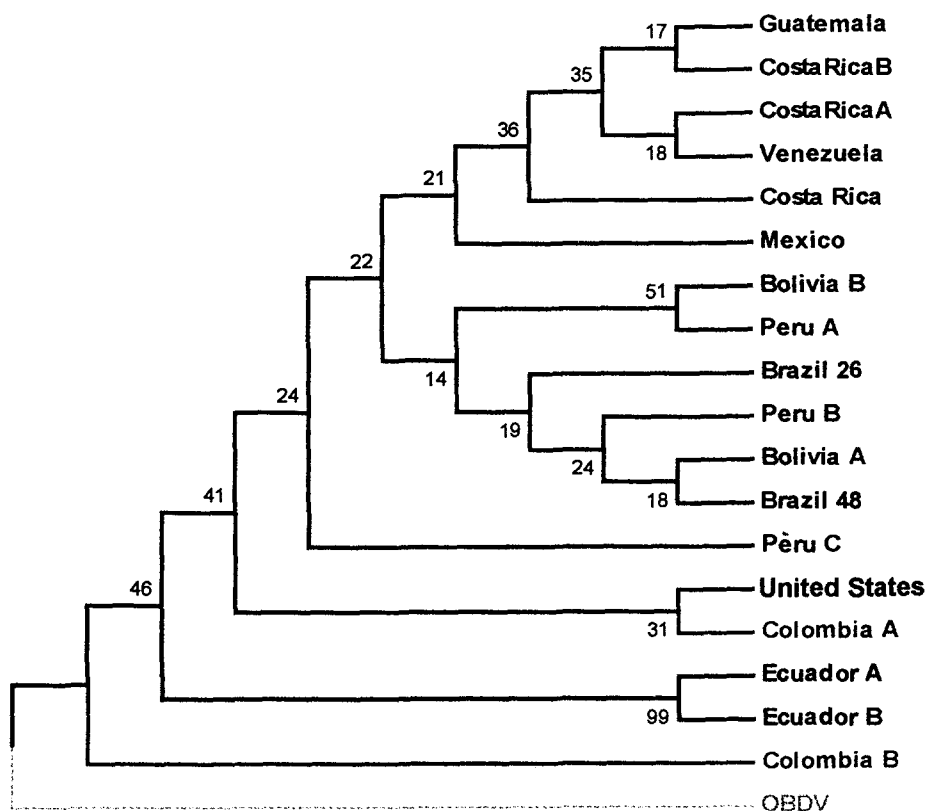


Figura 23 Árbol filogenético obtenido con el método de UPGMA y a partir del alineamiento no codificante.

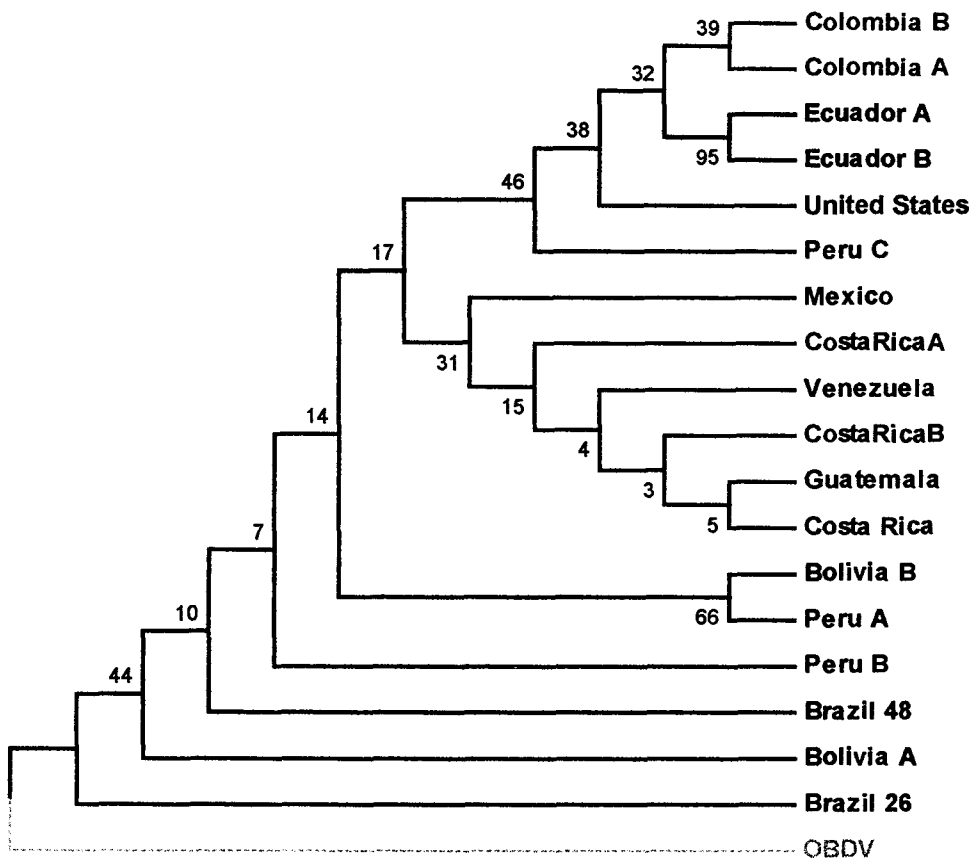


Figura 24. Árbol filogenético obtenido con el método de Neighbor-Joining y a partir del alineamiento no codificante.

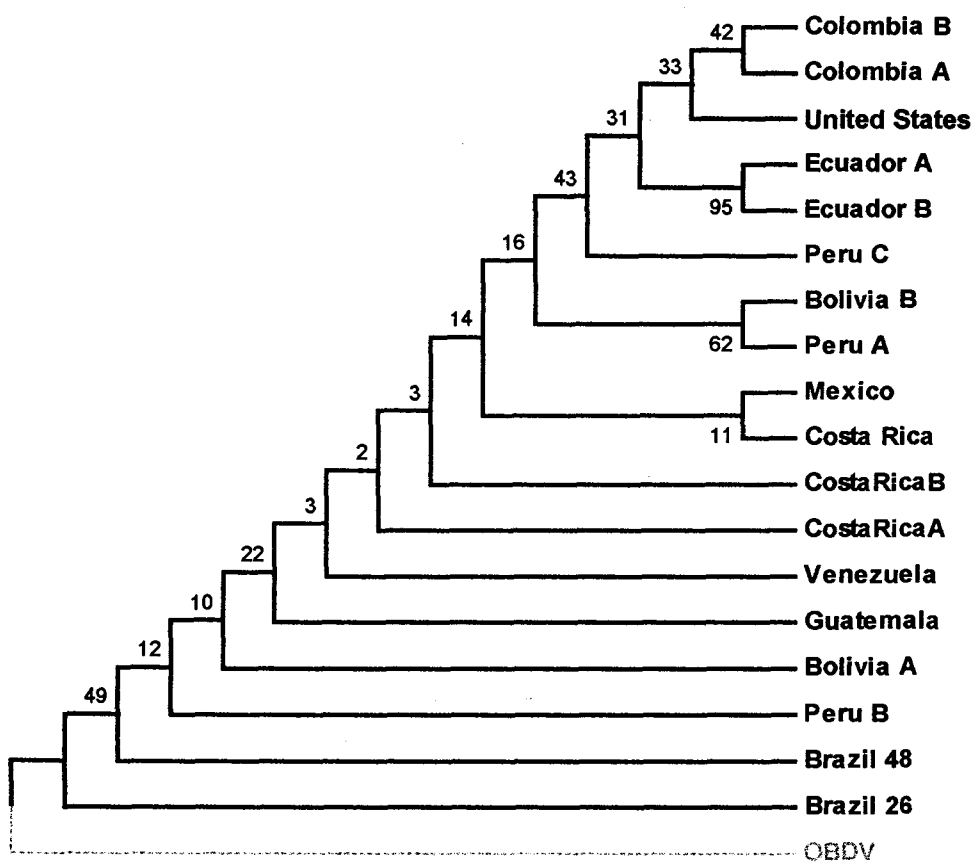


Figura 25. Árbol filogenético obtenido con el método de Mínima Evolución y a partir del alineamiento no codificante.

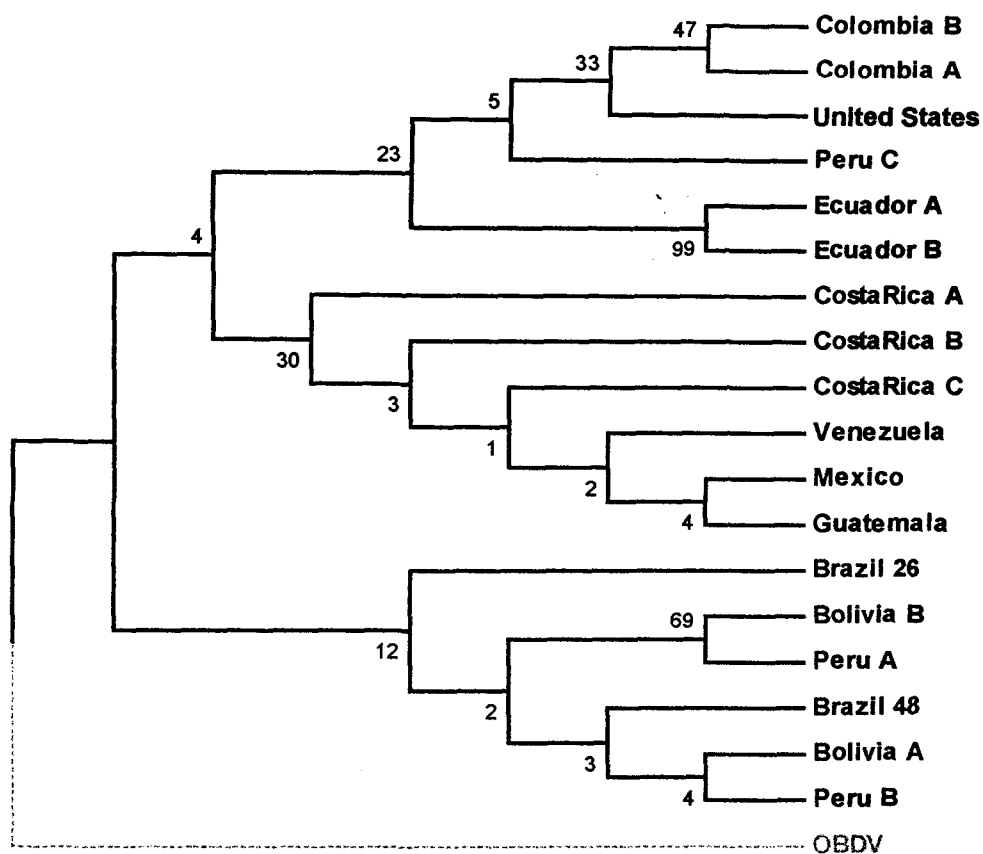


Figura 26. Árbol filogenético obtenido con el método de Máxima Parsimonia y a partir del alineamiento no codificante.

En el caso de los árboles filogenéticos obtenidos a partir del alineamiento no codificante, no se observa la misma consistencia de los subgrupos del MRFV, sin embargo, presentan una tendencia a formar los cuatro subgrupos definidos anteriormente.

6.6 ANÁLISIS DE DISTANCIAS GENÉTICAS

A continuación se presentan los valores de las distancias genéticas entre los diferentes aislamientos del MRFV y OBDV, para los alineamientos codificante y no codificante.

Cuadro 8. Distancias genéticas obtenidas a partir de las secuencias codificantes para la proteína de la cápside del MRFV y del OBDV

Aislamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1 United States	0.000																			
2 Mexico	0.065	0.000																		
3 Guatemala	0.069	0.027	0.000																	
4 Costa Rica A	0.065	0.027	0.027	0.000																
5 Costa Rica B	0.067	0.029	0.029	0.010	0.000															
6 Costa Rica C	0.084	0.041	0.045	0.045	0.035	0.000														
7 Venezuela	0.098	0.039	0.062	0.056	0.064	0.072	0.000													
8 Colombia B	0.128	0.093	0.097	0.101	0.104	0.126	0.128	0.000												
9 Colombia A	0.126	0.091	0.099	0.108	0.106	0.119	0.130	0.055	0.000											
10 Bolivia A	0.099	0.075	0.071	0.082	0.080	0.092	0.114	0.101	0.092	0.000										
11 Bolivia B	0.116	0.084	0.079	0.090	0.088	0.105	0.118	0.105	0.101	0.023	0.000									
12 Peru A	0.114	0.088	0.088	0.095	0.093	0.110	0.121	0.107	0.097	0.054	0.051	0.000								
13 Peru B	0.126	0.099	0.095	0.102	0.100	0.117	0.133	0.114	0.108	0.065	0.061	0.033	0.000							
14 Peru C	0.126	0.095	0.087	0.098	0.096	0.111	0.126	0.115	0.108	0.059	0.057	0.059	0.070	0.000						
15 Brazil 48	0.101	0.079	0.071	0.082	0.080	0.096	0.111	0.107	0.096	0.044	0.044	0.041	0.047	0.059	0.000					
16 Brazil 26	0.099	0.069	0.069	0.075	0.073	0.090	0.100	0.088	0.084	0.033	0.036	0.025	0.031	0.045	0.019	0.000				
17 Ecuador A	0.131	0.104	0.110	0.115	0.113	0.122	0.144	0.127	0.123	0.094	0.101	0.099	0.106	0.115	0.094	0.088	0.000			
18 Ecuador B	0.131	0.104	0.110	0.115	0.113	0.122	0.144	0.127	0.123	0.094	0.101	0.099	0.106	0.115	0.094	0.088	0.000	0.000		
19 OBDV	0.622	0.559	0.610	0.637	0.635	0.636	0.660	0.636	0.623	0.625	0.644	0.654	0.654	0.638	0.647	0.636	0.654	0.654	0.000	

Cuadro 9. Distancias genéticas obtenidas a partir de las secuencias no codificantes para la proteína de la cápside del MRFV y del OBDV

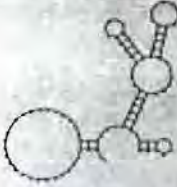




Aislamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1 United States	0.00																			
2 Mexico	0.06	0.00																		
3 Guatemala	0.04	0.02	0.00																	
4 Costa Rica A	0.04	0.02	0.00	0.00																
5 Costa Rica B	0.04	0.02	0.00	0.00	0.00															
6 Costa Rica C	0.05	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00														
7 Venezuela	0.04	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00													
8 Colombia B	0.08	0.10	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09	0.00												
9 Colombia A	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.06	0.00											
10 Bolivia A	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.09	0.05	0.00										
11 Bolivia B	0.05	0.05	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.11	0.08	0.02	0.00									
12 Peru A	0.04	0.04	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.10	0.06	0.01	0.01	0.00								
13 Peru B	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.09	0.05	0.00	0.02	0.01	0.00							
14 Peru C	0.03	0.05	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.11	0.05	0.02	0.04	0.03	0.02	0.00						
15 Brazil 48	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.09	0.05	0.00	0.02	0.01	0.00	0.02	0.00					
16 Brazil 26	0.04	0.04	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.10	0.06	0.01	0.03	0.02	0.01	0.03	0.01	0.00				
17 Ecuador A	0.08	0.10	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.11	0.08	0.06	0.09	0.08	0.06	0.06	0.06	0.08	0.00			
18 Ecuador B	0.08	0.10	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.11	0.08	0.06	0.09	0.08	0.06	0.06	0.06	0.08	0.00	0.00		
19 OBDV	1.28	1.18	1.12	1.12	1.12	1.18	1.12	1.32	1.31	1.12	1.22	1.17	1.12	1.23	1.12	1.12	1.26	1.30	0.00	

En los cuadros de distancias se destacó con un azul los menores valores de distancia entre el OBDV y los diferentes aislamientos del MRFV.

6.7 ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DEL ARN DE LA REGIÓN NO CODIFICANTE

Se obtuvo la estructura secundaria de la región no codificante para cada uno de los aislamientos para observar si son conservadas al igual que las secuencias de esta región.

Cuadro 10. Estructuras secundarias del ARN de las regiones no codificantes.

Estructura	Casos en las que se observó
	<p>Se observó para el aislamiento United States y fue estable cuando se calculó a 50° (ΔG -9.97) y hasta los 0° C (ΔG -38.28).</p>
	<p>Se observó para el aislamiento México y fue estable cuando se calculó a 50° (ΔG -42.2) y hasta los 0° C (ΔG -11.78).</p>
	<p>Fue estable entre 0°C y 50 °C para Guatemala (ΔG -36.77 y -11.78), Costa Rica A (ΔG -36.66 y -11.78), Costa Rica B (ΔG -36.66 y -11.66), Costa Rica C (ΔG -37.65 y 11.99) y Venezuela (ΔG -36.77 y 11.78). Entre 35 °C y 50 °C fue estable para Bolivia A (ΔG -15.2 y -8.29), Bolivia B (ΔG -16.42 y -9.39), Perú A (ΔG -16.42 y -9.39), Perú B (ΔG -15.2 y -8.29), Brazil 26 (ΔG -14.49 y -9.01) y Brazil 48 (ΔG -15.2 y -8.29).</p>
	<p>Esta estructura fue estable entre 0 °C y 50 °C para los dos aislamientos de Colombia A (ΔG -35.82 y -9.97), Colombia B (ΔG -37.5 y -8.43), Ecuador A (ΔG -31.97 y -8.15), Ecuador B (ΔG -30.95 y -8.15) y Perú C (ΔG -36.72 y -10.18).</p>
	<p>Esta estructura fue estable entre los 0 °C y los 35 °C para Bolivia A (ΔG a 0° = -35.85), Bolivia B (ΔG a 0° = -36.18), Perú A (ΔG a 0° = -36.18), Perú B (ΔG a 0° = -35.85), Brazil 26 (ΔG a 0° = -35.85) y Brazil 48 (ΔG a 0° = -35.85).</p>

Para todas las secuencias analizadas se observó una estructura en forma de Y cuando se calculó bajo cierto rango de temperatura.

6.8 PRUEBAS DE NEUTRALIDAD Y SELECCIÓN

De acuerdo a la prueba de neutralidad de Tajima, se rechazó la hipótesis de neutralidad para los datos, cuando se analizaron las tres posiciones de cada codón y cuando se analizaron dos de las tres posiciones. Sin embargo, cuando se analizó la tercera posición se aceptó la hipótesis de neutralidad.

Se aplicó la prueba de Z bajo la hipótesis de neutralidad, selección positiva y purga genética. Se rechazó las hipótesis de neutralidad y purga genética, pero se aceptó la hipótesis de selección positiva; por lo cual, los modelos de sustitución que se fundamentan en la teoría neutral es posible que no se ajusten de la mejor manera a este caso y por lo tanto, el análisis filogenético puede no ser confiable debido a que los métodos utilizados se fundamentan en la teoría neutral de la evolución (Phillips *et al.* 2000).

7. DISCUSIÓN

De acuerdo con Moya *et al.* (1993) las poblaciones de virus de ARN no se comportan tal como lo describe la teoría neutral de la evolución, sino que presentan una fuerte selección positiva. Por lo tanto, el análisis filogenético debe hacerse con mucho cuidado.

Según Hammond *et al.* (1997) existe tres subgrupos del MRFV. La formación de los subgrupos y la relación que se pueda observar entre ellos depende del grupo de afuera que se use. Por tal motivo, se tomaron las secuencias de los genomas de algunos Marafivirus y Tymovirus (Fig. 15). Al hacer un árbol filogenético a partir de estas secuencias, se observa que los marafivirus son un subgrupo dentro de los Tymovirus y que el OBDV se encuentra en una rama agrupado únicamente con el MRFV; asimismo, el OBDV se encuentra más cerca del punto de divergencia que el MRFV, por lo que se puede decir que el OBDV es más parecido al ancestro (desde el cual divergieron el MRFV y el OBDV) que el MRFV.

De acuerdo al árbol filogenético obtenido por Hammond *et al.* (1997) (el cual se describe en la figura 4). Los aislamientos de Colombia se sitúan en la parte externa del árbol, lo que podría ser indicio de que el MRFV se haya originado en Colombia y no en México o Guatemala, tal como cree Hammond *et al.* (1997). Sin embargo, los árboles que se obtuvieron se organizan de forma diferente; ya no se observan los aislamientos de Colombia más cercanos al OBDV y hay cuatro grupos bien definidos.

Fargette *et al.* (2004) observaron que había correlación entre la distancia genética y la forma en que se cree que se dispersó el RYMV; por lo tanto, las distancias genéticas pueden servir para inferir la ruta de dispersión de un virus. De acuerdo a esto es

interesante que estos subgrupos estén bien definidos, pues si el vector puede dispersarse por el viento largas distancias como menciona Kogel *et al.* (1996), entonces se esperaría que a partir del sitio de origen del MRFV (que por hipótesis es México o Guatemala), los diferentes aislamientos vayan mostrando más divergencia conforme se va más hacia el sur. Esto claramente no es así, pues los cuatro diferentes grupos parecen tener una distancia muy similar con respecto al OBDV; tal como se describe en la figura 16, la cual es un árbol filogenético obtenido por el método de UPGMA (este es un método basado en distancias genéticas por lo que es útil para observar distancias entre grupos).

Sin embargo, cabe destacar que los grupos I, II, III y IV describen cierta agregación geográfica, pues el grupo I corresponde a los aislamientos de la región norte según la distribución del MRFV en América, el grupo II concierne a los aislamientos de la región sur y los grupos III y IV están conformados por los de la región central. Esto se puede apreciar mejor en la siguiente figura.

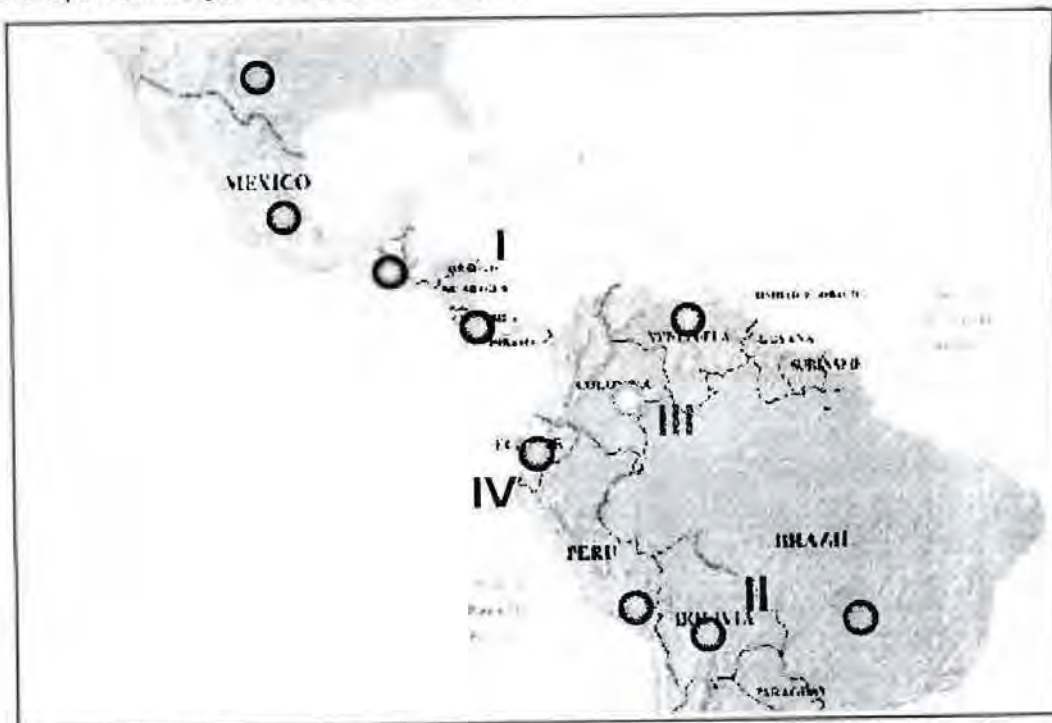


Figura 27. Distribución de los diferentes subgrupos del MRFV en América.

En la figura 27 se puede notar que existe una cadena montañosa que divide al continente. Esta cadena montañosa separa al grupo I del III y al grupo IV del III. Asimismo, los Andes se extienden entre los grupos II y IV.

Oberste *et al.* (1999) en un trabajo sobre el *Venezuelan equine encephalitis virus* determinaron que las montañas en América Central pueden ser suficientes para producir un aislamiento geográfico entre la región Pacífico y Caribe; sin embargo, puede haber mezcla de las poblaciones en la región cercana al lago de Nicaragua, debido a la baja altura del relieve. Considerando lo anterior, se plantea la hipótesis de que las barreras geológicas influyen en la diversificación del MRFV.

El grupo IV (el cual corresponde al MRFV de Ecuador) es el aislamiento que presenta las mayores distancias con respecto a los demás (Cuadro 8). Este hecho podría explicarse debido a que las muestras fueron colectadas a una altura de 3000 msnm, lo que puede ser una barrera geográfica bastante importante para el movimiento del insecto vector. De acuerdo con Kogel *et al.* (1996) el insecto vector es susceptible a la altura, sin embargo, el microclima de las plantaciones de maíz pueden darle las condiciones necesarias para que se desarrolle. De esta forma, es posible que se genere un aislamiento del vector en la zona alta de Ecuador. Por su parte, Rodríguez *et al.* (1996) concluyeron que distintos factores ambientales determinan los diferentes subgrupos del VSV en América, por lo que es posible que en el caso del MRFV no sólo el relieve, sino que también otros factores ecológicos intervengan en la diferenciación de los cuatro subgrupos mencionados.

Hammond *et al.* (1997) menciona que la parte codificante de las secuencias analizadas es menos conservada que la parte no codificante. Por ello, se hizo análisis

filogenéticos por separado. Además, se utilizó diferentes métodos, pues algunos utilizan un modelo de distancias (UPGMA y Neighbor-Joining), otros utilizan modelos que minimizan el tamaño y las longitudes de las ramas del árbol (Máxima Parsimonia y Mínima Evolución) y Maximum Likelihood se apoya en un modelo probabilístico y evolutivo. Puesto que los virus de ARN no se comportan de acuerdo a la teoría neutral, puede que el mejor método no sea Maximum Likelihood o Máxima Parsimonia, tal como lo es en la mayoría de otros casos (Swofford, 1996).

En las figuras 17 a 21 se muestra los árboles filogenéticos, según los diferentes métodos de inferencia y utilizando la región codificante. En general se observa que hay cuatro subgrupos del MRFV y los aislamientos ecuatorianos presentan algunas similitudes con el subgrupo 3.

Cuando se utiliza la región no codificante también se pueden obtener las mismas conclusiones, aunque existen casos en donde algunos aislamientos se salen del patrón esperado (tal como es el caso de aislamiento United States, pues parece agrupar con aislamientos de la región sur del continente). Esto es un buen indicio de la consistencia de los subgrupos del MRFV, ya que se observa la misma relación en una región codificante que está sujeta a selección y una región no codificante que en principio no sufre selección o la sufre en diferente forma.

A partir de lo anterior no se puede comprobar la hipótesis de que el MRFV se haya originado en México o Guatemala, pues lo ideal sería que el grupo que se encuentre más cercano al OBDV fuese el I. No obstante, cuando se obtiene las distancias entre los diferentes pares de secuencias (Cuadros 8 y 9), se observa que las menores distancias entre el OBDV y los diferentes aislamientos se dieron para México y Guatemala cuando se usó la región codificante. Aunque, para la región no codificante hubo varios aislamientos

con la misma distancia con respecto al OBDV, cabe destacar que entre éstos aislamientos se encontraba Guatemala.

Esto puede ser un indicio de que la hipótesis de un origen en México o Guatemala es cierta, pero falta un poco más para probarla.

Fargette *et al.* (2004) analizaron las secuencias de varios aislamientos del RYMV y para algunos sitios del alineamiento de éstas se evidenció la existencia de dos grupos principales, uno en la región norte del área de estudio y en otro en la sur. Por lo tanto, si se observa el alineamiento codificante informativo y el alineamiento proteína cp informativo (Figuras 13 y 14) se puede apreciar que existen algunos sitios en donde los aislamientos se pueden subdividir en región norte y región sur. Por tal motivo, se reordenó éstos sitios y se tomó en cuenta sólo aquellos en donde había una o más secuencias diferentes al consenso. Posteriormente, se eliminó los sitios en donde las secuencias que diferían del consenso pertenecían al mismo sitio (Por ejemplo Ecuador o Colombia) y eran similares entre sí. De esta forma, se obtuvo lo siguiente:

```

United States GGGTTTACGTTGCTGTAACGGGAGGTCCGCCCTGTGTCTTGCCCGGCTTGATTTCG
México AGTTTACGGTCCGGTCCGGTCCGTCCGCCCTGTGTCTTGCCCTGTGTTTTGCTTGGTCGCCTCCCA
Guatemala GATTTACGGTACGGTCCGGTCCGTCCGCCCTGTGTCTTGCTCGGTCCGCTCCTA
Costa Rica A AATTTACGGTCCGGTCCGGTCCGTCCGCCCTGTGTCTTGCCCTGTGCTTGCTCCGTCCGTTCCCTA
Costa Rica B AACTTACGGTCCGGTCCGGTCCGTCCGCCCTGTGTCTTGCCCTGTGCTTGCTCCGTCCGTTCCCTA
Costa Rica C AACTTACGGTCCGGTCCGGTCCGTCCGCCCTGTGTCTTGCCCTGCCTCTTGCTCCGTCCGCTCCCA
Venezuela AAGTTTACGGTCCGGTCCGGTCCGTCCGCCCTGTGTCTTGCCCTGTGTTTTGCTTGGTCGCCTCCGA
Colombia A CTCCGCTATGTTCCGTCCGGCCATTCCCTCTGCTCCGCCCTGCTTCTGCCTGACTTCCTCCTG
Colombia B CTCCGCTACGTTCTTCCGCCCAATCCCTCTGCTCCGCCCTTATTCCAATCCGCTCCCTCCTG
Ecuador A TCCCGCTACGTTCACTTCTCGTCCCTCTTCTTCTTGTGTCAATCCAACCGGTCCGCCACCA
Ecuador B TCCCGCTACGTTCACTTCTCGTCCCTCTTCTTCTTGTGTCAATCCAACCGGTCCGCCACCA
Perú A GCCCGCTACGTTCACTTACTTCGTTCTCCCTCCCATCTGCCTTGTGCTCCGTCCGCTCCTA
Perú B GCCCGCTACGTTCACTTACTTCGTTTTTCTTTTGCCTGTGTCTTGCTTGGTCTCCTCCTA
Perú C GCCCGCTACGTTCACTTACTTCGTTTTTCTTTTGCCTGTGTCTTGCTTGGTCTCCTCCTA
Bolivia A GCCCGCTACGTTCACTTACTTCGTTTTTCTTTTGCCTGTGTCTTGCTCGGTCTCCTCCTA
Bolivia B GCCCGCTACGTTCACTTACTTCGTTTTTCTTTTGCCTGTGACTTGCCCGGTCCGCTCCTA
Brazil 26 GCCCGTTTACGTTCACTTACTTCGTTTTTCTTTTCACTGTGTCTTGCTCGATCCGCTTTTA
Brazil 48 GCCCGCTACGTTCACTTACTTCGTTTTTCTTTTGCCTGTGTCTTGCTCGGTCCGCTCCTA

```

Figura 28. Alineamiento cp informativo luego de haber reordenado y eliminado algunos sitios.

En la figura 28 se denotó con color azul los casos en que se observó el mismo nucleótido para las secuencias de la región norte, con verde los casos en que se presentó el mismo nucleótido para las secuencias de la región sur, con color ámbar cuando hubo similitudes entre las secuencias de la región central y en amarillo los casos en que la secuencia del aislamiento United States fue similar a otras secuencias.

A partir de la figura 28 se puede entender que con forme el MRFV se fue moviendo desde su lugar de origen (en la región norte) hacia el sur se acumularon algunas mutaciones que luego fueron fijadas. Esto se evidencia en que (en general) cuando se observa un nucleótido en la región norte en alguno de los sitios del alineamiento, este nucleótido se mantiene hasta llegar a una de las secuencias de la región sur. Además, debido a la forma escalonada en la que se observa este fenómeno (según la figura 28) se puede suponer que el MRFV (en efecto) se originó en algún lugar de la región norte, la cual va desde México hasta Costa Rica.

En la figura 28 se destacó los casos en que había similitudes entre las secuencias de la región central debido a que el MRFV se dispersó por América hace mucho tiempo y se esperaría que haya mutaciones fijadas posteriormente al fenómeno de dispersión. Es decir, luego de que el virus se asentó en una región, siguió un proceso de adaptación en donde nuevas mutaciones se fijarían dentro de la subpoblación y es probable que las similitudes en la región central se deban a este proceso de asentamiento del virus.

También se resaltó los casos en que había similitud entre el aislamiento United States y otros aislamientos, pues a pesar de que United States agrupa con los aislamientos de la región norte (México hasta Venezuela), en varios sitios se parece a secuencias de la región sur, lo cual se puede deber al azar, o bien, que el MRFV haya llegado posteriormente a Estados Unidos o que la población viral de Estados Unidos haya tenido contacto con virus de la región sur y se haya llevado a cabo recombinación.

Anteriormente se señaló que la región no codificante era más conservada que la región codificante. Esto no es muy raro si la región no codificante tiene alguna función en la regulación de la expresión viral. Para poder determinar si este es el caso, se obtuvieron las estructuras secundarias del ARN de la región no codificante. De acuerdo al cuadro 10, en todos los casos se observó una estructura en forma de Y, la cual, no fue muy estable para algunos aislamientos de la región sur; pues la estructura cambió cuando se disminuyó la temperatura a la que se calculó. La falta de estabilidad se puede entender en términos de que en la estabilidad de la estructura secundaria interviene toda la molécula de ARN viral y no sólo un fragmento. Debido a la conservación de esta estructura en forma de Y, se cree que es posible que esté involucrada en algún proceso de regulación de la expresión del genoma viral, pues ya se han informado de algunos casos en los que estructuras tridimensionales en el ARN de virus sirven como señales de regulación (Hull, 2002).

Los virus de ARN no se comportan de una forma esperada por la teoría neutral de la evolución, si embargo, se procedió a realizar los análisis filogenéticos por los métodos descritos (los cuales son todas las aplicaciones de la teoría neutral), por la ausencia de métodos de inferencia filogenética para virus de ARN.

Según las pruebas de neutralidad y selección que se aplicaron, se comprueba que no es aplicable la teoría neutral para este caso, debido a que se evidenció la presencia de una fuerte selección positiva y la teoría neutral no acepta la existencia de las fuerzas de selección. No obstante, la hipótesis de neutralidad sí es aplicable para las terceras posiciones de codón del alineamiento codificante. Si se utiliza sólo éstas posiciones para hacer un análisis filogenético se disminuye en gran medida la información (se reduce la cantidad de sitios analizados a la tercera parte). Además, el número de sitios informativos

en este alineamiento es de 100, por lo que se contaría en principio con unos 30 sitios para hacer la inferencia.

De todas formas, si se realiza un análisis filogenético usando sólo las terceras posiciones de codón bajo el método de Máxima Parsimonia se obtiene el siguiente árbol:

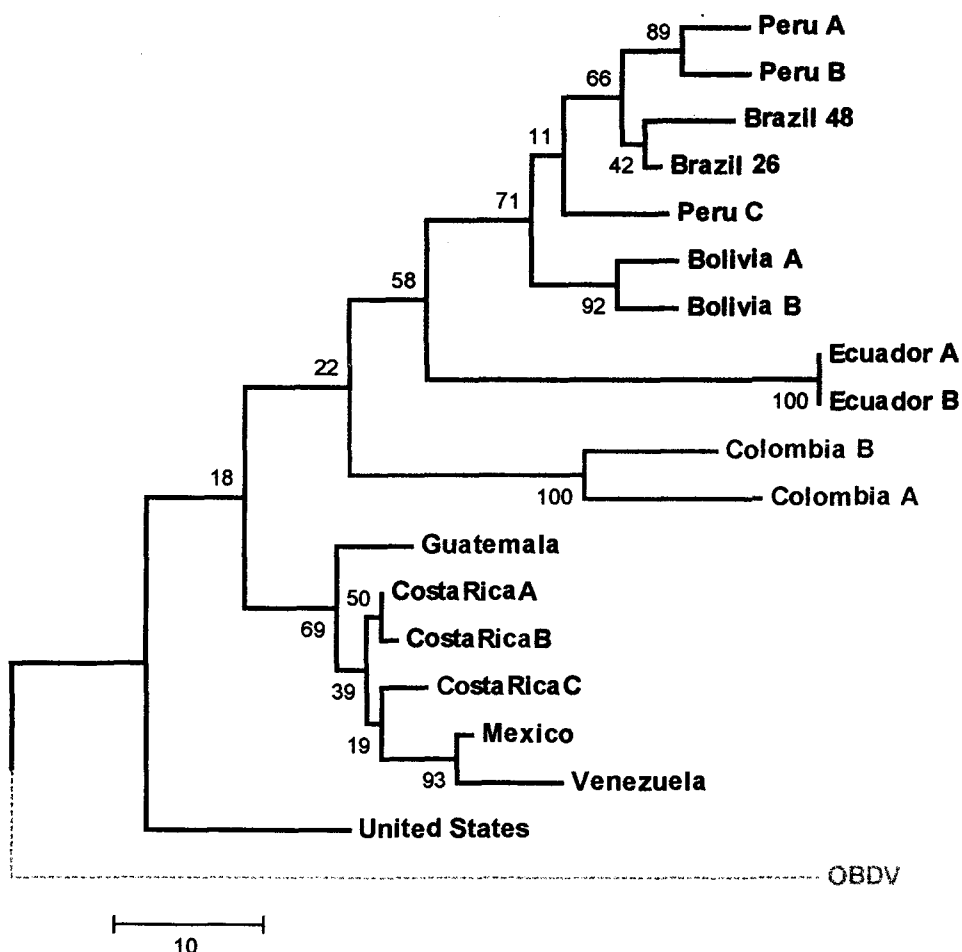


Figura 29. Árbol filogenético obtenido por máxima parsimonia y utilizando los terceros sitios de codón del alineamiento codificante.

En el árbol de la figura 29, las longitudes de las ramas representan la distancia genética (o bien el tiempo de divergencia según la teoría neutral) y los números entre las ramas el porcentaje de las veces en que se observó la topología de la rama luego de realizar 500 bootstrap.

Como se esperaba, los porcentajes de los bootstrap son muy bajos, por lo cual, si se supone que un valor aceptable para un bootstrap es de 85% (Strimmer y Haesler, 1996), el árbol que se muestra no es fiable en la mayoría de sus ramas. Sin embargo, en este árbol, el grupo que se muestra más afuera es el grupo 1, en el cual se destaca el aislamiento USA como el más diferente (lo cual es evidente si se observa los alineamientos). Además, el grupo 1 es el más cercano al grupo de afuera y como se mencionó con anterioridad, esto puede ser un indicio de que sea el grupo más similar al ancestro en común con el OBDV; y por lo tanto, el más viejo. También cabe destacar que los subgrupos se organizan de forma tal que es visible que si el virus se originó en la región norte, luego se fue moviendo y divergiendo hasta que llegó a la región más al sur (grupo 2).

De acuerdo a este árbol, se cumplen las hipótesis acerca del origen y evolución del MRFV. Sin embargo, desgraciadamente la corta secuencia que se analizó no es suficiente para poder soportarlas de la manera adecuada.

En la figura 13 se señaló dentro de un cuadro algunos aminoácidos pertenecientes a los aislamientos de Ecuador y Colombia. En un caso se observó similitud entre Colombia A y las secuencias ecuatorianas, en otro similitud entre las dos Colombianas y las Ecuatorianas, en otro similitud entre Colombia B y las secuencias ecuatorianas y en un sitio de la región no codificante se observó similitud entre Colombia A y las secuencias ecuatorianas. Esto puede ser indicio de que la población viral de Colombia y la de Ecuador tienen un origen común y luego hubo mutaciones en las secuencias de Colombia, o bien, tienen un ancestro común y ha existido recombinación entre la población viral de Colombia y la de Ecuador.

No hay suficiente información para poder verificar una hipótesis u otra, pero el estudio de recombinación en poblaciones del MRFV puede ser un tema interesante en trabajos futuros.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo al trabajo realizado se puede concluir que existen cuatro diferentes subgrupos del MRFV en América y que la cadena montañosa que divide al continente americano es una de las posibles causas de la formación de los cuatro subgrupos del MRFV. Además, la región 3' terminal del genoma del MRFV posee una secuencia y estructura conservada, lo que sugiere que puede tener alguna función en la expresión del genoma viral.

La definición de estos cuatro subgrupos puede ser de interés para la elaboración de planes de manejo del virus, pues si se desea obtener una variedad de maíz resistente al MRFV será necesario hacer ensayos de resistencia para los cuatro subgrupos del MRFV. Asimismo, es probable que las variedades comerciales de maíz se comporten de forma diferente ante los aislamientos virales de una región u otra, por lo que es necesario tomar en cuenta esto cuando se planea iniciar el cultivo de una variedad en una región diferente.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ancalmo, O. y WC. Davis. 1961. Achaparramiento (corn stunt). *Plant Dis. Rep.* 45:281.
- Bakonyi, T., E. Grabensteiner, J. Kolodziejek, M. Rusvai, G. Topolska, W. Ritter y N. Nowotny. 2002. Phylogenetic Analysis of Acute Bee Paralysis Virus Strains. *App. And Env. Microbiol.* 68: 6446–6450.
- Barrett, W., R. Nichols. y J. Breuer. 2002. Phylogenetic Analysis of Varicella-Zoster Virus: Evidence of Intercontinental Spread of Genotypes and Recombination. *J. Virol.* 76: 1971–1979.
- Bergstrom, C., P. McElhany y L. Real. 1999. Transmission Bottlenecks as determinants of virulence in rapidly evolving pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:5095-5100.
- Bradfute, O., J. Tsai y B. Falk. 1985. Maize rayado fino and maize dwarf mosaic viruses in Ecuador. *Plant Dis.* 69: 1078-1080.
- Bradfute, O., L. Nault, D. Gordon, D. Robertson, R. Toler y C. Bootroyd. 1980. Identification of maize rayado fino virus in United States. *Plant Dis.* 64: 50-53.
- Burt, F., A. Grobbelaar, P. Leman, F. Anthony, G. Gibson, y R. Swanepoel. 2002. Phylogenetic Relationships of Southern African West Nile Virus Isolates. *Emerg. Infec. Dis.* 8: 820-826.

Bustamante, P., R. Hammond y P. Ramírez. 1998. Evaluation of maize germoplasm for resistance to maize rayado fino virus. *Plant Dis.* 82: 50-56.

Carballo, O. y R. Lastra. 1984. El virus rayado fino del maíz en Venezuela sintomatología, purificación y características de las partículas vírales. *Agron. Trop.* 33: 213-228.

CIMMYT, 2002. Maize in development countries. http://www.cimmyt.cgiar.org/worldwide/cimmyt_regions/development_countries.

Dimcheff, D., S. Drovetski, M. Krishnan y P. Mindell. 2000. Cospeciation and Horizontal Transmission of Avian Sarcoma and Leukosis Virus gag Genes in Galliform Birds. *J. Virol.* 74: 3984–3995.

Doebley, J. 1992. Mapping the genes that made maize. *TIG* 8: 302-307.

Doebley, J. y A. Stec. 1993. Inheritance of the morphological differences between Maize and teosinte: comparison of results for two F2 populations. *Genetics*: 135: 559-570.

Doebley, J., A. Stec, J. Wendel y M. Edwards. 1990. Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: Implications for the origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:9888-9892.

Domingo, E. 1997. Rapid evolution of viral RNA genomes. Symposium: newly emergin viral diseases, what role for nutrition?. 958s-961s.

Domingo, E. 2002. Quasispecies theory in virology. *J. of Virol.* 76(1): 463-465.

Espinoza, A. y R. Gámez. 1980. La ultraestructura de la superficie foliar de cultivares de maíz infectados con el virus del rayado fino. *Turrialba* 30: 413-420.

Espinoza, A., P. Ramírez y P. León. 1987. Cell-free translation of maize rayado fino virus genomic RNA. *J. of Gen. Virol.* 69: 757-762.

Eyre-Walker, A., R. Gaut, H. Hilton, D. FieldMan y B. Gaut. 1998. Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 4441-4446.

Falk, B. y J. Tsai. 1986. The two proteins of maize rayado fino virus contain common peptide sequences. *Intervirol.* 25: 111-116.

FAO, 2003. El Maíz en la nutrición humana. <http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S00.htm#Contents>

Fargette, D., A. Pinel, Z. Abubakar, O. Traore, C. Brugidou, S. Fatogoma, E. Hebrard, M. Choisy, Y. Sere, C. Fauquet, y G. Konate. 2004. Inferring the Evolutionary History

- of Rice Yellow Mottle Virus from Genomic, Phylogenetic, and Phylogeographic Studies. *J. Virol.* 78: 3252–3261.
- Gómez, R. 1969. A new leafhopper-borne virus of corn in Central America. *Plant Dis. Rep.* 53: 929-932.
- Gómez, R: 1973. Transmission of rayado fino virus of maize (*Zea mays*) by *Dalbulus maidis*. *Annu. of Appl. Biol.* 73: 285-292.
- Gómez, R. 1979. Virus del maíz en América Latina: El rayado fino. *Fitopatol. Brasileira* 4: 171-176.
- Gómez, R. 1980. Rayado fino virus of maize in the American Tropics. *Trop. Pest Manage.* 26: 26-33.
- Gómez, R. 1987. Relationships of Cicadellid leafhoppers with rafaviruses (Maize rayado fino group). 109-115. En *Workshop on leafhoppers and planthoppers of economic importance*. Wilson, M. y L. Nault. CIE, London.
- Gómez, R., T. Fukuoka y Y. Kozuka. 1977. Purification of isometric particles from maize plants infected with rayado fino virus. *Rev. de Biol. Trop.* 25: 151-157.
- Gaut, B., M. d'Ennequin, A. Peek y M. Sawkins. 2000. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 7008–7015.

- Giménez, M.P., E. Oliveira, R. Resende, I. Laguna, L. Conci, A. Avila, P. Herrera, E. Galdeano, E. Virla y C. Nome. 2002. Ocorrência de doenças causadas por mollicutes e por vírus nas Províncias de Tucumán e de Córdoba na Argentina. *Fitopatol. Brasileira* 27:403-407.
- Gingery, E., Gordon, D. y Nault, L. 1982. Purification and properties of an isolates of maize rayado fino virus from the United states. *Etiology* 72: 1313-1318.
- González, V. y R. Gámez. 1974. Algunos factores que afectan la transmisión del rayado fino del maíz por *Dalbulus maidis*. *Turrialba* 24: 51-57.
- Hammond, R. y P. Ramírez. 2001. Molecular characterization of the genome of Maize Rayado Fino Virus, the type member of the genus Marafavirus. *Virology*. 282: 338-347.
- Hammond, R., R. Kogel y P. Ramírez. 1997. Variability of geographically distinct isolates of maize rayado fino virus in Latin America. *J. of Gen. Virol.* 78: 3153-3159.
- Hilton, H. y B. Gaut. 1998. Speciation and domestication in maize and its wild relatives: evidence from the globulin-1 gene. *Genetics* 150:863-872.
- Hull, R. 2002. *Plant Virology*. 4 Edición. Londres, Inglaterra. Academic Press.

- ISAAA. 1996. ISAAA Annual Report 1995: Shared Solutions to shared problems. ISAAA: Itaca, New York.
- Kamp, C. y S. Bornhold. 2002. Coevolution of quasispecies: B-Cell mutation rates maximize viral error catastrophes. *Physical review letters*. 88: 0681041-0681044.
- Kimura, M. 1991. Recent Development of the Neutral Theory Viewed from the Wrightian Tradition of Theoretical Population Genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 5969-5973,
- Kitajima, E. y R. Gámez. 1977. Histological observations on maize leaf tissues infected with rayado fino virus. *Turrialba* 27: 71-74.
- Kitajima, E. y R. Gámez. 1983. Electron microscopy of maize rayado fino virus in the internal organs of its leafhopper vector. *Intervirology* 19: 129-134.
- Kogel, R., R. Hammond y P. Ramírez. 1996. Incidence and geographic distribution of maize rayado fino virus (MRFV) in Latin America. *Plant Dis.* 80: 679-683.
- Kumar, S., Tamura, T., Jakobsen, I. y Nei, M. 2001 MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Larsen, K., L. Nault y G. Moya-Raygoza. 1992. Overwintering Biology of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicallidae): Adult populations and drought hardiness. *Env. Entomol.* 21: 566-577.

- Legrant, A., y A. Power. 1994. Inoculation and acquisition of maize bushy stunt micoplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. *Annu. of Appl. Biol.* 125: 115-122.
- León, P y R. Gámez. 1985. Biología molecular del virus del rayado fino del maíz. *Rev. de Biol. Trop.* 34: 111-114.
- León, P. Y R. Gámez. 1981. Some physicochemical properties maize rayado fino virus. *J. of Gen. Virol.* 56: 67-75.
- Luria, S., J. Adam y R. Teng. 1960. Transduction of lactose utilizing ability among strains of *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology.* v.12: 348-390.
- Madriz-Ordeñana, K. 1999. Molecular studies of the defense responses of maize (*Zea mays* L) in interaction with Maize Rayado Fino Virus (MRFV). Ph.D. Thesis. Department of Plant Biology, The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen, Denmark.
- Madriz-Ordeñana, K., R. Rojas-Montero, T. Lundsgaard, P. Ramírez, H. Thordal-Christensen y D. Collinge. 2000. Mechanical transmission of maize rayado fino virus (MRFV) to maize and barley by means of the vascular puncture technique. *Plant Pathol.* 49: 302-307.

- Martelli, G., S. Sabanadzovic, A-G.Sabanadzovic y P. Saldarelli. 2002a. Maculavirus, a new genus of plant viruses. *Arch. Virol.* 147(9):1847-1853.
- Martelli., G., S. Sabanadzovic, A-G. Sabanadzovic, M. Edwards y T. Dreher. 2002b. The family Tymoviridae. *Arch. Virol.* 147(9):1837-1846.
- Moonan, F. y T. Mirkov. 2002. Analyses of genotypic diversity among north, south and central american isolates of sugarcane yellow leaf virus: evidence for Colombia origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. *J. of Virol.* 76: 1339-1348.
- Moya, A., E. Rodríguez-Cerezo, E y F. García-Arenal. 1993. genetic structure of natural population of the plant RNA virus tobacco mild green mosaic virus. *Mol. Biol. Evol.* 10(2): 449-456.
- Moya, A., E. Santiago, A. Bracho, R. Miralles y E. Barrio. 2000. The evolution of RNA viruses: a population genetics view. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 6967-6973.
- Nault, L. 1989. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annual Rev. of Entomol.* 34: 503-529.

- Nault, L. y O. Bradfute. 1979. Corn stunt: involvement of a complex of leafhopper-borne pathogens. 561-586. En Maramorosh, K. Y K. Harris (eds) Leafhopper vectors and plant disease agents. Academic Press, New York.
- Oberste, M., S. Schmura, S. Weaver y J. Smith. 1999. Geographic Distribution Of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Subtype Ie Genotypes In Central America And Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 630-634.
- Oliveira, E., R. Oliveira, M. Giménez, I. Laguna, P. Herrera y I. Cruz. 2003. Occurrence of viruses and stunting diseases and estimative of yield losses by mollicutes in corn in Paraná State, Brazil. *Pesq. Agropec. Bras.* 38(1):19-25.
- Peterson, T., J. Bauer y J. Mill. 2004. Ecologic and Geographic Distribution of Filovirus Disease. *Emerging Infectious Diseases* www.cdc.gov/eid. 10: 40-47.
- Phillips, A. D. Janies y W. Wheeler. 2000. Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. *Mol. Phylogenetics Evol.*
- Pingali, P. y S. Pandey. 2000. Meeting world maize needs: technological opportunities and priorities for public sector. 1-3. En CIMMYT Inform 2000. CIMMYT, México.
- Radjef, N., E. Gordien, V. Ivaniushina, E. Gault, P. Anais, T. Drugan, JC Trinchet, D. Roulot, M. Tamby, M. Milinkovitch y P. Deny. 2004. Molecular Phylogenetic Analyses Indicate a Wide and Ancient Radiation of African Hepatitis Delta Virus,

Suggesting a Deltavirus Genus of at Least Seven Major Clades. *J. Virol.* 78: 2537–2544.

Rivera, C. y R. Gámez. 1983. Adaptación de una técnica de inmunoabsorbencia (ELISA) a la detección del virus del rayado fino del maíz en su insecto vector. *Turrialba* 33: 177-184.

Rodríguez, L., W. Fitch y T. Nichol. 1996. Ecological factors rather than temporal factors dominate the evolution of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 13030–3035.

Schierup, M. y J. Hein. 2000. Consequences of Recombination on Traditional Phylogenetic Analysis. *Genetics* 156: 879–891.

Simmonds, P. y D. Smith. 1999. Structural constraints on RNA virus evolution. *J. of Virol.* 73: 5787-5794.

Strimmer, K. y A. Haesler. 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 13: 964-969.

Switzer, W., S. Pieniasek, P. Swanson, H. Samdal, V. Soriano, R. Khabbaz, K. Kaplan, R. Lal y W. Heneine. 1995. Phylogenetic Relationship and Geographic Distribution of Multiple Human T-Cell Lymphotropic Virus Type II Subtypes. *J. Virol.* 69:621–632.

- Swofford, D., G. Olsen, Waddell, P y D. Hillis. 1996. Phylogenetic Inference. 407-514. En Hillis, A., C. Moritz y B. Mable (eds) Molecular Systematics. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Thompson, J., D. Higgins y T. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22: 4673-4680
- Toler, R., G. Skinner, A. Bockholt y K. Harris. 1985. Reactions of maize (*Zea mays*) accessions to maize rayado fino virus. Plant Dis. 69: 56-57.
- Tsimring, L. y H. Levine. 1996. RNA virus evolution via a fitness-space model. Physical review letters. 76:4440-4443.