

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA**



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS  
ASOCIADAS A VIRUS PROVENIENTES DE ARRACACHA  
(*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) Y SU DETECCIÓN EN PAPA**

**Presentada por**

**JOAO ADHEMIR DE SOUZA PACHECO**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN FITOPATOLOGÍA**

**Lima – Perú  
2021**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS  
ASOCIADAS A VIRUS PROVENIENTES DE ARRACACHA  
(*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) Y SU DETECCIÓN EN PAPA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**JOAO ADHEMIR DE SOUZA PACHECO**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Mg.Sc. César Fribourg Solís  
**PRESIDENTE**

Dr. Enrique Fernández Northcote  
**ASESOR**

Mg. Sc. Liliana Aragón Caballero  
**MIEMBRO**

Dr. Raúl Blas Sevillano  
**MIEMBRO**

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Jorge y Yolanda, quienes con su constante apoyo y empuje me motivaron a avanzar en mi carrera y a asumir nuevos retos.

A mi esposa, Gianina Cuya, por ser mi apoyo y por obligarme a terminar la tesis. Quisiera agradecer al Centro Internacional de la Papa por haberme brindado la oportunidad de desarrollar esta (otra) tesis en sus instalaciones. Las gracias infinitas al Mg. Sc. Biol. Segundo Fuentes Delgado, por sus enseñanzas y paciencia; por nunca cansarse de enseñar y siempre tener tiempo para sus tesis; así como por hacer crecer la semilla de la investigación.

Al Dr. Wilmer Cuellar, por brindarme la oportunidad de comenzar la tesis.

Al Dr. Jan Kreuze de quien recibí sabios consejos para ser un mejor profesional. Agradezco a todo el personal supervisor, técnico y científico del área de virología del CIP. Mi gratitud especial para los miembros del Jurado de Tesis por sus valiosas sugerencias, en especial al Dr. Enrique Fernández Northcote, por aceptar ser mi asesor en un momento difícil. Gracias infinitas por sus acertados consejos y apoyo constante.

## DEDICATORIA

A mi amada esposa, Gianina Cuya, por estar siempre a mi lado en todo momento  
hasta en los más difíciles.

Con mucho amor, aprecio y respeto a mis queridos padres Jorge y Yolanda,  
cuyos ejemplos de lucha y trabajo constante me guían e impulsan siempre.

A mi hermano Coqui, por su tiempo para la discusión de comics

A mi abuela Helder, por sus oraciones.

Al Taller de Arte José María Arguedas (TAJMA), siempre en mis recuerdos

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. LA ARRACACHA	4
2.2. VIRUS EN ARRACACHA	7
2.3. DIAGNÓSTICO DE VIRUS	9
2.3.1. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	9
2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	12
2.3.3. Métodos de amplificación isotérmica y detección en campo	14
2.3.4. Métodos múltiples ( <i>Multiplexing</i> )	18
2.3.5. Secuenciamiento de última generación ( <i>Next generation sequencing</i> ) en el diagnóstico viral	18
2.4 GÉNEROS DE VIRUS DEL PRESENTE ESTUDIO	20
2.4.1. Género <i>Crinivirus</i>	20
2.4.2. Género <i>Vitivirus</i>	22
2.4.3. Género <i>Nepovirus</i>	24
2.4.4. Género <i>Potyvirus</i>	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	30
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO	30
3.3. MANTENIMIENTO DE VIRUS Y RANGO DE HOSPEDEROS	30
3.4. SEROLOGÍA	31
3.5. EXTRACCIÓN DE ARN	31
3.6. SECUENCIACIÓN PROFUNDA O DE GRAN ESCALA ( <i>DEEP SEQUENCING</i> )	32
3.7. RT-PCR	36
3.8. ELECTROFORESIS	37
3.9. CLONAMIENTO	37
3.10. SELECCIÓN DE COLONIAS	38
3.11. SECUENCIAMIENTO	38

3.12. ANÁLISIS DE SECUENCIAS	38
3.13. PRUEBAS DE DETECCIÓN	38
3.14. PRUEBAS DE TRANSMISIÓN CON INSECTOS VECTORES	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. PRUEBAS EN PLANTAS INDICADORAS Y SEROLOGÍA	40
4.2. SECUENCIACIÓN PROFUNDA PARA EL VIRUS A8 Y EL AP-1	45
4.2.1 Nepovirus de arracacha (Virus A8)	45
4.2.2. Arracacha potyvirus 1 (AP-1)	50
4.3. SECUENCIAS ASOCIADAS A VIRUS ENCONTRADOS POR SECUENCIACIÓN PROFUNDA EN PLANTAS DE ARRACACHA	56
4.3.1. Secuencias asociadas a Crinivirus	56
4.3.2. Secuencias asociadas a Vitivirus	61
4.4. EVALUACIÓN DE INCIDENCIA EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE ARRACACHA DEL CIP	66
4.5. PRUEBAS DE DETECCIÓN DE LAS SECUENCIAS ASOCIADAS A VIRUS EN PAPA	66
4.6. PRUEBA DE TRANSMISIÓN CON INSECTOS VECTORES	70
V. CONCLUSIONES	71
VI. RECOMENDACIONES	72
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
VIII. ANEXOS	89

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Rango altitudinal de plantación de arracacha en Perú	6
Tabla 2	Relación de <i>primers</i> utilizados para amplificar el genoma del PBRV de arracacha	33
Tabla 3	Relación de <i>primers</i> utilizados para amplificar el genoma del AP-1 de arracacha	34
Tabla 4	Relación de <i>primers</i> utilizados para amplificar el genoma del putativo crinivirus detectado en arracacha	35
Tabla 5	Relación de <i>primers</i> utilizados para amplificar el genoma del putativo vitivirus detectado en arracacha	36
Tabla 6	Valores de la absorbancia (405nm) de las muestras con su repetición contra los anticuerpos comerciales de PBRV y TRSV	43
Tabla 7	Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región Pro-Pol entre algunos miembros del género <i>Nepovirus</i>	49
Tabla 8	Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región de la cubierta proteica (CP) entre algunos miembros del género <i>Nepovirus</i>	49
Tabla 9	Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región de la CP entre algunos miembros del género <i>Potyvirus</i>	55
Tabla 10	Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región de HSP70 entre algunos miembros del género <i>Crinivirus</i>	59
Tabla 11	Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región CP entre algunos miembros del género <i>Crinivirus</i>	60
Tabla 12	Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región RdRp entre algunos miembros del género <i>Vitivirus</i>	64
Tabla 13	Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región CP entre algunos miembros del género <i>Vitivirus</i>	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1	Parte aérea de la arracacha, así como su raíz, la parte cosechada	4
Figura. 2	Síntomas sistémicos producidos por el supuesto nepovirus de arracacha	41
Figura. 3	DAS-ELISA con el anticuerpo para PBRSV y TRSV realizado para las muestras de plantas infectadas con TRSV-Ca, TRSV NC-38 y nepovirus de arracacha	42
Figura. 4	Evaluación de NCM-ELISA.	44
Figura. 5	Secuenciamiento genómico del virus A8 encontrado en arracacha	47
Figura. 6	Árboles filogenéticos realizados con algunos miembros del género <i>Nepovirus</i> basados en el análisis de secuencias de aminoácido de la región Pro-Pol y la cubierta proteica	48
Figura. 7	Secuencia del genoma del virus AP-1 (aislamiento S1) obtenido por secuenciación profunda	52
Figura. 8	Árbol filogenético construido con algunos miembros del género <i>Potyvirus</i> basado en el análisis de secuencias de aminoácidos de la cubierta proteica	53
Figura. 9	Secuenciamiento del ARN asociado a crinivirus encontrado en arracacha por secuenciación profunda	57
Figura. 10	Árboles filogenéticos realizados con algunos miembros del género <i>Crinivirus</i> basados en el análisis de secuencias nucleotídicas del ORF correspondiente a HSP70 y la cubierta proteica	58 62
Figura. 11	Secuencia incompleta del genoma del vitivirus encontrado en arracacha	
Figura. 12	Árbol filogenético realizado con algunos miembros del género <i>Vitivirus</i> basado en el análisis de secuencias aminoacídicas correspondiente a la replicasa y a la cubierta proteica	63 66
Figura. 13	Corrida electroforética de geles de agarosa de los RT-PCR realizados a las muestras de arracacha del banco de germoplasma del CIP	

- Figura. 14 Corrida electroforética de geles de agarosa de los RT-PCR realizados a muestras de papas colombianas para secuencias asociadas a crinivirus 67
- Figura. 15 Corrida electroforética de geles de agarosa de los RT-PCR realizados a muestras de papa colombianas para secuencias asociadas a vitivirus 67
- Figura. 16 Árbol filogenético de la región de la polimerasa de secuencias asociadas a crinivirus mostrando la relación geográfica entre muestras colombianas y peruanas 68
- Figura. 17 Árbol filogenético de la región de la cubierta proteica de secuencias asociadas a vitivirus mostrando la relación geográfica entre muestras colombianas y peruanas 68
- Figura. 18 Corrida electroforética de geles de agarosa de los RT-PCR realizados a muestras de papas provenientes de Cajamarca para secuencias asociadas a crinivirus 69
- Figura. 19 Corrida electroforética de geles de agarosa de los RT-PCR realizados a muestras de papas provenientes de Cajamarca para secuencias asociadas a vitivirus 69

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	Reactivos para electrophoresis	89
ANEXO 2	Protocolo de Ligación	90
ANEXO 3	Protocolo de transformación de bacterias quimiocompetentes	91
ANEXO 4	Preparación de <i>E. coli</i> quimiocompetentes	92
ANEXO 5	Medios de cultivo	95

## RESUMEN

La arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) es una planta cultivada en varios países de América del Sur. El producto comercial, la raíz reservante, tiene múltiples propiedades nutritivas, su fino almidón lo hace fácilmente digerible y tiene altos niveles de calcio y vitamina A. Debido a que hay muy pocos estudios en raíces y tubérculos andinos, los objetivos de esta tesis son: caracterizar las secuencias asociadas a virus detectados en muestras de arracacha mediante secuenciación profunda (*deep sequencing*), detectar dichas secuencias asociadas a virus tanto en arracacha y en papa; y evaluar los cebadores diseñados para su uso en la detección rápida de dichas secuencias asociadas a virus.. Se realizaron evaluaciones en plantas hospederas y se caracterizaron molecularmente los virus detectados utilizando la tecnología de *deep sequencing*. Se detectó el nepovirus *Potato black ringspot virus* (PBRSV) de una planta de arracacha conservada in-vitro, confirmándose la presencia del virus no sólo por identidad de nucleótidos y aminoácidos en ORFs claves, sino también mediante DAS-ELISA con anticuerpos comerciales para *Tobacco ringspot virus* y PBRSV. También se evaluó una muestra liofilizada infectada por el potyvirus denominado Arracacha potyvirus 1 (AP-1), se secuenció el virus mediante *deep sequencing* y se pudo obtener dos aislados del virus en esa muestra, cuyas secuencias indicaron que corresponden a *Arracacha mottle virus* previamente detectado en Brasil. De la misma forma, se evaluó dos muestras de arracachas que no mostraban algún síntoma por *deep sequencing*, obteniéndose dos secuencias nuevas relacionadas a crinivirus y vitivirus. Basado en las secuencias obtenidas, se diseñaron cebadores que sirvieron para evaluar accesiones de arracacha y plantas de papa colectadas en campos de agricultores en Perú y Colombia. Se logró detectar dichas secuencias nuevas en algunas muestras. Los intentos de transmisión mecánica y por posibles insectos vectores de estos virus putativos fueron negativos. Sin embargo, la organización genómica de las secuencias encontradas indica que pueden tratarse de virus nuevos capaces de infectar arracacha y papa.

Palabras claves: Arracacha, papa, *deep sequencing*, nepovirus, potyvirus, crinivirus, vitivirus

## ABSTRACT

Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) is a plant grown in several countries of South America. The commercial product, which is the storage root, has multiple nutritional properties; its fine starch makes it easily digestible and has high levels of calcium and vitamin A. Due to there are very few studies in Andean roots and tubers, the objectives of this thesis are: characterize the sequences associated with viruses detected in arracacha samples by deep sequencing, detect those virus-associated sequences in both arracacha and potato, and evaluate designed primers for use in the rapid detection of the virus-associated sequences. Evaluations were performed on host plants and the viruses detected using the deep sequencing technology were molecularly characterized. *Potato black ringspot virus* (PBRSV) nepovirus was detected from an in vitro conserved arracacha plant, confirming the presence of the virus not only by nucleotide and amino acid identity in key ORFs, but also by DAS-ELISA with commercial antibodies to *Tobacco ringspot virus* and PBRSV. A lyophilized sample infected with a potyvirus called Arracacha potyvirus 1 (AP-1) was also screened. The virus was sequenced by deep sequencing and two virus isolates were obtained in that sample, which sequences indicated that they correspond to *Arracacha mottle virus*, previously detected in Brazil. In the same way, two arracacha samples showing symptoms were evaluated by deep sequencing, obtaining two new sequences related to crinivirus and vitivirus. Based on the sequences obtained, primers were designed to evaluate the accessions of arracacha and potato plants collected in farmers' fields in Peru and Colombia. These new sequences were detected in some samples. Attempts of mechanical transmission and by possible insect vectors were negative. However, the genomic organization found in the sequences indicates that they may be new viruses capable of infecting arracacha and potato.

Key words: Arracacha, potato, *deep sequencing*, nepovirus, potyvirus, crinivirus, vitivirus

## I. INTRODUCCIÓN

La región andina es uno de los centros de origen y domesticación de numerosas plantas alimenticias. Ellas incluyen raíces y tubérculos como la papa, ulluco, oca, mashua, arracacha, achira, yacón y maca; los cuales son cultivadas a lo largo de la cordillera andina. Estas plantas constituyeron la fuente principal de alimentación de las grandes civilizaciones que se forjaron en esta parte del mundo. Su propagación se hace desprendiendo partes vegetativas como pueden ser los esquejes. La mayoría son de clima templado, sin presencia de heladas y crecen en alturas que no sobrepasan los 3500 msnm, con excepción de la maca, que está adaptada a más de 4000 msnm y a climas muy fríos (Tapia y Fries 2007). La importancia de estas raíces es que son muy usadas como cultivo de subsistencia en comunidades de los Andes (Hermann 1997); sin embargo, la industria en el pasado los dejó de lado a pesar de los grandes beneficios alimentarios que estos tienen (como fuente energética, nutritiva y algunas veces medicinal) y que pueden ser aprovechados para darles mayor importancia

Muchos países, múltiples instituciones y personas de la región andina están evidenciando un interés renovado en los cultivos andinos al promover proyectos de investigación y fomento relacionados a estos cultivos nativos en los últimos cuatro decenios (Tapia y Fries 2007), siendo importante los estudios de biodiversidad en la que destacan los caracteres morfológicos, descriptores y estudios de marcadores moleculares de estos cultivos (Blas *et al.* 2008a, 2008b).

Las enfermedades producidas por agentes virales se denominan virosis. Los estudios de virosis en raíces y tubérculos andinos, entre ellos la arracacha, se han dejado de lado en el área de virología del Centro Internacional de la Papa (CIP). En el CIP hay mayor enfoque en el estudio de patógenos virales que infectan tanto papa como camote, debido a su mayor importancia mundial. Sin embargo, los virus que infectan estas raíces podrían infectar otros (como papa) que se cultiven en sus cercanías, pudiendo actuar como reservorios de virus u hospederos intermediarios (Jones y Kenten 1978, Kenten y Jones 1979).

La arracacha es una planta nativa cultivada por sus raíces suculentas, usándose cotidianamente por su alto contenido de almidón, calcio y vitamina A, además de ser valorada por sus propiedades digestivas y organolépticas (Ames de Icochea 1997, Orilio *et al.* 2009). En Brasil, es un cultivo bastante difundido en el centro y sur del país, incluso se expenden productos procesados a base de este cultivo. Entre los cultivos andinos, la arracacha es uno de los pocos que se industrializa (Ames de Icochea 1997). También es uno de los cultivos andinos que más reportes hay sobre virus que lo infectan. Los virus hasta el momento reportados que infectan arracacha son: AVA (Arracacha virus A, *Nepovirus*), AVB (Arracacha virus B, *Cheravirus*), AP-1 (Arracacha potyvirus 1, *Potyvirus*), AV3 (Arracacha virus 3, *Carlavirus*), PBRSV-A (Potato Black ring spot virus strain arracacha, *Nepovirus*), AMoV (Arracacha mosaic virus, *Potyvirus*) (Jones y Kenten 1978, Kenten y Jones 1979, Santa Cruz 1994, Lizárraga 1997, Lizárraga *et al.* 1994, Orilio *et al.* 2009). Cabe mencionar que se ha reportado que otras raíces y tubérculos andinos son también infectados por virus que infectan papa, como PYV (*Potato yellowing virus*, *Ilarvirus*) en yacón (Silvestre *et al.* 2020) o APLV (*Andean potato latent virus*, *Tymovirus*), PLRV (*Potato leafroll virus*, *Polerovirus*) y PVT (*Potato virus T*, género no asignado de la familia *Betaflexiviridae*) en ulluco (Lizárraga *et al.* 1996a, 1996b, 1999) sin mostrar síntomas aparentes de infección en las plantas afectadas pudiendo actuar como reservorio de virus u hospederos alternativos. Hasta la fecha no hay estudio sobre los efectos de estos virus en el cultivo.

Debido a que la arracacha puede ser reservorio de virus de cultivos andinos y de papa (quizá al ser asintomático para algunos de ellos) y debido a que la arracacha es un cultivo importante en algunas partes de los Andes, se procedió a hacer este trabajo. A esto hay que agregar que la arracacha se siembra cerca de cultivos de papa, pudiendo el virus “saltar” de un cultivo a otro, especialmente al cultivo de papa que tiene gran importancia en el mercado local (Jones y Kenten 1978, Kenten y Jones 1979). Debido a que la arracacha es propagada vegetativamente, puede acumular patógenos como virus que degeneran el cultivo y que llegan a reducir la producción de raíces debido a infecciones múltiples (Orilio *et al.* 2009).

Los virus que se puedan detectar en arracacha podrían ser virus emergentes y causar problemas en este cultivo y otro cercanos como la papa (Jones y Kenten 1978, Kenten y Jones 1979) debido al calentamiento global y al desplazamiento de vectores a lugares donde antes no se les encontraba. Debido a la dificultad de detectar algunos virus y por ser de difícil transmisión mecánica o estar restringidos al floema, éstos pueden escapar a los métodos de detección rutinarios.

La presente tesis busca utilizar la tecnología del secuenciamiento de última generación, conocida en inglés como *next generation sequencing* o *deep sequencing*, para poder detectar secuencias asociadas a virus en muestras de arracacha.

La presente investigación tiene los siguientes objetivos:

- Caracterizar las secuencias genómicas asociadas a virus detectadas en muestras de arracacha mediante secuenciamiento de próxima generación (*deep sequencing*).
- Detectar en papa las secuencias asociadas a virus detectados inicialmente en arracacha.
- Evaluar cebadores (*primers*) que permitan la rápida detección de las secuencias asociadas a los virus en estudio.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. LA ARRACACHA

La arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) es un cultivo originario de los Andes; cultivado entre los 600 – 3200 msnm (NRC, 1989). La arracacha es una raíz andina considerada como la única planta alimenticia de la familia de la zanahoria (*Apiaceae*) domesticada en Sudamérica (Tapia y Fries 2007). La arracacha (Figura 1) habría sido cultivada sobre todo en terrenos elevados desde Colombia hasta Bolivia en donde es frecuente la presencia de parientes silvestres como *A. equatorialis* y *A. andina* (Tapia y Fries 2007).



Figura 1: Parte aérea de la arracacha, así como su raíz, la parte cosechada

Según Bukasov (1930), la arracacha es quizás la planta cultivada más antigua de América, y su cultivo habría precedido a la papa y al maíz. Según Blas (2005), su centro de origen sería Perú, descartando la posibilidad que sea Colombia como previamente se había reportado. *Arracacia xanthorrhiza* fue descrita por Bancroft en 1825 en Jamaica con base a plantas introducidas en Jamaica por los británicos (Constance 1949). Con excepción del área donde se cultiva, la arracacha es todavía poco conocida como lo fue en tiempos de la

conquista. La arracacha es un hierba vigorosa, perenne, algo parecida al apio y es una de las más grandes umbelíferas cultivadas (NRC 1989). Según León (1964), la planta de arracacha alcanza hasta 1.50 m de altura; el tallo es cilíndrico, corto, de 3 a 10 cm de largo por 2 a 8 cm de diámetro y lleva en la parte superior numerosos brotes colinos. Las hojas son pinnadas, con 3 a 4 folíolos opuestos, pecíolos largos y envainadores, la inflorescencia es una umbela compuesta, flores con cáliz diminuto, 5 pétalos verdosos que alternan con estambres largos y finos. El fruto es bicapelar y termina en un ápice bifido. Las raíces reservantes son ovoides, cónicos o fusiformes de 5 a 25 cm de largo por 2.5 a 6 cm de diámetro.

Según Mostacero y Mejía (1993), la arracacha tiene la siguiente clasificación:

División: *Angiospermae*

Clase: *Dicotyledonae* (= Magnoliopsida)

Subclase: *Archichlamydeae* (= Apetalae = Choripetalae)

Orden: *Umbelliflorae* (= Umbelliferales = Umbellales = Ammiales = Apiales)

Familia: *Apiaceae* (= Umbelliferae = Ammiaceae)

Género: *Arracacia*

Especie: *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft (1825)

La arracacha es una planta cultivada principalmente en 4 países (Colombia, Brasil, Ecuador y Venezuela) en donde el área de producción total sobrepasa probablemente las 30000 hectáreas, siendo el producto comercial la raíz reservante. En esos países, la arracacha es común en mercados urbanos y es consumida y conocida por la mayoría de su población (en Brasil sólo en la región sureste). En los Andes, la arracacha es ampliamente cultivada en Perú y Bolivia, pero más es una producción de subsistencia; algunos excedentes van a los mercados locales (Hermann 1997).

En Perú, la arracacha se cultiva generalmente en Cajamarca y otras ciudades de los Andes, pero tiene importancia para la subsistencia y diversificación de la dieta de la gente pobre rural (Herman 1997). Acorde a Seminario (1995), Perú tiene cerca de 2000 – 3000 hectáreas de arracacha, de los cuales 60-80% corresponde al departamento de Cajamarca.

El segundo departamento de importancia es Amazonas. La diferencia entre los departamentos en donde se cultiva arracacha se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Rango altitudinal de plantación de arracacha en Perú (Fuente: Herman 1997)

Departamentos	Número de sitios	Altura (msnm)	
		Promedio	Rango
Piura	23	1788	1600 - 1900
Amazonas	22	2109	1610 - 3240
Cajamarca	56	2298	870 - 3460
La Libertad, Ancash, Huánuco	7	2877	2610 - 3240
Cusco	20	2286	1938 - 2590
Apurímac	11	2784	2540 - 3275
Arequipa	5	2918	2370 - 3190
Moquegua, Tacna	8	1848	950 - 3050

Tradicionalmente, la arracacha se ha cultivado en Perú en 3 diferentes zonas agroecológicas con condiciones ambientales ampliamente variables: la ceja de selva, la húmeda y vertiente oriental lluviosa de la Cordillera Andina hasta el Amazonas entre 1500 a 2200 msnm (Amazonas, Cusco, Huánuco, La Libertad); el valle seco interandino entre 2500 y 3200 m (Ancash, Apurímac alta y Cajamarca) y desierto costero de Moquegua, Piura y Tacna a 1000 – 2500 m (Hermann 1997).

Acorde a lo investigado por Hermann (1997), entre las principales explicaciones del abandono del cultivo de arracacha por parte de agricultores tacneños y moqueguanos son: la carencia de materiales de cultivo (semilla) y carencia de demanda en el mercado. Perú tiene numerosos cultivares con algunas variaciones en pigmentación y forma de la raíz, pero los clones amarillos son los preferidos sobre el material blanco en mercados urbanos. Los agricultores a menudo cultivan una variedad morada que no es comercial (Meza 1995).

Las raíces de arracacha constituyen uno de los alimentos nativos más agradables de la ecorregión andina (Vietmeyer 1984), pero ha recibido poca atención por parte de los

genetistas, mejoradores y agrónomos. Esto principalmente porque su raíz reservante es altamente perecible, lo cual constituye una limitante importante para su explotación (Hlatky y Romero 1988; Hermann 1992). Otro de los principales problemas de este cultivo es su largo periodo vegetativo, en comparación con la papa y otros tubérculos; así como la lignificación de las raíces en la madurez (Mazón 1993). Además, se ha quedado rezagada, por la competencia con otros alimentos andinos (papa y otros tubérculos), y por su fracaso en intentos de aclimatación en Europa (León 1964). Otra razón de su marginación y olvido es su baja calidad nutricional, principalmente en su contenido de proteínas, por lo que se le considera como fuente energética; sin embargo, es compensado por el gran volumen que produce y se le puede utilizar como sucedáneo en la industria de la harina y fermentación (Franco y Rodríguez 1988). Por otro lado, la arracacha es una planta cuyas raíces reservantes tienen importancia principalmente para la alimentación humana y la agroindustria, debido a su almidón muy fino que lo hace fácilmente digerible. Además, tiene niveles altos de calcio y vitamina A.

## **2.2. VIRUS EN ARRACACHA**

Un virus es un conjunto de uno o más moléculas de ácido nucleicos, normalmente encerradas en una cubierta protectora o cubiertas de proteína o lipoproteína, que es capaz de organizar su propia replicación sólo dentro de la adecuada célula huésped. Dentro de tales células, la replicación del virus es: (1) dependiente de la maquinaria de síntesis de proteína del hospedero, (2) organizado en grupos de los materiales requeridos en vez de por fisión binaria, (3) se localiza en sitios que no están separados de los contenidos celulares por una membrana de bicapa de lipo-proteína, y (4) continuamente da lugar a variantes a través de varios tipos de cambios en el ácido nucleico viral (Hull 2009).

Los virus vegetales son patógenos de plantas económicamente importantes y muy dispersos. Virtualmente, todas las plantas que los humanos cultivan para alimento propio, alimento de ganado y fibra son afectados por al menos un virus. Los virus de plantas cultivadas son las más estudiadas debido a sus consecuencias económicas por las pérdidas ocasionadas. Sin embargo, también es importante reconocer que muchas plantas silvestres son también hospederos de virus. Aunque los virus de plantas no tienen un impacto inmediato en humanos a la medida que los virus de humanos lo hacen, el daño que estos

causan en los cultivos tiene un efecto indirecto importante. El estudio de los virus de plantas ha llevado a la comprensión total del virus en muchos aspectos (Hull 2009).

Se han descrito las características de varios virus de arracacha, pero no está claro cómo afectan el rendimiento del cultivo y su producción. A la fecha, los virus que infectan arracacha son: AVA, AVB, AP-1, AV-3, PBRSV-A, AMoV, (Jones y Kenten 1978, Kenten y Jones 1979, Santa Cruz 1994, Lizárraga 1997, Lizarraga *et al.* 1994, Orilio *et al.* 2009). Brunt *et al.* (1996), mencionan otros dos virus en arracacha: Arracacha potyvirus Y (AVY) y arracacha latent carlavirus (ALV) que podrían estar relacionados con AP-1 y AV-3, respectivamente. Estos virus difieren de AP-1 y AV-3 en sus relaciones serológicas y en que no infectan a *Chenopodium quinoa* sistémicamente (Lizárraga 2000).

El CIP disponía de los anticuerpos para la detección de 5 virus de arracacha (AVA, AVB, AV-3, PBRSV-A, AP-1), sin embargo, ante la pérdida tanto de ellos como de los aislamientos correspondientes mantenidos en invernadero (por el mayor énfasis que se le dio a los virus de papa y de camote), actualmente no se puede relacionar dichos virus con los nuevos que se puedan encontrar. Además, nunca se tuvo información de la secuencia de sus genomas.

Es importante considerar que un cultivo puede ser infectado por muchos virus, así como también es importante tener presente los estudios realizados para conocer la distribución e incidencia de éstos. Para ello, el primer paso será determinar qué virus están presentes en un cultivo por lo que se necesita desarrollar métodos para su detección. Dicha metodología ayuda a producir material libre de virus, hacer comparaciones del material sano e infectado en campo, determinar la tasa de reinfección, la distribución e incidencia.

Es conocido que la infección mixta puede producir síntomas más severos que los ocasionados por infección simple. De esto se puede citar como ejemplos en cultivos comerciales como el camote (como el Sweet potato virus disease –SPVD-, entre *Sweet potato chlorotic stunt virus* –SPCSV- y *Sweet potato fethery mottle virus* –SPFMV-) (Untiveros *et al.* 2007) o la papa (como *Potato virus Y* –PVY- con *Potato virus X* –PVX-) (Stouffer y Ross 1961).

## **2.3. DIAGNÓSTICO DE VIRUS**

A pesar del desarrollo aparentemente continuo, y cada vez más elaborados, de métodos nuevos para la detección e identificación de virus, muy pocos de estos métodos nuevos tienen uso rutinario en los laboratorios, a menudo a pesar de las múltiples y variadas ventajas que han afirmado poseer. Para entender por qué la tasa de adopción de tecnologías nuevas es tan baja, se requiere una comprensión sólida de lo que hace una buena herramienta de diagnóstico de rutina para comenzar. Esto se puede hacer mirando a los dos métodos de detección de virus de plantas establecidas con más éxito: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante el examen de las características de estas dos tecnologías, se hace evidente que comparten muchos beneficios, como un formato estándar de la industria y los altos niveles de repetición y reproducción. Estos beneficios se combinan para hacer que los métodos sean accesibles a los laboratorios, que sean fáciles de establecer y robustos en su uso, incluso con los usuarios nuevos y sin experiencia. Por lo tanto, para garantizar el establecimiento de técnicas nuevas es necesario que no sólo proporcionen beneficios que no lo ofrecen ELISA o PCR, sino también para proporcionar una plataforma que es fácil de establecer y utilizar. En el diagnóstico de virus de plantas, los acontecimientos recientes pueden ser agrupados en tres áreas principales:

- 1) Las técnicas que se pueden realizar en el campo o en lugares con bajos recursos (por ejemplo, la amplificación isotérmica mediada por horquilla (LAMP, por sus siglas en inglés *loop-mediated isothermal amplification*);
- 2) métodos múltiplex que son capaces de detectar muchos virus en un solo ensayo (por ejemplo, matrices de perlas Luminex); y
- 3) los métodos adecuados para el descubrimiento de virus (por ejemplo, la secuenciación de nueva generación, (NGS, por sus siglas en inglés *next generation sequencing*, también conocido como *deep sequencing*) (Boonham *et al.* 2014)

A continuación, se explica brevemente cada técnica de detección de virus

### **2.3.1. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

La prueba de ELISA está basada en la producción de un anticuerpo conjugado donde la enzima y el anticuerpo retienen sus propiedades individuales. El anticuerpo se une al

antígeno, mientras la enzima detecta y amplifica la reacción. ELISA puede ser usada para discriminar entre materiales sanos de infectados (cualitativa) o para determinar la concentración del virus en los materiales (cuantitativa). Se han descrito varios tipos de ELISA que pueden ser aplicados de acuerdo a la necesidad de la investigación (Salazar 1996). Debido a su adaptabilidad, sensibilidad y economía en uso de reactivos, ELISA se usa en un amplio rango de situaciones, especialmente para pruebas de un gran número de muestras en un período relativamente corto de tiempo (Naidu y Hughes 2003).

En la técnica de ELISA en membrana de nitrocelulosa (NCM-ELISA), la cual es un método indirecto, el virus vegetal a ser detectado se fija a una membrana de nitrocelulosa y los anticuerpos específicos se unen a las partículas virales. Luego la presencia del complejo virus-anticuerpo se detecta con anticuerpos preparados contra los anticuerpos específicos del virus (anti-anticuerpos) conjugado con una enzima. El paso final es la reacción de la enzima con su sustrato bajo condiciones ideales (Salazar 1996), lo que genera un cambio de color del sustrato.

El desarrollo del ELISA (Clark y Adams 1977) inició una nueva era en los métodos y tecnologías de evaluación que ha llegado a definir el fitodiagnóstico moderno. Previo a esto, la diagnosis de virus era realizado por especialistas con años de experiencia en el reconocimiento y descripción de síntomas de virus en hospederos, suplementado por métodos complejos y engorrosos tales como bioensayos en plantas indicadoras y el uso de técnicas elaboradas como la microscopía eléctrica de transmisión. Los métodos serológicos han sido utilizados por algún tiempo antes que se haya desarrollado el ELISA, ya sea para propósitos de diagnóstico (i.e., microscopía electrónica inmuno-específico; Derrick 1972) o para determinar las relaciones taxonómicas de virus (i.e., ensayo de difusión en gel; Bercks 1967). Sin embargo, estos métodos tenían una variedad de inconvenientes, por ejemplo, el uso de grandes cantidades de antisuero crudo o estar limitado por su formato, y por lo tanto sólo se podían evaluar muy pocos números de muestras. La introducción de ELISA entonces revolucionó el diagnóstico del virus mediante la simplificación de la detección y el acortar el tiempo necesario para llegar a resultados concluyentes (Torrance y Jones 1981). Otras mejoras llegaron a través del uso de anticuerpos monoclonales, lo que mejoró la sensibilidad y especificidad del ensayo a través de modificaciones del formato de la prueba, por lo que el ELISA se tornó más versátil y sensible para las pruebas de virus. ELISA fue utilizado rápidamente en laboratorios de investigación y se convirtió en la

principal herramienta de las pruebas de virus en áreas tales como el mejoramiento (por ejemplo, la evaluación de resistencia a virus), la cuarentena (por ejemplo, la detección de material importado) y la certificación (por ejemplo, para asegurar el material de siembra está libre de virus). ELISA se ha establecido como el método más utilizado para la detección de virus en los cultivos, en sustitución de otros métodos más complicados. Por ejemplo, ELISA ha sustituido en gran medida las pruebas de inoculación por injerto de virus que infectan a los árboles frutales como los cítricos (EPPO 2004a) o frutas de hueso (EPPO 2004b, 2005). Debido a su velocidad, su facilidad de aplicación, el uso e interpretación de los resultados, ELISA es muy adecuada para pruebas de alto rendimiento.

Sin embargo, mientras ELISA tiene muchas ventajas para las pruebas de virus de rutina (Torrance y Jones 1981), siendo rentable, robusto, fácil de usar y escalable para evaluar un gran número de muestras, también tiene varios obstáculos que limitan su uso como una prueba aplicable universalmente para el diagnóstico de virus de plantas (Boonham *et al.* 2014). En primer lugar, ELISA y sus diversos formatos requieren antisueros de alta calidad, para permitir la unión específica y sensible a antígenos virales. La producción de tales antisueros requiere experiencia en virología y la capacidad de purificar viriones o cubiertas virales u otras proteínas como antígenos. En segundo lugar, el método ELISA detecta antígenos virales. En general, es eficiente y sensible; e incluso para los virus que no pueden ser purificados, la detección de virus por ELISA puede ser sensible y específico, utilizando antisueros producidos contra las proteínas recombinantes de los virus (Steel *et al.* 2010). Sin embargo, los antisueros a menudo carecen de la resolución para identificar correctamente las variantes de virus, que están estrechamente relacionados pero que sí tienen un fenotipo distinto, a menudo porque el carácter que determina la variante no se refleja en una variación proteínica de la cubierta. En tercer lugar, ELISA se usa ampliamente como una herramienta de diagnóstico para evaluar el estado fitosanitario de las plantas, para aplicaciones de cuarentena o certificación virus, y se ha convertido en una parte integral de la indexación de patógenos. Cuando un grupo de diversos patógenos necesita ser evaluado en un cultivo (por ejemplo: la detección en papas de viroides, patógenos virales, bacterianas y fúngicas), ELISA carece de la flexibilidad y la compatibilidad que es inherente a algunos métodos moleculares (Boonham *et al.* 2014).

### 2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mientras que los métodos basados en hibridación de ácidos nucleicos (NASH, de sus siglas en inglés *nucleic acid spot hybridization*) se han utilizado en gran medida para algunos virus y en particular para los viroides, la técnica que más se ha explotado con éxito se basa en la reacción en cadena de polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés *polimerase chain reaction*). Los métodos de PCR para la detección de virus fueron publicados primero a principios de 1990 (Vunsh *et al.* 1990) ofrecido con altos niveles de especificidad y sensibilidad. Mientras que la especificidad a menudo se puede lograr, la sensibilidad está frecuentemente por debajo de la expectativa, especialmente en la PCR convencional (utilizando electroforesis en gel para la resolución de los resultados). Mientras que muchos ensayos de PCR para la detección de virus de plantas se han publicado, muy pocos métodos convencionales de PCR se han utilizado de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico, debido a una serie de cuestiones prácticas, pero en particular por problemas con la contaminación post-PCR. Efectivamente la sensibilidad que atrajo a muchos usuarios a la PCR se convirtió en su mayor problema, ya que las pequeñas cantidades de ADN liberado en el ambiente del laboratorio tras la apertura de los tubos después del ciclo térmico podría eventualmente ser detectado por el método de PCR, lo que resulta en problemas con resultados falsos positivos recurrentes. Estos problemas fueron resueltos principalmente por el uso de pruebas de PCR homogéneas y de tubo cerrado comúnmente conocido como PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (q-PCR, *quantitative PCR*). Inicialmente, el q-PCR se desarrolló para la cuantificación en los estudios de expresión de genes, donde el tiempo en el que se observa la amplificación producida está relacionado con el logaritmo inverso de la cantidad de secuencias blanco (*targets*) que se está amplificado; por lo que este método fue rápidamente adoptado para aplicaciones de diagnóstico (Mumford *et al.* 2000). Una razón clave es que la señal fluorescente se genera dentro del tubo cerrado de PCR y se puede detectar ya sea durante la amplificación (en "tiempo real") o en el final de la misma ('punto final') sin abrir el tubo; sellando efectivamente en el riesgo de contaminación. Como el PCR convencional, se han desarrollado y evaluado diferentes formas de PCR en tiempo real para la evaluación de virus; predominantemente, las principales diferencias eran alrededor de las diferentes formas en que la señal podría ser generada dentro de la reacción a medida que este progresaba. Estos eran los métodos basados en sondas (por ejemplo, TaqMan<sup>TM</sup>, balizas moleculares –*molecular beacons*–, sondas escorpión –*scorpion probes*–) o como los no basados en sondas (por ejemplo, SYBR *green*, cebadores LUX). Podría decirse que las

sondas más utilizados en el diagnóstico de virus han sido el TaqMan<sup>TM</sup> basada en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa, y la actividad de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET, *Fluorescent Resonance Energy Transfer*) basada en pares de tintes fluorescentes denominados reporteros (*reporters*) y extintores (*quencher*s). Los métodos basados en sondas tienen la ventaja añadida de que tres (o más) oligonucleótidos independientes necesitan unirse a la secuencia blanco dentro de la reacción para generar la señal, reduciendo la probabilidad de señales inespecíficas. En la química de métodos no basado en sondas, tales como SYBR *green*, los perfiles de fusión se utilizan a menudo para discriminar artefactos de cebadores de la amplificación real, lo que añade pasos a la prueba que se está realizando, que no se necesitan en ensayos basados en sondas. De los métodos basados en sondas exploradas, sondas TaqMan<sup>TM</sup> parece ser la más establecida, aunque esto es probablemente debido a que es uno de los primeros enfoques adoptados y por lo tanto la técnica es más familiar, en lugar de poseer alguna ventaja de rendimiento específicos sobre otros sistemas de sonda. Las técnicas de PCR en tiempo real para la detección de virus fueron desarrollados inicialmente para aplicaciones que necesitan una mayor sensibilidad (Boonham *et al.* 2009) o en los que no se podrían utilizar métodos de anticuerpos (Boonham *et al.* 2004). Sin embargo, más recientemente, los métodos de PCR en tiempo real se han desarrollado para los objetivos donde ELISA no puede ser utilizada, basado puramente en el criterio de rendimiento (es decir, la sensibilidad/especificidad) y por tres principales razones prácticas. En primer lugar, la PCR en tiempo real es más rápida para establecer en comparación con el desarrollo de anticuerpos para virus recién descritos. En segundo lugar, la técnica es de aplicabilidad más genérico que ELISA, especialmente en laboratorios de rutina que buscan llevar a cabo pruebas para las bacterias, hongos y potencialmente de identificación de invertebrados, donde los métodos de ELISA no están tan bien establecidos. Por último, mientras que el costo por prueba de ELISA es menos de PCR en tiempo real (los costos por reactivos de ensayo son típicamente 50% más alto que para ELISA), el costo de producir un anticuerpo es considerablemente más alto, por tanto, el costo-beneficio a largo plazo debe ser significativa para que la generación de un nuevo anticuerpo sea una propuesta viable. Incluso, debido el éxito de q-PCR, se logró bajar el costo de capital del equipo a menos de una décima parte de hace unos diez años.

Si bien, ELISA y PCR son pruebas muy específicas, no pueden ser un fiel reflejo de la etiología de la enfermedad en particular que puede estar afectando a la planta evaluada, ya que ninguna de estas técnicas en la actualidad diagnostica el potencial de otros virus (conocidos y desconocidos) que puedan estar implicados en la etiología de una enfermedad en particular. Por otra parte, la replicación propensa a error de los virus de ARN que lleva a las cuasi-especies (se dice que una especie de virus no es una población uniforme sino que es una cuasi-especie, cuyo término describe a un tipo reestructura poblacional en el cual las colecciones de los genomas cercanamente relacionados están sujetos a un continuo proceso de variación genética, competencia y selección; Hull 2009), que puede complicar las pruebas de detección basadas en PCR, ya que no todas las variantes del virus pueden ser detectadas (Coetzee *et al.* 2010). Es por ello que aparecieron nuevas técnicas de diagnóstico que permitan detectar diferentes *strains* y/o virus desconocidos, que son los que comentarán brevemente a continuación:

### **2.3.3. Métodos de amplificación isotérmica y detección en campo**

Los métodos de amplificación isotérmica comparten con la PCR el concepto central de la extensión de una secuencia blanco con cebadores y ADN polimerasa (o en algunos casos, una ARN polimerasa). En términos generales, el reto de amplificación isotérmica, por lo tanto, es permitir la unión del cebador, de tal manera que la amplificación puede ocurrir sin los ciclos repetidos de desnaturalización y reasociación requeridos para la PCR. Hay una serie de enfoques para la generación de sitios de unión del cebador de cadena sencilla sin ciclos térmicos, incluyendo métodos basados en: métodos no térmicos de plantilla de desnaturalización; transcripción de ARN; desplazamiento de la hebra alrededor de una plantilla circular; *nicking* o degradación parcial de los productos de extensión del cebador para permitir la extensión o rondas adicionales de cebado; y la formación de estructura secundaria que contiene los sitios de una sola hebra de unión a cebador. Mientras que los métodos isotérmicos (por ejemplo, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico, NASBA, por las siglas en inglés *Nucleic acid sequence based amplification*) se investigaron inicialmente como alternativas a la PCR o PCR en tiempo real (Leone *et al.* 1997), se ha renovado el interés en la investigación de estos métodos para aplicaciones en laboratorios con pocos recursos o para realizar pruebas en campo. Dado que estos métodos se basan en la amplificación a una sola temperatura, en lugar de los ciclos térmicos, que pueden realizarse utilizando equipos mucho más simples.

Un enfoque simple para lograr la amplificación isotérmica de ADN es la de separar las hebras de la plantilla de doble hebra por medios no térmicos. La amplificación dependiente de helicasa (HDA) (Vincent *et al.* 2004) y amplificación de la polimerasa recombinasa (RPA) (Piepenburg *et al.* 2006) son dos ejemplos de este enfoque. HDA utiliza una helicasa para separar las hebras de ADN de doble cadena que permiten la unión del cebador y extensión por el ADN polimerasa a una temperatura constante de aproximadamente 65°C. Los tiempos de reacción para HDA están generalmente en el rango de 30-90 min. Este método mantiene la amplificación de productos relativamente cortos de aproximadamente de 70-120 pb. HDA se puede realizar en una sola temperatura, pero la inclusión de una breve incubación a 95° C antes de la adición de las enzimas HDA se ha demostrado que aumentó la sensibilidad. RPA utiliza una recombinasa que forma un complejo con cebadores para iniciar la amplificación sin desnaturalización térmica. La RPA no requiere un paso inicial de desnaturalización, pero la sensibilidad se incrementa si la reacción se agita después de 5 min de incubación. La reacción se incuba a una temperatura de reacción baja (entre 37 y 42° C) que puede ser fácilmente sostenido por un instrumento de baja potencia. Sin embargo, el uso de una baja temperatura de reacción puede dar lugar a la generación de más artefactos de amplificación no específicos que se observan típicamente en métodos de amplificación isotérmicas, que utilizan temperaturas de reacción más altas. La principal ventaja de RPA es sus tiempos de reacción cortos, que son típicamente <30 min.

NASBA es un método para la amplificación isotérmica de ARN basado en la transcripción (Compton 1991). Un cebador modificado se utiliza para incorporar la secuencia del promotor de ARN polimerasa de T7 en un ADN de doble cadena intermedia, funcionalizar el promotor y que resulta en la transcripción de un producto de ARN monocatenario a una temperatura de reacción de 41 °C. NASBA ha sido utilizada para la detección de un número de patógenos de plantas en conjunción con sondas de baliza molecular, en un formato denominado a veces AmpliDet (Klerks *et al.* 2001). Este formato, en el que la fluorescencia se monitoriza en tiempo real para detectar la hibridación de la sonda con el amplicón monocatenario, es un sistema cerrado de tubo y permite la cuantificación de la secuencia blanco, pero requiere el uso de un instrumento con fluorescencia en tiempo real capacidad de monitoreo. NASBA requiere la desnaturalización de la plantilla para permitir la hibridación del cebador antes de la adición de las enzimas no termoestables, por lo que se configura a la reacción como un proceso de dos etapas. NASBA se considera que es un

método de detección altamente sensible, pero con tiempos de reacción relativamente largos (típicamente 90 min).

Tanto NASBA y HDA se realizan de manera óptima con un perfil térmico de dos etapas y como tal no son realmente isotérmica. RPA, además, requiere que los tubos se puedan agitar manualmente, después de varios minutos de amplificación, para lograr un rendimiento óptimo. Cada una de estas características hace a estas reacciones menos adecuado para su uso en el sitio, aumentando el tiempo y la complejidad de la amplificación.

Otros dos métodos de amplificación isotérmica, que se han aplicado a la detección de patógenos de plantas, son la amplificación círculo rodante (RCA, de sus siglas en inglés *rolling-circle amplification*) y la amplificación isotérmica o quimérica de ácidos nucleicos iniciada por cebadores (ICAN, de sus siglas en inglés *Isothermal and Chimeric primer-initiated*). En su formato más simple, RCA se utiliza para amplificar ácidos nucleicos circulares que utilizan la actividad de desplazamiento de cadena de ADN polimerasa Phi29. RCA seguido de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se ha utilizado para el diagnóstico de geminivirus que tienen genomas pequeños de ADN circular de cadena sencilla (Haible *et al.* 2006). Los métodos más complejos basados en RCA hacen uso de sondas de candado circularizable (Banér *et al.* 1998) para proporcionar plantillas para la amplificación. ICAN utiliza cebadores quiméricos (5'-ADN-ARN-5') con una RNasa H termófila que introduce un *nick* en la unión entre las porciones de ADN y ARN de los cebadores, y un ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra que continúa la extensión desde el *nick* (Mukai *et al.* 2007).

Cada uno de los métodos discutidos hasta ahora tienen diversas ventajas; sin embargo, en el contexto del desarrollo de métodos para la utilización en el lugar, los factores tales como el tiempo de reacción (>1 h en el caso de HDA, NASBA y ICAN) y la complejidad del diseño de ensayo (RPA, RCA para blancos no circulares) son potenciales desventajas. Un enfoque alternativo de amplificación isotérmica es diseñar cebadores tales que los productos de amplificación contengan sitios únicos de unión de cebadores de cadena sencilla. La amplificación isotérmica mediada por ciclo (LAMP, de las siglas en inglés *loop-mediated isothermal amplification*) es el método más comúnmente utilizado para adoptar este enfoque, utilizando tres pares de cebadores (cebadores internos, externos y de

bucle), para generar un producto de amplificación que contiene regiones de bucle de cadena sencilla a la que los cebadores pueden unirse sin plantilla de desnaturalización (Notomi *et al.* 2000) a una temperatura de reacción de alrededor de 65 °C. Los cebadores internos introducen una autocomplementariedad dentro del producto de amplificación, causando la formación de bucles, mientras que la extensión de los cebadores externos provoca el desplazamiento de los productos de extensión de los cebadores internos. Los productos de las reacciones de LAMP consisten en repeticiones orientadas alternativamente de la secuencia blanco. La adición de cebadores bucle acelera la amplificación mediante su unión en las regiones de bucle que son de la orientación incorrecta de los cebadores internos a unirse. Los cebadores de bucle incrementan la sensibilidad y reducen los tiempos de reacción, y son requeridos para un rendimiento aceptable de algunos ensayos. Sin embargo, para acomodar los cebadores de bucle se requiere una región más larga de la secuencia adecuada, ya que el diseño de dos cebadores de bucle podría no ser posible, y muchos ensayos han sido reportados en la literatura, los cuales logran un rendimiento aceptable sin cebadores de bucle, o con un solo cebador de bucle. Una modificación recientemente descrita de la reacción LAMP incorpora uno o más cebadores “de tallo” (del inglés *stem*), los que se unen a la parte central de doble hebra de cada repetición de la región amplificada, para mejorar aún más el rendimiento del ensayo e incrementar las opciones de diseño de cebadores (Gandelman *et al.* 2011). Como LAMP utiliza al menos seis regiones de unión a cebador, es posible diseñar ensayos con una alta especificidad por el posicionamiento de cada cebador en el sitio de no coincidencia (*mismatches*) entre las especies blanco y no blanco. Los ensayos de LAMP se han reportados con sensibilidad comparable a los ensayos de PCR en tiempo real y por lo general superior a la de PCR convencional (Tomlinson *et al.* 2007).

La técnica LAMP no requiere desnaturalización de la plantilla inicial y recientes desarrollos en el desplazamiento en una hebra del ADN polimerasa muestra una cinética de reacción más rápida, de manera que los tiempos de reacción de LAMP puede reducirse a menos de 30 minutos. LAMP, en común con otros métodos de amplificación isotérmica de ADN, puede ser modificado para la detección de blancos de ARN mediante la adición de transcriptasa inversa para la reacción. En RT-LAMP, la transcripción inversa y la amplificación de ADNc proceden simultáneamente a una única temperatura de alrededor de 65 °C. Significativamente para las pruebas *in-situ*, se ha reportado que LAMP es tolerante de algunas sustancias que son inhibidoras de PCR (Kaneko *et al.* 2007), lo que

potencialmente permite a LAMP ser utilizado en conjunción con métodos de extracción de ácidos nucleicos simplificados.

En el contexto específico de las pruebas *in-situ* de patógenos de plantas, algunas de las características de ensayo son particularmente deseables, incluyendo la velocidad de la amplificación, la simplicidad de flujo de trabajo (es decir, que requiere pocas manipulaciones) y la tolerancia de los inhibidores, todos los cuales se exhiben por la química de LAMP.

#### **2.3.4. Métodos Múltiples (*Multiplexing*)**

La capacidad para realizar pruebas múltiples (es decir, la capacidad para detectar más de un patógeno en un único ensayo) ofrece enormes beneficios de costo, especialmente cuando se requiere probar un gran número de muestras. Esto se ha empleado en técnicas serológicas y se puede utilizar con técnicas moleculares. En términos de *multiplexing*, esta tecnología tiene limitaciones técnicas, con lo que distinguen con precisión las diferentes señales fluorescentes resultantes de reportero múltiple y el tinte extintor (*quencher dye*) utilizados para la detección en tiempo real, lo que limita el número de ensayos que se pueden detectar con precisión en un solo tubo (Mumford *et al.* 2006).

Si bien los enfoques del *multiplexing* ofrecen beneficios reales en situaciones donde el tamizado de alto rendimiento para múltiples virus u otros agentes patógenos, todavía se limita a la detección de dianas “conocidas”. Como con ELISA, PCR en tiempo real y otros métodos específicos, utilizando sondas específicas, existe un límite para el grado de variación del patógeno que puede ser detectado y por lo tanto nuevos patógenos o cepas no serían detectados y, por tanto, perdidas.

#### **2.3.5. *Next generation sequencing* en diagnóstico viral**

La tecnología del secuenciamiento de última generación (NGS, por sus siglas en inglés *Next generation sequencing*) ha dado lugar a una revolución en el descubrimiento de virus y da posibilidades nuevas e interesantes para el diagnóstico; la aplicación de métodos de secuenciación masiva y el posterior análisis bioinformático de las secuencias virales, da la esperanza de detección de rutina y genérica de virus y otros patógenos. De hecho, varios reportes se publicaron por primera vez en el 2009 cuando se utilizó NGS para identificar

diversos virus de plantas, utilizando diferentes plataformas de secuenciación y preparaciones de ácidos nucleicos como material de trabajo (Adams *et al.* 2009, Al Rawahneh *et al.* 2009, Kreuze *et al.* 2009) y muchos otros reportes han continuado. Se han utilizado diferentes plataformas de secuenciación (principalmente Roche 454 e Illumina) los cuales tienen diferencias en costo, facilidad de ensamblaje e identificación de secuencia, pero las distinciones claves residen en las técnicas de purificación del ácido nucleico empleadas.

Mientras que algunas técnicas, tales como la amplificación por círculo rodante (Ng *et al.* 2011a, Hagen *et al.* 2012) están claramente limitados a ciertos tipos de virus (es decir, virus de ADN circular), otras son más ampliamente aplicables a todo tipo de virus. Varios estudios han tenido éxito, simplemente mediante la secuenciación total de ARNm (Al Rwahnih *et al.* 2009; Wylie y Jones 2011; Wylie *et al.* 2012a, 2012b, 2013). Sin embargo, un inconveniente de esta técnica es que, en particular con los virus con títulos bajos, una cantidad enorme de secuencia se "desperdicia", ya que la mayoría de secuencias será de ARN huésped. Adams *et al.* (2009) abordaron este problema mediante el uso de una planta infectada para la hibridación sustractiva; enriqueciendo de esta manera para cualquier ARN no vegetal y limitar la cantidad de secuenciación requerida. A pesar de las mejoras de este tipo, la secuenciación del ARNm total no puede capturar de manera óptima algunos virus que carecen de las secuencias poliA terminales utilizados para enriquecer ARNm. Otro método utilizado con frecuencia ha sido el aislamiento de ARN de doble cadena (dcARN) seguido de la síntesis de ADNc al azar (Coetzee *et al.* 2010, Roossinck *et al.* 2010, Al Rwahnih *et al.* 2011). Dado que los ARN de plantas endógenas no forman extensas estructuras de doble cadena, pero intermedios replicativos de los virus de ARN ha demostrado su valía en la identificación de virus nuevos y conocidos de los organismos infectados, la corta duración de las secuencias de ARN pequeños de interferencia (siRNA) plantea desafíos particulares para el montaje de secuencias del genoma completo, especialmente cuando las muestras están infectadas con varias variantes estrechamente relacionadas o, cuando están presentes, moléculas sub-virales defectuosos están presentes.

Independientemente del método de preparación de muestras, cualquier método sólo será utilizado ampliamente si es fácil de usar, relativamente rápido y no demasiado costosa. Mientras que los protocolos rápidos y fáciles se han publicado para la mayoría de las técnicas de purificación de muestras mencionadas, sólo kits comerciales están disponibles

para la purificación de ARN total, ARNm y la purificación del ARN pequeños. Los pasos de preparación de ácidos nucleicos antes de la secuenciación, que incluyen etapas en serie de ligaciones de adaptador y el PCR enriquecido pueden ser subcontratados por completo a los proveedores de secuenciación o se llevan a cabo en el laboratorio propio para ahorrar costos. Para aprovechar al máximo el rendimiento de los secuenciadores de NGS, y para reducir el costo por muestra, las muestras son a menudo “etiquetados” mediante la inclusión de un corto fragmento de ADN, a lo que se le denomina «código de barras», durante la preparación de la muestra y se combinan en una línea de secuenciación. Los kits para códigos de barras y de aumento de volumen hasta 96 muestras se encuentran disponibles, Mientras que cada uno de los pasos anteriores se hayan normalizado más o menos, el montaje y la identificación de los *contigs* virales aún no es sencillo y plantea su propio conjunto de desafíos, especialmente en relación con los nuevos virus y variantes de virus. Se han presentado diferentes soluciones para situaciones específicas (Isakov *et al.* 2011, Li *et al.* 2011, Vodovar *et al.* 2011, Wu *et al.* 2012) pero ninguno de ellos presenta una solución integral en relación a cada uno de los diferentes temas. El desarrollo de las tuberías bioinformáticas automatizadas y universalmente aplicables para el análisis de datos de NGS, específicamente para el descubrimiento y el diagnóstico del virus, sigue siendo un reto que debe cumplirse antes de que estas tecnologías puedan llegar a ser parte de la corriente principal de diagnóstico viral (Zheng *et al.* 2017).

## **2.4 GÉNERO DE VIRUS DEL PRESENTE ESTUDIO**

### **2.4.1. Género *Crinivirus***

Este género pertenece a la familia *Closteroviridae*. Los virus pertenecientes a este género no poseen envoltura, son partículas filamentosas bipartitas de alrededor de 650 – 850nm y de 700-900nm de longitud, y de 10-13nm de diámetro. El cuerpo del virión es ensamblado por la cubierta proteica principal (CP) y la cola por la cubierta proteica menor (CPm) (Bar-Joshep y Murrant 1982). Los crinivirus afectan principalmente plantas herbáceas, en los cuales inducen clorosis extensa a decoloración amarilla de las hojas, a menudo acompañado de enanismo. Son transmitidos de forma semipersistente por moscas blancas del género *Trialeurodes* y *Bemisia*. La persistencia y la especificidad de la transmisión por sus respectivos vectores han sido utilizadas como características para la diferenciación de especies. De este modo, se han clasificado a los crinivirus en 3 grupos. Así, los virus del grupo 1 [*Potato yellow vein virus* (PYVV), *Blackberry yellow vein-associated virus*

(BYVaV), *Beet pseudoyellows virus* (BPYV), *Strawberry pallidosis-associated virus* (SpaV)] son transmitidos por *Trialeurodes vaporariorum*; los virus del grupo 2 [*Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Bean yellow disorder virus* (BYDV)] son transmitidos por *Bemisia tabaci*; mientras que un virus del grupo 3 [*Lettuce infectious yellows virus* (LIYV)] es transmitido por *B. tabaci*, y el otro [*Tomato infectious chlorosis virus* (TICV)] es transmitido por *T. vaporariorum* (Martelli *et al.* 2012). Se identificaron estos grupos mediante análisis filogenéticos comparativos de secuencias de aminoácidos de la RdRp. Ninguno de estos virus es transmitido a través de semilla botánica ni mecánicamente. Sobre la distribución geográfica de estos virus, es muy variable, de restricta (p.e. BYVaV) a muy amplia (p.e. SPCSV). Algunos virus emergentes (p.e. CYSDV, TICV and ToCV) están incrementando su registro en países europeos, americanos y asiáticos (Martelli *et al.* 2012).

El genoma de muchos crinivirus (p.e. LIYV) está dividido en dos ARN lineales, de sentido positivo y de simple hebra, dando un tamaño total de 15.6 – 17.9 kb, siendo PYVV la excepción con un genoma tripartito (Livieratos *et al.* 2004). Todas las moléculas son necesarias para la infección y son encapsuladas separadamente. El ARN1 de LIYV contiene 3 ORF, el complejo ORF1a-ORF1b más un ORF que codifica para una proteína de 32kDa sin ninguna similitud con alguna proteína de la base de datos (Klaassen *et al.* 1995). Este ORF es similar en tamaño y localización al ORF2 de *Citrus tristeza virus* (CTV) y *Beet yellow stunt virus* (BYSV) (ambos del género *Closterovirus*) pero los respectivos productos de expresión no están relacionados (Martelli *et al.* 2012). El ARN1 tiene 97 y 219 nucleótidos en los 5' y 3' UTR, respectivamente. Como con otros miembros de la familia, el complejo ORF1a-ORF1b codifica para las proteínas relacionadas a la replicación incluyendo la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, de sus siglas en inglés) (Klaassen *et al.* 1995). El ARN2 tiene siete ORF que son flanqueantes por 326 nts en el 5'-UTR y 187 nts en el 3'-UTR. El ARN2 contiene los cinco genes modulares los cuales; sin embargo, difieren de los miembros del género *Closterovirus*, por la inserción de un gen extra (ORF 4) corriente arriba del gen de la cubierta proteica; además este ARN posee la proteína de movimiento y de transmisión del vector (Karasev 2000, Martelli *et al.* 2002). La replicación en los crinivirus sucede en el citoplasma, probablemente en asociación con vesículas membranosas, derivadas del retículo endoplásmico o de mitocondrias vesiculadas (CYSDV). Las proteínas estructurales y no estructurales son

similares en tipo y función de aquellas reportadas por el género *Closterovirus* (Martelli *et al.* 2012). Hay reportes de supresores del silenciamiento en algunas especies de crinivirus; por ejemplo, en ToCV hay supresores del silenciamiento en ambos ARN genómicos, expresa la p22 en el ARN1 y la CP y CPm en el ARN2; por otro lado, la proteína p25 de CYSDV y la RNAsa III y la p22 presente en pocos aislados de SPCSV también están reportados por tener actividad supresora (Martelli *et al.* 2012).

Los criterios de demarcación de especies para el género *Crinivirus* (Martelli *et al.* 2012) son:

- Tamaño de la partícula
- Tamaño de la cubierta proteica, determinado por deducción de la secuencia aminoacídica.
- Especificidad serológica utilizando anticuerpo monoclonal y policlonal discriminatorio
- Estructura y organización del genoma (número y localización relativa de los ORFs)
- Secuencia de aminoácidos de productos génicos relevantes (polimerasa, CP, HSP70h) deben diferir en más de 25%.
- Especies de vector y especificidad
- Magnitud y especificidad de rango de hospedero natural y experimental
- Características citopatológicas (aspecto de cuerpos de inclusión y origen de vesículas citoplásmicas)

#### **2.4.2. Género *Vitivirus***

Este género pertenece a la familia *Betaflexiviridae*. Los virus pertenecientes a este género no poseen envoltura y poseen un virión de 725 – 825 x 12nm de tamaño con bandas cruzadas diferenciables construida de forma helicoidal con un paso (*pitch*) de 3.3-3.5 nm y aproximadamente 10 subunidades por vuelta de la hélice (Adams *et al.* 2012a).

El rango de huéspedes naturales de los vitivirus se limita a un único hospedero. Hay virus cuyas infecciones no inducen ningún síntoma [Heracleum latent virus (HLV) y Mint virus 2 (MV-2)] pero también hay enfermedades graves que se caracterizan por picaduras y ranuras de la madera [Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB), Grapevine virus D (GVD), Grapevine virus E (GVE)]. El rango de huéspedes experimentales, y de su

distribución geográfica, varía de amplio (HLV) a restringido (GVA, GVB, GVD, GVE) (Adams *et al.* 2012a).

Todas las especies se transmiten por inoculación mecánica, siendo las de mayor dificultad aquellas que infectan vid. Las especies herbáceas, *Nicotiana benthamiana* y *N. occidentalis*, son utilizadas para propagación de GVA y GVB respectivamente; y especies de *Chenopodium* son utilizadas para diagnóstico y propagación de HLV. La transmisión por injerto y la dispersión a través de material de propagación es común en las especies que infectan vid (Adams *et al.* 2012a). La transmisión natural es por cochinillas (Hemiptera: Pseudococcidae), cochinillas blandas (Hemiptera: Coccidae) y áfidos (Hemiptera: Aphididae). En comparación con las cochinillas blandas, las cochinillas es probable que desempeñen un papel importante en la transmisión del virus a causa de su mayor movilidad, y son responsables de la propagación rápida de la enfermedad, incluso a bajas densidades de población en el campo (Cabaleiro y Segura 2006, Cabaleiro *et al.* 2008, Golino *et al.* 2008). Aunque todas las etapas de la vida de las cochinillas son capaces de la transmitir virus, se sabe que las ninfas de su primer estadio son los vectores más eficientes (Petersen y Charles 1997, Tsai *et al.* 2008, Le Maguet *et al.* 2012). GVA y GVB se transmiten de manera semipersistente por diferentes especies de cochinillas de los géneros *Pseudococcus* y *Planococcus*. GVA también es transmitida por la cochinilla blanda *Neopulvinaria innumerabilis*. HLV y MV-2 se transmiten de manera semipersistente por áfidos, en asociación con un virus auxiliar (Adams *et al.* 2012a).

Las células infectadas por estos virus están dañadas en un grado variable. Todas las especies investigadas provocan la formación de evaginaciones vesiculares de tonoplasto que contienen material finamente fibrilar, posiblemente representando formas replicativas de ARN viral. Los virus que infectan vid son estrictamente limitadas en el floema, pero pueden infectar el parénquima en huéspedes herbáceos. Las partículas virales de este género de virus se acumulan en el citoplasma en paquetes o en agregados paracrystalinos (Adams *et al.* 2012a).

El genoma contiene 5 ORF ligeramente solapadas. Las regiones 5'UTR del GVA y GVB es rica en A/T (60-68%) de 46-86nts. El ORF1 es la proteína relacionada con la replicación. El ORF2 es un polipéptido de 19-20kDa de función desconocida con ninguna homología en secuencia a proteínas conocidas, siendo esta proteína una característica

propia de género *Vitivirus* dentro de la familia *Betaflexiviridae*. El ORF3 (31-36.5kDa) es la proteína de movimiento y el ORF4 es la CP. El ORF final es un polipéptido de 10-14kDa, con un motivo de dedos de zinc, con una homología débil a proteínas con propiedades de unión al ARN el cual, en GVA, tiene actividad supresora del silenciamiento de ARN. La estrategia de expresión se basa en la producción de ARNsg, de acuerdo al análisis de ARNdh de tejidos infectados. Los 4 ARNdh tienen tamaños de 7.6, 6.48, 5.68 y 5.1 kpb para GVA y GVD. La generación de los ARNsg 5' y 3' parece ser controlado por elementos cis actuante. La replicación se realiza en el citoplasma, posiblemente en asociación con vesículas membranosas (Martelli *et al.* 2007, Adams *et al.* 2012a).

Los criterios de demarcación de especies para el género *Vitivirus* son (Adams *et al.* 2012a):

- El rango de huéspedes naturales.
- La especificidad serológica utilizando anticuerpos discriminatorios policlonales y monoclonales.
- La epidemiología, ya que especies o grupos de especies virales se transmiten por diferentes tipos y especies de vectores.
- Las diferencias en el molde del ARN de doble hebra.
- Menos del 72% de identidad de nucleótidos (o 80% de identidad de aa) entre los genes de la cubierta proteica o de la polimerasa.

### **2.4.3. Género *Nepovirus***

El género *Nepovirus* pertenece a la subfamilia *Comovirinae* (familia *Secoviridae*) y es el único miembro de la familia que codifica una gran CP de 52-60 kDa. Como los demás miembros de su familia, los viriones se distinguen de acuerdo a su densidad (superior, medio e inferior; también denominado por su letra inicial en inglés: T (top), M (middle) y B (bottom)). Los principales viriones (los componentes M y B) contienen ARN. Generalmente, el virion que contiene el ARN1 es el componente B (que sedimenta con valores de  $S_{20,w}$  de 150-190S) y el que contiene el ARN2 es el componente M (que sedimenta con valores de  $S_{20,w}$  de 110-135S); salvo los casos en donde el tamaño del ARN1 y ARN2 son similares. La cáscara vacía (componente T), dependiendo del virus, sedimenta a valores de  $S_{20,w}$  de 49-63S (Sanfaçon *et al.* 2012).

Los nepovirus se dividen en tres subgrupos. El subgrupo A tiene un ARN2 de 3700-4000 nts de longitud, presente tanto en los componentes M y B. El subgrupo B tiene un ARN2 de 4400-4700nts de longitud, presente sólo en el componente M. El subgrupo C tiene un ARN2 de 6400-7300nts de longitud presente en partículas del componente M que a veces se puede separar apenas del componte B. Los 3 subgrupos también difieren en los sitios de corte reconocido por la proteinasa (Sanfaçon 2008). La poliproteína codificada por el ARN2 (P2) de los subgrupos A y B. En *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), la proteína N-terminal de la poliproteína P2 (2A) parece estar implicada en la replicación del ARN2 (Gaire *et al.* 1999). Los otros dos dominios de proteína son la proteína de movimiento (MP) y una única cubierta proteica (CP), siendo ambos requeridos para el movimiento célula a célula del virus. De manera similar a los comovirus, el MP tiene un motivo LPL, el cual interactúa con el CP y es un componente estructural de las estructuras tubulares que contienen partículas similares a virus y atraviesan la pared celular (Sanfaçon *et al.* 2012). En *Tomato ringspot virus* (ToRSV) (Subgrupo C), la región N-terminal de la poliproteína P2 es escindida en un sitio adicional, definiendo 2 dominios (X3 y X4) (Carrier *et al.* 2001). La proteína X3 contiene algunas similitudes de secuencia con la proteína 2A de GFLV, pero la proteína X4 tiene una función desconocida (Carrier *et al.* 2001). El ARN1 de los nepovirus es traducida en una única poliproteína (P1) que es procesada en 6 dominios (Sanfaçon *et al.* 2012). La región C-terminal de la poliproteína contiene el bloque de replicación, que es similar a la de los comovirus (NTB-VPg-Pro-Pol), el cual en GFLV se realiza en el retículo endoplásmico (Ritzenthaler *et al.* 2002). En contraste a la región N-terminal de la poliproteína contiene un sitio de corte adicional que define dos dominios de proteínas (X1 y X2) en vez de un único dominio presente corriente arriba del NTB en el genoma de los comovirus (Zhang *et al.* 2005). El corte de este sitio adicional se demostró para *Arabis mosaic virus* (AMV) (subgrupo A) y ToRSV (subgrupo C). La función de la proteína X1 es desconocida, mientras que la proteína X2 contiene un motivo de secuencia común con la proteína cofactor de la proteinasa (Co-Pro) de los comovirus, pero no parece modelar la actividad de la proteinasa. Sin embargo, de forma similar al Co-Pro de los comovirus, la proteína X2 de ToRSV se asocia con membranas derivadas del retículo endoplásmico y se le ha propuesto un rol en la replicación viral (Zhang *et al.* 2005). Cuando se comparan el ARN1 y ARN2, los extremos 5' u 3'-UTR son similares en secuencia, pero no son idénticas en los nepovirus del subgrupo A. En los nepovirus del subgrupo B, el extremo 5'-UTR también muestra similitud entre el ARN1 y ARN2, mientras que el 3'-UTR son idénticas en ambos ARN. En los nepovirus del subgrupo C,

ambos UTR son idénticos o cercanamente idénticos entre el ARN1 y ARN2, aunque vale mencionar que la región de similitud se extiende hasta una parte de la región codificante de la poliproteína en ToRSV pero no en *Blackcurrant reversión virus*) (Sanfaçon *et al.* 2012).

Los nepovirus son ampliamente distribuidos en regiones templadas. El rango natural de hospedero varía de amplio a estrecho, dependiendo del virus. Los síntomas de mancha anular son característicos, pero igual de frecuentes son el moteado y las manchas cloróticas (Sanfaçon *et al.* 2012). Veinte especies son adquiridas y transmitidas persistentemente por nematodos de la familia *Longidoridae* (*Xiphinema*, *Longidorus* or *Paralongidorus* spp.), tres son transmitidos por polen, uno es transmitido por ácaros (*Blackcurrant reversión virus*) y otro no tienen vector biológico conocido. La transmisión por semilla y/o polen es muy común (Sanfaçon *et al.* 2012). En plantas herbáceas, los síntomas inducidos por nepovirus a menudo son transitorios, incluso las hojas nuevas (las que aparecen luego de la infección) parecen asintomáticas (fenómeno denominado “recuperación”). La recuperación de los síntomas está asociada con la inducción del silenciamiento de ARN, una defensa antiviral, y algunas veces está acompañada con la concentración reducida de ARN viral (Jovel *et al.* 2007).

Los criterios de demarcación de especies para el género *Nepovirus* (y para la familia *Secoviridae*) (Sanfaçon *et al.* 2012) son:

- Identidad de menos del 75% de identidad de aa de la región de la CP.
- Identidad de menos del 80% de identidad de aa en la región conservada Pro-Pol.
- Diferencias en las reacciones antigénicas
- Diferente rango de hospederos
- Distinta especificidad del vector
- Ausencia de protección cruzada
- Ausencia de re-arreglo entre el ARN1 y ARN2.

No se necesita que todos los criterios se encuentren simultáneamente (Sanfaçon *et al.* 2012). En algunos casos, sólo la información de secuencia puede ser un buen indicador de una especie diferente (p.e. cuando el porcentaje de identidad de secuencia tanto en las regiones de Pro-Pol y CP está por debajo de lo requerido). Sin embargo, analizando sólo una región del genoma generalmente no es suficiente, por lo que se deberían considerar

ambas regiones (Pro-Pol y CP). En casos donde el porcentaje de identidad de secuencia en una o ambas secuencias está cerca del límite propuesto (p.e. entre 75 y 85% en el Pro-Pol o entre 70 y 80% en la CP), se debería considerar otro criterio y es útil alguna información de las propiedades biológicas del virus (rango de hospederos, especificidad del vector, posibilidad de rearrreglo entre ambos ARN). Por ejemplo, *Beet ringspot virus* (BRSV) y *Tomato black ring virus* (TBRV) son cercanos en la secuencia Pro-Pol (89% de identidad) pero son mucho más divergentes en la secuencia de la CP (62% de identidad de secuencia); además ellos difieren en sus reacciones antigénicas y también en la transmisión de nematodos (BRSV es transmitido más eficientemente por *Longidorus elongatus* y TBRV es transmitido más eficientemente por *Longidorus attenuatus*) (Sanfaçon *et al.* 2012).

#### **2.4.4. Género *Potyvirus***

El género *Potyvirus* pertenece a la familia *Potyviridae*, siendo este una familia de virus vegetales con un genoma de ARN positivo de simple hebra y de partículas flexuosas, filamentosas. El género *Potyvirus* es el género en la familia que contiene los virus que son transmitidos por áfidos de manera no persistente. Los viriones son filamentos flexuosos de 680-900 nm de largo y 11-13nm de ancho, con simetría helicoidal y un paso (*pitch*) de alrededor de 3.4nm. Las partículas de algunos virus son más largas en presencia de cationes divalentes que en la presencia de EDTA. Los viriones tienen un valor de  $S_{20,w}$  de 137-160S, aunque su densidad en CsCl es de 1.31 g/cm<sup>3</sup>. El genoma está unido covalentemente a un VPg en el extremo 5'-UTR, mientras que el extremo 3'-UTR es poliadenilado. Este genoma codifica una poliproteína larga que se autoescinde en un conjunto de proteínas funcionales. El orden y la secuencia de las proteínas están conservadas en toda esta familia (Adams *et al.* 2012b).

El género *Potyvirus*, como los miembros *Potyviridae*, forman cuerpos de inclusión (CI) cilíndricos citoplasmáticos durante la infección. Los CI son una matriz de una proteína viral de 70 kDa que posee actividades ATPasa y helicasa. Algunos potyvirus inducen cuerpos de inclusión nuclear que son cocrystalinos de 2 proteínas virales (NIa y NIb) presentes en cantidades equimolares. La pequeña proteína de inclusión nuclear (NIa), de 49 kDa, es una poliproteína que consiste de la VPg y la proteinasa. También son evidentes cuerpos de inclusión amorfos en el citoplasma durante ciertas infecciones de potyvirus y representan agregaciones de la proteína HC-Pro y quizá otras proteínas no estructurales (Adams *et al.* 2012b).

Algunos miembros tienen un estrecho rango de hospedero, muchos miembros infectan un número intermedio de plantas y pocos miembros infectan especies de hasta 30 familias de plantas. La transmisión a muchos hospederos se consigue fácilmente mediante inoculación mecánica. Muchos virus son de amplia distribución, siendo ayudada en algunos casos por transmisión por semilla. De forma natural, son transmitidos por áfidos de una forma no persistente y no circulativa, siendo necesarios para esta transmisión un componente auxiliar (o colaborador) (la proteína HC-Pro) y un triplete de aa particular de la CP (DAG en algunos potyvirus) (Adams *et al.* 2012b).

El genoma de ARNsh, de tamaño alrededor de 9.7kb, es el 5% del peso del virión. Este ARN genómico codifica a una única poliproteína. Esta luego sufre un proceso co y postraduccional proteolítica por tres proteinasas codificadas por el virus para formar productos génicos individuales. El ARN genómico se replica vía la producción de ARN de longitud total, pero de sentido negativo (Adams *et al.* 2012b). La poliproteína es escindida en diez productos los cuales muestran conservación de secuencia y organización. Estos productos son (Adams *et al.* 2005):

- P1: es la secuencia menos conservada y la más variable en tamaño. Juega un rol significativo en la replicación del virus probablemente debido a la estimulación de la HC-Pro, que es el gen supresor del silenciamiento. El P1 se escinde en un dominio de serina-proteasa en su C-terminal de la poliproteína típicamente a Tyr/Phe-Ser.
- HC-Pro (Helper Component-Protease, o Proteasa del component auxiliary): Tiene un rol en la supresión del silenciamiento de genes y en el vector de transmisión. La HC-Pro se escinde en su C-terminal en un dominio cisteína proteasa de la poliproteína, típicamente en Gly-Gly.
- P3: Esta proteína está implicada en la replicación viral y parece ser significativa en el rango de hospedero y desarrollo de síntoma.
- 6K1: La función de esta pequeña proteína es desconocida.
- C1 (proteína de inclusión cilíndrica): Con actividad proteasa y acumula cuerpos de inclusión en el citoplasma de células vegetales.

- 6K2: Una pequeña proteína transmembrana que probablemente ancla el complejo de replicación al retículo endoplásmico.
- VPg (Proteína viral ligada al genoma): Se une al 5' terminal del genoma y pertenece a una clase de proteína desordenada intrínsecamente. Esta juega múltiples roles en el ciclo de infección viral. Es esencial para la replicación y traducción del virus, interactúa con una o varias isoformas del factor de iniciación de la traducción eIF4E. Está implicada en la supresión del ARN de silenciamiento.
- NIa-Pro: Es una cisteína proteasa (similar a serina proteasa) responsable por el clivaje de muchos sitios en la poliproteína, típicamente en Gln/Glu-(Ser/Gly/Ala).
- NIb-Pro: es la ARN polimerasa dependiente de ARN.
- CP: Proteína de la cubierta viral que también tiene roles en el movimiento viral, amplificación del genoma y transmisión del vector.

Recientes estudios han mostrado la presencia de un ORF corto adicional denominado PIPO (de sus siglas en inglés, *pretty interesting potyvirus ORF*), el cual está incrustado dentro del cistron de la P3 y se expresa como un producto fusión P3-PIPO vía desplazamiento del marco de lectura (*frameshifting*) (Chung *et al.* 2008). Esta ha sido identificada en toda la familia y ha sido mostrado que es esencial para el movimiento intercelular del virus.

Los criterios de demarcación de especies para el género *Potyvirus* (y para la familia *Potyviridae*) (Adams *et al.* 2012b) son:

- Diferentes especies tienen una identidad de secuencias de aa menor de 80%; y una identidad de secuencia de nucleótidos menor de 76% en la CP o en todo el genoma. También hay diferencia en los sitios de escisión de la poliproteína.
- Carencia de protección cruzada (en el rango de hospederos y reacciones de hospederos claves)
- Diferente morfología de los cuerpos de inclusión.
- Relaciones serológicas

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente trabajo se realizó en los laboratorios e invernaderos del área de Virología de la División de Manejo de Cultivos y Sistemas de producción del Centro Internacional de la Papa (CIP), con sede en La Molina, provincia de Lima, Perú.

#### **3.2. MATERIAL BIOLÓGICO**

- Aislamientos de los siguientes virus
  - Nepovirus aislado de arracacha (codificado como virus A8 en este trabajo)
  - Potyvirus aislado de arracacha (Arracacha potyvirus 1: AP-1)
- Arracachas provenientes de invernadero de CIP-Huancayo.
- Arracachas otorgadas por el Dr. Raúl Blas Sevillano provenientes de Cusco y Cajamarca.
- Aislamientos de virus otorgados por el profesor C.E. Fribourg
  - *Tobacco ringspot virus* variante NC-38 (TRSV NC-38)
  - *Tobacco ringspot virus* variante calico (TRSV-Ca)

#### **3.3. MANTENIMIENTO DE VIRUS Y RANGO DE HOSPEDEROS**

Los virus se conservaron mediante inoculación mecánica, para lo cual se obtuvo primero el jugo de las hojas infectadas (de los virus en estudio) por maceración con buffer fosfato de sodio (pH 8). Este jugo se frotó sobre las hojas de plantas indicadoras previamente espolvoreadas con carborundum malla 600. Las plantas posteriormente fueron colocadas en invernaderos a temperaturas de 16° C a 24° C (Jayasinghe y Chuquillanqui 1992). Se utilizaron plantas indicadoras de las familias *Chenopodiaceae* (*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. murale*), *Amaranthaceae* (*Gomphrena globosa*) y *Solanaceae* (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii* x *N. bigelovii*, *N. occidentalis*).

El virus AP-1 (Santa Cruz 1994), se recuperó de material liofilizado guardado a 4° C, inoculándolo en *N. clevelandii* x *N. bigelovii* y en *C. amaranticolor*. Para confirmar que es un potyvirus, se procedió a extraer el ARN y realizar un RT-PCR (punto 5.4 y 5.6 respectivamente) con cebadores degenerados para potyvirus. Para continuar con el secuenciamiento de su genoma, se procedió a enviar una muestra de ARN pequeños a secuenciación profunda, tal como se muestra en el punto 5.5. Además, el nepovirus A8 de arracacha fue aislado utilizando un rango de hospedero y se envió también a secuenciación profunda para confirmar su identificación.

### **3.4. SEROLOGÍA**

Las muestras se evaluaron con antisuero contra *Potato black ringspot virus* (PBRSV; # AS-0045; DSMZ, Braunschweig, Alemania) y *Tobacco ringspot virus* (TRSV, # 152275; Bioreba, Reinach, Suiza), los cuales son los únicos antisueros disponibles en CIP para la detección de PBRSV (que ha sido reportado que infecta arracacha) y uno relacionado (TRSV). Para ello se realizó una prueba de DAS-ELISA, cuyas placas se sensibilizarán con el antisuero contra el virus mencionado. Luego se colocan en cada pocillo las muestras y los controles negativos y positivos. El procedimiento de DAS-ELISA se llevará a cabo según el método modificado de Clark y Adams (Salazar 1979). Las lecturas colorimétricas se realizarán a los 30 y 60 minutos en un lector de ELISA TECAN SUNRISE utilizando el programa MEGALLAN 7. Cada muestra en la prueba se realizó con 2 repeticiones. Posteriormente, se evaluó las muestras con el anticuerpo de TRSV variante NC-38 (gentilmente otorgado por Mg Sc. Ing. Agr. César Fribourg) en una membrana de nitrocelulosa (NCM-ELISA; Gibb y Padovan 1993). En ambos casos se utilizó como control una planta sana de *N. benthamiana*.

### **3.5. EXTRACCIÓN DE ARN**

El ARN de cada aislamiento del virus fue extraído usando Trizol Reagent (Invitrogen) siguiendo el siguiente protocolo. Se cosechó 200 mg de tejido y se molió en nitrógeno líquido. El polvo se transfirió a un tubo de 2ml con 0.5ml de trizol. Se agitaron con un vortex y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente para después centrifugar a 14000rpm por 10 minutos a 4° C. Luego se removió el sobrenadante a un nuevo tubo con 0.4ml de cloroformo y se agitó vigorosamente esta mezcla manualmente por 15 minutos y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente para después centrifugar a 14000rpm por 15 minutos a 4° C. Se removió el sobrenadante y añadió 1ml de isopropanol. Se mezcló

bien y se dejó por 10 minutos a temperatura ambiente para después centrifugar por 14000rpm por 10 minutos a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 75% para luego secar dicho pellet y resuspenderlo en 35ul de NFW (de sus siglas en inglés: nuclease free water – agua libre de nucleasas).

La concentración de los ácidos nucleicos totales se calculó a partir de la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a 260 nm (Nanodrop, ThermoFisher, Watham)

### **3.6. SECUENCIACIÓN PROFUNDA O DE GRAN ESCALA (*DEEP SEQUENCING*)**

Esta es una técnica que se basa en el secuenciamiento de siARN, productos de la degradación del ARN de doble hebra como consecuencia del silenciamiento génico. Los siARN producto de la degradación son moléculas de ARN viral de 20 a 25 nucleótidos que a su vez sirven a la planta como sondas específicas para continuar la detección y degradación del ARN viral. Se utilizó para confirmar la identidad viral y obtener secuencias del genoma tanto de los aislamientos del AP-1 y del nepovirus A8, así como de secuencias asociadas a virus de muestras asintomáticas de arracacha. Se cortó la porción de ARN de 15 a 30 nucleótidos de gel de agarosa de 4%, se liofilizó y se envió para su secuenciamiento a gran escala (*deep sequencing*) (Fasteris, Suiza). Para el análisis se utilizó los programas MAQ (Li 2008) y VELVET (Zerbino y Birney 2008), para comparar las secuencias obtenidas con secuencias virales de referencia disponibles (GenBank) y para producir secuencias *contigs* (un *contig* es una secuencia producto del solapamiento de fragmentos de ADN superpuestos en extremos idénticos; Bonilla-Rosso 2008) con estos, respectivamente. Dichos *contigs* fueron utilizados para la búsqueda en la base de datos del GenBank utilizando BLASTx [este programa usa como entrada una secuencia de nucleótidos; traduce la secuencia en sus seis posibles marcos de lectura (tres marcos de lecturas por hebra) y compara estas secuencias traducidas contra una base de datos de proteínas. Se usa cuando se tiene sospecha de que la secuencia de entrada codifica para una proteína, pero no se sabe exactamente cuál es su producto]. Basados en las secuencias genómicas obtenidas se diseñaron cebadores (Tablas 2, 3, 4 y 5). Se hizo un mix de siARN pequeños extraídas de 4 muestras de arracacha conservadas en invernadero en CIP-Huancayo y se envió a secuenciación profunda (Fasteris). La identificación de dichas muestras fue desconocida por lo que se realizó un tamizado utilizando los cebadores diseñados a partir de las secuencias obtenidas de la secuenciación profunda.

Tabla 2: Relación de cebadores utilizados para amplificar el genoma del PBRSV de arracacha.

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado (bp)	Región amplificada
PBRSV1-R	CATGACCATCACAGATGTCGGTGC	820	NABP
PBRSV1-F4	TGTCCACATGGAGATCAGGGC		
Nepo1-Arra-Fb	CCAAGAAGGCCAAAAAGTCCACC	1273	poliproteína1
Nepo1-Arra-Rb	GACCTTATTCCATAACTGGCCCAGG		
Nepo1-Arra-Fc	CAGGATCACCAATTATTATTGATGGCG	1278	poliproteína1
Nepo1-Arra-Rc	ACTGGGGGCACAAAACCTTGCG		
Nepo1-Arra-Fd	CAGAAATAGTGCAATATCGCTGCCC	343	poliproteína1
Nepo1-Arra-Rd	AAGTCCCACAACCTGATATTGGCC		
Nepo1-Arra-Fe	GCTTCTTGTCAGTAGTTCGGTCAGG	333	poliproteína1
Nepo1-Arra-Re	TGGCGGGATCTATCAACATATCC		
Nepo1-Arra-3F *	GTCAGAAGATTAGCGCCAACGATGC	801	3UTR
PBRSV-FERA_5UTR-F1	TCACACGGTTCGGAATATTTGTGTT	110	5UTR
PBRSV-FERA_5UTR-F2	CCCCCTCTTCTCTCTTAATTGCTTTG		
A8-PBRSV-5UTR-R **	CACGAAGTCTCGGTTAGAAAAGACTG	110	5UTR
A8-PBRSV-F1n	AGGTTACGAAGCAGGTGGATAGCG	254	poliproteína 1
A8-PBRSV-R1n	TGACACAGATGTCACAGTTTTGTTTCCTC		
PBRSV1-aF	TTCTGAGCTTCCACATATGCCACG	1028	poliproteína 1
PBRSV1-aR	ACCGAGTTCAGTAAGACGGTAAGTGC		
PBRSV2-F2	CCCAAGAAATGCTTTTGCTGGC	994	CP
PBRSV2-R2	GATTGGACGCCAAAGTAACTGTGG		
PBRSV2-F1	TGTGTGTCTGCCCTTCCACGC	954	MP
PBRSV2-R1	GCCAGCAAAGCATTCTTGGG		
Nepo2-arra-5'R **	GGGCATGGGGAAACATGCAC	465	5UTR
Nepo2-arra-F1	GCTGACCCTGATGAGCGCAAGG	945	poliproteína 2
Nepo2-arra-R1	AAGATAAGACTTTGGACTTTTCACGGC		
Nepo2-arra-3F *	CGCCTGATGCACATGTTGGG	1136	3UTR

\* Utilizado junto con Ban One primer (ATTGATGGTGCCTACAG)

\*\* Utilizado junto con Ban Two primer (ATCGTAGGCACCTGAAA)

Tabla 3: Relación de cebadores utilizados para amplificar el genoma del AP-1 de arracacha.

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado (bp)	Región amplificada
pot3	gacgaattcTGGAARCAYTGGAI	1117	Nib-CP
pot1	gactggatccATTBTCDATRCACCA		
Poty-AP1-F	CAGAGGGAATAACAGTGGACAGCCT	700	CP
Poty-AP1-R	CTGGATCCATTTTCGATGCACCAA		
Poty-Arra-F	CAGCCTTCGACAGTTGTCGATAATTC	700	CP
Poty-Arra-R	GATCCATTTTCGATACACCAAACCAT		
AP1_5'-A-R**	GATCGCCTTTTCGAATCGGTGC	362	5UTR
AP1_B-F	CACATTCTGTGTGGCGAAATCAC	1603	poliproteína
AP1_B-R	CATACGCCCCATAGCCTTTGGAT		
AP1_C-F	ATATGGAGACATTTTCGAATTTTCGG	2204	poliproteína
AP1_C-R	CGACTGTTGTCGATTTGATTGCTCC		
AP1_D-F	TGTTTGATGCTGAGCGAAGTGATTG	4465	poliproteína
AP1_D-R	CCCATTCCGAATGAACGAATAATGC		
AP1_E-F	CCCGAGGATTTATAACAATACTCGTGC	748	poliproteína
AP1_E-R	CCCAAATGAAGAACCAATAAAGGGGT		
AP1_3'-F(2)*	CTCCAATCTGCACAGTCTGATGGG	342	3UTR
AP1-S2-5UTR**	CATTTCAAAGTAACCTTGGAAAGATTCT	230	5UTR
AP1-S2_F1	AAGCTATCAAGCAATCAGACATTCTACC	1180	poliproteína
AP1-S2-R1	ATCTGGTATATTTCTTGCACATGTATCG		
AP1-S2-F2	TTGTGGAACCTATTATTCGGTAGAAGAG	1534	poliproteína
AP1-S2-R2	TAAGCAACATTTGTGAAATACTCTGATCC		
AP1-S2-F3	CTTTAGAGGAGATAACAAGCATCAAAAT	1469	poliproteína
AP1-S2-R3	CCAACAGCACCTCTAATTAGAAAGTCCG		
AP1-S1-F1	GGACACTTTCGAGCTTAAGAATGAGG	3087	poliproteína
AP1-S1_R1	AACTGCTACAAACGGTAAGCCACAG		
AP1-S1-F2	CGGAAATTGAAATTTAGAGAGCCAGTC	1222	poliproteína
AP1-S1-R2	GTAAAGAACTATCAAATCGAGACCCG		
AP1-S1-F3	CGAAGTTCTATGGGGTTGGAAT	1260	poliproteína
AP1-S1_R3	CCATCATCTCCTACGTCATACTCTCGT		
AP1-S1-F4	GTTCACAGTACCACGACTCAAAGGTT	793	poliproteína
AP1-S1-R4	TAACGTAAGTAACACACAAGGAGGTATG		

\* Utilizado junto con Ban One primer (ATTGATGGTGCCTACAG)

\*\* Utilizado junto con Ban Two primer (ATCGTAGGCACCTGAAA)

Tabla 4: Relación de cebadores utilizados para amplificar el genoma del crinivirus putativo detectado en arracacha.

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado (bp)	Región amplificada
Crini-RNA1-F1	TGTCACGACGTCAAAAACCTTAGGG	446	ORF1a
Crini-RNA1-R1	CCCAAATGACACCAAGGAACCC		
Crini-RNA1-F2	ATGGTTGGAGAATCGTGAAGGAGAC	936	ORF1b
Crini-RNA1-R2	GCAATCATAGCGTCGACCAATACAC		
Crini1-Arra-Fa	GCAAGAACATCCATGTATGTTGCC	516	ORF1a
Crini1-Arra-Ra	CGTATTTACCATTTTGAACCCAACGC		
Crini1-Arra-Fb	GAGTGGATGAAGAAGCTCAGGAATACC	2446	ORF1a
Crini1-Arra-Rb	GCATCATCAATTACATTCCTCATATCCC		
Crini1-Arra-Fc	GCCAAATACAATGCAAAACATTCCG	1815	ORF1b
Crini1-Arra-Rc	CTCCCTTTAACCATCATCTTCATCC		
Crini1-arra-F1	TCTCTCCAATGATCAGTTCGCTGC	1321	ORF1a
Crini1-arra-R1	GCAGTTACTGTCAACAATCTCTGGTGG		
Crini1_Arra_iF4	GAATGGAAGATTTTCTGTACGGTGAGC	467	ORF1b
Crini1_Arra_iR4	YAAMMCGCGTATATGACTCTAAGGGAA		
Crini-RNA2-F1	TGATGTACGATTTCCGGTGGTGGC	619	HSP70
Crini-RNA2-R1	GGGATAGACATAGGCTTGCGAACC		
Crini-RNA2-F2	TGTGGTTAAATCACAACCTGATGCC	348	CP
Crini-RNA2-R2	CGTTGACGTAATCACCAGTAGAATTCC		
Crini2-Arra-Fa	GCTTATCGATAACTGATGGTGGAGACG	587	HSP70
Crini2-Arra-Ra	TGATGTTGTCAATATCACGGCCACC		
Crini2-Arra-Fb	AAGTTCTGTGTCTTATGGGTGTTCTATGC	1297	HSP70 - p59
Crini2-Arra-Rb	CCCTTGATAACACCCTGATCAAGTTCAG		
Crini2-Arra-Fc	GGAGGTGATATGAATGATTACTTGCTTCA	1530	p59 - CP
Crini2-Arra-Rc	TGATTGATTCAAAGCAGCTTGAGCC		
Crini2-Arra-Fd	CCAATCCATGGAGACAGTATATGAGGG	1955	CP - mCP
Crini2-Arra-Rd	TTCATAGCACCTTACTGTCCCTCCAC		
Crini2-d1F4	GGTTTGAACGATGGTATGCTTGAATTG	1471	mCP – p27
Crini2-d1R4	CAGTTGCCAACTAGTCAACGTCGG		
Crini2_Fn1a	TGTCATTGTGTGATCTTCTTCTTTCTATTG	1014	HSP70
Crini2_Rn1	TCAAGAATGTAAATGATGATTTTCCGAG		

Tabla 5: Relación de cebadores utilizados para amplificar el genoma del vitivirus putativo detectado en arracacha.

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado (bp)	Región amplificada
Viti-CP-F1	CTTTAAAATTGGCTAAATTGGG	305	CP - NABP
Viti-CP-R1	GTGAAAAAGCCCCACACTTCAG		
Viti-Rep-i1F1b	AGGATGAAGGCGAGGGTACATTTCAG	497	Replicasa
Viti-Rep-i1R1	AAAGCAATCATCGAGCTAACCATGAG		
Viti-RdRp-iFn	GTTTACAGGTGATGCGGTTCTCTGG	2268	Replicasa - CP
Viti-CP-iRn	TGAATCACTTGAGCTTCGCTAACGC		
Viti-F6	CTCTCTAGCATAGGGGTTTCATACTTCAGTG	629	Replicasa
Viti-R6	GACATGATGAGCCCCGAAACTCTC		
Viti-long-F	GCAAACCAGAGCCTCAATCAGCG	3545	Replicasa
Viti-long-R	GCCAATGCAAATACCTAAGAAGCG		
Viti-3UTR-Fn*	CTATGGAGGCTCCGTTCTTGGG	416	NABP - 3'UTR

\* Utilizado junto con Ban One primer (ATTGATGGTGCCTACAG)

### 3.7. RT-PCR

Para realizar la técnica de PCR, primero se requiere la síntesis del ADN complementario (cuyas siglas en inglés es cDNA) mediante la técnica RT-PCR (del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction, Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa) para copiar las secuencias de ARN a ADN. La técnica consiste en hacer una denaturalización de la muestra en un volumen que contiene 1000ng de ARN, 1µl de cebadores aleatorios (*random primers*) (250 µg/µl), 1µl de dNTPs 10 mM y NFW hasta completar 12µl. Este volumen se incubó a 65° C por 10 minutos (para la denaturalización). Posteriormente se añadió 4µl de buffer RT 5X, 2µl de DTT 0.1mM, 1µl de ARNasa SIN ('RNase OUT') y 1µl de M-MLV (200 U/µl, Invitrogen). El volumen final (20 µl) se llevó a un termociclador Viriti (AB – Applied Biosystem) con un programa de 37° por 50 minutos, 70° C por 15 minutos y luego 4° C. Lo obtenido es lo denominado cDNA

La amplificación del ADN se realizó por el método PCR. Cada reacción se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 1µl del cDNA, buffer de PCR 1X, 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.2 µM de cada cebador (*forward* y *reverse*) y 1U de Taq DNA polimerasa por reacción. Las condiciones en el termociclador Viriti (AB – Applied Biosystem) fueron de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 50-65° C (dependiendo de los cebadores utilizados) por 30 segundos, 72° C a 1

minuto por cada kb de producto amplificado 30 segundos y 72°C por 10 minutos. Los productos amplificados se almacenaron a 4° C.

### **3.8. ELECTROFORESIS**

Los productos amplificados de ADN se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (p/v) en buffer TAE 1X (Anexo 1), agregando 10 µl de reacción de PCR con 5ul de SALB 10X (Anexo 1). Se utilizó GelRed (1µl de GelRed por 30mL de buffer TAE 1X) para visualizar el ADN por fluorescencia en luz ultravioleta (UV).

### **3.9. CLONAMIENTO**

El ADN amplificado por PCR se limpió mediante kits de purificación (Roche) antes de ligarlo en el plásmido pGEM-T easy (Promega) (Anexo 2). Cuando fue necesario, el ADN amplificado se concentró precipitándolo con 10% de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 vol. de alcohol 100% (v/v), y se congelaron a -20° C por 1 a 2 horas. Después, estas muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos. Luego de eliminar el sobrenadante, se lavó el ADN con alcohol 70% y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el alcohol, se dejó secar y finalmente el ADN se resuspendió en 20ul de NFW.

Los plásmidos recombinantes se clonaron en bacterias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes (debido a que los ácidos nucleicos no entran a la bacteria por sí solos, requieren de una asistencia para atravesar la membrana externa e interna y así lograr un sitio intracelular donde ellos pueden ser expresados y replicados. Para preparar bacterias quimiocompetentes, las células de bacterias *E. coli* se lavaron en cocteles de soluciones simples salinas para lograr un estado de competencia durante el cual las moléculas de ADN pueden ser admitidas a la célula (Sambroock y Rusell 2001). Los protocolos de transformación y de preparación de células competentes se detallan en el anexo 3 y 4 respectivamente. Se incubaron entre 16 a 18 horas a 37° C en placas de LB agar con ampicilina y sustrato X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido [Invitrogen]) y el IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido [Invitrogen]) (anexo 5) para la selección de bacterias transformadas (bacterias conteniendo el plásmido con el inserto inserto –fragmento de ADN amplificado por PCR).

### **3.10. SELECCIÓN DE COLONIAS**

Después del periodo de incubación se observó colonias blancas y azules utilizando el sustrato X-Gal/IPTG. Se seleccionó las colonias blancas (que poseen el plásmido con el inserto) y se hicieron crecer en medio LB con ampicilina, para después hacer la extracción de plásmidos.

### **3.11. SECUENCIAMIENTO**

Los productos amplificados por PCR y plásmidos con insertos purificados fueron procesados y enviados a MacroGen-Korea para el secuenciamiento por el método de Sanger (Sanger *et al.* 1977) en un secuenciador automático (Smith *et al.* 1986) siguiendo las recomendaciones de MacroGen.

### **3.12. ANÁLISIS DE SECUENCIAS**

Las secuencias fueron comparadas usando el programa DNASTAR (Madison, WI, USA) para obtener el porcentaje de identidad, así como el alineamiento de los fragmentos secuenciados. También se usó el programa MEGA 4 (Kumar *et al.* 2008) para el alineamiento múltiple de secuencias y para la construcción de árboles filogenéticos. Un árbol filogenético es la representación gráfica de un alineamiento múltiple de secuencias. Dichos árboles se evaluaron mediante el método *bootstrap* o remuestreo, que es la reestimación del árbol mediante la variación en la posición y la repetición de caracteres de la secuencia. Este método consiste en crear una matriz de datos cuyas columnas se van cambiando de forma aleatoria, e incluso se repiten en una misma matriz, y de cada una de las matrices resultantes crear un árbol filogenético, contando al final en cuántos de ellos aparece el clado a estudiar. Este proceso se repite varias veces, siendo lo más común repetirlo 1000 veces. Al final se indica el porcentaje de veces en que cada nodo del árbol se presentó en las matrices remuestreadas. Al final todos estos árboles se representan en uno consenso donde aparecen los porcentajes de la proporción de cada réplica. Así, si una rama presenta más del 50% quiere decir que ésta es fiable. Por otro lado, las secuencias obtenidas fueron visualizadas y editadas en el programa Vector NTI (Invitrogen).

### **3.13 PRUEBAS DE DETECCIÓN**

Se evaluaron, mediante RT-PCR, las muestras de arracachas provenientes del banco de germoplasma de CIP para las secuencias de crinivirus y vitivirus. Así mismo, se evaluaron también muestras de papas provenientes de Colombia (Cundinamarca) y de Perú (Huánuco

y Cajamarca). Para la detección del crinivirus putativo de arracacha se utilizaron los cebadores Crini-RNA2-Fi y Crini-RNA2-R1 (Tabla 4); y para el vitivirus putativo, los cebadores Viti-CP-F1 y Viti-CP-R1 (Tabla 5).

### **3.14. PRUEBAS DE TRANSMISIÓN CON INSECTOS VECTORES**

Las plantas de arracacha donde se encontraron secuencias asociadas a virus (vitivirus y crinivirus) se colocaron por separado en una jaula junto con 400 insectos vectores en un invernadero de vidrio. Como insectos vectores, se utilizaron el áfido *Myzus persicae* (para el caso de la arracacha donde se encontraron secuencias asociadas a vitivirus) y mosca blanca de las especies *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (para el caso de la arracacha en donde se encontró secuencias asociadas a crinivirus), por ser insectos vectores reportados para estos grupos de virus. Se dejaron los insectos con las plantas por un periodo de adquisición de 48 horas dentro de jaulas, para posteriormente colocar 20 insectos a plántulas de papa independientes dentro de jaulas para un ‘periodo de inoculación’ de 48 horas. Pasado dicho tiempo, se procedió a eliminar los insectos manualmente y mediante la aplicación de insecticidas. Se hicieron 20 repeticiones en 2 variedades de papa: Canchán y Perricholi (40 plántulas de papa en total). Un mes después, las plantas inoculadas fueron evaluadas mediante RT-PCR para vitivirus y crinivirus.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. PRUEBAS EN PLANTAS INDICADORAS Y SEROLOGÍA

Mediante RT-PCR (con los cebadores diseñados basados en las secuencias obtenidas en la secuenciación profunda), se llegó a detectar la presencia del nepovirus A8 en una planta de arracacha mantenida en el germoplasma *in-vitro* del Centro Internacional de la Papa (con número CIP 204085 y código de colector MH-548), el cual fue colectado en la cercanía de Calca, departamento de Cusco. De esta planta infectada se realizó un rango de hospedero, observándose principalmente síntomas sistémicos en *Nicotiana benthamiana* (líneas de arabesco), *Nicotiana occidentalis* (amarillamiento de nervaduras y puntos necróticos), así como en *Chenopodium quinoa* y *C. murale* (necrosis apical) (Figura 2).

A la muestra de arracacha positiva a nepovirus A8 se le realizó una prueba de DAS-ELISA utilizando el anticuerpo para PBRSV [nepovirus que se ha reportado infectando arracacha (Lizárraga *et al.* 1994)] y para TRSV de Bioreba se utilizó como control positivo a *Tobacco ring spot virus* variante calico (TRSV-Ca) y NC-38 (TRSV NC-38), gentilmente otorgados por el profesor C.E. Fribourg. El TRSV-Ca y el nepovirus A8 reaccionaron sólo con el anticuerpo para PBRSV. El control TRSV NC-38 no reaccionó con ningún anticuerpo (Figura 3).

La reacción positiva del virus A8 de arracacha frente al antisuero de PBRSV demostraría que es un aislamiento correspondiente a PBRSV. Con esta idea, se evaluó con más detalles los resultados obtenidos de la secuenciación profunda, tanto para identificar al nepovirus A8 como para, de tratarse del PBRSV, poder obtener la secuencia completa y posteriormente depositarlo en la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica o *National Center for Biotechnology Information*, el cual almacena y actualiza constantemente la información referente a secuencias genómicas en un banco de datos (*GenBank*). Dicha información se puede obtener de forma libre en internet). Los síntomas observados en las plantas indicadoras se parecieron más a los

reportados para PBRSV y TRSV-Ca (Salazar y Harrison 1978a, Fribourg 1977) que a las demás variantes de TRSV (Salazar y Harrison 1978b).

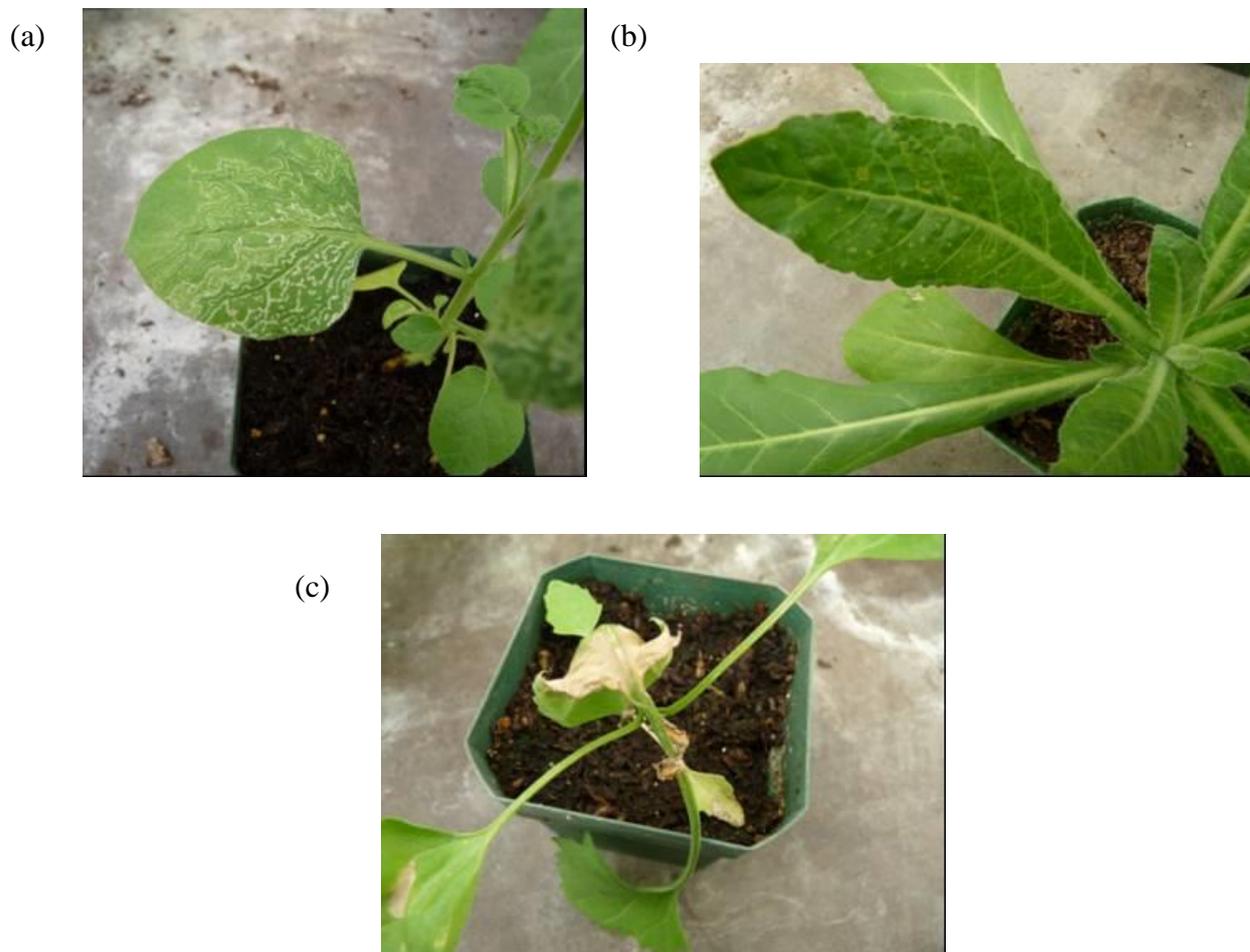


Figura 2: Síntomas sistémicos producidos por el supuesto nepovirus de arracacha: (a) líneas de arabesco en *Nicotiana benthamiana*, (b) amarillamiento de nervaduras y puntos necróticos en *Nicotiana occidentalis* y (c) necrosis apical en *Chenopodium murale*.

La reacción positiva del TRSV-Ca y el virus A8 ante el antisuero de PBRSV y no al antisuero para TRSV indicaría que los virus TRSV-Ca y A8 tienen una mayor semejanza con PBRSV. Los controles positivos comerciales (variante de PBRSV de DMSZ y de TRSV de Bioreba) reaccionaron con su respectivo anticuerpo. Debido a que TRSV-Ca fue inicialmente reportado como variante de TRSV (Fribourg 1977) y posteriormente como una variante de PBRSV (Salazar y Harrison 1977, 1978a, 1978b), se consideró necesario realizar un análisis genético del nepovirus A8 (y TRSV-Ca) para conocer su verdadera

relación en el género *Nepovirus* (para definir si se trata de una variante/aislamiento de TRSV o de PBRSV).

Los valores con los datos de absorbancia para cada muestra se presentan en el cuadro 6.

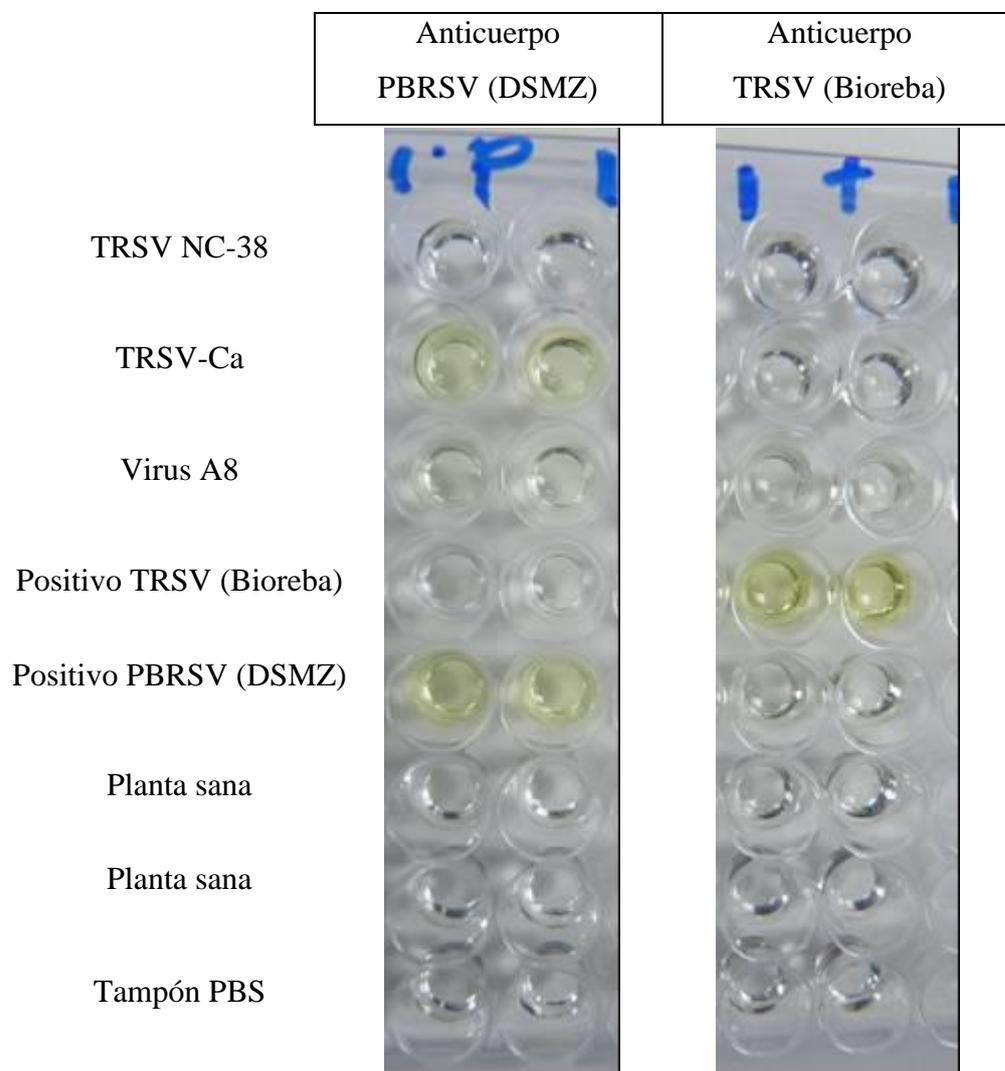


Figura 3: DAS-ELISA con el anticuerpo para PBRSV (izquierda) y TRSV (derecha) realizado para las muestras de plantas infectadas con TRSV-Ca, TRSV NC-38 y nepovirus de arracacha. Cada muestra se encuentra con su repetición al costado por cada anticuerpo utilizado. El color amarillo en el pocillo indica reacción positiva de TRSV-Ca, virus A8 con el anticuerpo de PBRSV, y de TRSV con su homólogo de Bioreba.

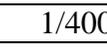
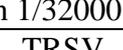
Tabla 6: Valores de la absorbancia (405nm) de las muestras con su repetición contra los anticuerpos comerciales de PBRSV y TRSV.

Muestras	Lecturas de absorbancias a 60 minutos de reacción			
	Anticuerpo PBRSV (DSMZ)		Anticuerpo TRSV (Bioreba)	
	I	II	I	II
TRSV NC-38	0.095	0.084	0.092	0.079
TRSV-Ca	<b>0.532</b>	<b>0.500</b>	0.097	0.090
Virus A8	<b>0.213</b>	<b>0.197</b>	0.155	0.150
Positivo TRSV (Bioreba)	0.077	0.081	<b>1.203</b>	<b>1.267</b>
Positivo PBRSV (DSMZ)	<b>0.770</b>	<b>0.760</b>	0.106	0.114
Planta sana ( <i>N. benthamiana</i> )	0.076	0.080	0.082	0.075
Planta sana ( <i>N. benthamiana</i> )	0.083	0.079	0.081	0.082
Buffer	0.083	0.077	0.083	0.085

\* Se consideran como muestras positivas (en negritas) a los valores que tienen un valor de absorbancia más alto que el doble del sano.

Así mismo también se realizó una prueba de NCM-ELISA utilizando el antisuero de TRSV NC-38 (también otorgado por Mg Sc. Ing. César Fribourg) donde primero se realizó una prueba de dilución del antisuero para saber cuál es la dilución correcta (que resultó ser 1/32000, Figura 4) para después proseguir con la prueba de dilución de las muestras (Figura 5). En esta segunda prueba se confirmó lo observado en la prueba anterior, que el anticuerpo de TRSV NC-38 sólo reaccionó con su homólogo.

A)

Aislamientos de virus	Diluciones del anticuerpo del virus TRSV NC-38			
	1/250	1/500	1/1000	1/2000
TRSV NC-38				
TRSV-Ca				
Virus A8				
Planta sana ( <i>N. benthamiana</i> )				
	1/4000	1/8000	1/16000	1/32000
TRSV NC-38				
TRSV-Ca				
Virus A8				
Planta sana ( <i>N. benthamiana</i> )				

B)

Dilución 1/32000 del anticuerpo del virus TRSV NC-38				
TRSV (Bioreba) 1/10	TRSV (Bioreba) 1/20	PBRSV (DSMZ) 1/10	PBRSV (DSMZ) 1/20	Tampón PBS
				

Figura 4: Evaluación de NCM-ELISA. A) Prueba de titulación del antisero de TRSV NC-38. Las diluciones realizadas del antisero de TRSV *strain* NC-38 fueron 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000, 1/32000. Se evaluaron los virus TRSV NC-38, TRSV *strain* calico, virus A8 (en el presente estudio). Las reacciones de color púrpura oscura en las distintas diluciones indican una reacción positiva de las diluciones de TRSV NC-38 con su antisero. B) Prueba con diluciones de muestras de TRSV y PBRSV comerciales, donde se observa que el antisero de TRSV NC-38 no reacciona con ninguna de ellas.

En lo concerniente a Arracacha virus 1 (AP-1), se inoculó en plantas indicadoras (*Nicotiana clevelandii*, *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa*) el aislamiento que se mantenía liofilizado en el CIP, lográndose recuperar este aislamiento viral en *C. quinoa*, para futuro secuenciamiento de su genoma.

## **4.2. SECUENCIACIÓN PROFUNDA PARA EL VIRUS A8 Y EL AP-1**

La tecnología de *next generation sequencing* o *deep sequencing*, se ha estado utilizando en los últimos años como una herramienta de caracterización molecular de virus, lo que ha servido para detectar no sólo virus conocidos sino también, hasta la fecha de su publicación, todavía desconocidos (Kreuze *et al.* 2009, 2013; De Souza *et al.* 2013, Fuentes *et al.* 2012). Esto es de gran importancia ya que, debido a que técnicas comúnmente utilizadas como ELISA y PCR, sólo son capaces de detectar a virus conocidos, de los que se tiene anticuerpos para diagnóstico e información de secuencia; sin embargo, mediante *deep sequencing* se puede encontrar virus sin tener información previa, lo que ayuda a diseñar nuevos cebadores para esos nuevos virus putativos o para sintetizar anticuerpos recombinantes que puedan reconocer muchas más variantes de una especie viral en particular.

### **4.2.1) Nepovirus de arracacha (Virus A8)**

Por secuenciación profunda se pudieron obtener *contigs*, los que sirvieron como base para diseñar cebadores e intentar completar el genoma viral. Hasta el momento se tiene secuenciado 7514 nucleótidos del ARN 1 y 3877 nucleótidos del ARN 2 (sin contar la cola poli-A en ambos ARN). Se logró secuenciar la región 3' UTR (del inglés: untranslated region; región no traducida) en ambos ARNs, quedando por secuenciar solamente un fragmento de la región 5' UTR del ARN 1 (unos 75 nucleótidos, comparado con el genoma del TRSV –número de acceso del GenBank NC\_005097-); sin embargo, el ARN2 fue secuenciado completamente (Figura 5). Entre lo secuenciado se tiene tanto la parte de la región Pro-Pol (región delineada por el motivo “CG” de la proteinasa similar a 3C y el motivo “GDD” de la polimerasa) como de la cubierta proteica (CP). Estas regiones son utilizadas para el estudio taxonómico, por lo que se realizó un alineamiento y un árbol filogenético para conocer su estatus taxonómico (Figura 6).

Con base en los datos del NCBI, sólo se encontraba disponible la secuencia de un fragmento del genoma del PBRVS (número de accesoión AJ616715), que está relacionado sólo a la región del RdRp (del inglés: RNA dependent RNA polimerase; ARN polimerasa dependiente de RNA), no existía secuencias reportadas para la proteinasa. La secuencia del RdRp disponible del PBRVS muestra identidad en aminoácidos (85%) al TRSV, ligeramente por encima el límite de demarcación (80%) de especies determinado por el ICTV (Sanfaçon *et al.* 2012). Según la secuencia obtenida, del virus A8 (al parecer una variante de PBRVS que infecta arracacha) tiene 95% de identidad en aminoácidos a la secuencia de PBRVS (región RdRp) pero es 90% al TRSV. La identidad de la secuencia de aminoácidos de la región de Pro-Pol (utilizada para la demarcación de especies) del virus A8 comparado con el TRSV es 85% y se encuentra cercano a límite de demarcación de especies (80%), lo cual no evidencia claramente que se trate de dos especies distinta. Por esta razón, considerando los resultados de ELISA, se utilizó la secuencia de la cubierta proteica (CP), obteniéndose una identidad de 64% con TRSV, muy por debajo del límite de demarcación (75%) de acuerdo a lo estipulado en el Virus Taxonomy (Sanfaçon *et al.* 2012). El fragmento amplificado del RdRp del TRSV-Ca que se logró secuenciar mostró una identidad en aminoácidos de 100% con el PBRVS. Las tablas 7 y 8 muestran las identidades en aminoácidos de la región Pro-Pol y CP, respectivamente, de los nepovirus evaluados. El análisis molecular de la CP y del RdRp y las reacciones serológicas entre los virus evidencian que el virus A8 y el TRSV-Ca serían un aislamiento/variante de PBRVS y que éste es una especie viral diferente del TRSV. La cercanía entre estos virus se puede observar en los árboles filogenéticos construidos tomando en cuenta el núcleo del RdRp y la cubierta proteica (Figura 6). Los mismos resultados obtuvieron Richards *et al.* (2014) con un PBRVS aislado de papa.

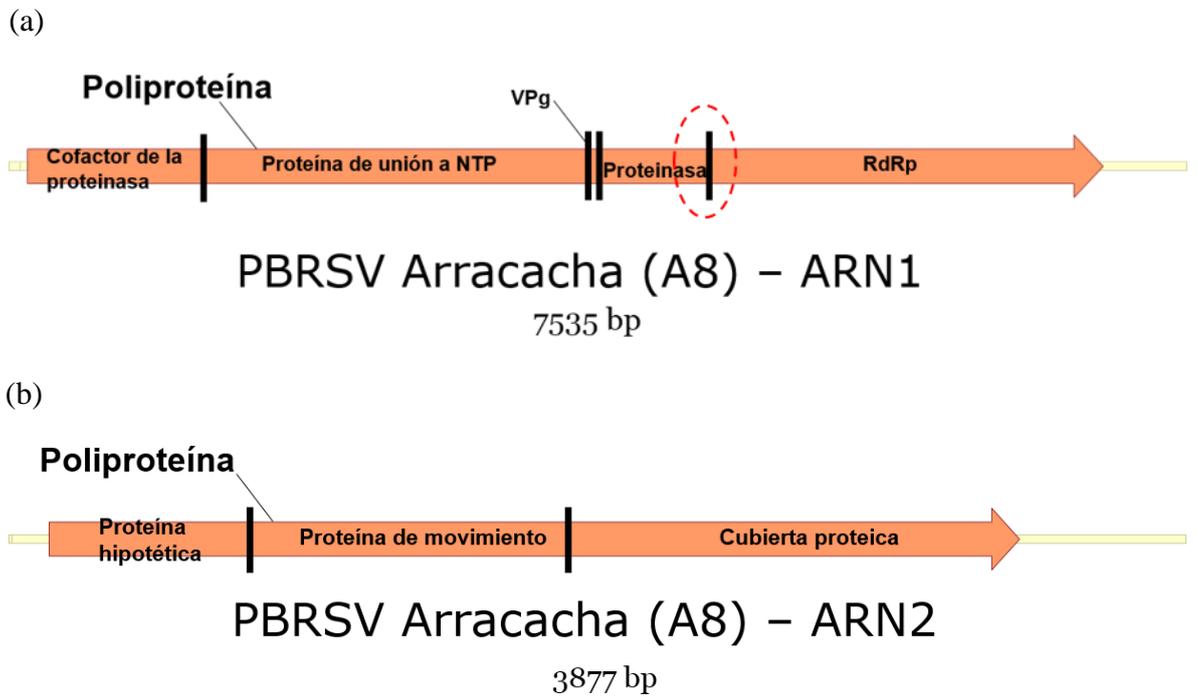
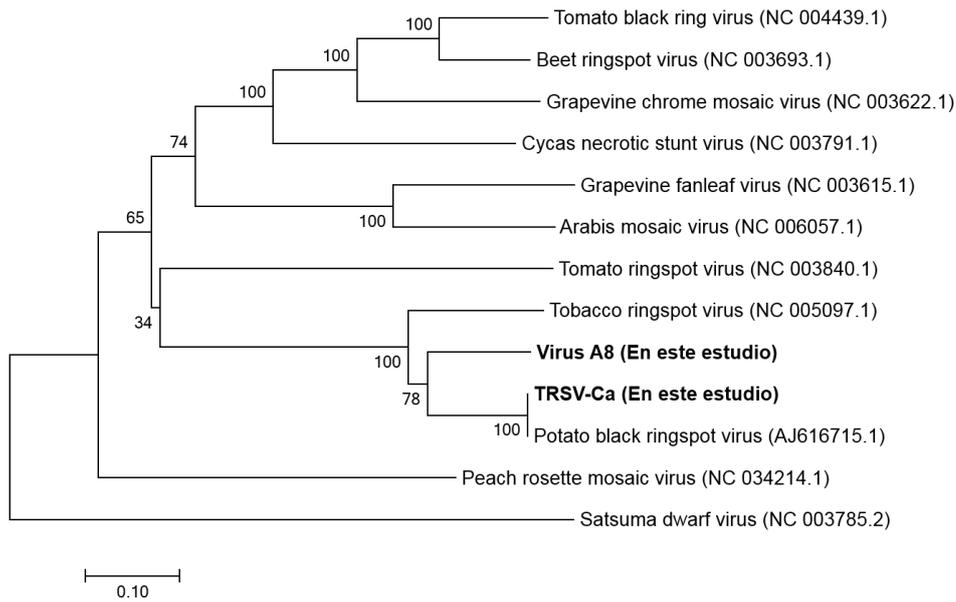


Figura 5: Secuencia genómica del ARN1 (a) y ARN2 (b) del virus A8 encontrado en arracacha. El círculo rojo en líneas punteadas rojas indica la posición de la región Pro-Pol.

(a)



(b)

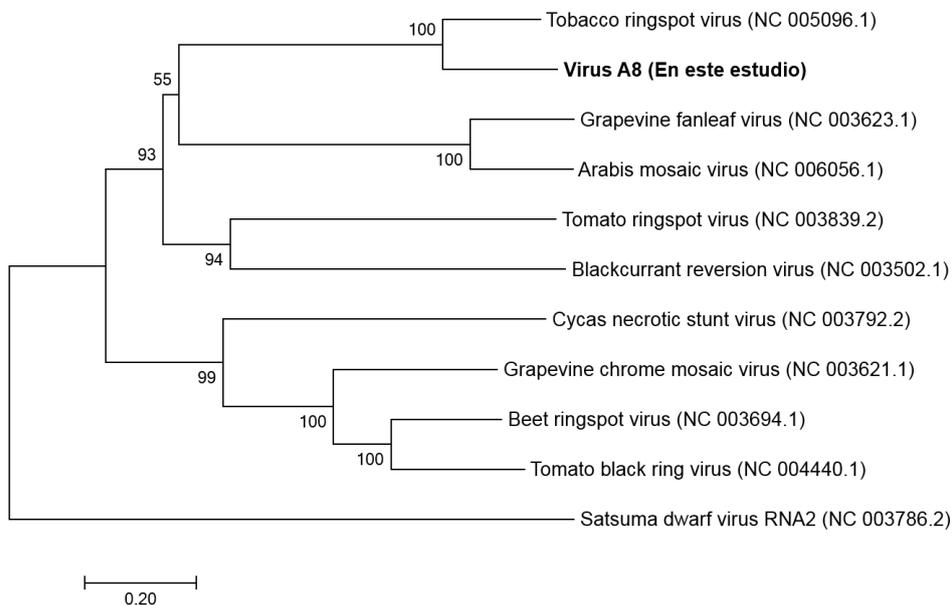


Figura 6: Árboles filogenéticos realizados con algunos miembros del género *Nepovirus* basados en el análisis de secuencias de aminoácido, utilizando el modelo *Neighbor-joining*, de las regiones Pro-Pol (a) y de la cubierta proteica (CP) (b). Los números en cada nodo indican valores porcentuales de soporte *bootstrap* obtenidos con 1000 repeticiones. Las barras horizontales representan el porcentaje estimado de divergencia de las secuencias. Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos del GenBank (NCBI, National Center of Biotechnology Information). Las secuencias de *Satsuma dwarf virus* (género *Sadwavirus*) se utilizaron como *outgroup*.

Tabla 7: Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región Pro-Pol entre algunos miembros del género *Nepovirus*. TRSV (*Tobacco ringspot virus*), PBRSV (*Potato black ringspot virus*), GFLV (*Grapevine fanleaf virus*), ArMV (*Arabis mosaic virus*), TBRV (*Tomato black ring virus*), BRSV (*Beet ringspot virus*), GCMV (*Grapevine chrome mosaic virus*), CNSV (*Cycas necrotic stunt virus*), ToRSV (*Tomato ringspot virus*), PRMV (*Peach rosette mosaic virus*).

Virus	TRSV	Virus_A8	PBRSV	TRSV-Ca	GFLV	ArMV	TBRV	BRSV	GCMV	CNSV	ToRSV	PRMV
TRSV												
Virus_A8	85%											
PBRSV	80%	95%										
TRSV-Ca	82%	92%	90%									
GFLV	39%	41%	24%	21%								
ArMV	41%	43%	26%	22%	81%							
TBRV	37%	40%	24%	21%	41%	40%						
BRSV	36%	38%	24%	21%	39%	39%	90%					
GCMV	36%	38%	24%	21%	41%	41%	76%	74%				
CNSV	35%	35%	22%	18%	41%	40%	53%	54%	53%			
ToRSV	36%	39%	23%	19%	41%	40%	37%	35%	39%	36%		
PRMV	31%	32%	20%	18%	39%	39%	36%	35%	37%	33%	37%	

Tabla 8: Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región de la cubierta proteica (CP) entre algunos miembros del género *Nepovirus*. TRSV (*Tobacco ringspot virus*), PBRSV (*Potato black ringspot virus*), GFLV (*Grapevine fanleaf virus*), ArMV (*Arabis mosaic virus*), TBRV (*Tomato black ring virus*), BRSV (*Beet ringspot virus*), GCMV (*Grapevine chrome mosaic virus*), CNSV (*Cycas necrotic stunt virus*), ToRSV (*Tomato ringspot virus*), PRMV (*Peach rosette mosaic virus*), BRV (*Blackcurrant reversion virus*).

Virus	TRSV	Virus_A8	GFLV	ArMV	TBRV	BRSV	GCMV	CNSV	ToRSV	BRV
TRSV										
Virus_A8	64%									
GFLV	22%	23%								
ArMV	23%	24%	69%							
TBRV	24%	22%	20%	19%						
BRSV	20%	20%	20%	19%	61%					
GCMV	21%	20%	21%	20%	50%	54%				
CNSV	17%	17%	15%	15%	28%	28%	30%			
ToRSV	23%	23%	20%	19%	18%	18%	19%	18%		
BRV	21%	21%	20%	20%	21%	21%	19%	17%	25%	

Con los resultados obtenidos mediante el *deep sequencing* se puede confirmar que PBRSV es capaz de infectar arracacha y, por otro lado, mediante una prueba de PCR e identidad de secuencia, se demostró que este agente viral es el mismo, o una variante, de TRSV-Ca, confirmando los resultados de Salazar y Harrison (1978), quienes emplearon ensayos de protección cruzada y pseudorecombinantes, además del serológico realizado por Fribourg (1977). Asimismo, una reciente publicación (Richards *et al.* 2014) compara las secuencias de este aislado de arracacha con el PBRSV de papa estudiado por Salazar y Harrison (1977, 1978a, 1978b), confirmando la afirmación dicha previamente. Sería interesante agregar que, debido a que el único TRSV reportado que era capaz de infectar papa era TRSV-Ca, y debido a que este en realidad resultó ser PBRSV, se podría decir que TRSV no sería capaz de infectar a la papa.

#### **4.2.2) Arracacha potyvirus-1 (AP-1)**

Se realizó extracción de ARN de material liofilizado de hojas infectadas con el virus denominado Arracacha potyvirus 1 (AP1), con la idea original de poder confirmar su ubicación taxonómica. Se realizó un RT-PCR con cebadores degenerados para potyvirus ([pot1 y pot3 (Tabla 3) los cuales amplifican la región parcial de la NIB y la CP], cuyo secuenciamiento del fragmento amplificado esperado resultó ser un aislamiento de *Arracacha mottle virus* (AMoV), anteriormente reportado en Brasil (Orilio *et al.* 2009), obteniéndose la secuencia parcial de la cubierta proteica (utilizado para demarcación de especie del género *Potyvirus*; Adams *et al.* 2012b) con una identidad en aminoácidos de 80% a AMoV. Con esta idea, se envió la muestra a *deep sequencing* para obtener más *contigs* y poder completar tanto la parte concerniente a la cubierta proteica (y poder dilucidar la identidad completa con AMoV) como también poder completar el genoma viral y compararlo con el genoma completo de AMoV. Con esto, se pudo completar la secuencia de la cubierta proteica hasta la cola poli-A; además se encontraron *contigs* en la dirección 5' que se utilizaron para diseñar cebadores y completar el genoma viral. Sin embargo, hubo mucha diferencia entre algunos *contigs* por lo que se pensó que había 2 variantes en el material liofilizado que se envió a *deep sequencing*, las cuales se denominaron variantes AP1-S1 y AP1-S2. Se confirmaron las secuencias de estas variantes utilizando cebadores específicos para cada variante, que a su vez sirvió para completar algunos *gaps* entre dichos *contigs*.

Cuando se obtuvo la secuencia completa de la poliproteína (y un poco de los UTRs de ambas variantes) se procedió a analizar la identidad de dichas secuencias. La poliproteína de las variantes AP1-S1 y AP1-S2 tuvieron una identidad de 92% en aminoácidos, y ambas tuvieron una identidad de 90% y 89% con la *Arracacha mottle virus* (AMoV), respectivamente. Debido a que la demarcación de especies en el género *Potyvirus*, que debe ser menor del 80%, se basa principalmente en la cubierta proteica (Adams *et al.* 2012b), se procedió a analizar la CP de ambas variantes, obteniéndose que la AP1-S1 y AP1-S2 tuvieron una identidad en aminoácidos con AMoV de 91%; y entre ambas variantes de 95%. Esto confirmaría que el AP1 sería un aislamiento diferente de AMoV. En la tabla 9, se puede observar las identidades en aminoácidos de la región de la cubierta proteica con diferentes miembros de género *Potyvirus*, entre los cuales están los 2 aislamientos de AP-1 evaluados en este estudio. Las secuencias obtenidas de ambas variantes fueron de 9619 nucleótidos para el AP1-S1 (sin contar la cola poliA) y 9569 para el AP1-S2 (no se pudo obtener la cola poliA). El genoma del AP-1 (Figura 7) produce dos ORFs (del inglés *open reading frame*; marco abierto de lectura), uno que traduciría la poliproteína común de los potyvirus y un ORF pequeño recientemente encontrado en todos los potyvirus, denominado proteína PIPO (del inglés: *pretty interesting potyvirus ORF*), la cual se fusiona a la región N terminal de proteína P3 después de fraccionamiento de la poliproteína (Orilio *et al.* 2013, Chung *et al.* 2008). La proteína PIPO de la variante AP1-S1 no comenzaría con ATG, sino con TTG (posiblemente debido a un error de secuenciamiento); sin embargo, hay potyvirus cuyo PIPO tampoco comienzan con ATG. Asimismo, la variante AP1-S2 sí comienza con ATG, al igual que la AMoV que está en el GenBank. La identidad en aminoácidos del PIPO entre ambas variantes es de 73%; sin embargo, del AP1-S1 y el AP1-S2 con la AMoV es de 73% y 76% respectivamente.

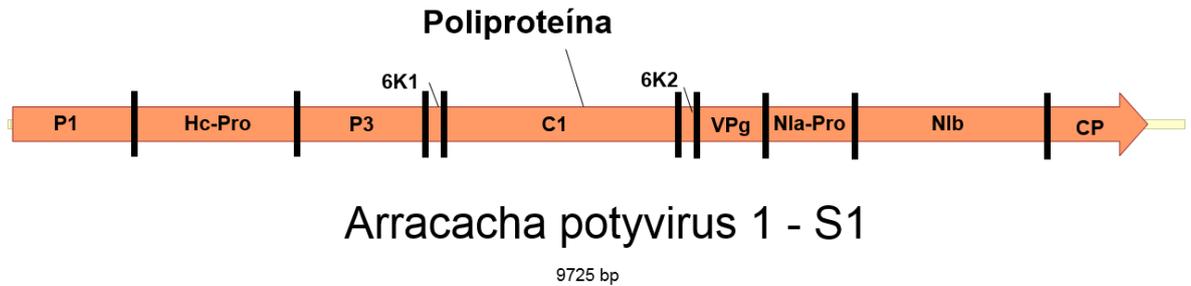


Figura 7: Secuencia del genoma del virus AP-1 (variante S1) obtenido por secuenciación profunda. La figura muestra la poliproteína codificada por este virus, la cual es fragmentada, produciendo diferentes proteínas como P1, Hc-Pro (*helper component-protease*), P3, 6K1, C1, 6K2, VPg (proteína viral ligada al genoma), NIa-Pro, Nib, CP.

Al igual que con el virus A8, se construyó un árbol filogenético (Figura 8) con varios miembros del género *Potyvirus*, en el que se incluyeron a los virus AP-1 y AMoV, observándose una relación cercana entre ellos.

Este resultado afianza la importancia de tener información de secuencia para poder hacer una comparación con posteriores hallazgos en casos de no disponer de anticuerpos para realizar relaciones serológicas. Fue interesante encontrar 2 variantes en una sola muestra de material liofilizado, ya que se supone que sólo una variante o *strain* de una especie viral debe estar infectando un determinado cultivo debido al silenciamiento genético (Waterhouse *et al.* 2001); sin embargo, se conoce que un cultivo puede ser infectado por distintas variantes si la infección ocurre casi al mismo tiempo (Srinivasan *et al.* 2012). Casos similares se ha encontrado en begomovirus que infectan camote, donde varias variantes se pueden encontrar en una única planta (Sanz *et al.* 2000, García-Andrés *et al.* 2006, Paprotka *et al.* 2010) pudiendo ser capaces de protegerse de alguna forma del silenciamiento de ARN; principalmente debido a que el silenciamiento parece ocurrir cuando las infecciones ocurren en tiempos distantes uno del otro, principio en que se basa la protección cruzada (Gonsalves 1998, Moreno *et al.* 2008, Dawson *et al.* 2015). Las 2 variantes del AP1 tuvieron una identidad tal que se los podía diferenciar; sin embargo, en una región intermedia la variación fue mínima, siendo prácticamente las mismas secuencias, lo que se demostró mediante cebadores específicos que amplificaron estas regiones. En el caso de la proteína PIPO llama la atención que en la variante AP1-S1, dicho ORF no comienza con ATG, similar a las proteínas PIPO de otros potyvirus que tampoco comienzan con ATG,

como *Callistephus mottle virus* (Seo *et al.* 2016), *Cyrtanthus elatus virus A* (Wylie y Jones 2012), *Vanilla distortion mosaic virus* (Adams *et al.* 2014), entre otros. La caracterización biológica del AP1 fue previamente realizada por Santa Cruz (1994), llegando a la conclusión que se trataba de un potyvirus, lo cual es confirmado en esta investigación. Por otro lado, los resultados del AP1 nunca fueron publicados, y debido a que el AMoV sí, entonces a partir de la fecha se debe considerar al AP1 como un aislamiento de AMoV.

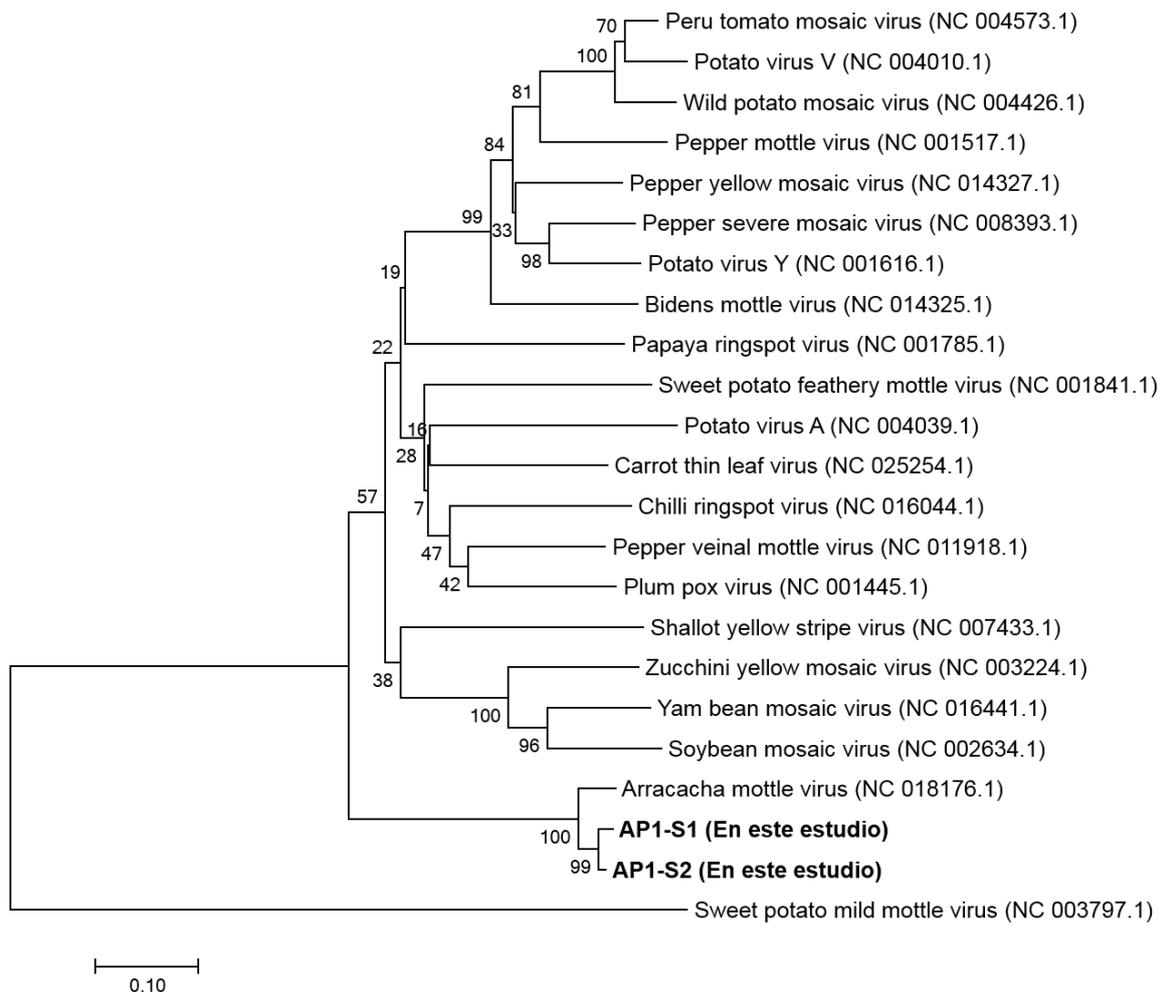


Figura 8: Árbol filogenético construido con algunos miembros del género *Potyvirus* basado en el análisis de secuencias de aminoácidos de la cubierta proteica (CP). Los números en cada nodo indican valores porcentuales de soporte *bootstrap* obtenidos con 1000 repeticiones. Las barras horizontales representan el porcentaje estimado de divergencia de las secuencias. Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos del GenBank (NCBI, National Center of Biotechnology Information). *Sweet potato mild mottle virus* es usado como *outgroup*.

Tabla 9: Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región de la CP entre algunos miembros del género *Potyvirus*. AMoV (*Arracacha mottle virus*), PTV (*Peru tomato mosaic virus*), PVV (*Potato virus V*), WPMV (*Wild potato mosaic virus*), PepMoV (*Pepper mottle virus*), PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*), PepSMV (*Pepper severe mosaic virus*), PVY (*Potato virus Y*), BiMoV (*Bidens mottle virus*), PRSV (*Papaya ringspot virus*), PVA (*Potato virus A*), SPFMV (*Sweet potato feathery mottle virus*), ChiRSV (*Chilli ringspot virus*), PVMV (*Pepper veinal mottle virus*), PPV (*Plum pox virus*), SYSV (*Shallot yellow stripe virus*), ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*), YBMV (*Yam bean mosaic virus*), SMV (*Soybean mosaic virus*), CTLV (*Carrot thin leaf virus*)

Virus	AP1-S1	AP1-S2	AMoV	PTV	PVV	WPMV	PepMoV	PepYMV	PepSMV	PVY	BiMoV	PRSV	PVA	SPFMV	ChiRSV	PVMV	PPV	SYSV	ZYMV	YBMV	SMV	CTLV
AP1-S1																						
AP1-S2	95%																					
AMoV	91%	91%																				
PTV	56%	56%	56%																			
PVV	56%	55%	54%	88%																		
WPMV	57%	57%	57%	86%	84%																	
PepMoV	52%	52%	52%	73%	70%	73%																
PepYMV	55%	56%	55%	71%	69%	69%	71%															
PepSMV	57%	57%	56%	73%	71%	71%	72%	74%														
PVY	57%	57%	56%	72%	68%	69%	72%	73%	80%													
BiMoV	55%	56%	55%	68%	65%	68%	67%	70%	71%	73%												
PRSV	54%	55%	53%	53%	52%	51%	54%	60%	58%	57%	58%											
PVA	52%	53%	52%	57%	54%	54%	56%	56%	60%	57%	56%	54%										
SPFMV	45%	46%	46%	51%	51%	50%	50%	53%	48%	48%	51%	49%	51%									
ChiRSV	54%	54%	54%	55%	53%	56%	56%	56%	57%	57%	58%	59%	61%	54%								
PVMV	55%	55%	55%	60%	60%	60%	59%	60%	60%	60%	61%	57%	64%	53%	70%							
PPV	47%	48%	47%	50%	50%	50%	49%	53%	53%	51%	53%	52%	53%	57%	56%	62%						
SYSV	56%	57%	58%	55%	54%	55%	56%	57%	58%	57%	58%	54%	55%	47%	58%	57%	49%					
ZYMV	53%	55%	53%	55%	53%	53%	57%	57%	61%	59%	57%	55%	57%	47%	55%	54%	49%	57%				
YBMV	54%	54%	54%	54%	52%	54%	57%	57%	57%	58%	56%	52%	58%	47%	55%	55%	50%	56%	70%			
SMV	52%	53%	53%	56%	56%	56%	56%	57%	59%	60%	58%	51%	56%	46%	55%	56%	48%	59%	67%	76%		
CTLV	55%	57%	55%	59%	57%	57%	56%	60%	58%	58%	60%	59%	60%	53%	61%	66%	55%	58%	55%	55%	56%	

### 4.3. SECUENCIAS ASOCIADAS A VIRUS ENCONTRADOS POR SECUENCIACIÓN PROFUNDA EN PLANTAS DE ARRACACHA

Mediante esta tecnología se obtuvieron *contigs* que tenían identidad con pequeñas regiones del genoma de *Crinivirus* y *Vitivirus*. Con base en estos *contigs* se diseñaron cebadores tanto para realizar un tamizado con las muestras de arracacha del banco de germoplasma del CIP y para evaluarlas en papa, como para tentar obtener secuencias más largas y si estas poseen la organización genómica de los géneros virales reportados a los que estas secuencias tienen identidad.

#### 4.3.1) Secuencias asociadas a Crinivirus

En una planta de arracacha proveniente de CIP-Huancayo, cuyo ARN fue mezclado con la de otras arracachas del mismo lugar para *deep sequencing*, se encontraron secuencias asociadas a virus del género *Crinivirus*, cuyos *contigs* sirvieron de base para diseñar cebadores. Sin embargo, al terminarse el ARN de esta mezcla, se procedió a buscar otra arracacha que esté infectada con el mismo agente viral utilizando los cebadores que amplifican la región de la HSP70, resultando positivo la arracacha con código CIP204009. Se pudo secuenciar 7461 nucleótidos del ARN 1 y 7305 nucleótidos del ARN 2. En el ARN 1 faltaría por secuenciar 172 nucleótidos aproximadamente por el extremo 3' UTR y 797 nucleótidos por el extremo 5' UTR. En la secuencia con identidad al ARN 2 de crinivirus, faltaría por obtener 496 nucleótidos del extremo 5' UTR y 190 nucleótidos del extremo 3' UTR (Figura 9). El tamaño de la secuencia se basó originalmente de la secuencia de *Blackberry yellow vein-associated virus* (BYVaV), el cual tiene como números de accesoión NC\_006962 y NC\_006963 para el ARN 1 y ARN 2, respectivamente.

Con respecto al análisis de secuencia, se realizaron árboles con el HSP70 (cuyas siglas provienen del inglés: 70KDa *heat shock protein*, proteína de choque térmico de 70KDa) y con la cubierta proteica, las cuales son usadas taxonómicamente para clasificar a los virus de este género (Martelli *et al.* 2012), debiendo tener una identidad menor al 90% en aminoácidos para ser considerado una nueva especie. Al hacer la comparación de secuencia, se obtuvo con el HSP70 una identidad de 72% con BYVaV. Con respecto a la CP, se tuvo una identidad de 54% con *Beet pseudoyellows virus*. En las tablas 10 y 11 se observan los valores de identidad con las regiones de

HSP70 y CP en diferentes miembros del género *Crinivirus*. Basados en estos resultados, la ubicación taxonómica de esta secuencia asociada a virus, está relacionado con el género *Crinivirus* (Figura 10). Por ello, se propuso denominar a este virus putativo como Arracacha latent virus C (ALVC). Se hicieron pruebas de transmisión con insectos vectores (punto 4.6) para poder aislar este virus putativo sin éxito.

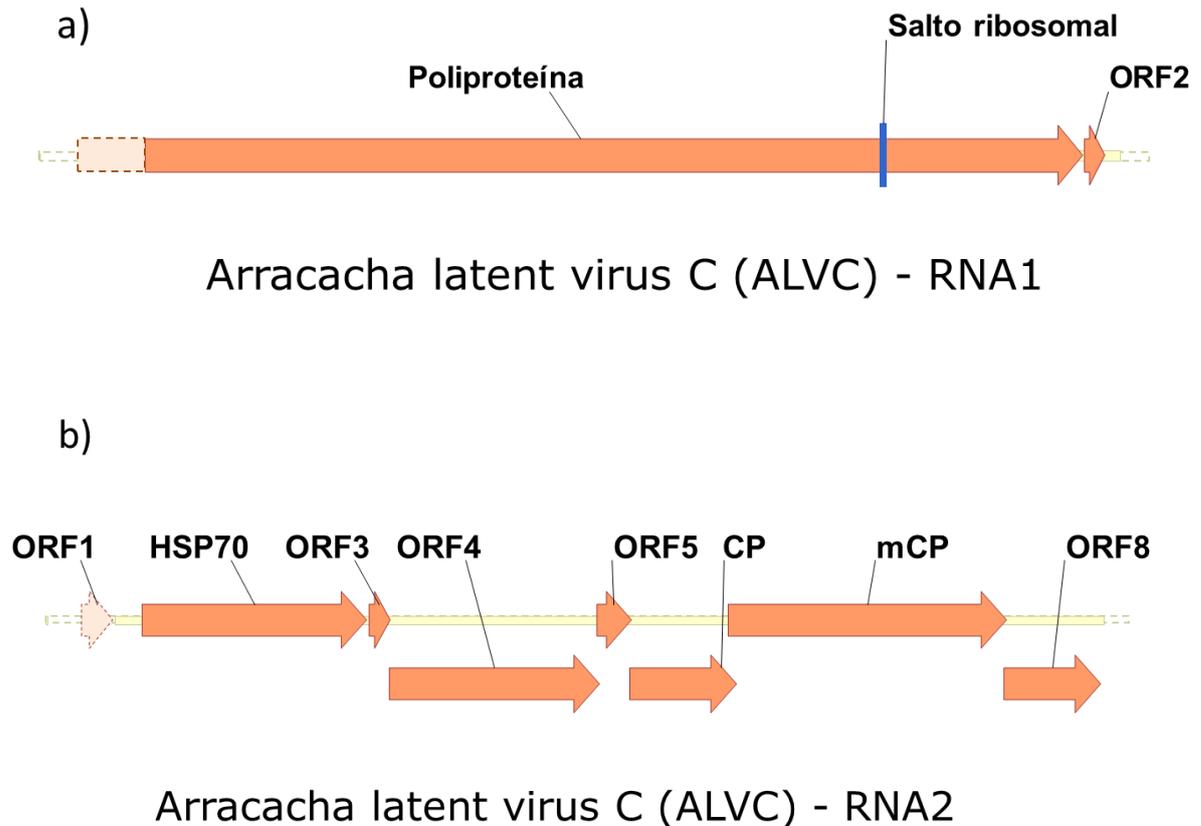


Figura 9: Secuenciamiento del ARN asociado a crinivirus encontrado en arracacha por secuenciación profunda. Las regiones rodeadas por líneas continuas indican que fueron secuenciadas por RT-PCR usando cebadores diseñados a partir de las secuencias obtenidas por la tecnología de *next generation sequencing*, mientras que las zonas sombreadas más claras con líneas discontinuas representan regiones no secuenciadas estimadas según virus relacionados. (a) ARN 1 y (b) ARN 2.

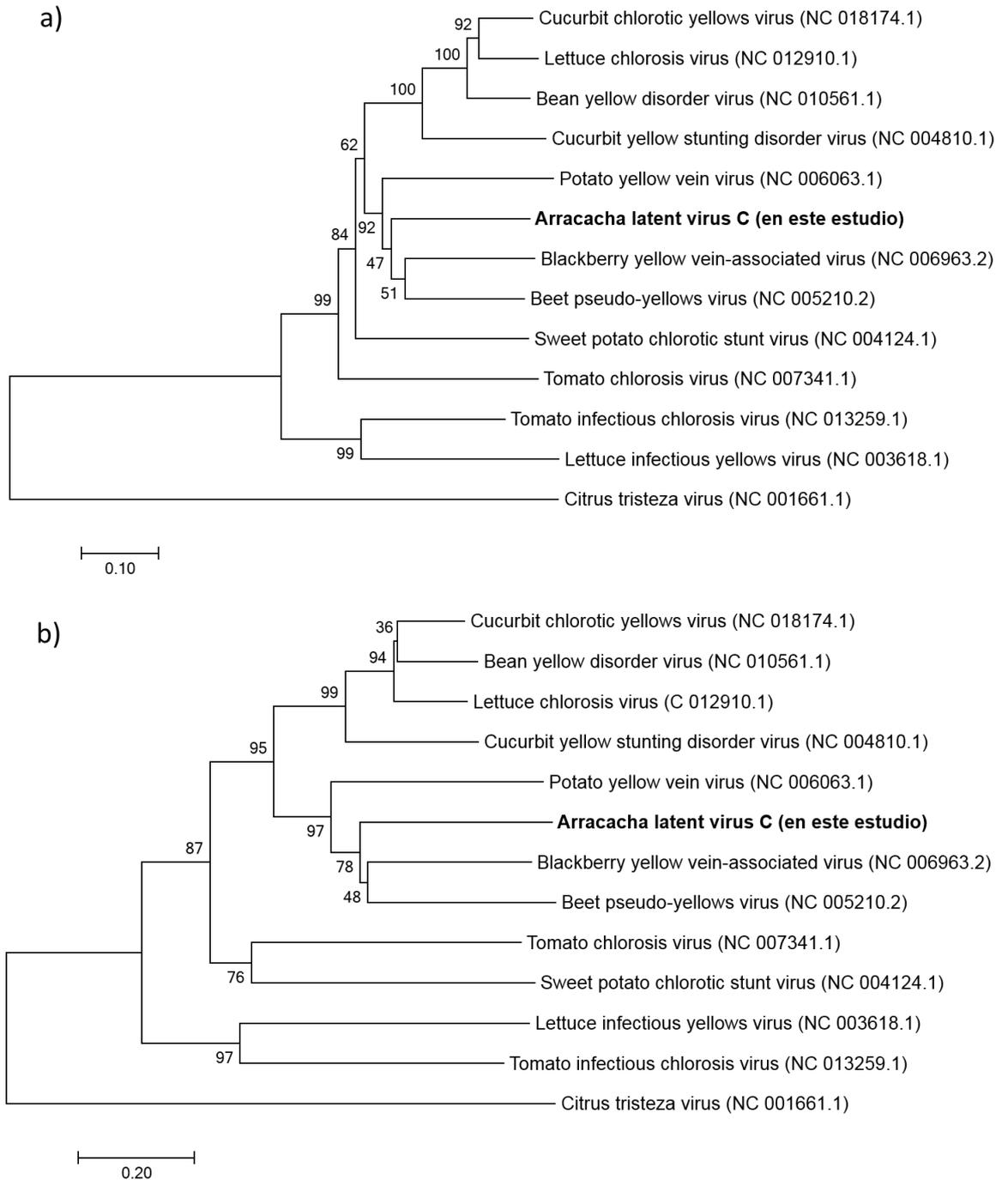


Figura 10: Árboles filogenéticos realizados con algunos miembros del género *Crinivirus* basados en el análisis de secuencias nucleotídicas del marco abierto de lectura (ORF) correspondiente a: (a) HSP70, (b) cubierta proteica. Los números indican valores porcentuales de soporte *bootstrap* obtenidos con 1000 repeticiones. Las barras horizontales representan el porcentaje estimado de divergencia de las secuencias. Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos del GenBank (NCBI, National Center of Biotechnology Information). Las secuencias de *Citrus tristeza virus* (género *Closterovirus*) se utilizaron como ‘outgroup’.

Tabla 10: Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región de HSP70 entre algunos miembros del género *Crinivirus*. ALVC (Arracacha latent virus C), CCYV (*Cucurbit chlorotic yellows virus*), LCV (*Lettuce chlorosis virus*), BYDV (*Bean yellow disorder virus*), ToCV (*Tomato chlorosis virus*), BYVaV (*Blackberry yellow vein-associated virus*), PYVV (Potato yellow vein virus), BPYV (*Beet pseudo-yellows virus*), CYSDV (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*), SPCSV (*Sweet potato chlorotic stunt virus*), TICV (*Tomato infectious chlorosis virus*), LIYV (*Lettuce infectious yellows virus*)

Virus	ALVC	CCYV	LCV	BYDV	ToCV	BYVaV	PYVV	BPYV	CYSDV	SPCSV	TICV	LIYV
ALVC												
CCYV	65%											
LCV	64%	85%										
BYDV	65%	84%	83%									
ToCV	60%	59%	59%	60%								
BYVaV	67%	63%	62%	63%	58%							
PYVV	64%	62%	64%	64%	57%	67%						
BPYV	72%	65%	64%	64%	59%	72%	67%					
CYSDV	62%	73%	72%	73%	60%	63%	61%	62%				
SPCSV	64%	64%	63%	63%	60%	63%	61%	63%	61%			
TICV	54%	53%	53%	54%	53%	52%	53%	52%	53%	52%		
LIYV	50%	47%	47%	48%	50%	48%	49%	48%	49%	50%	63%	

Tabla 11: Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región CP entre algunos miembros del género *Crinivirus*. ALVC (Arracacha latent virus C), CCYV (*Cucurbit chlorotic yellows virus*), LCV (*Lettuce chlorosis virus*), BYDV (Bean yellow disorder virus), ToCV (*Tomato chlorosis virus*), BYVaV (*Blackberry yellow vein-associated virus*), PYVV (*Potato yellow vein virus*), BPYV (*Beet pseudo-yellows virus*), CYSDV (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*), SPCSV (*Sweet potato chlorotic stunt virus*), TICV (*Tomato infectious chlorosis virus*)

Virus	ALVC	CCYV	LCV	BYDV	ToCV	BYVaV	PYVV	BPYV	CYSDV	SPCSV	LIYV	TICV
ALVC												
CCYV	40%											
LCV	38%	76%										
BYDV	37%	74%	72%									
ToCV	25%	30%	30%	28%								
BYVaV	44%	41%	41%	38%	26%							
PYVV	42%	38%	36%	35%	30%	44%						
BPYV	46%	37%	38%	36%	29%	47%	43%					
CYSDV	38%	60%	54%	58%	31%	38%	38%	39%				
SPCSV	25%	33%	33%	33%	37%	24%	27%	28%	33%			
LIYV	23%	25%	25%	22%	22%	22%	25%	24%	25%	23%		
TICV	21%	26%	23%	24%	19%	23%	24%	23%	25%	23%	32%	

Sobre el hecho que no se haya podido obtener los extremos del ARN1 en el secuenciamiento de este crinivirus putativo, hubiera sido interesante conocer si existía otro ORF cercano al extremo 3' UTR (como, por ejemplo, saber si pudiese tener un supresor del silenciamiento, como es el caso del SPCSV). Del mismo modo, tampoco se obtuvo los extremos del ARN2, por lo que no se conoce el ORF1 de este ARN, principalmente debido a que esta región es una zona de mayor variabilidad entre los crinivirus. La falta de una cola poliA en el extremo 3' UTR en los crinivirus (Martelli *et al.* 2012) hizo más complicada la intención de obtener la secuencia de esta región. En el análisis filogenético, se pudo visualizar en el árbol obtenido utilizando la CP (Figura 11b), que este crinivirus putativo se encuentra junto con PYVV, BYVaV, SpaV y BPYV, los cuales pertenecen al grupo 1 de los crinivirus, que son transmitidos por *Trialeurodes vaporariorum*, junto con los del grupo 3 (Martelli *et al.* 2012). Es por ello que se hicieron pruebas de transmisión utilizando *T. vaporariorum*, pero además también con *Bemisia tabaci* (que es vector de transmisión de los crinivirus del grupo 2); pero con resultados negativos. En dicha prueba, los intentos de transmisión del virus

de arracacha se realizaron a papas variedad Canchán y Perricholi, debido a que en un tamizado (que se discute más abajo) se encontró que los cebadores para la HSP70 de este crinivirus de arracacha amplificaron en muestras de papas colombianas, además de que no había disponibilidad de una arracacha sana.

#### **4.3.2) Secuencias asociadas a Vitivirus**

Se encontró una secuencia de ARN asociada a vitivirus entre la mezcla de muestras que se enviaron al *deep sequencing*. De los cebadores diseñados a partir de los *contigs* hallados, sólo se pudo amplificar parcialmente las regiones correspondientes a la cubierta cubierta, los cuales fueron los únicos *contigs* con una alta identidad para vitivirus reportados en el NCBI. Al agotarse el stock tanto del ARN como del ADNc se procedió a la búsqueda de otra arracacha que esté infectada con este posible nuevo virus, evaluando la colección de germoplasma del CIP, en donde se encontró que la arracacha con número de accesión CIP-204068 salió positiva con los cebadores para la CP (con la que se trabajó previamente con la mezcla enviada a *deep sequencing*). Se diseñaron varios cebadores, tanto degenerados como basados en los *contigs* de *deep sequencing* con baja identidad para vitivirus reportados; sin embargo, sólo se pudo amplificar un fragmento de la parte final de la RdRp. Posteriormente se realizó un nuevo envío para *deep sequencing* de donde se logró conseguir nuevos *contigs* de nuevas regiones de este virus putativo nuevo que sirvieron para diseñar nuevos cebadores y obtener nuevas secuencias de este virus putativo nuevo. Posteriormente, se completaron los *gaps* que había entre los fragmentos de PCR obtenidos mediante cebadores específicos, obteniéndose casi la totalidad del genoma. La región secuenciada del genoma se grafica en la Figura 11. Se compararon las secuencias obtenidas correspondientes a la CP (la totalidad) y a la secuencia parcial de la RdRp, los cuales mostraron una identidad de 47% y 44% en aminoácidos con el *Grapevine virus B* (GVB), respectivamente. En las tablas 12 y 13 se observan los valores de identidad con las regiones de RdRp y CP en diferentes miembros del género *Vitivirus*. Según el Virus Taxonomy (Adams *et al.* 2012a), la secuencia correspondiente a la cubierta proteica y a la replicasa deben de tener una identidad menor de 80% en aminoácidos para ser considerado una nueva especie de vitivirus, y dado que es así, se confirmó este resultado construyendo un árbol filogenético para ambas proteínas (Figura 12a y b). Por ello, se propuso denominar a este virus putativo como Arracacha latent virus V (ALVV).

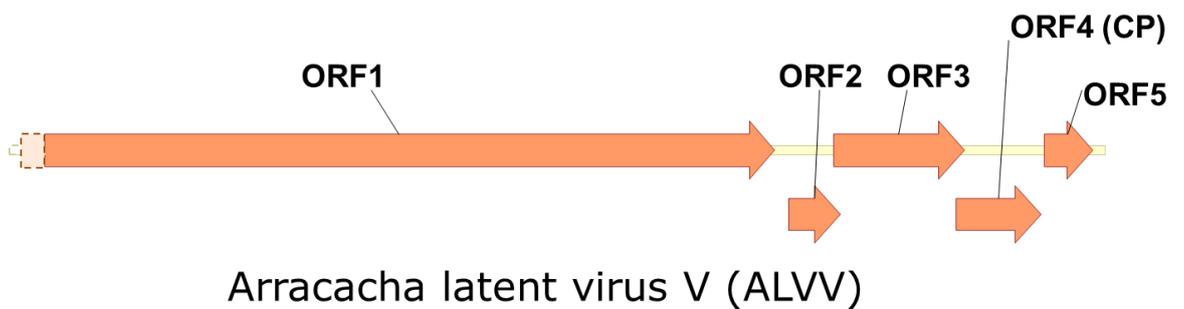


Figura 11: Secuenciamiento del ARN asociado a vitivirus encontrado en arracacha por secuenciación profunda. Las regiones rodeadas por líneas continuas indican que fueron secuenciadas por RT-PCR usando cebadores diseñados a partir de las secuencias obtenidas por la tecnología de *next generation sequencing*, mientras que la zona sombreada más clara con líneas discontinuas representa regiones no secuenciadas estimadas según virus relacionados.

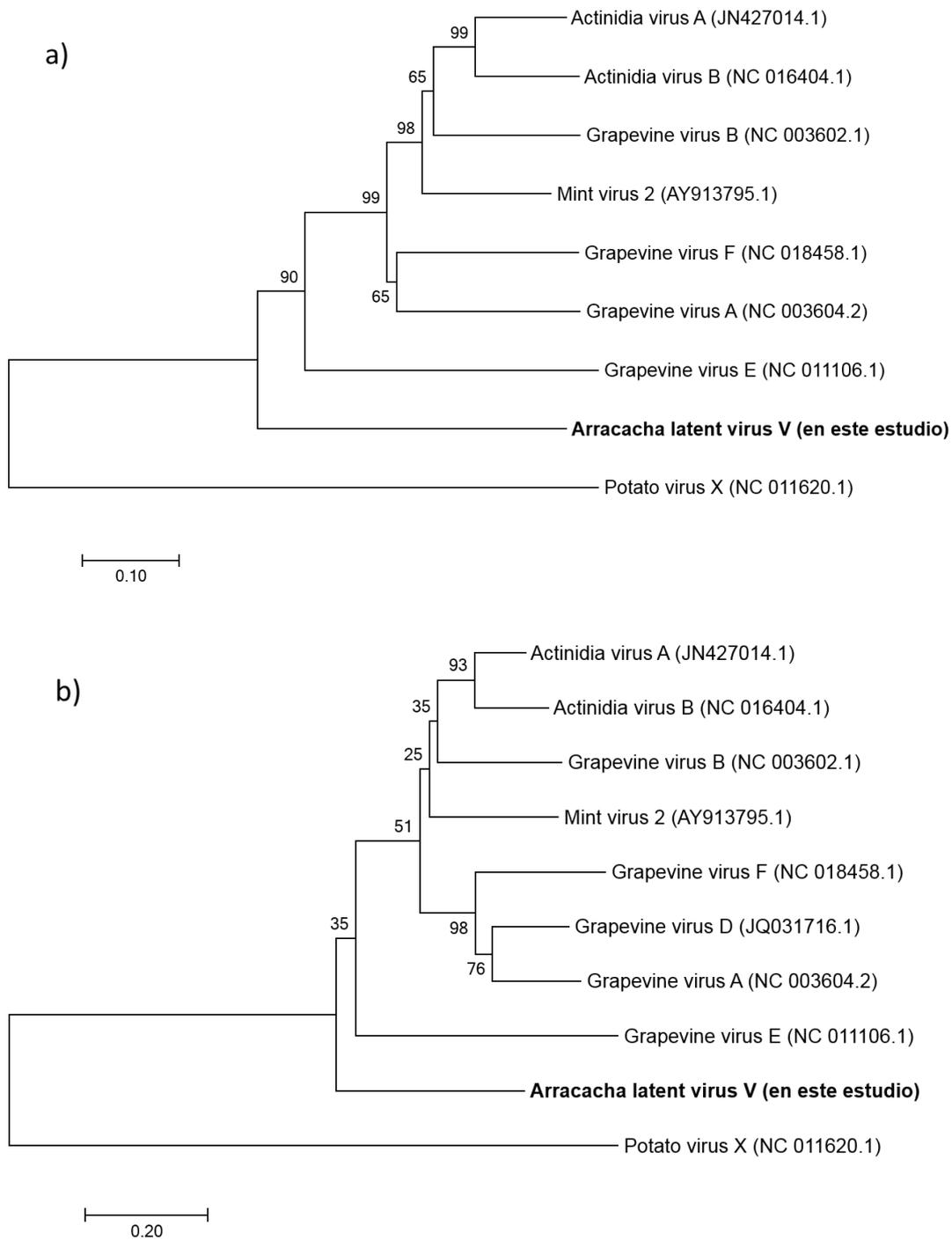


Figura 12: Árbol filogenético realizado con algunos miembros del género *Vitivirus* basado en el análisis de secuencias aminoacídicas correspondiente a (a) RdRp y a (b) la cubierta proteica (CP). Los números indican valores porcentuales de soporte *bootstrap* obtenidos con 1000 repeticiones. Las barras horizontales representan el porcentaje estimado de divergencia de las secuencias. Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos del GenBank (NCBI, National Center of Biotechnology Information). Las secuencias de *Potato virus X* (género *Potexvirus*) se utilizaron como *outgroup*.

Tabla 12: Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región RdRp entre algunos miembros del género *Vitivirus*. ALVV (*Arracacha latent virus V*), AcVA (*Actinidia virus A*), AcVB (*Actinidia virus B*), GVA (*Grapevine virus A*), GVB (*Grapevine virus B*), GVE (*Grapevine virus E*), GVF (*Grapevine virus F*), MV-2 (*Mint virus 2*)

Virus	ALVV	AcVA	AcVB	GVA	GVB	GVE	GVF	MV-2
ALVV								
AcVA	36%							
AcVB	35%	65%						
GVA	35%	46%	46%					
GVB	35%	54%	55%	47%				
GVE	27%	31%	31%	29%	31%			
GVF	34%	45%	46%	48%	46%	29%		
MV-2	15%	21%	21%	19%	20%	15%	19%	

Tabla 13: Porcentaje de identidad de aminoácidos deducido de la región CP entre algunos miembros del género *Vitivirus*. ALVV (*Arracacha latent virus V*), AcVA (*Actinidia virus A*), AcVB (*Actinidia virus B*), GVA (*Grapevine virus A*), GVB (*Grapevine virus B*), GVD (*Grapevine virus D*), GVE (*Grapevine virus E*), GVF (*Grapevine virus F*), MV-2 (*Mint virus 2*)

Virus	ALVV	AcVA	AcVB	GVA	GVB	GVD	GVE	GVF	MV-2
ALVV									
AcVA	47%								
AcVB	45%	75%							
GVA	44%	58%	54%						
GVB	46%	67%	60%	55%					
GVD	43%	53%	50%	62%	51%				
GVE	41%	39%	36%	42%	38%	40%			
GVF	40%	55%	56%	61%	54%	57%	38%		
MV-2	41%	60%	56%	54%	58%	47%	34%	50%	

Se pudo secuenciar parcialmente el genoma de un vitivirus putativo obtenido de una planta de arracacha con CIP-number 204068. Al comparar la secuencia obtenida con las secuencias de genomas de vitivirus que se pueden encontrar en el NCBI, faltarían alrededor

de 230 nts iniciales en el 5'UTR (según una comparación realizada con el GVB). Al igual que los vitivirus reportados, este vitivirus putativo tendría 5 ORFs. El ORF1 codificaría para una replicasa, el ORF2 codificaría una proteína hipotética, el ORF3 para la proteína de movimiento, el ORF4 para la cubierta proteica y el ORF5 para una proteína de unión al ácido nucleico (ARN) (Figura 12).

El secuenciamiento de este vitivirus putativo, se logró obtener casi la totalidad del genoma, faltando el extremo 5'-UTR, así como una pequeña parte del ORF1 cercano a esa región. Los virus de este género generalmente afectan plantas leñosas (como plantas de vid y del género *Actinidia*) y sólo la menta está reportada como la única planta herbácea que puede ser infectada por virus de este género de forma natural (Tzanetakis *et al.* 2007), a la cual se sumaría la arracacha. La transmisión mecánica de este virus fue negativa. Se ha reportado que los virus dentro del género *Vitivirus* son de difícil transmisión mecánica (Adams *et al.* 2012a). De la misma forma que para el crinivirus, se realizaron pruebas de transmisión utilizando insectos vectores. Según Adams *et al.* (2012a), los vectores de los vitivirus son cochinillas para las plantas leñosas y áfidos para plantas herbáceas, por lo que se hizo la prueba utilizando *Myzus persicae* con resultados negativos. Posiblemente los insectos vectores utilizados en las pruebas de transmisión del crinivirus y vitivirus no son sus vectores o, si lo fueran, pueden ser poco eficientes; por lo que se requiere un mayor número de plantas en las inoculaciones.

Se intentó aislar tanto a los virus putativos ALVC y ALVV mediante una transmisión injertos, a *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *Datura stramonium* y *Physalis floridana*, pero debido a una incompatibilidad morfológica (el tallo de arracacha es hueco) no pudo ser posible, ni tampoco utilizando peciolo ni hojas como púas. Sin embargo, el hecho de haber obtenido gran parte del genoma y observar que su organización es idéntica a la de otros virus reportados, sería una evidencia de la posibilidad de ser nuevas especies virales que infectan arracacha, como ya fue comentado previamente con otros virus (Massart *et al.* 2017).

#### 4.4. EVALUACIÓN DE INCIDENCIA EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE ARRACACHA DEL CIP

Se encontró una alta incidencia (25%) de las secuencias de crinivirus, pero ninguna secuencia del vitivirus en las arracachas de banco de germoplasma del CIP (Figura 13) en las pruebas de RT-PCR.

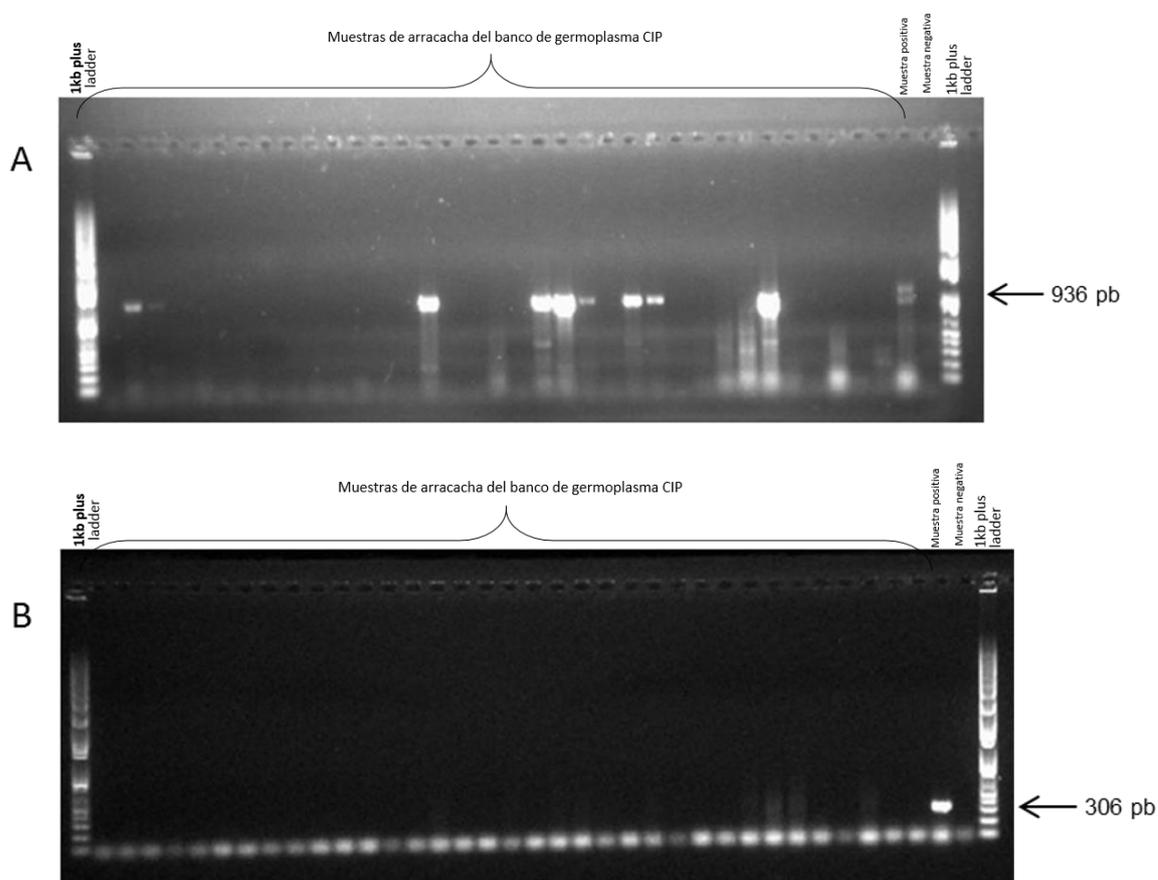


Figura 13: Corrida electroforética de geles de agarosa de los RT-PCR realizados a las muestras de arracacha del banco de germoplasma del CIP, donde se evaluaron para secuencias asociadas a crinivirus (A) y vitivirus (B). Las flechas indican el tamaño del producto amplificado esperado. Se utilizó como marcador 1kb plus (Promega).

#### 4.5. PRUEBAS DE DETECCIÓN DE LAS SECUENCIAS ASOCIADAS A VIRUS EN PAPA

Se evaluaron plantas de papas provenientes de Cundinamarca (Bogotá – Colombia) (papa del grupo Phureja) y Perú (de Huánuco y Cajamarca).

Se encontraron muestras positivas con los cebadores evaluados para las secuencias de crinivirus y vitivirus en las muestras colombianas (Figura 14 y 15). Las secuencias de crinivirus colombianas formaron un grupo diferente a las secuencias de crinivirus de arracacha peruanas (Figura 16); sucediendo lo contrario con las muestras amplificadas con los cebadores para vitivirus, ya que todas las secuencias disponibles formaron un solo grupo (Figura 17). De ser virus, se podría decir que existe una variabilidad geográfica en el caso del crinivirus, pero no en el caso del vitivirus.

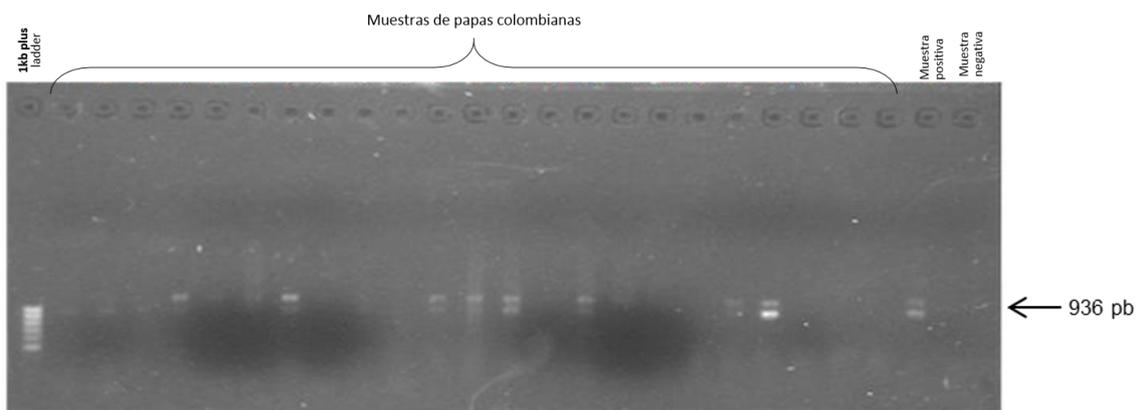


Figura 14: Corrida electroforética de geles de agarosa de los RT-PCR realizados a muestras de papas colombianas para secuencias asociadas a crinivirus. Las flechas indican el tamaño del producto amplificado esperado.

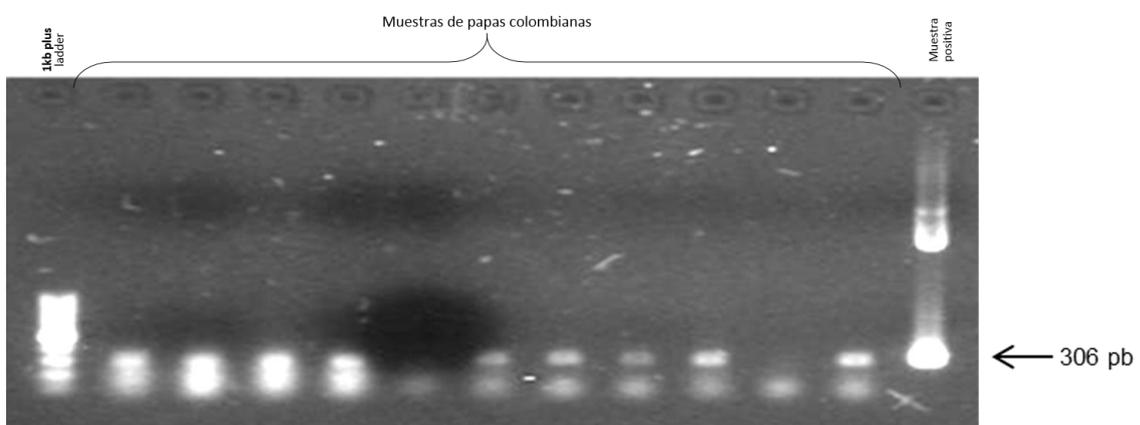


Figura 15: Corrida electroforética de geles de agarosa de los RT-PCR realizados a muestras de papa colombianas para secuencias asociadas a vitivirus. Las flechas indican el tamaño del producto amplificado esperado. Se utilizó como marcador 1kb plus (Promega).

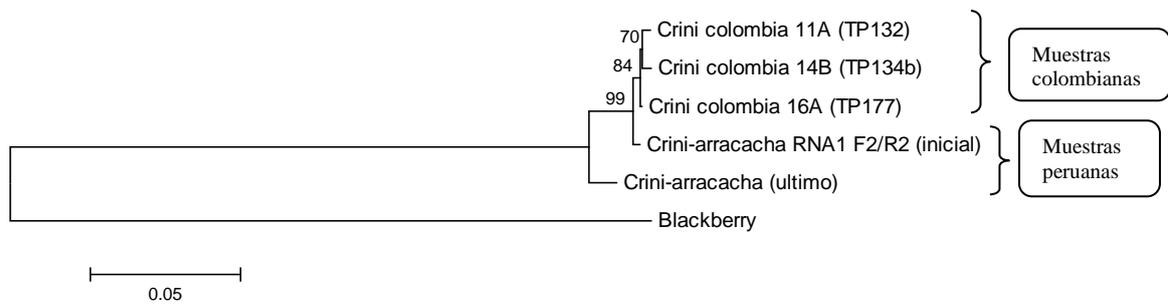


Figura 16: Árbol filogenético de la región de la polimerasa de secuencias asociadas a crinivirus mostrando la relación geográfica entre muestras colombianas (papa) y peruanas (arracacha)

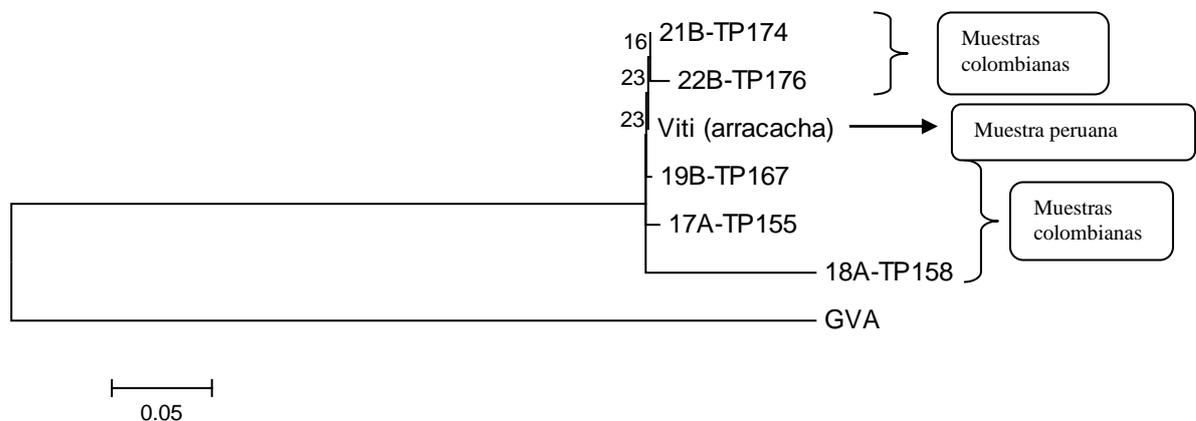


Figura 17: Árbol filogenético de la región de la cubierta proteica de secuencias asociadas a vitivirus mostrando la relación geográfica entre muestras colombianas (papa) y peruanas (arracacha)

En lo relacionado a las muestras peruanas evaluadas, no se detectó ninguna secuencia en las muestras provenientes de Huánuco, mientras en las provenientes de Cajamarca se encontraron 3 muestras positivas para las secuencias de crinivirus (Figura 18) y 2 positivas para las secuencias de vitivirus (Figura 19).

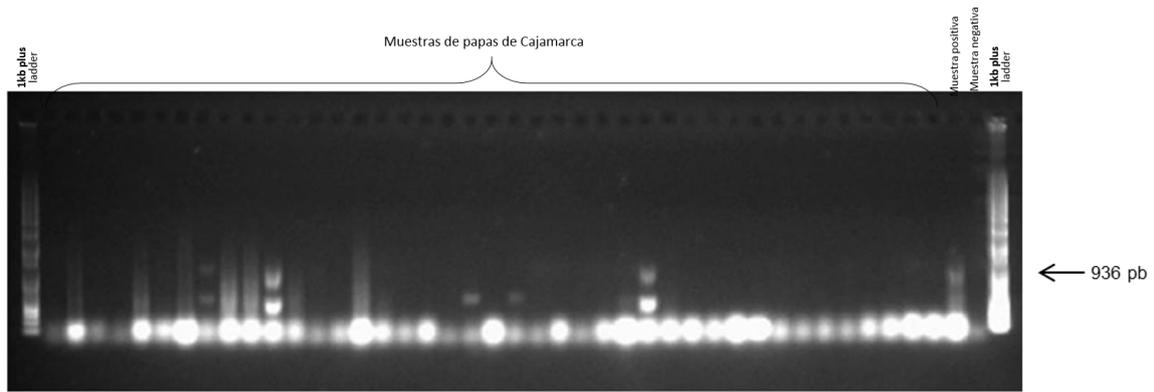


Figura 18: Corrida electroforética de geles de agarosa de los RT-PCR realizados a muestras de papas provenientes de Cajamarca para secuencias asociadas a crinivirus. Las flechas indican el tamaño del producto amplificado esperado. Se utilizó como marcador 1kb plus (Promega).

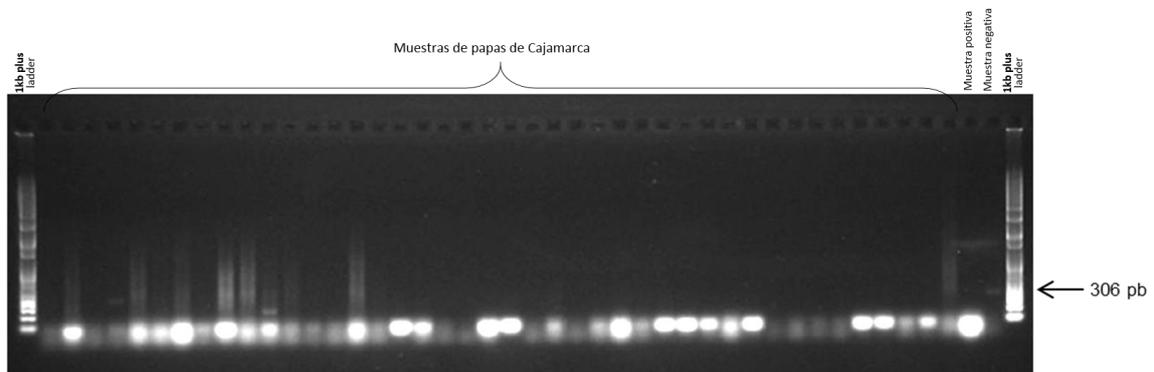


Figura 19: Corrida electroforética de geles de agarosa de los RT-PCR realizados a muestras de papas provenientes de Cajamarca para secuencias asociadas a vitivirus. Las flechas indican el tamaño del producto amplificado esperado. Se utilizó como marcador 1kb plus (Promega). El último pocillo es la muestra blanca.

Este diagnóstico de las papas del grupo Phureja colombianas y del grupo Tuberosum peruanas para los crinivirus y vitivirus putativos detectados en arracacha, se realizó debido a reportes previos que afirman que virus de raíces y tubérculos andinos son capaces de infectar papa y viceversa (Lizárraga *et al.* 1996a, 1996b, 1999). Fue interesante detectar, mediante RT-PCR, a estos 2 virus en las muestras de papa evaluadas, lo que indicaría que estos virus pueden “saltar” de una especie vegetal a otra, en presencia de vectores de estos virus en las zonas donde estos 2 cultivos se siembren cercanos el uno del otro. Si bien, la incidencia de estos virus es baja, de existir el vector en las zonas de cultivo, y debido a que no es posible su detección por plantas indicadoras o por ELISA, estos virus pueden escapar

de la detección convencional/rutinaria llevando en un futuro a la degeneración de semilla en un escenario de cambio climático.

#### **4.6. PRUEBA DE TRANSMISIÓN CON INSECTOS VECTORES**

Las pruebas de transmisión en las arracachas con secuencias de ARN asociadas a vitivirus y crinivirus, fueron negativas. Es decir, de tratarse de un virus, los insectos utilizados (*Myzus persicae*, *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*) no serían sus vectores o podrían ser vectores poco eficientes, por lo que se necesitaría un mayor número de repeticiones en pruebas posteriores. Por otro lado, se recomienda continuar con los estudios de estas secuencias para confirmar su estado infeccioso; para esto se requiere completar los supuestos genomas y hacer una construcción de clones infecciosos e inocularlo en plantas indicadoras para evaluar sintomatología y poder posteriormente aislar el virus y lograr conocer su morfología por microscopía electrónica.

## V. CONCLUSIONES

1. PBRSV es un nepovirus capaz de infectar tanto arracacha como papa, siendo TRSV-Ca la misma especie viral pero diferente de TRSV NC-38. El virus denominado AP1 es una variante de AMoV, el cual pertenece al género *Potyvirus*. Además, se detectó por primera vez la presencia de secuencias con identidad a virus de los géneros *Crinivirus* y *Vitivirus* en plantas de arracacha.
2. Tanto los crinivirus como vitivirus putativos de arracacha se detectaron también en papa.
3. Debido a que la organización genómica de los virus putativos encontrados por *next generation sequencing* fue similar a los grupos taxonómicos relacionados, probablemente se traten de verdaderos virus infecciosos.
4. Los cebadores diseñados serán útiles en la detección de los virus en estudio. Con ellos, se encontró variabilidad entre aislamientos; así como se mostró que la incidencia del crinivirus putativo es mayor que la del vitivirus putativo en el banco de germoplasma in-vitro de arracacha del CIP.
5. Este trabajo es de particular importancia para el diagnóstico cuando se realice intercambio de germoplasma y para la obtención de material libre de virus, tanto de arracacha como de papa, por ser posibles virus que pueden estar presentes en ambos cultivos.

## VI. RECOMENDACIONES

Al final de la realización de esta tesis, es interesante recomendar las siguientes actividades a realizar en un futuro.

- Completar el secuenciamiento del crinivirus y del vitivirus.
- Utilizar la RT-PCR como un método de diagnóstico rápido como ensayo de detección en las regulaciones cuarentenarias para prevenir la propagación de estos virus, debido a que no se posee actualmente anticuerpos para el AP-1, crinivirus y vitivirus de arracacha.
- Fortalecer la limpieza de virus en plantas de arracacha *in vitro* con el fin de obtener plantas sanas para ensayos biológicos.
- Seguir con la búsqueda del agente vector de tanto del crinivirus como del vitivirus putativo.
- Realizar pruebas de patogenicidad utilizando clones infecciosos para evaluar la infección de tanto el crinivirus como el vitivirus.
- Producir anticuerpos monoclonales para la detección serológica de crinivirus y vitivirus e intentar reducir los costos para el diagnóstico de estos virus.
- Seguir tamizando muestras de papa contra los virus de este estudio para continuar con la evaluación de la infección de dichos virus en papa.
- Realizar experimentos de pérdida de producción ocasionada por estos virus.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M.J.; Antoniw, J.F.; Beaudoin, F. 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Molecular Plant Pathology*, 6: 471–487.

Adams, I.; Glover, R.; Monger, W.; Mumford, R.; Jackeviciene, E.; Navalinskiene, M.; Samuitiene, M.; Boonham, N. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10: 537–545.

Adams M.J.; Candresse T.; Hammond J.; Kreuze J.F.; Martelli G.P.; Namba S.; Pearson M.N.; Ryu K.H.; Saldarelli P. y Yoshikawa N. 2012a. Family Betaflexiviridae. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 920–941.

Adams, M. J.; King, A. M.; Lefkowitz, E. y Carstens, E. B. 2012b. Family Potyviridae. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 1069–1090.

Adams, I. P.; Rai, S.; Deka, M.; Harju, V.; Hodges, T.; Hayward, G.; Skelton, A.; Fox, A.; Boonham, N. 2014. Genome sequence of vanilla distortion mosaic virus infecting *Coriandrum sativum*. *Archives of virology*, 159(12): 3463-3465.

Al Rwahnih, M.; Daubert, S.; Golino, D.; Rowhani, A. 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, 387: 395–401.

Ames de Icochea. 1997. Enfermedades Fungosas y Bacterianas de Raíces y tubérculos andinos. Centro Internacional de la Papa. Lima – Perú.

Banér, J.; Nilsson, M.; Mendel-Hartvig, M.; Landegren, U. 1998. Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic Acids Research*, 22: 5073–5078.

Bar-Joseph, M.; Murant, A.F. 1982. Closterovirus group. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No. 260.

Bercks, R. 1967. Methodische Untersuchungen über den serologischen Nachweis pflanzlicher pathogener Viren mit dem Bentonit-Flockungstest, dem Latex-Test und dem Bariumsulfat-test. *Phytopath. Z.* 58, 1–17.

Blas, R. 2005. Diversity of *Arracacia* species in Peru. Ph.D. thesis. Gembloux Agricultural University, Belgium, 154 p.

Blas, R.; Ghislain, M.; Herrera, M.R.; Baudoin, J.P. 2008a. Genetic diversity analysis of wild *Arracacia* species according to morphological and molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(5): 625-642.

Blas, R.; Hermann, M.; Baudoin, J.P. 2008b. Analysis of the geographic distribution and relationships among Peruvian wild species of *Arracacha*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(5): 643-655.

Bonilla-Rosso, G.; Souza, V.; Eguiartea, L. E. 2008. Metagenómica, genómica y ecología molecular: La nueva ecología en el bicentenario de Darwin. *Revista especializada de Ciencias Químico-Biológicas*, 11(1): 41-51.

Boonham, N.; Pérez, L.G.; Mendez, M.S.; Peralta, E.L.; Blockley, A.; Walsh, K.; Barker, I.; Murford, R. A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, 116: 139–146.

Boonham, N., Laurensen, L., Weekes, R., Mumford, R., 2009. Direct detection of plant viruses in potato tubers using real-time PCR. In: Burns, R. (Ed.), *Methods in Molecular*

Biology No. 508: Plant Pathology: Techniques and Protocols. Humana Press, New York, USA, pp. 249–258.

Boonham, N.; Kreuze, J.; Winter, S.; van der Vlugt, R.; Bergervoet, J.; Tomlinson, J.; Mumford, R. 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing, *Virus Research* 186: 20–31.

Brunt, A.A.; Crabtree, K.; Dallwitz, M.J.; Gibbs, A.J.; Watson, L. 1996. *Viruses of plants*. CAB International, University Press, Cambridge, Great Britain. 1484 p.

Bukasov, S.M. 1930. *Las plantas cultivadas de México, Guatemala y Colombia*. Leningrado, Rusia. Traducido de la versión inglesa de M.H. Byleved por Jorge León (1985) CATIE Unidad de Recursos Genéticos. Turrialba, Costa Rica. Pp 168.

Cabaleiro, C.; Segura A. 2006. Temporal analysis of Grapevine leafroll associated virus 3 epidemics. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 441–446

Cabaleiro, C.; Couceiro, C.; Pereira, S.; Cid, M.; Barrasa, M.; Segura, A. 2008. Spatial analysis of epidemics of Grapevine leafroll associated virus-3. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 121–130

Carrier, K.; Xiang, Y.; Sanfaçon, H. 2001. Genomic organization of RNA2 of Tomato ringspot virus: processing at a third cleavage site in the N-terminal region of the polyprotein in vitro. *Journal of General Virology*, 82: 1785–1790.

Chung, B.; Miller, W.; Atkins, J.; Firth, A. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 5897–5902.

Clark, M.F.; Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 334: 475–83

Coetzee, B.; Freeborough, M.; Maree, H.; Celton, J.; Jasper, D.; Rees, G.; Burger, J. 2010. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400: 157-163.

- Compton, J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 350: 91–92
- Constance, I. 1949. The South American species of *Arracacia* (*Umbellefiferae*) and some related genera. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76 (1): 39-52.
- Dawson, W. O.; Bar-Joseph, M.; Garnsey, S. M.; Moreno, P. 2015. Citrus tristeza virus: making an ally from an enemy. *Annual review of phytopathology*, 53: 137-155.
- Derrick, K.S. 1972. Immuno-specific grids for electron microscopy of plant viruses. *Phytopathology*, 62: 753-754.
- De Souza, J.; Fuentes, S.; Savenkov, S.; Cuellar, W.; Kreuze, J. 2013. The complete nucleotide sequence of sweet potato C6 virus: a carlavirus lacking a cystein rich protein. *Archives of Virology*, 158: 1393–1396.
- EPPO 2004a. Diagnostic protocol for regulated pests. Citrus tristeza virus. *OEPP/EPPO Bulletin*, 34: 239–246.
- EPPO 2004b. Diagnostic protocol for regulated pests. Plum pox potyvirus. *OEPP/EPPO Bulletin*, 34: 155–157.
- EPPO 2005. Diagnostic protocol for regulated pests. Tomato ringspot nepovirus. *OEPP/EPPO Bulletin*, 35: 271–273.
- Franco, S.; Rodriguez, J. 1988. Evaluación del germoplasma de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) en el valle de Cajamarca. En: *Memorias VI Congreso internacional de cultivos andinos*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Quito, Ecuador. Pp 247 – 252.
- Fribourg, C.E. 1977. Andean potato calico strain of tobacco ringspot virus. *Phytopathology*, 67: 174-178.
- Fuentes, S.; Heider, B.; Tasso, R.C.; Romero, E.; Zum Felde, T.; Kreuze, J.F. 2012. Complete genome sequence of a potyvirus infecting yam beans (*Pachyrhizus* spp.) in Peru. *Archives of Virology*, 157: 773–776.

Gaire, F.; Schmitt, C.; Stussi-Garaud, C.; Pinck, L.; Ritzenthaler, C. 1999. Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology*, 264: 25–36.

Gandelman, O.; Jackson, R.; Kiddle, G.; Tisi, L. 2011. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 9108–9124.

García-Andrés, S.; Monci, F.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology*, 350(2): 433-442.

Gibb, K.S.; Padovan, A.C. 1993. Detection of sweet potato feathery mottle in sweet potato grown in Northern Australia using an efficient and simple assay. *International Journal of Pest Management*, 39: 223–228.

Golino, D.A.; Weber, E.; Sim, S.T.; Rowhani, A. 2008. Leafroll disease is spreading rapidly in a Napa Valley vineyard. *California Agriculture*, 62: 156–160.

Gonsalves, D. 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual review of phytopathology*, 36(1): 415-437.

Hagen, C.; Frizzi, A.; Gabriels, S.; Huang, M.; Salati, R.; Gabor, B.; Huang, S. 2012. Accurate and sensitive diagnosis of geminiviruses through enrichment, high-throughput sequencing and automated sequence identification. *Archives of Virology*, 157: 907–915.

Haible, D.; Kober, S.; Jeske, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, 135: 9–16.

Hermann, M. 1992. Raíces y tubérculos andinos: Prioridades de investigación para un recurso alimentario propuesto. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima, Perú. Pp. 20 – 24.

Hermann, M. 1997. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). En: Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Hermann, M. and J. Heller (eds). 21. Institute of Plant

Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italia, pp. 75-172.

Hlatky, A.; Romero, R. 1988. Descripción agronómica del cultivo de zanahoria blanca (*Arracacia esculenta* D.C. syn, *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). En: Memorias VI Congreso Internacional sobre los cultivos Andinos. Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INIAP). Quito, Ecuador, del 30 de mayo al 2 de junio. P. 242 – 246.

Hull, R. 2009. Comparative Plant Virology. Elsevier Academic press.

Isakov, O.; Modai, S.; Shomron, N. 2011. Pathogen detection using short-RNA deep sequencing subtraction and assembly. *Bioinformatics*, 27: 2027–2030.

Jayasinghe, U.; Chuquillanqui, C. 1992. Uso de plantas indicadoras para la detección de virus de papa. Lima: Centro Internacional de la papa.

Jovel, J.; Walker, M.; Sanfaçon, H. 2007. Recovery of *Nicotiana benthamiana* plants from a necrotic response induced by a nepovirus is associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. *Journal of Virology*, 81: 12285–12297.

Jones, R.A.C.; Keten, R.H. 1978. Arracacha virus A, a newly reconized virus infecting arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*, *Umbeliferae*) in the Peruvian Andes. *Annals Apply Biology*, 90: 85-91.

Kaneko, H.; Kawana, T.; Fukushima, E.; Suzutani, T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 10: 499–501.

Karasev, A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 293–324.

Keten, R.H.; Jones, R.A.C. 1979. Arracacha virus B, a second isometric virus infecting arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*, *Umbeliferae*) in the Peruvian Andes. *Annals Apply Biology*, 93: 31-36.

- Klaassen, V.A.; Boeshore, M.L.; Koonin, E.V.; Tian, T.; Falk, B.W. 1995. Genome structure and phylogenetic analysis of lettuce infectious yellows virus, a whitefly-transmitted, bipartite closterovirus. *Virology*, 208: 99–110.
- Klerks, M.M.; Leone, G.O.; Verbeek, M.; van den Heuvel, J.F.; Schoen, C.D. 2001. Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of *Potato leafroll virus* and *Potato virus Y* in potato tubers. *Journal of Virological Methods*, 93: 115–125.
- Kreuze, J.; Perez, A.; Untiveros, M.; Quispe, D.; Fuentes, S.; Barker, I.; Simon, R. 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388: 1–7.
- Kreuze, J.; Koenig, R.; De Souza, J.; Vetten, H.J.; Muller, G.; Flores, B., Ziebell, H.; Cuellar, W. 2013. The complete genome sequences of a Peruvian and a Colombian isolate of Andean potato latent virus and partial sequences of further isolates suggest the existence of two distinct potato-infecting tymovirus species. *Virus Research*, 173: 431–435.
- Kumar, S; Nei, M; Dudley, J; Tamura, K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in BioInformatics*, 9(4): 299-306.
- Le Maguet, J.; Beuve, M.; Herrbach, E.; Lemaire O. 2012. Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. *Phytopathology*, 102(7): 717–723.
- León, J. 1964. Plantas alimenticias andinas. Boletín técnico Nro 6. Instituto interamericano de Ciencias Agrícolas de la Zona Andina. Lima, Perú. Pp. 112.
- Leone, G.; van Schijndel, H.B.; van Genien, B.; Schoen, C.D. 1997. Direct detection of potato leafroll virus in potato tubers by immunocapture and the isothermal nucleic acid amplification method NASBA. *Journal of Virological Methods*, 66: 19–27.

- Li H. 2008. Maq: Mapping and Assembly with Qualities. (<http://maq.sourceforge.net/index.shtml>) website. Version 0.6.3.
- Li, S.C.; Chan, W.C.; Lai, C.H.; Tsai, K.W.; Hsu, C.N.; Jou, Y.S.; Chen, H.C.; Lin, W.C. 2011. UMARS: un-mappable reads solution. BMC Bioinform. 12 Suppl 1: S9.
- Livieratos, I.C.; Eliasco, E.; Muller, G.; Olsthoorn, R.C.L.; Salazar, L.F.; Pleij, C.W.A; Coutts, R.H.A. 2004. Analysis of the RNA of " Potato yellow vein virus: evidence for a tripartite genome and conserved 3' -terminal structures among members of the genus Crinivirus. Journal of General Virology, 85: 2065–2075
- Lizarraga, C. 1997. Progress in the identification of the viruses infecting Andean root and tuber crops. Seminar, International Potato Center, Lima, Peru.
- Lizárraga, C. 2000. Virus en raíces andinas. En: Seminario, J comp. Raíces andinas: manual de capacitación. CIP. Lima.
- Lizárraga, C., Chuquillanqui, C.; Jayasinghe, U. 1994. Una variante del virus del anillo necrótico de la papa (*Potato black ringspot virus*, PBRV) aislado de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). Fitopatología (Lima), 29(2): 144-149.
- Lizárraga, C.; Santa Cruz, M.; Jayasinghe, U. 1996a. Detection of an isolate of Andean Potato Itent virus in Ulluco (*Ullucos tuberosus* Caldas). Plant Disease 80(3): 344.
- Lizárraga, C.; Santa Cruz, M.; Salazar, L. F. 1996b. First report of Potato Leafroll virus in ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). Plant disease 80(3): 344.
- Lizárraga, C.; Santa Cruz, M.; Marca, J.L.; Salazar, L.F. 1999. La importancia de los virus que infectan a *Ullucus tuberosus* Caldas en el Perú. Fitopatología 34(1): 22-28.
- Martelli, G.P.; Agranovsky, A.A.; Bar-Joseph, M.; Boscia, D.; Candresse, T; Coutts, R.H.A.; Dolja, V.V.; Falk, B.W.; Gonsalves, D.; Jelkmann, W.; Karasev, A.V.; Minafra, A.; Namba, S.; Vetten, H.J.; Wisler, G.C.; Yoshikawa, N. 2002. The family Closteroviridae revised. Archives of Virology, 147: 2039–2044.

Martelli, G.; Adams, M.J.; Kreuze, J.F.; Dolja, V.V. 2007. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 73–100.

Martelli, G. P.; Agranovsky, A. A.; Bar-Joseph, M.; Boscia, D.; Candresse, T.; Coutts, R. H. A.; Dolja, V.V.; Hu, J.S.; Jelkmann, W.; Karasev, A.V.; Martin, R.R.; Minafra, A.; Namba, S. y Vetten, H.J. 2012. Family Closteroviridae. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego. Pp.: 987–1001.

Massart, S.; Candresse, T.; Gil, J.; Lacomme, C.; Predajna, L.; Ravnikar, M.; Reynard, J.; Rumbou, A.; Saldarelli, P.; Skoric, D.; Vainio, E.; Valkonen, J.; Vanderschuren, H.; Varveri, C.; Wetzel, T. 2017. A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies. *Frontiers in microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00045

Mazón, N. 1993. Análisis de la variación morfológica e isoenzimática de la colección ecuatoriana de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Tesis Ing. Agr. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Fac. de Ing. Agronómica, Riobamba, Ecuador. Pp 135.

Meza, G. 1995. Variedades nativas de virraca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en Cusco. Centro de Investigaciones en Cultivos Andinos (CICA), Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú, 14p.

Moreno, P.; Ambros, S.; Albiach-Martí, M. R.; Guerri, J.; Pena, L. 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 9(2): 251-268.

Mostacero, J.; Mejía, F. 1993. Taxonomía de fanerógamas peruanas. CONCYTEC. Lima – Perú.

Mukai, H.; Uemori, T.; Takeda, O.; Kobayashi, E.; Yamamoto, J.; Nishiwaki, K.; Enoki, T.; Sagawa, H.; Asada, K. 2007. Highly efficient isothermal DNA amplification system

using three elements of 5'-DNA-RNA-3' chimeric primers, RNaseH and strand-displacing DNA polymerase. *The Journal of Biochemistry*, 142: 273–281.

Mumford, R.A.; Walsh, K.; Barker, I.; Boonham, N. 2000. Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using multiplex real-time fluorescent RT-PCR assay. *Phytopathology* 90, 448–453.

Mumford, R.A.; Boonham, N.; Tomlinson, J.; Barker, I. 2006. Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 1–19.

Naidu, RA; y Hughes J d'A. 2003. Methods for the detection of plant virus diseases. Pp 233–260. En: *Plant Virology in Sub-Saharan Africa* (J.d'A. Hughes, B.O. Odu, eds.). Proceedings of a conference organized by IITA, 4–8 June 2001, Ibadan, Nigeria.

Ng, T.F.F., Duffy, S., Polston, J.E., Bixby, E., Vallad, G.E., Breitbart, M. 2011. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. *Plos One* 6, e19050.

Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28(12): E63.

NRC (National Research Council) 1989. *Lost Crops of the Incas: Little Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide cultivation*. National Academic Press. Washington D.D. pp. 415.

Orilio, A. F.; Dusi, A. N.; Madeira, N. R.; Inoue-Nagata, A. 2009. Characterization of a member of a new Potyvirus species infecting arracacha in Brazil. *Archives of Virology* 154: 181–185.

Orilio, A. F.; Lucinda, N.; Dusi, A. N.; Nagata, T.; Inoue-Nagata, A. 2013. Complete genome sequence of arracacha mottle virus. *Archives of virology*, 158: 291-295.

Paprotka, T.; Boiteux, L. S.; Fonseca, M. E. N.; Resende, R. O.; Jeske, H.; Faria, J. C.; Ribeiro, S. G. 2010. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Research*, 149(2): 224-233.

Petersen C.L.; Charles J.G. 1997. Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. *Plant Pathology*, 46: 509–515.

Piepenburg, O.; Williams, C.H.; Stemple, D.L.; Armes, N.A. 2006. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology*, 4(7): e204.

Richards, R.S.; Adams, I.P.; Kreuze, J.F.; De Souza, J.; Cuellar, W.; Dullemans, A.M.; Van Der Vlugt, R.A.; Glover, R.; Hany, U.; Dickinson, M.; Boonham, N. 2014. The complete genome sequences of two isolates of potato black ringspot virus and their relationship to other isolates and nepoviruses. *Archives of Virology* 159(4): 811–815.

Ritzenthaler, C.; Laporte, C.; Gaire, G.; Dunoyer, P.; Schmitt, C.; Duval, S.; Piéquet, A.; Loudes, A. M.; Rohfritsch, O.; Stussi-Garaud, C.; Pfeiffer, P. 2002. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *Journal of Virology*, 76: 8808–8819.

Roossinck, M.J.; Saha, P.; Wiley, G.B.; Quan, J.; White, J.D.; Lai, H.; Chavarría, F.; Shen, G.; Roe, B.A. 2010. Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Molecular Ecology*, 19: 81–88

Salazar, L.F. 1979. Aplicación de la técnica serológica con conjugados enzimáticos (ELISA) para diagnosticar virus de papa. *Fitopatología* 14:1-9.

Salazar, L.F. 1996. *Potato Viruses and Their Control*. Centro Internacional de la Papa (CIP) pp: 83, 132.

Salazar, L.F., Harrison, B.D. 1977. Two previously undescribed potato viruses from South America. *Nature* 264: 337-338.

Salazar, L.F.; Harrison, B.D. 1978a. Host range and properties of potato black ringspot virus. *Annals of Applied Biology* 90, 375-386

Salazar LF, Harrison B.D. 1978b. The relationship of potato black ringspot to tobacco ringspot and allied viruses. *Annals of Plant Biology* 90: 387-394.

Sambrook, J.; Rusell, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press. Tercera edición USA.

Sanfaçon, H.; Iwanami, T.; Karasev, A.V.; van der Vlugt, R.; Wellink, J.; Wetzel, T. y Yoshikawa, N. 2012. Family Secoviridae. In *Virus Taxonomy – Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J.(eds.). Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA; pp. 881–899.

Sanfaçon, H. 2008. Nepovirus. En: B.W.J. Mahy y M.H. Van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of Virology* (pp. 405–413) (3rd edn.). Oxford: Elsevier.

Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74(12): 5463–5467.

Santa Cruz, M. 1994. Aislamiento y caracterización parcial de un potyvirus de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Tesis para optar el título de Licenciado en Biología, Microbiología y Parasitología. Univ. Nac. Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú. 109 p.

Sanz, A. I.; Fraile, A.; García-Arenal, F.; Zhou, X.; Robinson, D. J.; Khalid, S.; Butt, T.; Harrison, B. D. 2000. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology*, 81(7), 1839-1849.

Seminario, J.C. 1995. La investigación sobre arracacha en Cajamarca 1967-1994. Universidad Nacional de Cajamarca. Mimeograph, 16 p.

Seo, E. Y.; Lim, S.; Hammond, J.; Moon, J. S.; Lim, H. S. 2016. Complete genome sequence of a novel potyvirus, *Callistephus mottle virus*, identified in *Callistephus chinensis*. *Archives of virology*, 161(11): 3281-3283.

Silvestre, R.; Fuentes, S.; Risco, R.; Berrocal, A.; Adams, I.; Fox, A.; Cuellar, W.; Kreuze, J. 2020. Characterization of distinct strains of an aphid-transmitted ilarvirus (Fam. Bromoviridae) infecting different hosts from South America. *Virus research*, 282, 197-944.

Smith, LM; Sanders, JZ; Kaiser, RJ; Hughes, P; Dodd, C; Connell, CR; Heiner, C.; Kent, S.B.H.; Hood, L.E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321 (6071): 674-679.

Srinivasan, R., Hall, D. G., Cervantes, F. A., Alvarez, J. M., Whitworth, J. L. 2012. Strain specificity and simultaneous transmission of closely related strains of a Potyvirus by *Myzus persicae*. *Journal of economic entomology*, 105(3), 783-791.

Steel, E.; Barker, I.; Danks, C.; Coates, D.; Boonham, N. 2010. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transient expression as a tool for antigen production for *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Journal of Virological Methods*, 163: 222–228.

Stouffer, R.F.; Ross, A.F. 1961. Effect of infection by potato virus Y on the concentration of potato virus X in tobacco plants. *Phytopathology* 51: 740-744.

Tapia, M. E.; Fries, A. M. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. FAO y ANPE-PERU. Lima.

Tomlinson, J.A.; Barker, I.; Boonham, N. 2007. Faster, simpler, more-specific methods for improved molecular detection of *Phytophthora ramorum* in the field. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4040–4047

Torrance, L.; Jones, R.A.C. 1981. Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses. *Plant Pathology* 30: 1–24.

Tsai, C.-W.; Chau, J.; Fernandez, L.; Bosco, D.; Daane, K.M.; Almeida, R.P.P. 2008. Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the vine mealybug (*Planococcus ficus*). *Phytopathology*, 98, 1093–1098.

- Tzanetakis I.E.; Postman J.D.; Martin, R.R. 2007. Identification, detection and transmission of a new vitivirus from *Mentha*. *Archives of Virology*, 152:2027–2033
- Untiveros, M.; Fuentes, S.; Salazar, L.F. 2007. Synergistic interaction of sweet potato chlorotic stunt virus (Crinivirus) with carla-, cucumo-, ipomo-, and potyviruses infecting sweet potato. *Phytopathology*, 91: 669-676.
- Vietmeyer, N. 1984. Los cultivos olvidados de los Incas. En: revista CERES, FAO 3(17): 37-40.
- Vincent, M.; Xu, Y.; Kong, H. 2004. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Reports*, 5: 795–800.
- Vodovar, N.; Goic, B.; Blanc, H.; Saleh, M.C. 2011. In silico reconstruction of viral genomes from small RNAs improves virus-derived small interfering RNA profiling. *Journal of Virology*, 85: 11016–11021.
- Vunsh, R.; Rosner, A.; Stein, A. 1990. The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of Bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Annals of Applied Biology*, 117: 561–569.
- Waterhouse, P.M.; Wang, M.B.; Lough, T. 2001. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature*, 411: 834–842.
- Wu, Q.; Wang, Y.; Cao, M.; Pantaleo, V.; Burgyan, J.; Li, W.-X.; Ding, S.-W. 2012. Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 3938–3943.
- Wylie, S.J.; Jones, M.G.K. 2011. The complete genome sequence of a Passion fruit woodiness virus isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. *Archives of Virology*, 156: 479–482.
- Wylie, S. J.; Jones, M. G. 2012. Complete genome sequences of seven carlavirus and potyvirus isolates from *Narcissus* and *Hippeastrum* plants in Australia, and proposals to clarify their naming. *Archives of virology*, 157(8): 1471-1480.

Wylie, S.J., Luo, H., Li, H., Jones, M.G.K. 2012a. Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. *Archives of Virology*, 157: 271–284.

Wylie, S.J.; Tan, A.J.Y.; Li, H.; Dixon, K.W.; Jones, M.G.K. 2012b. *Caladenia virus A*, an unusual new member of the family *Potyviridae* from terrestrial orchids in Western Australia. *Archives of Virology*, 157: 2447–2452.

Wylie, S.J., Li, H., Dixon, K.W., Richards, H., Jones, M.G.K. 2013. Exotic and indigenous viruses infect wild populations and captive collections of temperate terrestrial orchids (*Diuris* species) in Australia. *Virus Research*, 171: 22–32.

Zhang, S.C.; Zhang, G.; Yang, L.; Chisholm, J.; Sanfaçon, H. 2005. Evidence that insertion of tomato ringspot nepovirus NTB-VPg protein in endoplasmic reticulum membranes is directed by two domains: A C-terminal transmembrane helix and an N-terminal amphipathic helix. *Journal of Virology*, 79: 11752–11765.

Zheng, Y.; Gao, S.; Padmanabhan, C.; Li, R.; Galvez, M.; Gutierrez, D.; Fuentes, S.; Ling, K.; Kreuze, J.; Fei, Z. 2017. VirusDetect: An automated pipeline for efficient virus discovery using deep sequencing of small RNAs. *Virology*, 500: 130-138.

Zerbino, D., Birney, E. 2008. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18: 821 – 829.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Reactivos para electroforesis

#### Tampón TAE (50X)

A 600 ml de agua mili-Q, añadir:

Tris-base (Sigma) .....	242 gr
Acido acético glacial (MERCK)..	57.1 ml
EDTA 0.5M pH 8 .....	100.0 ml

Enrasar a 1 litro.

#### SALB 10X:

Para un volumen final de 100 ml, agregar:

Azul de bromofenol (Sigma)....	150 mg
Xilen cianol (BIO-RAD) .....	150 mg
Naranja-G (MERCK) .....	200 mg
TAE 1X .....	5ml
Sucrosa .....	60 gr

## **ANEXO 2: Protocolo de Ligación**

1. Centrifugar el tubo eppendorff con el vector a usar (pGEM-T easy o pUC19) para colectar todo el contenido al fondo del tubo.

2. Agregar los reactivos de la siguiente manera:

Realizar un vortex al tampón 2X de ligación rápida, del kit de la pGEM-T, antes cada uso.

Tampón 2X de ligación rápida.... 5 µl

Vector pGEM-T easy (25ng) ..... 1 µl

Producto PCR ..... X\* µl

Ligasa T4 DNA ..... 1 µl

Agregar agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 10 µl

3. Mezclar la reacción por pipeteo. Incubar la reacción toda la noche a 4° C.

\* Para calcular la cantidad apropiada del producto de PCR (inserto) a incluir en la reacción de ligación, se usa la siguiente reacción.

$$\frac{\eta g \text{ de vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times \text{ratio molar inserto:vector} = \eta g \text{ de inserto}$$

Ratio de 3:1 provee buen parámetro inicial. Sin embargo, ratio de 8:1 ha sido usada exitosamente.

### **ANEXO 3: Protocolo de transformación de bacterias quimiocompetentes**

1. Añadir 50 ng de la ligación por 100 ul de células quimiocompetentes, mover el tubo suavemente para una mejor mezcla (no pipetear). Dejar los tubos eppendorff con las bacterias en hielo de 20 a 30 minutos.
2. Realizar un shock térmico a las bacterias, transfiriendo los tubos eppendorff a un baño María a 42° C por 90 segundos.
3. Rápidamente transferir los tubos a hielo y permanecer las células ahí por 1 ó 2 minutos.
4. Agregar 700 ul de medio LB a cada eppendorff con bacterias. Colocar dichas bacterias en un baño María a 37° C con agitación por una hora.
5. Agregar el volumen adecuado (100 ó 200 ul) de bacterias quimiocompetentes transformadas en una placa con medio LB agar con el antibiótico apropiado.
6. Invertir las placas e incubarlas a 37° C. Las colonias transformantes deberían aparecer en 12 ó 16 horas.

#### **ANEXO 4: Preparación de *E. coli* quimicompetentes**

##### Preparación de células:

1. Preparar tampón Inoue de transformación (se debe de colocar a 0° C antes de su uso).

Para mejores resultados, es preparar este tampón con agua obtenida directamente del servicio de filtración Mili-Q.

a. Preparar 0.5M de PIPES (pH 6.7) (piperazina-1,2-bis[ácido 2-etanosulfónico]) disolviendo 15.1 g de PIPES en 80 ml de agua Mili-Q. Ajustar el pH de la solución a 6.7 con KOH 5M y luego añadir agua Mili-Q hasta obtener un volumen final de 100ml. La solución se esterilizará por filtración.

El PIPES se irá diluyendo mejor a medida que va llegando al pH arriba indicado.

b. Preparar el tampón Inoue de transformación disolviendo todos los solutos indicados abajo en 800 ml de agua Mili-Q y luego añadir 20 ml de PIPES 0.5M (pH 6.7). Ajustar el volumen del tampón a un litro.

Reactivo	Cantidad por litro	Concentración final
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	10.88 g	55 mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.20 g	15 mM
KCl	18.65 g	250 mM
PIPES (0.5M, pH 6.7)	20 ml	10 mM
H <sub>2</sub> O	A 1 litro	

c. El tampón Inoue de transformación se esterilizará por filtración.

2. Colocar una colonia bacteriana (2-3 mm de diámetro) de una placa que ha sido incubada en medio SOB agar por 16 a 20 horas a 37°C (se puede dejar overnight). Transferir la colonia en 25 ml de medio SOB medio líquido en un matraz Erlenmeyer de 250 ml (esto debe hacerse cercano a las 8am) Incubar el cultivo por 6-8 horas a 37° C con una agitación vigorosa (250-300 rpm).
  
3. Alrededor de las 4 de la tarde, se usará este cultivo inicial para inocular 4 matraces Erlenmeyer de 1 litro, cada uno conteniendo 250 ml de medio SOB. El primer matraz recibirá 10 ml del cultivo inicial, el segundo recibirá 6 ml, el tercero 4 ml y el cuarto 2 ml. Incubar todos los frascos toda la noche a 18-22° C con agitación moderada.
  
4. A la mañana siguiente, leer la densidad óptica a 600 nm de longitud ( $OD_{600}$ ) de los 4 cultivos.
  
5. Cuando el  $OD_{600}$  de uno de los cultivos alcanza 0.45-0.55, colocar el matraz con el cultivo en hielo por 10 minutos. Descartar los que obtengan un  $OD_{600}$  más alto.  
La temperatura en muchos laboratorios incrementa durante el día y disminuye en la noche (el número de grados depende de la estación del año, el número de personas trabajando en el laboratorio en la noche, etc). Debido a esta variabilidad, es difícil predecir la velocidad al cual los cultivos crecerán en cualquier noche. Usando 4 diferentes inóculos, se incrementa las chances que uno de los cultivos será el de densidad correcta después de la incubación por toda la noche.
  
6. Centrifugar las células por 10 minutos a 4000 rpm a 4° C.
  
7. En una cámara de flujo laminar, eliminar el medio y colocar la botella de centrifuga abierta boca abajo en papel toalla por 2 minutos.
  
8. Resuspender las células suavemente en 80 ml de tampón Inoue de inoculación frío. Las células son mejor suspendidas por agitación suave que por pipeteo o vortex.

9. Centrifugar las células por 10 minutos a 4000 rpm a 4° C.

10. En una cámara de flujo laminar, eliminar el medio y colocar la botella de centrifuga abierta boca abajo en papel toalla por 2 minutos.

#### Congelamiento de células competentes

11. Resuspender las células suavemente en 20 ml de Inoue de inoculación frío.

12. Añadir 1.5 ml de DMSO (7% de concentración final). Mezclar la suspensión bacteriana por agitación suave y luego colocarlo en hielo por 10 minutos.

13. Dispensar rápidamente la solución en alícuotas de 100 µl en eppendorff de 1.5 ml estériles con tips previamente enfriados a -20° C o si se prefiere en nitrógeno líquido justo antes de su uso. Inmediatamente enfriar las células competentes inmergiendo los eppendorff cerrados en nitrógeno líquido y luego dejarlas en hielo hasta acabar de alícuotar. Almacenar los tubos a -70° C una vez terminado.

Enfriar en nitrógeno líquido mejora la eficiencia de la transformación 5 veces.

Para propósitos de clonamiento, son adecuados unas alícuotas de 50 µl de la suspensión de células competentes.

## ANEXO 5: Medios de cultivo

Los medios LB y SOB fueron usados para el crecimiento inicial bacterias.

### Medio LB (Luria-Bertani)

Por litro

A 800 ml de agua Mili-Q, añadir:

Triptona (DIFCO) .....10 g

Extracto de levadura (GIBCO) . 5 g

NaCl (MERCK) .....10 g

Agitar hasta que los solutos estén disueltos. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1M. Ajustar el volumen de la solución a 1 litro con agua Mili-Q. Esterilizar por autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) en ciclo líquido.

### Medio SOB

Por litro

A 800 ml de agua Mili-Q, añadir:

Triptona .....20 g

Extracto de levadura..... 5 g

NaCl ..... 0.5 g

Agitar hasta que los solutos estén disueltos. Añadir 10 ml de KCl 250 mM (esta solución es preparada disolviendo 1.86 g de KCl en 100 ml de agua Mili-Q). Ajustar el pH del medio a 7.0 con NaOH 1M. Agregar 10 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M (esta solución es preparada disolviendo 38 g de MgCl<sub>2</sub> en 90 ml de agua Mili-Q). Ajustar el volumen de la solución a 100 ml con agua Mili-Q y esterilizar autoclavando por 15 minutos a 15 libras de presión (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) en ciclo líquido). Ajustar el

volumen de la solución a 1 litro con agua destilada. Esterilizar por autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) en ciclo líquido.

#### Medio LB o SOB agar

Cada litro de medio LB o SOB líquido se pasará a 5 botellas de 200 ml, agregándose a cada una 3 g de agar-agar. Después se esterilizará en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) en ciclo líquido. Una vez autoclado y enfriado, se debe guardar en un cuarto a 4° C.

Cuando se necesite un frasco, se licuará el medio con agar y cuando esté a la temperatura adecuada se agregará el antibiótico a utilizar de acuerdo al plásmido que se use.